Το κείμενο αυτό αποτελεί απλώς εργαλείο τεκμηρίωσης και δεν έχει καμία νομική ισχύ. Τα θεσμικά όργανα της Ένωσης δεν φέρουν καμία ευθύνη για το περιεχόμενό του. Τα αυθεντικά κείμενα των σχετικών πράξεων, συμπεριλαμβανομένων των προοιμίων τους, είναι εκείνα που δημοσιεύονται στην Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης και είναι διαθέσιμα στο EUR-Lex. Αυτά τα επίσημα κείμενα είναι άμεσα προσβάσιμα μέσω των συνδέσμων που περιέχονται στο παρόν έγγραφο

►**B** **ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 440/2008 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ**

της 30ής Μαΐου 2008

για καθορισμό των μεθόδων δοκιμής κατ' εφαρμογή του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, για την καταχώριση, την αξιολόγηση, την αδειοδότηση και τους περιορισμούς των χημικών προϊόντων (REACH)

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

(ΕΕ L 142 της 31.5.2008, σ. 1)

Τροποποιείται από:

		Επίσημη Εφημερίδα		
		αριθ.	σελίδα	ημερομηνία
►**M1**	Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 761/2009 της Επιτροπής της 23ης Ιουλίου 2009	L 220	1	24.8.2009
►**M2**	Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 1152/2010 της Επιτροπής της 8ης Δεκεμβρίου 2010	L 324	13	9.12.2010
►**M3**	Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 640/2012 της Επιτροπής της 6ης Ιουλίου 2012	L 193	1	20.7.2012
►**M4**	Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 260/2014 της Επιτροπής της 24ης Ιανουαρίου 2014	L 81	1	19.3.2014
►**M5**	Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 900/2014 της Επιτροπής της 15ης Ιουλίου 2014	L 247	1	21.8.2014
►**M6**	Κανονισμός (ΕΕ) 2016/266 της Επιτροπής της 7ης Δεκεμβρίου 2015	L 54	1	1.3.2016
►**M7**	Κανονισμός (ΕΕ) 2017/735 της Επιτροπής της 14ης Φεβρουαρίου 2017	L 112	1	28.4.2017
►**M8**	Κανονισμός (ΕΕ) 2019/1390 της Επιτροπής της 31ης Ιουλίου 2019	L 247	1	26.9.2019

▼B

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 440/2008 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 30ής Μαΐου 2008

για καθορισμό των μεθόδων δοκιμής κατ' εφαρμογή του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, για την καταχώριση, την αξιολόγηση, την αδειοδότηση και τους περιορισμούς των χημικών προϊόντων (REACH)

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

Άρθρο 1

Οι μέθοδοι δοκιμής που εφαρμόζονται για τους σκοπούς του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 παρατίθενται στο παράρτημα του παρόντος κανονισμού.

Άρθρο 2

Η Επιτροπή επανεξετάζει, κατά περίπτωση, τις μεθόδους δοκιμής που περιέχονται στον παρόντα κανονισμό, με σκοπό την αντικατάσταση, τη μείωση και τον εξευγενισμό των δοκιμών σε σπονδυλωτά ζώα.

Άρθρο 3

Κάθε παραπομπή στο παράρτημα V της οδηγίας 67/548/ΕΟΚ νοείται ως παραπομπή στον παρόντα κανονισμό.

Άρθρο 4

Ο παρών κανονισμός αρχίζει να ισχύει την επομένη της δημοσίευσής του στην *Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης*.

Εφαρμόζεται από την 1η Ιουνίου 2008.

▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΜΕΡΟΣ Α: ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ

▼M6

Σημείωση:

Προτού χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε από τις ακόλουθες μεθόδους δοκιμών για τη δοκιμασία μιας πολυσυστατικής ουσίας (MCS), μιας ουσίας άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, ενός προϊόντος πολύπλοκης αντίδρασης ή βιολογικού υλικού (UVCB), ή μείγματος, και αν η εφαρμοσιμότητα της μεθόδου για τη δοκιμασία MCS, UVCB ή μειγμάτων δεν αναφέρεται στην αντίστοιχη μέθοδο δοκιμών, θα πρέπει να εξετάζεται κατά πόσον η μέθοδος ενδείκνυται για τον επιδιωκόμενο κανονιστικό σκοπό.

Αν η μέθοδος δοκιμών χρησιμοποιείται για τη δοκιμασία MCS, UVCB ή μείγματος, θα πρέπει να παρέχονται, στο μέτρο του δυνατού, επαρκείς πληροφορίες σχετικά με τη σύνθεσή του, π.χ. τη χημική ταυτότητα των συστατικών του, την ποσοτική τους εμφάνιση, καθώς και τις σχετικές ιδιότητες των συστατικών.

▼B

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Α.1.	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΤΗΞΕΩΣ/ΠΗΞΕΩΣ
Α.2.	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΖΕΣΕΩΣ
Α.3.	ΣΧΕΤΙΚΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ
Α.4.	ΤΑΣΗ ΑΤΜΩΝ
Α.5.	ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗ ΤΑΣΗ
Α.6.	ΥΔΑΤΟΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ
Α.8.	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ
Α.9.	ΣΗΜΕΙΟ ΑΝΑΦΛΕΞΗΣ
Α.10.	ΑΝΑΦΛΕΞΙΜΟΤΗΤΑ (ΣΤΕΡΕΑ)
Α.11.	ΑΝΑΦΛΕΞΙΜΟΤΗΤΑ (ΑΕΡΙΑ)
Α.12.	ΑΝΑΦΛΕΞΙΜΟΤΗΤΑ (ΣΕ ΕΠΑΦΗ ΜΕ ΝΕΡΟ)
Α.13.	ΠΥΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΣΤΕΡΕΩΝ ΚΑΙ ΥΓΡΩΝ
Α.14.	ΕΚΡΗΚΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ
Α.15.	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΑΥΤΑΝΑΦΛΕΞΗΣ ΓΙΑ ΥΓΡΑ ΚΑΙ ΑΕΡΙΑ
Α.16.	ΣΧΕΤΙΚΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΑΥΤΑΝΑΦΛΕΞΗΣ ΓΙΑ ΣΤΕΡΕΑ
Α.17.	ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ (ΣΤΕΡΕΑ)
Α.18.	ΑΡΙΘΜΗΤΙΚΟ ΜΕΣΟ ΜΟΡΙΑΚΟ ΒΑΡΟΣ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΒΑΡΩΝ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ
Α.19.	ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΣΕ ΚΛΑΣΜΑΤΑ
Α.20.	ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΔΙΑΛΥΣΗΣ/ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΣΕ ΝΕΡΟ
Α.21.	ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ (ΥΓΡΑ)
Α.22.	ΣΤΑΘΜΙΣΜΕΝΟΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΜΗΚΟΣ, ΓΕΩΜΕΤΡΙΚΟΣ ΜΕΣΟΣ ΤΩΝ ΔΙΑΜΕΤΡΩΝ ΤΩΝ ΙΝΩΝ
Α.23.	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ (ΟΚΤΑΝΟΛΗ-1/ΝΕΡΟ): ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΗΣ ΑΡΓΗΣ ΑΝΑΔΕΥΣΗΣ
Α.24.	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ (Ν-ΟΚΤΑΝΟΛΗ/ΝΕΡΟ), ΜΕΘΟΔΟΣ HPLC (ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ)
Α.25.	ΣΤΑΘΕΡΕΣ ΔΙΑΣΤΑΣΗΣ ΣΤΟ ΝΕΡΟ (ΤΙΤΛΟΔΟΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ — ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ — ΑΓΩΓΙΜΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ)

▼B

Α.1. ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΤΗΞΕΩΣ/ΠΗΞΕΩΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Οι περισσότερες από τις περιγραφόμενες μεθόδους βασίζονται στην κατευθυντήρια οδηγία δοκιμών του ΟΟΣΑ (1). Οι βασικές αρχές δίδονται στις παραπομπές (2) και (3).

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι μέθοδοι και τα όργανα που περιγράφονται, εφαρμόζονται για τον προσδιορισμό της θερμοκρασίας τήξεως ουσιών, χωρίς οποιοδήποτε περιορισμό ως προς το βαθμό καθαρότητας τους.

Η επιλογή της μεθόδου εξαρτάται από τη φύση της ουσίας που πρόκειται να εξετασθεί. Κατά συνέπεια, σαν περιοριστικός παράγοντας για την επιλογή θεωρείται το αν η ουσία μπορεί να κονιοποιηθεί εύκολα, δύσκολα ή καθόλου.

Για μερικές ουσίες, είναι προτιμότερος ο προσδιορισμός της θερμοκρασίας πήξεως ή στερεοποίησης και γι' αυτό το λόγο, στη μέθοδο αυτή, περιελήφθησαν και τα πρότυπα για τους προσδιορισμούς αυτούς.

Όταν, λόγω κάποιων συγκεκριμένων ιδιοτήτων της ουσίας, καμία από τις ανωτέρω παραμέτρους δεν μπορεί να μετρηθεί εύκολα, το σημείο ροής μπορεί να είναι κατάλληλο.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Ως θερμοκρασία τήξεως ορίζεται η θερμοκρασία στην οποία λαμβάνει χώρα η μετάβαση από τη στερεά στην θερμοκρασία τήξεως ή πήξεως.

Δεδομένου ότι η μετατροπή φάσης πολλών ουσιών λαμβάνει χώρα σε μία περιοχή θερμοκρασιών, συχνά χαρακτηρίζεται ως περιοχή πήξεως.

Μετατροπή μονάδων (K σε ^{o}C)

$t = T - 273{,}15$

t: θερμοκρασιακή κλίμακα Κελσίου, βαθμός Κελσίου (^{o}C)

T: θερμοδυναμική θερμοκρασία, Κέλβιν (K)

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Δεν είναι απαραίτητο να χρησιμοποιούνται ουσίες αναφοράς σε όλες τις περιπτώσεις κατά τις οποίες διερευνάται μία νέα ουσία. Οι ουσίες αυτές θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κυρίως για να ελέγχεται κατά διαστήματα η μέθοδος που εφαρμόζεται και για να γίνεται δυνατή η σύγκριση με τα αποτελέσματα από άλλες μεθόδους.

Μερικές ουσίες βαθμονόμησης (calibration) αναφέρονται στη βιβλιογραφία (4).

▼B

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Προσδιορίζεται η θερμοκρασία (περιοχή θερμοκρασίας) μετάβασης από τη στερεά στην υγρά κατάσταση ή από την υγρά στη στερεά κατάσταση. Στην πράξη, κατά τη θέρμανση/ψύξη ενός δείγματος της υπό δοκιμή ουσίας υπό ατμοσφαιρική πίεση, προσδιορίζονται οι θερμοκρασίες της αρχής τήξεως/πήξεως και της τελικής φάσης τήξεως/πήξεως. Περιγράφονται πέντε τύποι μεθόδων, συγκεκριμένα η μέθοδος τριχοειδούς, μέθοδοι θερμών επιφανειών, προσδιορισμοί του σημείου πήξεως, οι μέθοδοι θερμικής ανάλυσης και ο προσδιορισμός του σημείου ροής (όπως αναπτύχθηκε για τα πετρελαιοειδή).

Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί αν είναι σκόπιμο να μετρηθεί αντί της θερμοκρασίας τήξεως η θερμοκρασία πήξεως.

1.4.1. **Μέθοδος τριχοειδούς**

1.4.1.1. *Συσκευή θερμοκρασίας τήξεως με υγρό λουτρό*

Μικρή ποσότητα της λεπτά κονιοποιημένης ουσίας φέρεται σε τριχοειδή σωλήνα και συμπιέζεται καλά. Ο σωλήνας θερμαίνεται, μαζί με ένα θερμόμετρο, και η άνοδος της θερμοκρασίας ρυθμίζεται σε λιγότερο από περίπου 1 K/min κατά τη διάρκεια της κυρίως τήξεως. Προσδιορίζονται η αρχική και η τελική θερμοκρασία τήξεως.

1.4.1.2. *Συσκευή θερμοκρασίας τήξεως με μεταλλικό κορμό*

Όπως περιγράφεται στο 1.4.1.1, με τη διαφορά ότι ο τριχοειδής σωλήνας και το θερμόμετρο είναι μέσα σε ένα θερμαινόμενο μεταλλικό κορμό (θάλαμο) και η παρατήρηση γίνεται μέσα από τρύπες πάνω στο θάλαμο.

1.4.1.3. *Ανίχνευση με φωτοκύτταρο*

Το δείγμα στον τριχοειδή σωλήνα θερμαίνεται αυτόματα σ' ένα μεταλλικό κύλινδρο. Μία δέσμη φωτός κατευθύνεται, μέσω της ουσίας, από μια τρύπα στον κύλινδρο, προς ένα, βαθμονομημένο με ακρίβεια, φωτοκύτταρο. Οι οπτικές ιδιότητες των περισσοτέρων ουσιών αλλάζουν από σκιερές σε διαφανείς όταν τήκονται. Η ένταση του φωτός που φθάνει στο φωτοκύτταρο αυξάνει και στέλνει σήμα «stop» στην ψηφιακή ενδεικτική διάταξη που διαβάζει τη θερμοκρασία ενός θερμομέτρου με αντίσταση από λευκόχρυσο, που βρίσκεται στο θάλαμο θέρμανσης. Η μέθοδος αυτή δεν είναι κατάλληλη για μερικές ισχυρά χρωματιστές ουσίες.

1.4.2. **θερμές επιφάνειες**

1.4.2.1. *θερμή ράβδος Kofler*

Η θερμή ράβδος Kofler χρησιμοποιεί δύο τεμάχια μετάλλου με διαφορετική θερμική αγωγιμότητα, που θερμαίνονται ηλεκτρικά, με τη ράβδο κατασκευασμένη κατά τρόπο ώστε η πτώση θερμοκρασίας να είναι σχεδόν γραμμική κατά την κατεύθυνση του μήκους της. Η θερμοκρασία της θερμής ράβδου μπορεί να κυμαίνεται από 2S3 K έως 573 K με ένα ειδικό εξάρτημα ανάγνωσης της θερμοκρασίας, που περιλαμβάνει ένα δρομέα με ένα δείκτη και μία κλίμακα σχεδιασμένη για τη συγκεκριμένη ράβδο. Για τον προσδιορισμό της θερμοκρασίας τήξεως, η ουσία τοποθετείται σε λεπτή στιβάδα απευθείας στην επιφάνεια της θερμής ράβδου. Σε λίγα δευτερόλεπτα σχηματίζεται μία λεπτή διαχωριστική γραμμή μεταξύ της άγρας και της στερεάς φάσης. Διαβάζεται η θερμοκρασία στη διαχωριστική γραμμή με την μετακίνηση του δείκτη πάνω στη γραμμή αυτή.

▼B

1.4.2.2. *Μικροσκόπιο τήξεως*

Για τον προσδιορισμό θερμοκρασιών τήξεως με πολύ μικρές ποσότητες υλικού χρησιμοποιούνται διάφορα μικροσκόπια θερμών επιφανειών. Στις περισσότερες από τις θερμές επιφάνειες η θερμοκρασία μετριέται με ένα ευαίσθητο θερμοστοιχείο, αν και μερικές φορές χρησιμοποιούνται θερμόμετρα υδραργύρου. Ένα τυπικό μικροσκόπιο θερμών επιφανειών για τον προσδιορισμό της θερμοκρασίας τήξεως αποτελείται από ένα θερμαινόμενο θάλαμο, ο οποίος περιέχει μία μεταλλική πλάκα, στην οποία τοποθετείται το δείγμα πάνω σε ειδικό πλακίδιο. Στο κέντρο της μεταλλικής πλάκας υπάρχει μία τρύπα, που επιτρέπει την είσοδο του φωτός από το κάτοπτρο φωτισμού του μικροσκοπίου. Κατά τη χρήση, ο θάλαμος κλείνεται με μία γυάλινη πλάκα, που αποκλείει τον αέρα από το χώρο του δείγματος.

Η θέρμανση του δείγματος ρυθμίζεται με ένα ροοστάτη. Για πολύ ακριβείς μετρήσεις σε οπτικά ανισότροπες ουσίες, μπορεί να χρησιμοποιηθεί πολωμένο φως.

1.4.2.3. *Μέθοδος μηνίσκου*

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ειδικά για πολυαμίδια.

Ο προσδιορισμός της θερμοκρασίας κατά την οποία γίνεται η μετατόπιση μηνίσκου από έλαιο σιλικόνης, που περικλείεται μεταξύ μιας θερμής επιφάνειας και μιας γυάλινης καλυπτρίδας, που στηρίζεται στο εξεταζόμενο δείγμα πολυαμιδίου, γίνεται οπτικά.

1.4.3. **Μέθοδος προσδιορισμού της θερμοκρασίας πήξεως**

Το δείγμα φέρεται σε ειδικό δοκιμαστικό σωλήνα και τοποθετείται σε μία συσκευή προσδιορισμού της θερμοκρασίας πήξεως. Το δείγμα αναδεύεται ελαφρά και συνεχώς κατά τη διάρκεια της ψύξεως και η θερμοκρασία μετράται σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα. Όταν η θερμοκρασία παραμείνει σταθερή κατά τη διάρκεια μερικών αναγνώσεων, αυτή η θερμοκρασία (διορθωμένη για θερμομετρικό σφάλμα) καταγράφεται ως η θερμοκρασία πήξεως.

Πρέπει να αποφεύγεται υπερψύξη με τη διατήρηση ισορροπίας μεταξύ της στερεάς και της υγράς φάσης.

1.4.4. **Θερμική ανάλυση**

1.4.4.1. *Διαφορική θερμική ανάλυση (ΔΘΑ)*

Αυτή η τεχνική καταγράφει τη διαφορά θερμοκρασιών μεταξύ της ουσίας και ενός υλικού αναφοράς ως συνάρτηση της θερμοκρασίας, ενώ η ουσία και το υλικό αναφοράς υποβάλλονται στο ίδιο ελεγχόμενο θερμοκρασιακό πρόγραμμα. Όταν το δείγμα υφίσταται μετατροπή που περιλαμβάνει αλλαγή ενθαλπίας, αυτή η *αλλαγή* καταδεικνύεται από μία ενδοθερμική (τήξη) ή εξωθερμική (πήξη) απόκλιση από τη βασική γραμμή της καταγραφόμενης θερμοκρασίας.

▼B

1.4.4.2. *Θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης (ΘΑΣ)*

Αυτή η τεχνική καταγράφει τη διαφορά ενεργειακών απολαβών μιας ουσίας και ενός υλικού αναφοράς, σαν συνάρτηση της θερμοκρασίας, ενώ η ουσία και το υλικό αναφοράς υποβάλλονται στο ίδιο ελεγχόμενο θερμοκρασιακό πρόγραμμα. Η ενέργεια αυτή είναι αναγκαία για την επίτευξη μηδενικής θερμοκρασιακής διαφοράς μεταξύ της ουσίας και του υλικού αναφοράς. Όταν το δείγμα υφίσταται μετατροπή που περιλαμβάνει αλλαγή ενθαλπίας, η αλλαγή αυτή καταδεικνύεται από μία ενδοθερμική (τήξη) ή εξωθερμική (πήξη) απόκλιση από τη βασική γραμμή της καταγραφόμενης ροής θερμότητας.

1.4.5. **Σημείο ροής**

Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε για να χρησιμοποιηθεί σε πετρελαιοειδή και είναι κατάλληλη για ελαιώδεις ουσίες με χαμηλή θερμοκρασία τήξεως.

Μετά από προκαταρκτική θέρμανση, το δείγμα ψύχεται με ένα συγκεκριμένο ρυθμό και εξετάζεται ανά διαστήματα 3 K ως προς τα χαρακτηριστικά ροής του. Ως σημείο ροής καταγράφεται η κατώτερη θερμοκρασία

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Το πεδίο εφαρμογής και η ακρίβεια των διαφόρων μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της θερμοκρασίας τήξεως/περιοχή τήξεως αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα:

ΠΙΝΑΚΑΣ: ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

A. **Μέθοδοι τριχοειδούς**

Μέθοδοι μέτρησης	Ουσίες που κονιοποιούνται	Ουσίες που δεν κονιοποιούνται εύκολα	Περιοχή θερμοκρασίας	Ορθότητα κατ' εκτίμηση (1)	Υφιστάμενο πρότυπο
Συσκευές θερμοκρασίας τήξεως με υγρό λουτρό	ναι	Μόνο σε μερικές	273 έως 573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Συσκευές θερμοκρασίας τήξεως με μεταλλικό κορμό (θάλαμο)	ναι	Μόνο σε μερικές	293 έως > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Προσδιορισμός με φωτοκύτταρο	ναι	Σε αρκετές με συσκευές προπροσαρμογής	253 έως 573 K	± 0,5 K	

(1) Εξαρτώμενη από τον τύπο του οργάνου και το βαθμό καθαρότητας της ουσίας.

▼B

Β. **Θερμές επιφάνειες και μέθοδοι πήξεως**

Μέθοδος μέτρησης	Ουσίες που μπορούν να κονιοποιούνται	Ουσίες που δεν κονιοποιούνται εύκολα	Περιοχή θερμοκρασίας	Ορθότητα κατ' εκτίμηση (1)	Υφιστάμενο πρότυπο
Θερμή ράβδος Kofler	ναι	όχι	283 έως > 573K	± 1,0 K	ANSI/ASTM D 3451-76
Μικροσκόπιο τήξεως	ναι	Μόνο σε μερικές	273 έως > 573K	± 0,5 K	DIN 53736
Μέθοδος μηνίσκου Μέθοδοι	όχι	Ειδικά για πολυαμίδια	293 έως > 573K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
θερμοκρασίας πήξεως	ναι	ναι	223 έως 573 K	± 0,5 K	π.χ. BS 4695

(1) Εξαρτώμενη από τον τύπο του οργάνου και το βαθμό καθαρότητας της ουσίας.

Γ. **Θερμική ανάλυση**

Μέθοδος μέτρησης	Ουσίες που μπορούν να κονιοποιούνται	Ουσίες που δεν κονιοποιούνται εύκολα	Περιοχή θερμοκρασίας	Ορθότητα κατ' εκτίμηση (1)	Υφιστάμενο πρότυπο
Διαφορική θερμική ανάλυση	ναι	ναι	173 έως 1 273 K	έως τους 600 K ± 0,5 K έως τους 1 273 K ± 2,0 K	ASTME 537-76
Θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης	ναι	ναι	173 έως 1 273 K	έως τους 600 K ± 0,5 K έως τους 1 273 K ± 2,0 K	ASTME 537-76

(1) Εξαρτώμενη από τον τύπο του οργάνου και το βαθμό καθαρότητας της ουσίας.

Δ. **Σημείο ροής**

Μέθοδος μέτρησης	Ουσίες που μπορούν να κονιοποιούνται	Ουσίες που δεν κονιοποιούνται εύκολα	Περιοχή θερμοκρασίας	Ορθότητα κατ' εκτίμηση (1)	Υφιστάμενο πρότυπο
Σημείο ροής	Για πετρελαιοειδή και ελαιώδεις ουσίες	Για πετρελαιοειδή και ελαιώδεις ουσίες	223 έως 323 K	± 3,0	ASTM D 97-66

(1) Εξαρτώμενη από τον τύπο του οργάνου και το βαθμό καθαρότητας της ουσίας.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

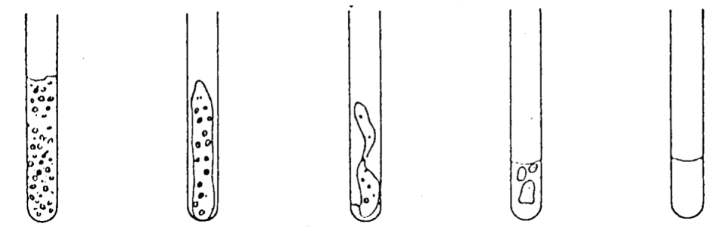
Η τεχνική σχεδόν όλων των μεθόδων δοκιμής περιγράφεται σε εθνικά και διεθνή πρότυπα (βλέπε προσάρτημα 1).

1.6.1. **Μέθοδοι με τριχοειδή σωλήνα**

Οι λεπτά κονιοποιημένες ουσίες, όταν υποβάλλονται σε διαδικασία αργής ανύψωσης της θερμοκρασίας, εμφανίζουν συνήθως τα στάδια τήξεως που εμφανίζονται στην εικόνα 1.

▼B

Εικόνα 1



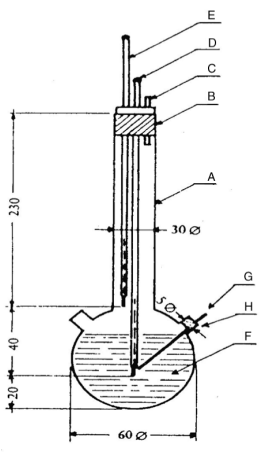
Στάδιο A	(Αρχή της τήξεως): Λεπτά σταγονίδια προσκολλώνται ομοιόμορφα στο εσωτερικό τοίχωμα του τριχοειδούς σωλήνα.
Στάδιο B	Εμφανίζεται ένα διάκενο μεταξύ του δείγματος και του εσωτερικού τοιχώματος λόγω της συρρίκνωσης του τήγματος.
Στάδιο Γ	Το συρρικνωθέν δείγμα αρχίζει να καταρρέει και να υγροποιείται.
Στάδιο Δ	Στην επιφάνεια του δείγματος δημιουργείται ένας πλήρης μηνίσκος, σημαντική όμως ποσότητα του δείγματος παραμένει στερεά.
Στάδιο E	(Τελικό στάδιο τήξεως): δεν υπάρχουν καθόλου στερεά σωματίδια.

Κατά τον προσδιορισμό της θερμοκρασίας τήξεως καταγράφονται οι θερμοκρασίες στην αρχή της τήξεως και στο τελικό στάδιο.

1.6.1.1. *Συσκευές θερμοκρασίας τήξεως με υγρό λουτρό*

Στην εικόνα 2 παρουσιάζεται ένας τύπος πρότυπης συσκευής θερμοκρασίας τήξεως κατασκευασμένης από γυαλί (JIS K 0064). Όλες οι διαστάσεις εκφράζονται σε mm.

Εικόνα 2



A: Δοχείο μέτρησης.
B: Πώμα.
C: Αερισμός.
D: Θερμόμετρο.
E: Βοηθητικό θερμόμετρο.
F: Υγρό λουτρό.
G: Τριχοειδής σωλήνας κατασκευασμένος από γυαλί 80 έως 100 mm μήκος, 1,0 ± 0,2 mm εσωτερική διάμετρος, 0,2 έως 0,3 mm πάχος τοιχώματος.
H: Πλευρικός σωλήνας.

▼B

Υγρό λουτρό:

Θα πρέπει να επιλέγεται το κατάλληλο υγρό. Η επιλογή του υγρού εξαρτάται από την, προς προσδιορισμό, θερμοκρασία τήξεως, π.χ. υγρή παραφίνη για θερμοκρασίες τήξεως όχι υψηλότερες από 473 K, έλαιο σιλικόνης για θερμοκρασίες τήξεως όχι υψηλότερες από 573 K.

Για θερμοκρασίες τήξεως πάνω από 523 K, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μείγμα αποτελούμενο από τρία μέρη θειικού οξέος και δύο μέρη θειικού καλίου (κατά βάρος). Κατάλληλες προφυλάξεις θα πρέπει να λαμβάνονται εάν χρησιμοποιηθεί ένα τέτοιο μείγμα.

Θερμόμετρο:

Πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο εκείνα τα θερμόμετρα που είναι σύμφωνα με τις απαιτήσεις των ακόλουθων ή ισοδύναμων προτύπων:

ASTM E 1-71, DIN 12770, JIS K 8001.

Διαδικασία:

Η ξηρά ουσία κονιοποιείται σε λεπτή μορφή σε ιγδίο και φέρεται στον τριχοειδή σωλήνα, συντετηγμένου στη μία άκρη, έτσι ώστε το ύψος της στάθμης της να είναι περίπου 3 mm μετά από καλή συμπίεση. Για να ληφθεί ένα ομοιόμορφα συμπιεσμένο δείγμα, ο τριχοειδής σωλήνας πρέπει να πέφτει από ένα ύψος περίπου 700 mm μέσω ενός κατακόρυφου γυάλινου σωλήνα, πάνω σε ένα γυαλί ρολογιού.

Ο γεμισμένος τριχοειδής σωλήνας τοποθετείται στο λουτρό έτσι ώστε το μεσαίο τμήμα της λεκάνης υδραργύρου του θερμομέτρου να ακουμπά τον τριχοειδή σωλήνα στο τμήμα που ευρίσκεται το δείγμα. Συνήθως ο τριχοειδής σωλήνας εισάγεται στη συσκευή σε 10 K κάτω από τη θερμοκρασία τήξεως.

Το υγρό λουτρό θερμαίνεται έτσι ώστε η ανύψωση της θερμοκρασίας να είναι περίπου 3 K/min. Το υγρό πρέπει να αναδεύεται. Στους 10 K περίπου κάτω από την αναμενόμενη θερμοκρασία τήξεως ο ρυθμός ανύψωσης της θερμοκρασίας ρυθμίζεται σε ί K/min κατά ανώτατο όριο.

Υπολογισμός:

Ο υπολογισμός της θερμοκρασίας τήξεως γίνεται όπως παρακάτω:

$T = T_D + 0{,}00016\ (T_D - T_E)\ n$

όπου:

T = διορθωμένη θερμοκρασία τήξεως σε K

T_D = ένδειξη θερμοκρασίας θερμομέτρου D σε K

T_E = ένδειξη θερμοκρασίας θερμομέτρου E σε K

π = αριθμός διαιρέσεων της υδραργυρικής στήλης του θερμομέτρου D στην εμβαπτισμένη λεκάνη.

1.6.1.2. *Συσκευές θερμοκρασίας τήξεως με μεταλλικό κορμό*

Συσκευή:

Η συσκευή αποτελείται από:

— έναν κυλινδρικό μεταλλικό κορμό, το πάνω μέρος του οποίου είναι κοίλο και σχηματίζει ένα θάλαμο (βλέπε σχήμα 3),

— ένα μεταλλικό πώμα, με δυο ή περισσότερες τρύπες, που επιτρέπουν να εισαχθούν σωλήνες μέσα στο μεταλλικό κορμό,

▼B

— ένα σύστημα θέρμανσης, για το μεταλλικό κορμό, που επιτυγχάνεται για παράδειγμα με μία ηλεκτρική αντίσταση ενσωματωμένη στον κορμό,

— ένα ροοστάτη για ρύθμιση της ισχύος, αν χρησιμοποιείται η ηλεκτρική θέρμανση,

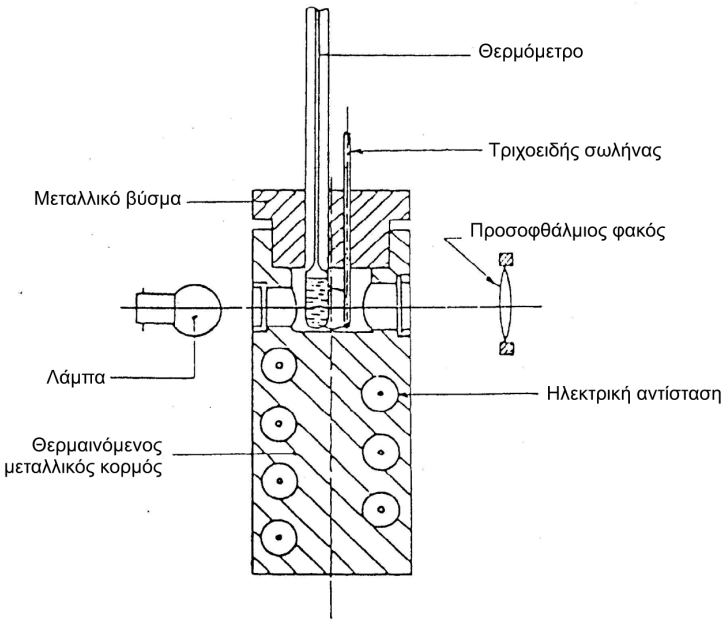
— τέσσερα παράθυρα, από γυαλί ανθεκτικό στη θερμότητα, πάνω στα όρθια τοιχώματα του θαλάμου, διαμετρικά τοποθετημένα σε ορθή γωνία μεταξύ τους. Εμπρός από το ένα από τα παράθυρα αυτά είναι στερεωμένος ένας προσοφθάλμιος φακός για παρατήρηση του τριχοειδή σωλήνα. Τα άλλα τρία παράθυρα χρησιμεύουν για το φωτισμό του εσωτερικού της διάταξης με λάμπες,

— έναν τριχοειδή σωλήνα από γυαλί ανθεκτικό στη θερμότητα, κλειστό στη μία άκρη (βλέπε σημείο 1.6.1.1).

Θερμόμετρο:

Βλέπε τα πρότυπα που αναφέρονται στο 1.6.1.1. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν και θερμοηλεκτρικές συσκευές μέτρησης με παρεμφερή ακρίβεια.

Εικόνα 3



1.6.1.3. *Προσδιορισμός με φωτοκύτταρο*

Συσκευή και διαδικασία:

Η συσκευή αποτελείται από ένα μεταλλικό θάλαμο με αυτόματο σύστημα θέρμανσης. Τρεις τριχοειδείς σωλήνες γεμίζονται σύμφωνα με το σημείο 1.6.1.1 και τοποθετούνται στον κλίβανο.

▼B

Αρκετές γραμμικές αυξήσεις της θερμοκρασίας είναι διαθέσιμες για τη βαθμονόμηση της συσκευής, και η κατάλληλη ανύψωση της θερμοκρασίας ρυθμίζεται ηλεκτρικά σε μία προεπιλεγμένη σταθερή και γραμμική ταχύτητα. Οι καταγραφείς δείχνουν την πραγματική θερμοκρασία του κλίβανου και τη θερμοκρασία της ουσίας στους τριχοειδείς σωλήνες.

1.6.2. **Θερμές επιφάνειες**

1.6.2.1. *Θερμή επιφάνεια Kofler*

Βλέπε προσάρτημα.

1.6.2.2. *Μικροσκόπιο τήξεως*

Βλέπε προσάρτημα.

1.6.2.3. *Μέθοδος μηνίσκου (πολυαμίδια)*

Βλέπε προσάρτημα.

Η ταχύτητα θέρμανσης κατά τον προσδιορισμό της θερμοκρασίας τήξεως θα πρέπει να είναι μικρότερη από 1 K/min.

1.6.3. **Μέθοδοι προσδιορισμού της θερμοκρασίας πήξεως**

Βλέπε προσάρτημα.

1.6.4. **θερμική ανάλυση**

1.6.4.1. *Διαφορική θερμική ανάλυση*

Βλέπε προσάρτημα.

1.6.4.2. *θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης*

Βλέπε προσάρτημα.

1.6.5. **Προσδιορισμός του σημείου ροής**

Βλέπε προσάρτημα.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Σε ορισμένες περιπτώσεις είναι αναγκαία η διόρθωση του θερμομέτρου,

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

Η έκθεση δοκιμής πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— Π χρησιμοποιηθείσα μέθοδος,

— επακριβείς προδιαγραφές της ουσίας (ταυτότητα και προσμείξεις) και τυχόν προκαταρκτικό στάδιο καθαρισμού,

— εκτίμηση της ακρίβειας (accuracy).

Ως θερμοκρασία τήξεως αναφέρεται ο μέσος όρος δύο τουλάχιστον μετρήσεων που είναι μέσα στην περιοχή της υπολογισθείσας ακρίβειας(βλέπε πίνακες).

▼B

Εάν η διαφορά μεταξύ της θερμοκρασίας στην αρχή και στο τελικό στάδιο τήξεως είναι μέσα στα όρια της ακρίβειας της μεθόδου, ως θερμοκρασία τήξεως λαμβάνεται η θερμοκρασία στο τελικό στάδιο τήξεως' διαφορετικά, καταγράφονται και οι δύο θερμοκρασίες.

Αν η ουσία αποσυντίθεται ή εξαχνούται πριν από τη θερμοκρασία τήξεως, η θερμοκρασία στην οποία παρατηρείται το γεγονός αυτό πρέπει να αναφέρεται.

Πρέπει να αναφέρονται όλες οι πληροφορίες και παρατηρήσεις που σχετίζονται με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, ιδιαίτερα όσον αφορά τις προσμείξεις και τη φυσική κατάσταση της ουσίας.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 102, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, vol. II, 803-834.

(3) R. Weissberger ed.: Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VII.

(4) IUPAC, Physicochemical measurements: Catalogue of reference materials from national laboratories, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 505-515.

▼B

Προσάρτημα

Για πρόσθετες τεχνικές πληροφορίες, μπορούν για παράδειγμα να χρησιμοποιηθούν τα ακόλουθα πρότυπα:

1. **Μέθοδοι τριχοειδούς**

1.1. Συσκευές θερμοκρασίας τήξεως με υγρό λουτρό

ASTM E 324-69	Standard test method for relative initial and final melting points and melting range of organic chemicals
BS 4634	Method for the determination of melting point and/or melting range
DIN 53181	Bestimmung der Schmelzintervalles von Harzen nach Kapillarverfahren.
JIS K 00-64	Testing methods for melting point of chemical products.

1.2. Συσκευές θερμοκρασίας τήξεως με μεταλλικό κορμό

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztempcratur von teilkristallinen Kunststoffen
ISO 1218 (E)	Plastics — polyamides — determination of «melting point»

2. **Θερμές επιφάνειες**

2.1. Θερμή ράβδος Kofier

ANSI/ASTM D 3451 76	Standard recommanded practices for testing polymeric powder coatings

2.2. Μικροσκόπιο τήξεως

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen.

2.3. Μέθοδος μηνίσκου (πολυαμίδια)

ISO 1218 (E)	Plastics — polyamides — determination of «melting point»

▼B

ANSI/ASTM D 2133-66	Standard specification for acetal resine injection moulding and extru-sion mate-rials
NT T 51-050	Resines de polyamides. Determina-tion du «point de fusion». Methode du me-nisque

3. **Μέθοδοι για τον προσδιορισμό της θερμοκρασίας πήξεως**

BS 4633	Method for the determination of cry-stallizing point
BS 4695	Method for Determination of Melting Point of Petroleum Wax (cooling cur-ve)
DIN 51421	Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Moto-renbenzolen
ISO 2207	Cires de pétrole: détermination de la température de figeage.
DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsauren
NF T 60-114	Point de fusion des paraffines
NF T 20-051	Méthode de détermination du point de cristallisation (point de con-gélation)
ISO 1392	Method for the determination of the freezing point.

4. **Θερμική ανάλυση**

4.1. Διαφορική θερμική ανάλυση

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal ana-lysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis

▼B

ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

4.2. Θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

5. **Προσδιορισμός του σημείου ροής**

NBN 52014	Échantillonnage et analyse des produits du pétrole: point de trouble et point d'écoulement limité — Monstememing en ontleding van aardolieproducten: Troe-belingspunt en vloeipunt
ASTM D 97-66	Standard test method for pour point of petroleum oils
ISO 3016	Petroleum oils — Determination of pour point.

▼B

Α.2. ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΖΕΣΕΩΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Οι περισσότερες από τις περιγραφόμενες μεθόδους βασίζονται στην κατευθυντήρια οδηγία δοκιμών του ΟΟΣΑ (1). Οι βασικές αρχές δίδονται στις παραπομπές (2) και (3).

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι μέθοδοι και οι συσκευές που περιγράφονται εδώ μπορούν να χρησιμοποιηθούν για υγρές και χαμηλού σημείου τήξεως ουσίες, υπό την προϋπόθεση ότι οι ουσίες αυτές δεν εμφανίζουν χημικές αντιδράσεις σε θερμοκρασία κάτω της θερμοκρασίας ζέσεως (π.χ.: αυτοξείδωση, αναδιάταξη, αποικοδόμηση, κ.λπ.). Οι μέθοδοι μπορούν να εφαρμοσθούν τόσο σε καθαρές, όσο και σε μη καθαρές υγρές ουσίες.

Έμφαση δίνεται στις μεθόδους που χρησιμοποιούν προσδιορισμό με φωτοκύτταρο και θερμική ανάλυση, διότι οι μέθοδοι αυτές επιτρέπουν τον προσδιορισμό τόσο της θερμοκρασίας τήξεως, όσο και της θερμοκρασίας ζέσεως. Επιπλέον, οι μετρήσεις μπορούν να γίνουν αυτόματα.

Η «δυναμική μέθοδος» έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί επίσης να εφαρμοσθεί στον προσδιορισμό της τάσης ατμών και ότι δεν χρειάζεται να διορθώνεται η θερμοκρασία ζέσεως σε κανονική πίεση (101,325 kPa) διότι η κανονική πίεση μπορεί να ρυθμιστεί κατά τη διάρκεια της μέτρησης με ένα μανόμετρο.

Παρατηρήσεις:

Η επίδραση των προσμείξεων στον προσδιορισμό της θερμοκρασίας ζέσεως εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη φύση της πρόσμειξης. Όταν στο δείγμα υπάρχουν πτητικές προσμείξεις, πράγμα που μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα, η ουσία μπορεί να καθαριστεί.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Ως κανονική θερμοκρασία ζέσεως ορίζεται η θερμοκρασία στην οποία η τάση ατμών ενός υγρού είναι 101,325 kPa.

Αν η θερμοκρασία ζέσεως δεν μετράται σε κανονική ατμοσφαιρική πίεση, η εξάρτηση της τάσης ατμών από τη θερμοκρασία μπορεί να περιγραφεί με την εξίσωση Clausius—Clapeyron:

$$\log p = \frac{\Delta H_v}{2{,}3\ RT} + \textit{σταθερά}$$

όπου:

p = η τάση ατμών της ουσίας σε πασκάλ

ΔH_v = η θερμότητα εξατμίσεως σε J mol^{-1}

R = η παγκόσμια σταθερά των αερίων = 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

T = η θερμοδυναμική θερμοκρασία σε K

Κατά τη διάρκεια της μέτρησης η θερμοκρασία ζέσεως αναφέρεται σε σχέση με την ατμοσφαιρική πίεση.

▼B

Μετατροπές:

Πίεση (μονάδες: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa

(το «bar» επιτρέπεται ακόμη, αλλά δεν συνιστάται)

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr

(οι μονάδες «mm Hg» και «Torr» δεν επιτρέπονται)

1 atm = πρότυπη ατμόσφαιρα = 101 325 Pa

(η μονάδα «atm» δεν επιτρέπεται).

Θερμοκρασία (μονάδες: K)

t = T - 273,15

t: θερμοκρασία Κελσίου, βαθμός Κελσίου (^{o}C)

T: θερμοδυναμική θερμοκρασία, Κέλβιν (K)

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Δεν είναι απαραίτητο να χρησιμοποιούνται ουσίες αναφοράς σε όλες τις περιπτώσεις κατά τις οποίες διερευνάται μια νέα ουσία. Οι ουσίες αυτές θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κυρίως για να ελέγχεται κατά διαστήματα η απόδοση της μεθόδου και για να γίνεται δυνατή η σύγκριση με τα αποτελέσματα από άλλες μεθόδους.

Μερικές ουσίες βαθμονόμησης μπορούν να βρεθούν στις μεθόδους που περιλαμβάνονται στο προσάρτημα.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Πέντε μέθοδοι για τον προσδιορισμό της θερμοκρασίας ζέσεως (περιοχής ζέσεως) βασίζονται στη μέτρηση της θερμοκρασίας ζέσεως, ενώ δύο άλλες βασίζονται στη θερμική ανάλυση.

1.4.1. **Προσδιορισμός με τη χρήση ζεσεομέτρου**

Τα ζεσεόμετρα αναπτύχθηκαν αρχικά για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους από την ανύψωση της θερμοκρασίας ζέσεως, είναι όμως επίσης κατάλληλα και για ακριβείς μετρήσεις της θερμοκρασίας ζέσεως. Μία πολύ απλή συσκευή περιγράφεται στο ASTM D 1120-72 (βλέπε προσάρτημα). Στη συσκευή αυτή το υγρό θερμαίνεται κάτω από συνθήκες ισορροπίας σε ατμοσφαιρική πίεση μέχρι να αρχίσει να βράζει.

1.4.2. **Δυναμική μέθοδος**

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη μέτρηση της θερμοκρασίας ανασυμπύκνωσης των ατμών με τη βοήθεια κατάλληλου θερμομέτρου στον κάθετο ψυκτήρα κατά το βρασμό. Η πίεση στη μέθοδο αυτή μπορεί να μεταβάλλεται.

1.4.3. **Μέθοδος απόσταξης για τη θερμοκρασία ζέσεως**

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην απόσταξη του υγρού και στη μέτρηση της θερμοκρασίας ανασυμπύκνωσης των ατμών και στον προσδιορισμό της ποσότητας του αποστάγματος.

▼B

1.4.4. **Μέθοδος κατα Siwoloboff**

Δείγμα θερμαίνεται σε σωλήνα δείγματος που είναι βυθισμένος σε θερμό υδρόλουτρο. Στο σωλήνα του δείγματος βυθίζεται συντηγμένο τριχοειδές που περιέχει στο κάτω άκρο μία φυσαλίδα αέρα.

1.4.5. **Προσδιορισμός με φωτοκύτταρο**

Ακολουθώντας την αρχή κατά Siwoboloff, εκτελείται αυτόματη φωτοηλεκτρική μέτρηση χρησιμοποιώντας τις ανερχόμενες φυσαλίδες.

1.4.6. **Διαφορική θερμική ανάλυση**

Στην τεχνική αυτή καταγράφεται η διαφορά θερμοκρασιών μεταξύ της ουσίας και ενός υλικού αναφοράς ως συνάρτηση της θερμοκρασίας, ενώ η ουσία και το υλικό αναφοράς υποβάλλονται στο ίδιο ελεγχόμενο θερμοκρασιακό πρόγραμμα. Όταν το δείγμα υφίσταται κάποια μετατροπή που περιλαμβάνει μεταβολή της ενθαλπίας, η μεταβολή αυτή καταδεικνύεται από μία ενδόθερμη απόκλιση (ζέση) από τη βασική γραμμή της θερμοκρασίας που έχει καταγραφεί.

1.4.7. **Σάρωση διαφορική θερμιδομετρίας**

Στην τεχνική αυτή καταγράφεται η διαφορά ενεργειακής απολαβής μιας ουσίας και ενός υλικού αναφοράς ως συνάρτηση της θερμοκρασίας, ενώ η ουσία και το υλικό αναφοράς υποβάλλονται στο ίδιο ελεγχόμενο θερμοκρασιακό πρόγραμμα. Η ενέργεια αυτή είναι η ενέργεια που χρειάζεται για την επίτευξη μηδενικής θερμοκρασιακής διαφοράς μεταξύ της ουσίας και του υλικού αναφοράς. Όταν το δείγμα υφίσταται κάποια μετατροπή που περιλαμβάνει μεταβολή της ενθαλπίας, η μεταβολή αυτή καταδεικνύεται από μία ενδόθερμη απόκλιση (ζέση) από τη βασική γραμμή της ροής θερμότητας που έχει καταγραφεί.

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Το πεδίο εφαρμογής και η ακρίβεια των διαφόρων μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της θερμοκρασίας ζέσεως/περιοχής ζέσεως περιλαμβάνονται στον Πίνακα 1.

Πινακας 1:

Σύγκριση των μεθόδων

Μέθοδος μέτρησης	Εκτιμώμενη ακρίβεια	Υπάρχον πρότυπο
Ζεσεόμετρο	± 1,4K(έως 373 K) (1) (2) ± 2,5 K (έως 600 K) (1) (2)	ASTM D 1120-72 (1)
Δυναμική μέθοδος	± 0,5 K (έως 600 K) (2)	
Μέθοδος απόσταξης (περιοχή ζέσεως)	± 0,5 K (έως 600 K)	ISO/R918, DIN 53171, BS 4591/71
Κατά Siwoloboff	± 2 K (έως 600 K) (2)	
Προσδιορισμός με φωτοκύτταρο	± 0,3 K (στους 373 K) (2)	
Διαφορική θερμική θερμιδομετρία	± 0,5 K (έως 600 K) ± 2,0 K (έως 1 273 K)	ASTM E 537-76
Σάρωση διαφορικής θερμιδομετρίας	+ 0,5 K (έως 600 K) ± 2,0 K (έως 1 273 K)	ASTM E 537-76

(1) Η ακρίβεια αυτή ισχύει μόνο για την απλή συσκευή όπως π.χ. περιγράφεται στο ASTM D 1120-72. Μπορεί να βελτιωθεί με ζεσεόμετρα υψηλότερης τεχνολογίας.

(2) Ισχύει μόνο για καθαρές ουσίες. Στις άλλες περιπτώσεις, η χρήση της θα πρέπει να αιτιολογείται.

▼B

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

Η πειραματική διαδικασία μερικών από τις μεθόδους δοκιμής περιγράφεται σε διεθνή και εθνικά πρότυπα (βλέπε προσάρτημα).

1.6.1. **Ζεσεόμετρο**

Βλέπε προσάρτημα.

1.6.2. **Δυναμική μέθοδος**

Βλέπε μέθοδο ελέγχου στο σημείο Α.4 για τον προσδιορισμό της τάσεως ατμών.

Καταγράφεται η θερμοκρασία ζέσεως που παρατηρείται με εφαρμογή της πίεσης 101,325 kPa.

1.6.3. **Διαδικασία απόσταξης (περιοχή ζέσεως)**

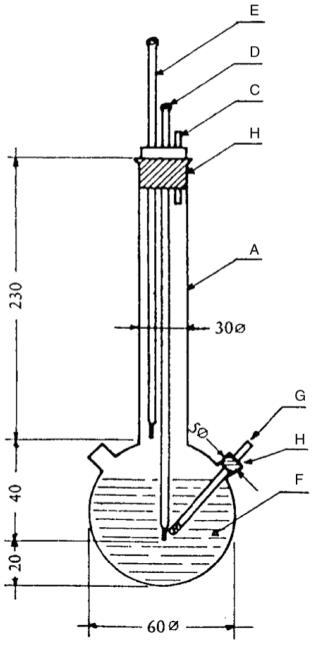
Βλέπε προσάρτημα.

1.6.4. **Μέθοδος κατά Siwoloboff**

Το δείγμα θερμαίνεται σε συσκευή θερμοκρασίας τήξεως μέσα σε σωλήνα δείγματος, με διάμετρο περίπου 5 mm (εικόνα 1).

Στην εικόνα 1 εικονίζεται ένας τύπος πρότυπης συσκευής θερμοκρασίας τήξεως και ζέσεως (JIS K 0064) (κατασκευασμένης από γυαλί, όλες οι διαστάσεις σε χιλιοστόμετρα).

Εικόνα 1



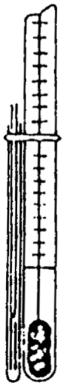
A: Δοχείο μέτρηση;
B: Πώμα
C: Αερισμός
D: Θερμόμετρο
E: Βοηθητικό θερμόμετρο
F: Υγρό λουτρό
G: Σωλήνας δείγματος με εξωτερική διάμετρο 5 mm κατ' ανώτατο όριο περιέχων τριχοειδή σωλήνα, μήκους περίπου 100 mm, εσωτερικής διαμέτρου περίπου 1 mm και πάχους τοιχώματος περίπου 0,2 έως 0,3 mm
H: Πλευρικός σωλήνας

Ένας τριχοειδής σωλήνας (τριχοειδές ζέσεως), συντετηγμένος περίπου 1 cm πάνω από το κατώτατο σημείο του, φέρεται μέσα στο σωλήνα δείγματος. Το επίπεδο μέχρι το οποίο προστίθεται η ελεγχόμενη ουσία είναι τέτοιο ώστε η συντετηγμένη τομή του τριχοειδή σωλήνα να είναι κάτω από την επιφάνεια του υγρού. Ο σωλήνας δείγματος που περιέχει το τριχοειδές ζέσεως στερεώνεται είτε πάνω στο θερμόμετρο με έναν ελαστικό σύνδεσμο είτε σε ένα πλευρικό υποστήριγμα (βλέπε εικόνα 2).

▼B

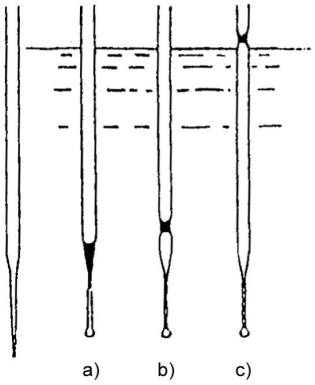
Εικόνα 2

Αρχή κατά Siwoloboff



Εικόνα 3

Τροποποιημένη αρχή



Το υγρό λουτρό επιλέγεται ανάλογα με τη θερμοκρασία ζέσεως. Για θερμοκρασίες μέχρι 573 K, μπορεί να χρησιμοποιηθεί έλαιο σιλικόνης. Υγρή παραφίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο μέχρι τους 473 K. Η θέρμανση του λουτρού θα πρέπει να ρυθμίζεται έτσι ώστε αρχικά η ανύψωση της θερμοκρασίας να γίνεται με ταχύτητα 3 K/min. Το λουτρό πρέπει να αναδεύεται. Στους 10 K περίπου κάτω από την αναμενόμενη θερμοκρασία ζέσεως, η θέρμανση ελαττώνεται έτσι ώστε η ταχύτητα ανύψωσης της θερμοκρασίας να είναι λιγότερο από 1 K/min. Όταν προσεγγίζεται η θερμοκρασία ζέσεως, από το τριχοειδές ζέσεως αρχίζουν να βγαίνουν με ταχύτητα φυσαλίδες.

Η θερμοκρασία ζέσεως είναι η θερμοκρασία εκείνη στην οποία, σε στιγμιαία ψύξη, σταματάει η αλυσίδα των φυσαλίδων και αρχίζει να ανέρχεται ξαφνικά υγρό μέσα στο τριχοειδές. Η αντίστοιχη ένδειξη του θερμομέτρου είναι η θερμοκρασία ζέσεως της ουσίας.

Στην τροποποιημένη αρχή (εικόνα 3) η θερμοκρασία ζέσεως προσδιορίζεται σε τριχοειδή σωλήνα θερμοκρασίας τήξεως. Ο σωλήνας αυτός καταλήγει σε ένα λεπτό άκρο μήκους περίπου 2 cm (α) και αναρροφάται μικρή ποσότητα του δείγματος. Το ανοικτό άκρο του λεπτού τριχοειδούς κλείνεται με σύντηξη έτσι ώστε να εγκλωβισθεί στην άκρη μία μικρή φυσαλίδα αέρα. Κατά τη θέρμανση στη συσκευή θερμοκρασίας τήξεως (b), η φυσαλίδα του αέρα διαστέλλεται. Η θερμοκρασία ζέσεως αντιστοιχεί στη θερμοκρασία στην οποία η υπό μορφή πώματος ουσία φθάνει στο επίπεδο της επιφάνειας του λουτρού (c).

1.6.5. **Προσδιορισμός με φωτοκύτταρο**

Το δείγμα θερμαίνεται μέσα σε τριχοειδή σωλήνα σε θερμαινόμενο μεταλλικό κορμό (θάλαμο).

Δέσμη φωτός κατευθύνεται, μέσω κατάλληλων οπών στον κορμό, διαμέσου της ουσίας ό ένα βαθμονομημένο με ακρίβεια φωτοκύτταρο.

Κατά την αύξηση της θερμοκρασίας του δείγματος, από το τριχοειδές ζέσεως αναδύονται μεμονωμένες φυσαλίδες αέρα. Όταν η θερμοκρασία φθάσει στη θερμοκρασία ζέσεως ο αριθμός των φυσαλίδων αυξάνει σε μεγάλο βαθμό. Το γεγονός αυτό προκαλεί μεταβολή στην ένταση του φωτός, που καταγράφεται από ένα φωτοκύτταρο και δίνει σήμα «stop» στο δείκτη ανάγνωσης της θερμοκρασίας ενός θερμομέτρου με αντίσταση από λευκόχρυσο που βρίσκεται στον κορμό.

Η μέθοδος αυτή είναι ιδιαίτερα χρήσιμη διότι επιτρέπει την πραγματοποίηση προσδιορισμών σε θερμοκρασίες κάτω από τη θερμοκρασία δωματίου και μέχρι τους 253,15 K (-20 °C) χωρίς καμία αλλαγή στη συσκευή. Συνεπώς το όργανο πρέπει να τοποθετήσει σε λουτρό ψύξης.

▼B

1.6.6. **Θερμική ανάλυση**

1.6.6.1. *Διαφορική θερμική ανάλυση*

Βλέπε προσάρτημα.

1.6.6.2. *Σάρωση διαφορικής θερμιδομετρίας*

Βλέπε προσάρτημα.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Για μικρές αποκλίσεις από την κανονική πίεση (μέγιστο ± 5 kPa), οι θερμοκρασίες ζέσεως ανάγονται σε κανονικές T_{Π} με τη βοήθεια της παρακάτω εξίσωσης αριθμών-τιμών του Sidney Young:

$T_n = T + (f_T \times \Delta p)$

όπου:

Δp = (101,325 — p) [σημείωση συμβόλου]

p = μέτρηση πίεσης σε kPa,

f_T = ταχύτητα μεταβολής της θερμοκρασίας ζέσεως με την πίεση σε K/kPa

T = μετρούμενη θερμοκρασία ζέσεως σε K

T_n = θερμοκρασία ζέσεως διορθωμένη σε κανονική πίεση σε K

Οι συντελεστές διόρθωσης της θερμοκρασίας f_T και οι εξισώσεις για τις προσεγγίσεις τους συμπεριλαμβάνονται στα διεθνή και εθνικά πρότυπα που προαναφέρθηκαν για πολλές ουσίες.

Η μέθοδος DIN 53171, π.χ., μνημονεύει τις ακόλουθες κατά προσέγγιση διορθώσεις για διαλύτες που περιλαμβάνονται στα χρώματα:

Πίνακας 2

Συντελεστές διόρθωσης θερμοκρασίας (f_T)

Θερμοκρασία T σε K	Συντελεστής διόρθωσης f_T σε K/kPa
323,15	0,26
348,15	0,28
373,15	0,31
398,15	0,33
423,15	0,35
448,15	0,37
473,15	0,39
498,15	0,41
523,15	0,44
548,15	0,45
573,15	0,47

▼B

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

Η έκθεση δοκιμής πρέπει, αν είναι δυνατόν, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— τη χρησιμοποιηθείσα μέθοδο,

— επακριβείς προδιαγραφές της ουσίας (ταυτότητα και προσμείξεις) και προκαταρκτικό στάδιο καθαρισμού, εφόσον υπάρχει,

— εκτίμηση της ορθότητας.

Ως θερμοκρασία ζέσεως αναφέρεται ο μέσος όρος δυο τουλάχιστον μετρήσεων που είναι μέσα στα όρια της εκτιμώμενης ακρίβειας (βλέπε Πίνακα 1).

Πρέπει να δηλώνονται οι μετρηθείσες θερμοκρασίες ζέσεως και ο μέσος όρος τους, οι δε πιέσεις στις οποίες έγιναν οι μετρήσεις πρέπει να αναφέρονται σε kPa. Η πίεση θα πρέπει κατά προτίμηση να είναι κοντά στην κανονική ατμοσφαιρική πίεση.

Πρέπει να αναφέρεται κάθε πληροφορία ή παρατήρηση σχετική με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, ιδιαίτερα όσον αφορά τις προσμείξεις και τη φυσική κατάσταση της ουσίας.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 103, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, vol. II.

(3) R. Weissbergcr ed.: Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd cd., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VIII.

▼B

Προσάρτημα

Για πρόσθετες τεχνικές πληροφορίες, μπορούν για παράδειγμα να χρησιμοποιηθούν τα ακόλουθα πρότυπα:

1. **Ζεσεόμετρο**

ASTM D 1120-72	Standard test method for boiling point of engine anti-freezes

2. **Μέθοδος απόσταξης (περιοχή ζέσεως)**

ISO/R 918	Test Method for Distillation (Distillation Yield and Distillation Range)
BS 4349/68	Method for determination of distillation of petroleum products
BS 4591/71	Method for the determination of distillation characteristics
DIN 53171	Losungmittel fur Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufes
NF T 20-608	Distillation: détermination du rendement et de l'intervalle de distillation

3. **Διαφορική θερμική ανάλυση και σάρωση διαφορικής θερμιδομετρίας**

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse: Begriffe

▼B

Α.3. ΣΧΕΤΙΚΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Οι περιγραφόμενες μέθοδοι βασίζονται στην κατευθυντήρια οδηγία δοκιμών του ΟΟΣΑ (1). Οι βασικές αρχές δίδονται στη βιβλιογραφία (2).

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι μέθοδοι για τον προσδιορισμό της σχετικής πυκνότητας που περιγράφονται εδώ εφαρμόζονται σε στερεές και υγρές ουσίες, χωρίς οποιονδήποτε περιορισμό σχετικά με το βαθμό καθαρότητας τους. Οι διάφορες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται αναφέρονται στον πίνακα 1.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Σχετική πυκνότητα, D_4^{20} των στερεών ή των υγρών είναι ο λόγος της μάζας ενός όγκου της εξεταζόμενης ουσίας προσδιορισμένου στους 20 °C, προς τη μάζα ίσου όγκου νερού, προσδιορισμένου στους 4 °C. Η σχετική πυκνότητα δεν έχει διαστάσεις.

Πυκνότητα, ρ, μιας ουσίας είναι το πηλίκον της μάζας, m, προς τον όγκο, v.

Η πυκνότητα, ρ, εκφράζεται, σε μονάδες SI, σε kg/m^3.

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (1) (3)

Δεν είναι απαραίτητο να χρησιμοποιούνται ουσίες αναφοράς σε όλες τις περιπτώσεις κατά τις οποίες διερευνάται μία νέα ουσία. Οι ουσίες αυτές θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κυρίως για να ελέγχεται κατά διαστήματα η μέθοδος που εφαρμόζεται και για να γίνεται δυνατή η σύγκριση με αποτελέσματα από άλλες μεθόδους.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

Χρησιμοποιούνται τέσσερεις τάξεις μεθόδων.

1.4.1. **Μέθοδοι άνωσης**

1.4.1.1. *Υδρόμετρο* (για υγρές ουσίες)

Ικανοποιητική ακρίβεια και γρήγοροι προσδιορισμοί της πυκνότητας επιτυγχάνονται με τα επιπλέοντα υδρόμετρα, τα οποία επιτρέπουν την εκτίμηση της πυκνότητας ενός υγρού από το βάθος που βυθίζονται και με ανάγνωση σε βαθμολογημένη κλίμακα.

1.4.1.2. *Υδροστατικός ζυγός* (για υγρές και στερεές ουσίες)

Η διαφορά μεταξύ των βαρών ενός εξεταζόμενου δείγματος όταν μετριέται στον αέρα και σε κατάλληλο υγρό (π.χ. νερό) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της πυκνότητας του.

Στα στερεά, η μετρούμενη πυκνότητα είναι αντιπροσωπευτική μόνο του συγκεκριμένου δείγματος. Για τον προσδιορισμό της πυκνότητας υγρών, σώμα γνωστού όγκου, v, ζυγίζεται πρώτα στον αέρα και κατόπιν στο υγρό.

1.4.1.3. *Μέθοδος βυθιζόμενου σώματος* (για υγρές ουσίες) (4)

Με τη μέθοδο αυτή, η πυκνότητα ενός υγρού προσδιορίζεται από τη διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων της ζύγισης του υγρού πριν και μετά τη βύθιση ενός σώματος γνωστού όγκου στο εξεταζόμενο υγρό.

▼B

1.4.2. **Μέθοδοι πυκνομέτρου**

Για στερεά ή υγρά μπορούν να χρησιμοποιηθούν πυκνόμετρα διαφόρων σχημάτων με γνωστούς όγκους. Η πυκνότητα υπολογίζεται από τη διαφορά βάρους του γεμάτου και του άδειου πυκνόμετρου και. από το γνωστό όγκο του.

1.4.3. **Συγκριτικά πυκνόμετρα αέρα** (για στερεά)

Η πυκνότητα ενός στερεού, οποιασδήποτε μορφής, μπορεί να μετρηθεί σε θερμοκρασία δωματίου με το συγκριτικό πυκνόμετρο αέρα. Ο όγκος μιας ουσίας μετριέται στον αέρα ή σε ένα αδρανές αέριο, σε έναν κύλινδρο μεταβλητά βαθμονομημένου όγκου. Για τον υπολογισμό της πυκνότητας γίνεται μια μέτρηση μάζας, αφού πρώτα γίνει η μέτρηση του όγκου.

1.4.4. **Πυκνόμετρο ταλάντωσης** (5) (6) (7)

Η πυκνότητα ενός υγρού μπορεί να μετρηθεί με ένα πυκνόμετρο ταλάντωσης. Μηχανικός ταλαντωτής σε σχήμα σωλήνα U δονείται στη συχνότητα συντονισμού του ταλαντωτή που εξαρτάται από τη μάζα του. Η εισαγωγή του δείγματος αλλάζει τη συχνότητα συντονισμού του ταλαντωτή. Η συσκευή πρέπει να βαθμονομείται με δύο υγρές υκνότητες τους να καλύπτουν την περιοχή που πρόκειται να μετρηθεί.

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Το πεδίο εφαρμογής των διαφόρων μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της σχετικής πυκνότητας παρατίθενται στον πίνακα.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

Τα πρότυπα που δίνονται σαν παραδείγματα, και που πρέπει να συμβουλεύονται για πρόσθετες τεχνικές λεπτομέρειες, αναφέρονται στο προσάρτημα.

Οι δοκιμές πρέπει να εκτελούνται στους 20 °C με διεξαγωγή τουλάχιστον δύο μετρήσεων.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Βλέπε πρότυπα.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

Η έκθεση δοκιμής πρέπει, αν είναι δυνατόν, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες·.

— χρησιμοποιηθείσα μέθοδο,

— επακριβείς προδιαγραφές της ουσίας (ταυτότητα και προσμείξεις) και καθαρισμού, εφόσον υπάρχει.

Η σχετική πυκνότητα D_4^{20} πρέπει να αναφέρεται όπως ορίζεται στο 1.2, μαζί με τη φυσική κατάσταση της εξεταζόμενης ουσίας.

Πρέπει να αναφέρεται κάθε πληροφορία και παρατήρηση που έχει σχέση με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, ιδιαίτερα όσον αφορά τις προσμείξεις και τη φυσική κατάσταση της ουσίας.

▼B

ΠΙΝΑΚΑΣ:

ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

Μέθοδος μέτρησης	Πυκνότητα		Μέγιστο δυνατό δυναμικό ιξώδες	Υφιστάμενα πρότυπα
	στερεό	υγρό		
1.4.1.1. Υδρόμετρο		ναι	5 Pa s	ISO 387, ISO 649-2, NF T 20-050
1.4.1.2. Υδροστατικός ζυγός				
(α) στερεά	ναι			ISO 1183 (A)
(β) υγρά		ναι	5 Pa s	ISO 901 και 758
1.4.1.3. Μέθοδος βυθισμένου σώματος		ναι	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2. Πυκνόμετρο				ISO 3507
(α) στερεά	ναι			ISO 1183 (B), NF T 20-053
(β) υγρά		ναι	500 Pa s	ISO 758
1.4.3. Συγκριτικό πυκνόμετρο αέρα	ναι			DIN 55990 τμήμα 3 DIN 53243
1.4.4. Πυκνόμετρο ταλάντωσης		ναι	5 Pa s	

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) OECD, Paris, 198I, Test Guideline 109, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) R. Weissberger ed., Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Chapter IV, Interscience Publ., New York, 1959, vol. 1, Part 1.

(3) IUPAC, Recommended reference materials for realization of physico-chemical properties, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 508.

(4) Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Fliissigkeiten, Technisches Messen tm, 1979, vol.11, 427-430.

(5) Leopold, H., Die digitaie Messung von Fiussigkeiten, Eiektronik, 1970, vol. 19, 297-302.

(6) Baumgarten, D., Fullmengenkontrolle bei vorgepackten Erzeugnissen — Verfahren zur Dichtebestimmung bei flussigen Produkten und ihre praktische Anwendung, Die Pharmazeutische Industrie, 1975, vol. 37, 717-726.

(7) Riemann, J., Der Einsatz der digitalen Dichtemessung im Braureilaboratorium, Brauwissenschaft, 1976, vol. 9, 253-255.

▼B

Προσάρτημα

Για πρόσθετες τεχνικές πληροφορίες, μπορούν για παράδειγμα να χρησιμοποιηθούν τα ακόλουθα πρότυπα:

1. **Μέθοδοι άνωσης**

1.1. Υδρόμετρο

DIN 12790, ISO 387	Hydrometer; general instructions
DIN 12791	Part I: Density hydrometers; construction, adjustment and use Part II: Density hydrometers; standardized sizes, designation Part III: Use and test
ISO 649-2	Laboratory glassware: Density hydrometers for general purpose
NF T 20-050	Chemical products for industrial use — Determination of density of liquids — Areometric method
DIN 12793	Laboratory glassware: range find hydrometers

1.2. Υδροστατικός ζυγός

Για στερεές ουσίες

ISO 1183	Method A: Methods for determining the density and relative density of plastics exciuuing ccnular plastics
NF T 20-049	Chemical products for industrial use — Determination of the density of solids other than powders and cellular products — Hydrostatic balance method
ASTM-D-792	Specific gravity and density of plastics by displacement
DIN 53479	Testing of plastics and elastometers; determination of density.

Για υγρές ουσίες

ISO 901	ISO 758

▼B

DIN 51757	Testing of mineral oils and related materials; determination of density
ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 and ASTM D 1481-62	
ASTM D 1298	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method
BS 4714	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method

1.3. Μέθοδος βυθιζόμενου σώματος

DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar coating materials; determination of density; immersed body method

2. **Μέθοδοι πυκνομέτρου**

2.1. Για υγρές ουσίες

ISO 3507	Pycnometers
ISO 758	Liquid chemical products; determination of density at 20 °C
DIN 12797	Gay-Lussac pycnometer (for non-volatile liquids which are not too viscous)
DIN 12798	Liplcin pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than 100, 10^{-6} m^2 s-1 at 15 °C)
DIN 12800	Sprengel pycnometer (for liquids as DIN 12798)
DIN 12801	Reischauer pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than 100,10^{-6} m^2 s^{-1} at 20 °C, applicable in particular also to hydrocarbons and aqueous solutions as well as to liquids with higher vapour pressure, approximately 1 bar at 90 °C)

▼B

DIN 12806	Hubbard pycnometer (for viscous liquids of all types which do not have too high a vapour pressure, in particular also for paints, varnishes and bitumen)
DIN 12807	Bingham pycnometer (for liquids, as in DIN 12801)
DIN 12808	Jaulmes pycnometer (in particular for ethanol-water mixture)
DIN 12809	Pycnometer with ground-in thermometer and capillar)' side tube (for liquids which are not too viscous)
DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar products; determination of density by pycnometer
DIN 51757	Point 7: Testing of mineral oils and related materials; determination of density
ASTM D 297	Section 15: Rubber products — chemical analysis
ASTM D 2111	Method C: Halogenated organic compounds
BS 4699	Method for determination of specific gravity and density of petroleum products (graduated bicapillary pycnometer method)
BS 5903	Method for determination of relative density and density of petroleum products by the capillary-stoppered pycnometer method
NF T 20-053	Chemical products for industrial use — Determination of density of solids in powder and liquids — Pyknometric method

▼B

2.2. Για στερεές ουσίες

ISO 1183	Method B: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics.
NF T 20-053	Chemical products for industrial use — Determination of density of solids in powder and liquids — Pyknometric method
DIN 19683	Determination of the density of soils

3. **Συγκριτικό πυκνόμετρο αέρα**

DIN 55990	Part 3: Prufung von Anstrichstoffen und ahnlichen Beschichtungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte
DIN 53243	Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere; Prufung

▼M1

Α.4. ΤΑΣΗ ΑΤΜΩΝ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η μέθοδος είναι ισοδύναμη προς τη μέθοδο OECD TG 104 (2004).

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα αναθεωρημένη έκδοση της μεθόδου Α.4 (1) περιλαμβάνει έναν επιπρόσθετο τρόπο εξέτασης, την εξέταση με έκχυση: ισόθερμη θερμοβαρυμετρία, μελετημένη για ουσίες με εξαιρετικά χαμηλές τάσεις (μέχρι 10^{-10} Pa). Υπό το πρίσμα αναγκών για διαδικασίες, ιδίως σχετικά με τον προσδιορισμό τάσεων ατμών για ουσίες με χαμηλή τάση ατμών, επαναξιολογούνται και άλλες διαδικασίες της παρούσας μεθόδου όσον αφορά άλλες περιοχές εφαρμοσιμότητας.

Στην κατάσταση θερμοδυναμικής ισορροπίας, η τάση ατμού καθαρής ουσίας είναι συνάρτηση της θερμοκρασίας και μόνο. Οι θεμελιώδεις αρχές περιγράφονται αλλού (2)(3).

Δεν είναι δυνατή η εφαρμογή μίας και μόνης διαδικασίας μέτρησης για ολόκληρη την περιοχή τάσεως ατμών από κάτω των 10^{-10} έως 10^5 Pa. Για τη μέτρηση της τάσης ατμών, οκτώ μέθοδοι περιλαμβάνονται στην παρούσα μέθοδο των οποίων η εφαρμογή είναι δυνατή σε διαφορετικές περιοχές τιμών τάσης. Όσον αφορά την εφαρμογή και την περιοχή μέτρησης, οι διάφορες μέθοδοι συγκρίνονται στον πίνακα 1. Η εφαρμογή των μεθόδων είναι δυνατή μόνο για ενώσεις που δεν αποσυντίθενται υπό τις συνθήκες του πειράματος. Στις περιπτώσεις κατά τις οποίες για τεχνικούς λόγους δεν είναι δυνατή η εφαρμογή των πειραματικών μεθόδων, η τάση ατμών μπορεί επίσης να εκτιμηθεί, οπότε στο Προσάρτημα περιγράφεται κάποια συνιστώμενη μέθοδος εκτίμησης.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Η τάση ατμών ουσίας ορίζεται ως η τάση κορεσμού υπεράνω στερεάς ή υγρής ουσίας.

Πρέπει να χρησιμοποιείται η μονάδα πίεσης του ΔΣ (Διεθνές σύστημα — SI) που είναι το πασκάλ (Pa). Άλλες μονάδες που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά το παρελθόν δίδονται στη συνέχεια μαζί με τους συντελεστές μετατροπής τους.

1 Torr	=	1 mm Hg	=	$1{,}333 \times 10^2$ Pa
1 ατμόσφαιρα	=	$1{,}013 \times 10^5$ Pa		
1 bar	=	10^5 Pa		

Η μονάδα θερμοκρασίας του ΔΣ είναι ο βαθμός Κέλβιν (K). Η μετατροπή βαθμών Κελσίου σε βαθμούς Κέλβιν γίνεται με τον τύπο:

$$T = t + 273{,}15$$

όπου T είναι η θερμοκρασία Κέλβιν, ή θερμοδυναμική θερμοκρασία, και t η θερμοκρασία Κελσίου.

▼**M1**

Πίνακας 1

Μέθοδος μέτρησης	Ουσίες		Εκτιμώμενη επαναληψιμότητα	Εκτιμώμενη αναπαραγωγιμότητα	Συνιστώμενη περιοχή τιμών
	Στερεές	υγρές			
Δυναμική μέθοδος	Με χαμηλό σημείο τήξης	Ναι	Μέχρι και 25 % 1 έως 5 %	Μέχρι και 25 % 1 έως 5 %	10^3 Pa έως 2×10^3 Pa 2×10^3 Pa έως 10^5 Pa
Στατική μέθοδος	Ναι	Ναι	5 έως 10 %	5 έως 10 %	10 Pa έως 10^5 Pa 10^{-2} Pa έως 10^5 Pa (1)
Μέθοδος ισοτενισκοπίου	Ναι	Ναι	5 έως 10 %	5 έως 10 %	10^2 Pa έως 10^5 Pa
Μέθοδος έκχυσης: ζυγός τάσης ατμών	Ναι	Ναι	5 έως 20 %	Μέχρι και 50 %	10^{-3} Pa έως 1 Pa
Μέθοδος έκχυσης: Κυψελίδα Κνούντσεν	Ναι	Ναι	10 έως 30 %	—	10^{-10} Pa έως 1 Pa
Μέθοδος έκχυσης: ισόθερμη θερμοβαρυμετρία	Ναι	Ναι	5 έως 30 %	Μέχρι και 50 %	10^{-10} Pa έως 1 Pa
Μέθοδος με κορεσμό αερίου	Ναι	Ναι	10 έως 30 %	Μέχρι και 50 %	10^{-10} Pa έως 10^3 Pa
Μέθοδος περιδινούμενου στροφέα	Ναι	Ναι	10 έως 20 %	—	10^{-4} Pa έως 0,5 Pa

(1) Όταν χρησιμοποιείται μανόμετρο χωρητικότητας.

1.3. ΑΡΧΗ ΑΚΟΛΟΥΘΟΥΜΕΝΗ ΓΙΑ ΤΗ ΔΟΚΙΜΗ

Γενικώς η τάση ατμών προσδιορίζεται σε διάφορες θερμοκρασίες. Σε περιορισμένη περιοχή θερμοκρασιών, ο λογάριθμος της τάσης ατμών καθαρής ουσίας αποτελεί γραμμική συνάρτηση του αντιστρόφου της θερμοδυναμικής θερμοκρασίας, σύμφωνα με την απλουστευμένη εξίσωση Clapeyron-Clausius:

$$\log p = \frac{\Delta Hv}{2{,}3RT} + \sigma\tau\alpha\theta\varepsilon\rho\acute{\alpha}$$

όπου:

p = η τάση ατμών σε πασκάλ

ΔHv = η θερμότητα εξάτμισης σε J mol^{-1}

R = η παγκόσμια σταθερά των αερίων, 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

T = η θερμοκρασία σε βαθμούς K

▼**M1**

1.4. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Η χρησιμοποίηση ουσιών αναφοράς δεν είναι αναγκαία. Χρησιμεύουν πρωταρχικά για τον έλεγχο της εκτέλεσης μεθόδου κατά διαστήματα καθώς επίσης για να καθιστούν δυνατή τη σύγκριση μεταξύ αποτελεσμάτων διάφορων μεθόδων.

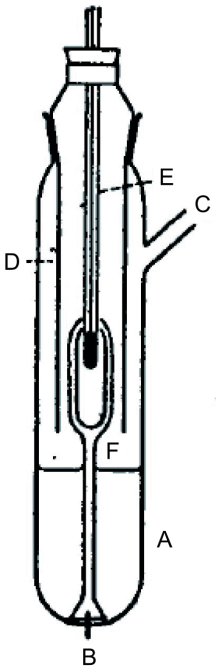
1.5. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.5.1. **Δυναμική μέθοδος (Μέθοδος Cottrell)**

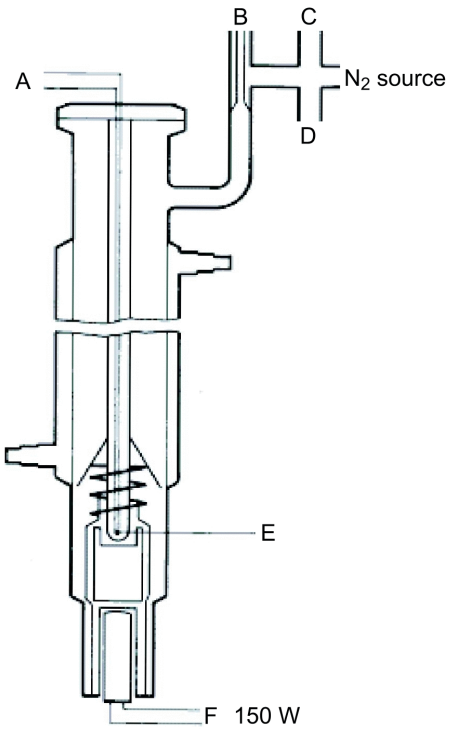
1.5.1.1. *Αρχή*

Η τάση ατμών προσδιορίζεται με μέτρηση της θερμοκρασίας ζέσεως της ουσίας σε διάφορες προδιαγραφόμενες πιέσεις, χονδρικά μεταξύ 10^3 και 10^5 Pa. Η μέθοδος αυτή συνιστάται επίσης για τον προσδιορισμό της θερμοκρασίας ζέσεως. Για το σκοπό αυτό είναι χρήσιμη μέχρι 600 βαθμούς K. Λόγω της υδροστατικής πίεσης της στήλης υγρού, οι θερμοκρασίες ζέσεως υγρών είναι περίπου κατά 0,1 °C υψηλότερες σε βάθος 3 έως 4 cm σε σχέση με την επιφάνεια. Στη μέθοδο Cottrell (4) το θερμόμετρο τοποθετείται εντός του ατμού υπεράνω της επιφάνειας του υγρού ενώ το ζέον υγρό αυτοαντλείται συνεχώς προσπίπτοντας επάνω στο βολβό του θερμομέτρου. Ο βολβός καλύπτεται από λεπτό στρώμα υγρού που βρίσκεται σε ισορροπία με τον ατμό υπό ατμοσφαιρική πίεση. Έτσι το θερμόμετρο δείχνει το αληθές σημείο ζέσεως, χωρίς σφάλματα λόγω υπερθέρμανσης ή υδροστατικής πίεσης. Η αντλία που χρησιμοποιήθηκε αρχικώς από τον Cottrell παρουσιάζεται στο σχήμα 1. Ο σωλήνας A περιέχει το ζέον υγρό. Την ομοιόμορφη ζέση διευκολύνει σύρμα λευκοχρύσου B ενσφράγιστο στον πυθμένα. Ο πλευρικός σωλήνας C οδηγεί σε συμπυκνωτή ενώ ο μανδύας D δεν επιτρέπει στο ψυχρό συμπύκνωμα να φθάνει στο θερμόμετρο E. Όταν το υγρό στο σωλήνα A ζέει, φυσαλίδες και υγρό που έχουν παγιδευτεί από τη χοάνη χύνονται μέσω των δύο βραχιόνων της αντλίας F επάνω στο βολβό του θερμομέτρου.

Σχήμα 1



Σχήμα 2



▼**M1**

Αντλία Cottrell (4)

A: Θερμοηλεκτρικό στοιχείο

B: Παρένθετος θάλαμος κενού

C: Μετρητής πίεσης

D: Κενό

E: Σημείο μέτρησης

F: Θερμαντικό στοιχείο ισχύος περίπου 150 W

1.5.1.2. *Συσκευές*

Στο σχήμα 2 παρουσιάζεται συσκευή πολύ μεγάλης ακριβείας, όπου εφαρμόζεται η αρχή Cottrell. Αποτελείται από σωλήνα με τμήμα ζέσεως στο κάτω μέρος του, με ψύκτη στο μεσαίο μέρος και έξοδο και φλάντζα στο άνω μέρος. Η αντλία Cottrell τοποθετείται στο τμήμα ζέσεως το οποίο θερμαίνεται με ηλεκτρικό στοιχείο. Η θερμοκρασία μετριέται με θερμοστοιχείο εντός μανδύα ή με θερμόμετρο αντίστασης εισαγόμενο μέσω της φλάντζας στο άνω μέρος. Η έξοδος συνδέεται με το σύστημα ρύθμισης της πίεσης. Το τελευταίο αυτό αποτελείται από αντλία κενού, παρένθετο θάλαμο, πιεσοστάτη στην υποδοχή αζώτου για ρύθμιση της πίεσης και μανόμετρο.

1.5.1.3. *Διαδικασία*

Η ουσία τοποθετείται στο τμήμα ζέσεως. Για μη κονιοποιημένα στερεά μπορεί να ανακύψουν προβλήματα τα οποία όμως μερικές φορές είναι δυνατόν να λυθούν με θέρμανση του μανδύα ψύξης. Η συσκευή σφραγίζεται στην φλάντζα και από την ουσία αφαιρούνται τα αέρια. Με τη μέθοδο αυτή δεν είναι δυνατή η μέτρηση για αφρίζουσες ουσίες.

Στη συνέχεια ρυθμίζεται η πίεση στη χαμηλότερη επιθυμητή τιμή και τίθεται σε λειτουργία η θέρμανση. Ταυτοχρόνως ο αισθητήρας θερμοκρασίας συνδέεται σε καταγραφικό όργανο.

Όταν υπό σταθερή πίεση καταγράφεται σταθερή θερμοκρασία ζέσεως, έχει επιτευχθεί ισορροπία. Πρέπει να λαμβάνεται ιδιαίτερη μέριμνα για την αποφυγή κραδασμών κατά τη ζέση. Επί πλέον, ή συμπύκνωση στον ψύκτη πρέπει να είναι τέλεια. Κατά τον προσδιορισμό της τάσεως ατμών για στερεά χαμηλού σημείου τήξεως πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για την αποφυγή έμφραξης του συμπυκνωτή.

Μετά την καταγραφή αυτού του σημείου ισορροπίας, η πίεση ρυθμίζεται σε υψηλότερη τιμή. Η διαδικασία συνεχίζεται με τον ίδιο τρόπο μέχρι την τιμή των 10^5 Pa (συνολικά περίπου 5 ως 10 σημεία μέτρησης). Προς έλεγχο πρέπει να γίνεται επανάληψη για τα σημεία ισορροπίας σε περίπτωση πιέσεων που μειώνονται.

1.5.2. **Στατική μέθοδος**

1.5.2.1. *Αρχή*

Κατά τη στατική μέθοδο (5) η τάση ατμών κατά τη θερμοδυναμική ισορροπία προσδιορίζεται για καθορισμένη θερμοκρασία. Η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη για ουσίες και πολυσύνθετα υγρά και στερεά στην περιοχή από 10 έως 10^5 Pa και, εφόσον ληφθεί σχετική μέριμνα, και στην περιοχή 1 έως 10 Pa.

▼**M1**

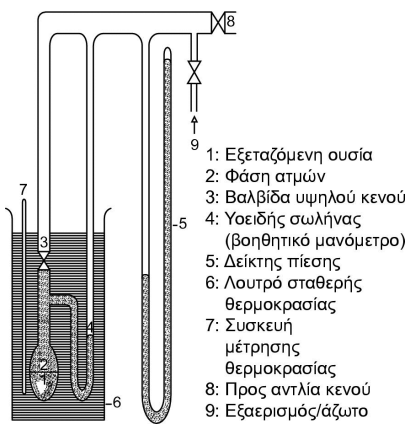
1.5.2.2. *Συσκευές*

Ο τεχνικός εξοπλισμός αποτελείται από λουτρό σταθερής θερμοκρασίας (ακρίβεια ± 0,2 K), περιέκτη για το δείγμα συνδεόμενο με γραμμή κενού, μανόμετρο και σύστημα ρύθμισης της πίεσης. Ο θάλαμος δείγματος (σχήμα 3α) συνδέεται με τη γραμμή κενού μέσω βαλβίδας και διαφορικού μανομέτρου (υοειδής σωλήνας ο οποίος περιέχει υγρό κατάλληλο για μανόμετρο) που χρησιμεύει ως δείκτης μηδενός. Κατάλληλα για χρήση στο διαφορικό μανόμετρο είναι ο υδράργυρος, σιλικόνες και φθαλικές ενώσεις, ανάλογα με την περιοχή τιμών τάσης και τη χημική συμπεριφορά της υπό εξέταση ουσίας. Πάντως, εφόσον είναι δυνατόν, η χρήση υδραργύρου πρέπει να αποφεύγεται για λόγους περιβαλλοντικούς. Η υπό εξέταση ουσία δεν πρέπει να διαλύεται σε βαθμό αισθητό στο υγρό του υοειδή σωλήνα ή να αντιδρά με αυτό. Αντί για υοειδή σωλήνα είναι δυνατή η χρήση μανομέτρου (σχήμα 3β). Στο μανόμετρο είναι δυνατή η χρήση υδραργύρου στην περιοχή τιμών από την κανονική πίεση μέχρι 10^2 Pa ενώ τα υγρά σιλικόνης και οι φθαλικές ενώσεις είναι κατάλληλες για χρήση κάτω από 10^2 Pa και μέχρι 10 Pa. Υπάρχουν άλλα μανόμετρα που μπορεί να χρησιμοποιούνται για πιέσεις κάτω από 10^2 Pa ενώ τα μανόμετρα χωρητικότητας με θερμαινόμενη μεμβράνη είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν ακόμη και κάτω από 10^{-1} Pa. Η θερμοκρασία μετριέται στο εξωτερικό τοίχωμα του σκεύους που περιέχει το δείγμα ή στο ίδιο το σκεύος.

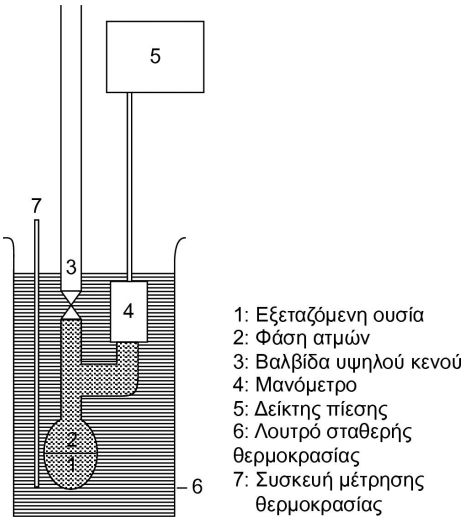
1.5.2.3. *Διαδικασία*

Χρησιμοποιείται η συσκευή που παρίσταται στο σχήμα 3α. Ο υοειδής σωλήνας πληρώνεται με το υγρό που έχει επιλεχθεί και το οποίο, πριν ληφθούν αποτελέσματα μετρήσεων, πρέπει να απαλλαχθεί από αέρια με αύξηση της θερμοκρασίας. Η εξεταζόμενη ουσία τοποθετείται στη συσκευή και απαλλάσσεται από αέρια σε μειωμένη θερμοκρασία. Στην περίπτωση πολυσύνθετου δείγματος η θερμοκρασία πρέπει να είναι επαρκώς χαμηλή ώστε να διασφαλίζεται ότι δεν αλλοιώνεται η σύνθεση του υλικού. Ισορροπία είναι δυνατόν να επιτευχθεί ταχύτερα με ανάδευση. Το δείγμα μπορεί να ψυχθεί με υγρό άζωτο ή ξηρό πάγο πρέπει όμως να ληφθεί μέριμνα για την αποφυγή συμπύκνωσης ατμών του αέρα του αντλούμενου υγρού. Με τη βαλβίδα που βρίσκεται επάνω από το σκεύος του δείγματος ανοικτή εφαρμόζεται επί μερικά λεπτά αναρρόφηση για την αφαίρεση του αέρα. Εφόσον απαιτείται, η διαδικασία αφαίρεσης αερίων επαναλαμβάνεται αρκετές φορές.

Σχήμα 3α



Σχήμα 3β



▼**M1**

Όταν το δείγμα θερμαίνεται με τη βαλβίδα κλειστή, η τάση των ατμών αυξάνει. Έτσι μεταβάλλεται η ισορροπία στο υγρό του υοειδή σωλήνα. Για την αντιστάθμιση αυτής της μεταβολής, αφήνεται να εισέλθει στη συσκευή άζωτο ή αέρας μέχρις ότου ο δείκτης διαφορικής πίεσης επανέλθει στο μηδέν. Η απαιτούμενη γι αυτό πίεση μπορεί να αναγνωσθεί στο μανόμετρο ή σε όργανο υψηλότερης ακριβείας. Η πίεση αυτή αντιστοιχεί στην τάση ατμών της ουσίας στη θερμοκρασία της μέτρησης. Όταν χρησιμοποιείται η συσκευή που περιγράφεται στο σχήμα 3β, η ανάγνωση της τάσης ατμών γίνεται απευθείας.

Η τάση ατμών προσδιορίζεται σε καταλλήλως μικρά διαστήματα θερμοκρασίας (συνολικά περίπου 5 έως 10 σημεία μέτρησης) μέχρι την επιθυμητή ανώτατη θερμοκρασία.

Προς έλεγχο πρέπει να επαναλαμβάνονται λήψεις μετρήσεων για χαμηλές θερμοκρασίες. Αν οι τιμές που λαμβάνονται κατά την επανάληψη μετρήσεων βρίσκονται εκτός της καμπύλης που έχει προκύψει για αυξημένη θερμοκρασία, αυτό μπορεί να οφείλεται σε κάποιον από τους ακόλουθους λόγους:

i) το δείγμα εξακολουθεί να περιέχει αέρα (π.χ. στην περίπτωση υλικών υψηλού ιξώδους) ή κατά τη θέρμανση ελευθερώνεται (-ονται) ουσία(-ες) χαμηλού σημείου ζέσεως·

ii) η ουσία υφίσταται χημική αντίδραση στη διερευνώμενη περιοχή θερμοκρασιών (π.χ. αποσύνθεση, πολυμερισμός).

1.5.3. **Μέθοδος ισοτενισκοπίου**

1.5.3.1. *Αρχή*

Το ισοτενισκόπιο (6) βασίζεται στην αρχή της στατικής μεθόδου. Η μέθοδος προβλέπει την τοποθέτηση δείγματος σε βολβοειδή υποδοχή που διατηρείται υπό σταθερή θερμοκρασία και συνδέεται με μανόμετρο και αντλία κενού. Ακαθαρσίες πτητικότερες από την ουσία αφαιρούνται με απαλλαγή από αέρια σε μειωμένη πίεση. Η τάση ατμών του δείγματος σε επιλεγμένες θερμοκρασίες εξισορροπείται από γνωστή πίεση αδρανούς αερίου. Το ισοτενισκόπιο αναπτύχθηκε για τη μέτρηση της τάσης ατμών ορισμένων υγρών υδρογονανθράκων αλλά είναι κατάλληλο για την εξέταση και στερεών. Συνήθως η μέθοδος δεν είναι κατάλληλη για πολυσύνθετα συστήματα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζουν μικρά σφάλματα μόνο για δείγματα που περιέχουν μη πτητικές ακαθαρσίες. Η συνιστώμενη περιοχή τιμών είναι 10^2 έως 10^5 Pa.

1.5.3.2. *Συσκευές*

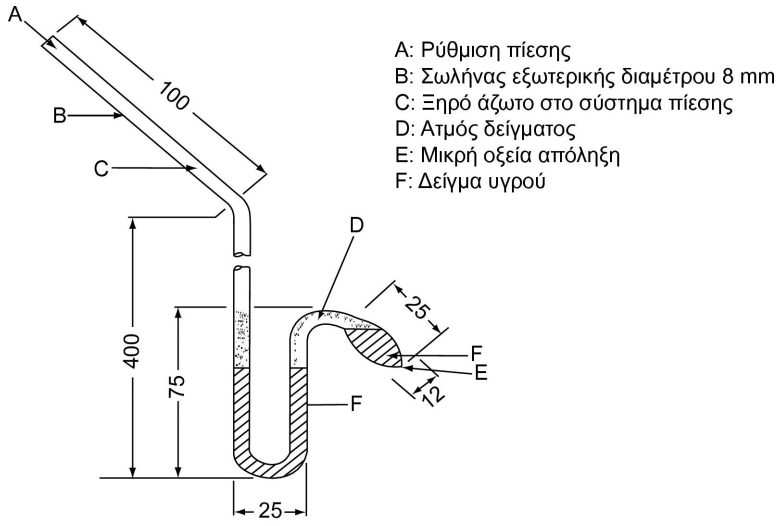
Στο σχήμα 4 παρουσιάζεται παράδειγμα συσκευής μέτρησης. Πλήρης περιγραφή περιέχεται στο ASTM D 2879-86 (6).

▼**M1**

1.5.3.3. *Διαδικασία*

Στην περίπτωση των υγρών, ως υγρό στο διαφορικό μανόμετρο χρησιμοποιείται η ίδια η ουσία. Στο ισοτενισκόπιο τοποθετείται ποσότητα του υγρού επαρκής για την πλήρωση της βολβοειδούς υποδοχής και του βραχέος σκέλους του μανομέτρου. Το ισοτενισκόπιο συνδέεται με σύστημα κενού, εκκενώνεται και στη συνέχεια πληρούται με άζωτο. Η εκκένωση και η έκπλυση του συστήματος επαναλαμβάνονται δύο φορές για να απομακρυνθεί το εναπομένον οξυγόνο. Το ισοτενισκόπιο που έχει πληρωθεί τοποθετείται σε οριζόντια θέση έτσι ώστε το δείγμα απλώνεται και σχηματίζει λεπτό στρώμα στη βολβοειδή υποδοχή δείγματος και στο μανόμετρο. Η πίεση του συστήματος μειώνεται σε 133 Pa και το δείγμα θερμαίνεται ήπια μέχρις ότου μόλις αρχίσει να ζέει (απομάκρυνση αερίων σε διάλυση). Στη συνέχεια το ισοτενισκόπιο τοποθετείται έτσι ώστε το δείγμα επιστρέφει στη βολβοειδή υποδοχή και πληροί το βραχύ σκέλος του μανομέτρου. Η πίεση διατηρείται στα 133 Pa. Η προέχουσα απόληξη της βολβοειδούς υποδοχής δείγματος θερμαίνεται με μικρή φλόγα μέχρις ότου ο απελευθερούμενος ατμός του δείγματος επεκταθεί επαρκώς ώστε να εκτοπίσει μέρος του δείγματος από το άνω μέρος της βολβοειδούς υποδοχής και του βραχίονα του μανομέτρου στο μανόμετρο, δημιουργώντας χώρο πλήρη με ατμό και ελεύθερο από άζωτο. Κατόπιν το ισοτενισκόπιο τοποθετείται σε λουτρό σταθερής θερμοκρασίας και η πίεση του αζώτου ρυθμίζεται μέχρις ότου εξισωθεί προς την πίεση του δείγματος. Κατά την ισορροπία η πίεση του αζώτου είναι ίση προς την τάση ατμών της ουσίας.

Σχήμα 4



(Διαστάσεις σε mm)

Στην περίπτωση στερεών, και ανάλογα με τις περιοχές τιμών της πίεσης και της θερμοκρασίας, χρησιμοποιούνται ως υγρά μανομέτρου υγρά σιλικόνης ή φθαλικές ενώσεις. Το απαλλαγμένο αερίων υγρό μανομέτρου τοποθετείται σε διεύρυσμα που υπάρχει στο μακρό βραχίονα του ισοτενισκοπίου. Στη συνέχεια το εξεταζόμενο στερεό τοποθετείται στη βολβοειδή υποδοχή δείγματος και απαλλάσσεται από αέρια σε αυξημένη θερμοκρασία. Μετά από αυτά το ισοτενικόσπιο τοποθετείται με κλίση έτσι ώστε το υγρό του μανομέτρου να μπορεί να ρέει στον υοειδή σωλήνα.

▼**M1**

1.5.4. **Μέθοδος έκχυσης: ζυγός τάσης ατμών** (7)

1.5.4.1. *Αρχή*

Δείγμα της εξεταζόμενης ουσίας θερμαίνεται σε μικρό κλίβανο και τοποθετείται σε γυάλινο κώδωνα υπό κενό. Ο κλίβανος καλύπτεται με κάλυμμα το οποίο φέρει μικρές οπές γνωστών διαμέτρων. Ο ατμός της ουσίας, που διαφεύγει μέσω κάποιας από τις οπές, κατευθύνεται σε δίσκο ζύγισης ζυγού υψηλής ευαισθησίας ο οποίος επίσης περικλείεται στο γυάλινο κώδωνα υπό κενό. Σε ορισμένους τύπους κατασκευής ο δίσκος ζύγισης περιβάλλεται από κιβώτιο ψύξης, για τη διάχυση θερμότητας προς το εξωτερικό με αγωγή, και ψύχεται με ακτινοβολία ώστε να συμπυκνώνεται επάνω του ο διαφεύγων ατμός. Επί του ζυγού επενεργεί ως δύναμη η ορμή της δέσμης ατμού. Η τάση ατμών μπορεί να συναχθεί με δύο τρόπους: άμεσα από τη δύναμη επί του δίσκου ζύγισης καθώς επίσης από την ταχύτητα εξάτμισης με την εξίσωση Hertz-Knudsen (2):

$$p = G\sqrt{\frac{2\,\pi RT\ \times 10^3}{M}}$$

όπου:

G = ταχύτητα εξάτμισης (kg s^{-1} m^{-2})

M = μοριακή μάζα (g mol^{-1})

T = θερμοκρασία (K)

R = παγκόσμια σταθερά των αερίων (J mol^{-1} K^{-1})

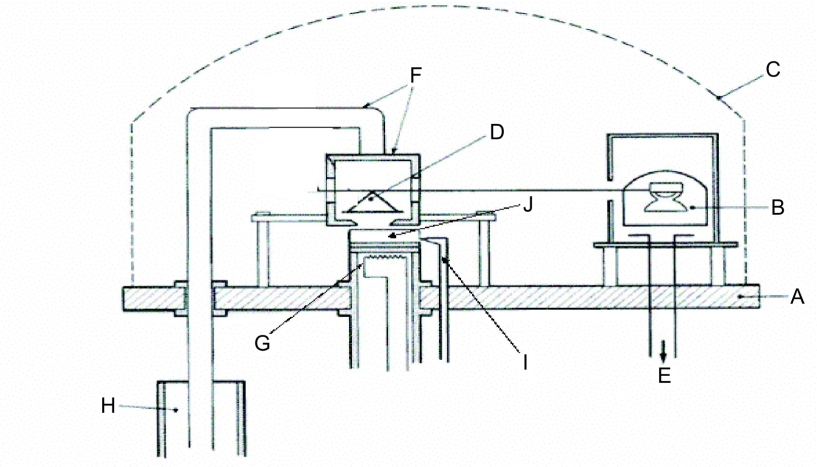
p = τάση ατμών (Pa)

Η συνιστώμενη περιοχή τιμών είναι 10^{-3} έως 1 Pa.

1.5.4.2. *α) Συσκευές*

Η γενική αρχή της συσκευής παρουσιάζεται στο σχήμα 5.

Σχήμα 5



A: Πλάκα βάσης

B: Όργανο κινητού πηνίου

C: Γυάλινος κώδωνας

D: Ζυγός με δίσκο ζύγισης

E: Συσκευή μέτρησης κενού

F: Κιβώτιο ψύξης και ψυκτική ράβδος

G: Κλίβανος για εξάτμιση

H: Δοχείο Ντιούαρ με υγρό άζωτο

I: Μέτρηση θερμοκρασίας δείγματος

J: Εξεταζόμενη ουσία

▼**M1**

1.5.5. **Μέθοδος έκχυσης: κυψελίδα Κνούντσεν**

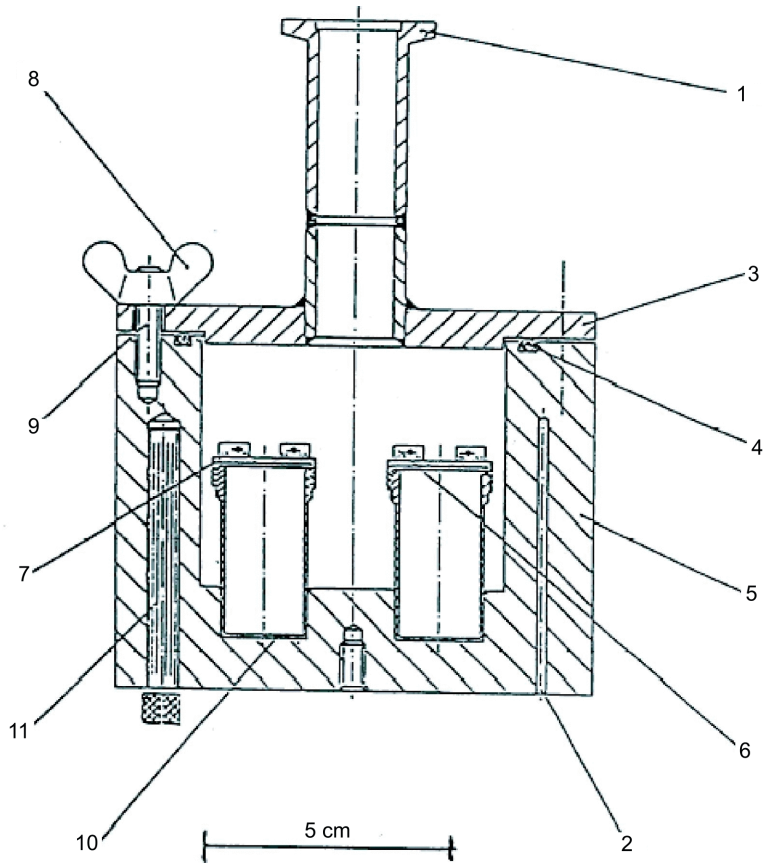
1.5.5.1. *Αρχή*

Η μέθοδος βασίζεται στην εκτίμηση της μάζας εξεταζόμενης ουσίας που εκρέει ανά μονάδα χρόνου από κυψελίδα Knudsen (8) υπό μορφή ατμού, μέσω μικροανοίγματος υπό συνθήκες υπερυψηλού κενού. Η μάζα εκχεόμενου ατμού είναι δυνατόν να προκύψει είτε με προσδιορισμό της απώλειας μάζας της κυψελίδας είτε με συμπύκνωση του ατμού σε χαμηλή θερμοκρασία και προσδιορισμό της ποσότητας ουσίας που εξατμίστηκε με χρησιμοποίηση χρωματογραφίας. Η τάση ατμών υπολογίζεται εφαρμόζοντας τη σχέση Hertz-Knudsen (βλέπε σημείο 1.5.4.1) με διορθωτικούς συντελεστές που εξαρτώνται από παραμέτρους της συσκευής (9). Η συνιστώμενη περιοχή τιμών είναι 10^{-10} έως 1 Pa (10)(11)(12)(13)(14).

1.5.5.2. *Συσκευές*

Η γενική αρχή της συσκευής παρουσιάζεται στο σχήμα 6.

Σχήμα 6



1: Σύνδεση προς κενό

2: Κοιλότητες από θερμόμετρο αντίστασης λευκοχρύσου

3: Κάλυμμα για δοχείο κενού

4: Δακτύλιος Ο

5: Δοχείο κενού από αλουμίνιο

6: Συσκευή για τοποθέτηση και αφαίρεση των κυψελίδων έκχυσης

7: Κοχλιοτομημένο κάλυμμα

8: Περικόχλια (παξιμάδια) τύπου πεταλούδας ή μέτρηση και ρύθμιση θερμοκρασίας

9: Αμφικόχλια (βίδες με παξιμάδια)

10: Κυψελίδες έκχυσης από ανοξείδωτο χάλυβα

11: Θερμαντικό στοιχείο

▼**M1**

1.5.6. **Μέθοδος έκχυσης: ισόθερμη θερμοβαρυμετρία**

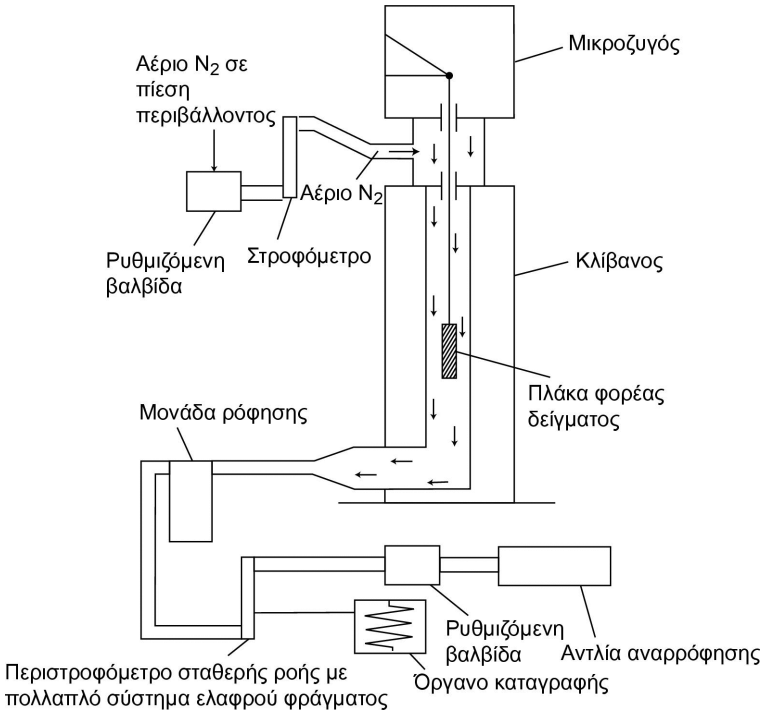
1.5.6.1. *Αρχή*

Η μέθοδος βασίζεται στον προσδιορισμό επιταχυνόμενων ρυθμών εξάτμισης για την εξεταζόμενη ουσία σε αυξημένες θερμοκρασίες και πίεση περιβάλλοντος με χρήση θερμοβαρυμετρίας (10)(15)(16)(17)(18)(19)(20). Οι ταχύτητες εξάτμισης v_T προκύπτουν με την έκθεση της επιλεχθείσας ένωσης σε ατμόσφαιρα βραδέως ρέοντος αδρανούς αερίου και την παρακολούθηση της απώλειας βάρους σε καθορισμένες ισόθερμες θερμοκρασίες Κέλβιν T κατά τα ενδεδειγμένα χρονικά διαστήματα. Οι τάσεις ατμών p_T υπολογίζονται από τις τιμές v_T με εφαρμογή της γραμμικής σχέσης μεταξύ του λογαρίθμου της τάσης ατμών και του λογαρίθμου της ταχύτητας εξάτμισης. Εφόσον είναι αναγκαίο, είναι δυνατή η παρεκβολή σε θερμοκρασίες 20 και 25 °C με ανάλυση παλινδρόμησης του log pT προς 1/T. Η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη για ουσίες με τάσεις ατμών έως 10^{-10} Pa (10^{-12} mbar) και με καθαρότητα κατά το δυνατόν πλησιέστερη προς 100 % ώστε να αποφεύγεται η παρερμηνεία των μετρούμενων απωλειών βάρους.

1.5.6.2. *Συσκευές*

Στο σχήμα 7 παρουσιάζεται η γενική αρχή της πειραματικής διάταξης.

Σχήμα 7



Η πλάκα φορέας του δείγματος, εξαρτημένη από μικροζυγό σε θάλαμο ελεγχόμενης θερμοκρασίας, σαρώνεται από ρεύμα ξηρού αερίου αζώτου το οποίο παρασύρει τα εξατμισθέντα μόρια της εξεταζόμενης ουσίας. Μετά την έξοδο από το θάλαμο, το αέριο ρεύμα υφίσταται καθαρισμό σε μονάδα ρόφησης.

1.5.6.3. *Διαδικασία*

Η εξεταζόμενη ουσία τοποθετείται ως ομοιογενές στρώμα στην επιφάνεια γυάλινης πλάκας που έχει τραχυνθεί. Στην περίπτωση στερεών, η πλάκα βρέχεται ομοιομόρφως με διάλυμα της ουσίας σε κατάλληλο διαλύτη και ξηραίνεται σε αδρανή ατμόσφαιρα. Για τη μέτρηση, η επικαλυμμένη επιφάνεια κρέμεται μέσα στο θερμοβαρυμετρικό αναλυτή και στη συνέχεια μετριέται συνεχώς η απώλεια βάρους της σε συνάρτηση με το χρόνο.

▼**M1**

Η ταχύτητα εξάτμισης v_T σε καθορισμένη θερμοκρασία υπολογίζεται από την απώλεια βάρους Δm της πλάκας με το δείγμα με τη σχέση

$$v_T = \frac{\Delta m}{F \cdot t} \ (gcm^{-2}h^{-1})$$

όπου F είναι το εμβαδόν της επιφάνειας των επικαλυμμένων εξεταζόμενων ουσιών, κανονικά το εμβαδόν της επιφάνειας της πλάκας με το δείγμα, και t ο χρόνος για την απώλεια βάρους Δm.

Η τάση ατμών p_T υπολογίζεται με βάση τη συνάρτησή της με την ταχύτητα εξάτμισης v_T:

$$\text{Log } p_T = C + D \text{ log } v_T$$

όπου C και D είναι σταθερές ίδιες της χρησιμοποιούμενης πειραματικής διάταξης, εξαρτώμενες από τη διάμετρο του θαλάμου μέτρησης και από την ταχύτητα ροής του αερίου. Οι σταθερές αυτές πρέπει να προσδιορίζονται άπαξ με μέτρηση συνόλου ενώσεων γνωστής τάσης ατμών και παλινδρόμηση log p_T προς log v_T (11)(21)(22).

Η σχέση μεταξύ της τάσης ατμών p_T και της θερμοκρασίας Κέλβιν T δίδεται από τη σχέση

$$\text{Log } p_T = A + B \ 1/T$$

όπου A και B είναι σταθερές που προκύπτουν με την παλινδρόμηση log p_T προς 1/T. Με την εξίσωση αυτή η τάση ατμών μπορεί να υπολογιστεί για κάθε άλλη θερμοκρασία με παρεκβολή.

1.5.7. **Μέθοδος με κορεσμό αερίου** (23)

1.5.7.1. *Αρχή*

Σε θερμοκρασία χώρου και με γνωστή παροχή διέρχεται αδρανές αέριο μέσω ή υπεράνω δείγματος της εξεταζόμενης ουσίας, αρκετά βραδέως ώστε να εξασφαλίζεται ο κορεσμός. Η επίτευξη κορεσμού στην αέρια φάση είναι κρίσιμης σημασίας. Η μεταφερόμενη ουσία παγιδεύεται, γενικώς με χρησιμοποίηση ροφητή, και προσδιορίζεται η ποσότητά της. Εναλλακτικώς προς την παγίδευση ατμού και την επακόλουθη ανάλυση, για τον προσδιορισμό της ποσότητας μεταφερόμενης ύλης είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν εντός διαδικασίας αναλυτικές τεχνικές όπως η αέρια χρωματογραφία. Η τάση ατμών υπολογίζεται με την παραδοχή ότι ισχύει ο νόμος των τελείων αερίων και ότι η συνολική τάση μείγματος αερίων ισούται προς το άθροισμα των τάσεων των συστατικών αερίων. Η μερική τάση της εξεταζόμενης ουσίας, δηλαδή η τάση ατμών, υπολογίζεται από το γνωστό ολικό όγκο αερίου και από το βάρος της μεταφερθείσας ύλης.

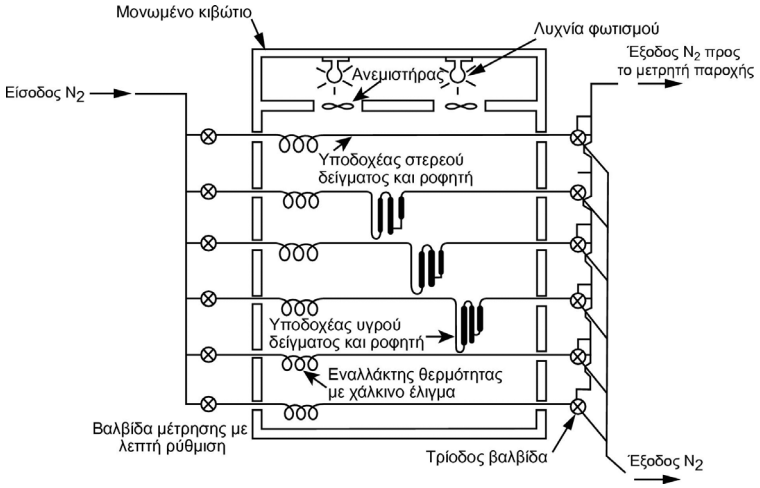
Η διαδικασία κορεσμού αερίου μπορεί να εφαρμόζεται για στερεές ή υγρές ουσίες. Είναι δυνατή η χρήση της για τάσεις ατμών χαμηλές μέχρι 10^{-10} Pa (10)(11)(12)(13)(14). Η μέθοδος παρουσιάζει τη μέγιστη αξιοπιστία για τάσεις ατμών κάτω των 10^3 Pa. Άνω των 10^3 Pa οι τάσεις ατμών γενικώς υπερεκτιμώνται, πιθανώς λόγω σχηματισμού αερολυμάτων. Εφόσον οι μετρήσεις τάσεων ατμών εκτελούνται σε θερμοκρασία χώρου, δεν είναι αναγκαία η παρεκβολή δεδομένων για υψηλές θερμοκρασίες και αποφεύγεται η παρεκβολή για υψηλή θερμοκρασία, η οποία συχνά μπορεί να προκαλέσει σοβαρά σφάλματα.

1.5.7.2. *Συσκευές*

Η διαδικασία απαιτεί τη χρήση κιβωτίου σταθερής θερμοκρασίας. Το σκαρίφημα στο σχήμα 8 παρουσιάζει κιβώτιο όπου υπάρχουν τρεις υποδοχείς στερεού δείγματος και τρεις υποδοχείς υγρού δείγματος, οπότε είναι δυνατός ο τριπλασιασμός ανάλυσης είτε στερεού είτε υγρού δείγματος. Η ρύθμιση θερμοκρασίας πραγματοποιείται μέχρι ± 0,5 °C ή λιγότερο.

▼**M1**

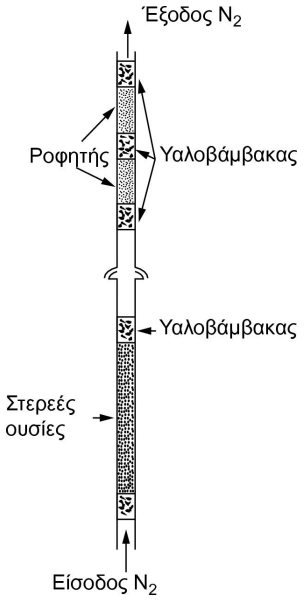
Σχήμα 8



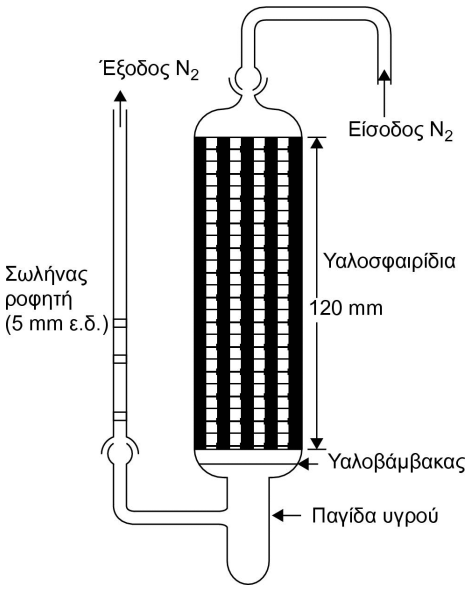
Γενικώς, ως αδρανής αέριος φορέας χρησιμοποιείται το άζωτο αλλά, περιστασιακά, είναι δυνατόν να απαιτείται κάποιο άλλο αέριο (24). Ο αέριος φορέας πρέπει να είναι ξηρός. Το αέριο ρεύμα διαχωρίζεται σε 6 ρεύματα, ελεγχόμενα από βαλβίδες βελόνας (οπής περίπου 0,79 mm), και εισρέει στο κιβώτιο μέσω χάλκινου σωλήνα εσωτερικής διαμέτρου 3,8 mm. Μετά την επίτευξη θερμοκρασιακής ισορροπίας, το αέριο ρέει μέσω του δείγματος και της παγίδας ροφητή και εξέρχεται από το κιβώτιο.

Τα στερεά δείγματα τοποθετούνται εντός γυάλινων σωλήνων εσωτερικής διαμέτρου 5 mm μεταξύ σβώλων υαλοβάμβακα (βλέπε σχήμα 9). Το σχήμα 10 παρουσιάζει υποδοχέα υγρού δείγματος και σύστημα ροφητή. Η πλέον αναπαραγώγιμη μέθοδος για μέτρηση της τάσης ατμών υγρών είναι η επικάλυψη με το υγρό υαλοσφαιριδίων ή αδρανή ροφητή όπως άμμου και η πλήρωση του υποδοχέα με τα υαλοσφαιρίδια αυτά. Εναλλακτικώς, ο αέριος φορέας είναι δυνατόν να διοχετευθεί μέσα σε τραχείας υφής υαλώδες πυριτικό μείγμα και να σχηματίσει φυσαλίδες διερχόμενος μέσω στήλης της εξεταζόμενης υγρής ουσίας.

Σχήμα 9



Σχήμα 10



▼**M1**

Το σύστημα ροφητή περιλαμβάνει ένα εμπρόσθιο και ένα εφεδρικό τμήμα ροφητή. Σε πολύ χαμηλές τάσεις ατμών από το ροφητή κατακρατούνται μικρές μόνο ποσότητες και η προσρόφηση στον υαλοβάμβακα και στο γυάλινο σωλήνα μεταξύ του δείγματος και του ροφητή μπορεί να αποτελέσει σοβαρό πρόβλημα.

Άλλος αποτελεσματικός τρόπος για τη συλλογή της εξατμισμένης ύλης αποτελούν οι παγίδες που ψύχονται με στερεό CO_2. Οι παγίδες αυτές δεν προκαλούν καθόλου αντίθλιψη στη στήλη του κορεστήρα ενώ είναι ευχερής και η ποσοτική αφαίρεση της παγιδευμένης ύλης.

1.5.7.3. *Διαδικασία*

Η ταχύτητα ροής του εκρέοντος αερίου φορέα μετριέται υπό θερμοκρασία χώρου. Κατά τη διάρκεια του πειράματος η παροχή ελέγχεται συχνά ώστε να διασφαλίζεται η ακρίβεια τιμής για το συνολικό όγκο αερίου φορέα. Είναι προτιμότερη η συνεχής παρακολούθηση με μετρητή παροχής μάζας. Για τον κορεσμό της αέριας φάσης είναι δυνατόν να απαιτηθεί σημαντικός χρόνος επαφής και, κατά συνέπεια, αρκετά χαμηλές παροχές αερίου (25).

Κατά το τέλος του πειράματος αναλύονται ξεχωριστά και το εμπρόσθιο και το εφεδρικό τμήμα του ροφητή. Σε κάθε τμήμα η ένωση εκροφάται με προσθήκη διαλύτη. Τα διαλύματα που προκύπτουν αναλύονται ποσοτικώς για τον προσδιορισμό του βάρους που εκροφήθηκε από κάθε τμήμα. Η επιλογή της αναλυτικής μεθόδου (καθώς και η επιλογή ροφητή και διαλύτη εκρόφησης) υπαγορεύεται από τη φύση του εξεταζόμενου υλικού. Η απόδοση εκρόφησης προσδιορίζεται με έκχυση γνωστής ποσότητας δείγματος στο ροφητή, την εκρόφησή του και την ανάλυση της ανακτώμενης ποσότητας. Είναι σημαντικό να ελέγχεται η απόδοση εκρόφησης στη συγκέντρωση του δείγματος ή πλησίον της υπό τις συνθήκες του πειράματος.

Προκειμένου να διασφαλίζεται ότι ο αέριος φορέας υφίσταται κορεσμό με την εξεταζόμενη ουσία, χρησιμοποιούνται τρεις διαφορετικές παροχές αερίου. Εφόσον η υπολογιζόμενη τάση ατμών δεν εμφανίζει εξάρτηση από την παροχή, θεωρείται ότι το αέριο έχει κορεσθεί.

Η τάση ατμών υπολογίζεται με την εξίσωση:

$$p = \frac{W}{V} \times \frac{RT}{M}$$

όπου:

p = η τάση ατμών (Pa)

W = η μάζα της εξεταζόμενης ουσίας που εξατμίστηκε (g)

V = ο όγκος του κορεσμένου αερίου (m^3)

R = η παγκόσμια σταθερά των αερίων 8,314 (J mol^{-1} K^{-1})

T = η θερμοκρασία (K)

M = η μοριακή μάζα της εξεταζόμενης ουσίας (g mol^{-1})

Οι μετρούμενοι όγκοι πρέπει να διορθώνονται όσον αφορά διαφορές πίεσης και θερμοκρασίας μεταξύ του μετρητή παροχής και του κορεστήρα.

▼**M1**

1.5.8. **Περιδινούμενος στροφέας**

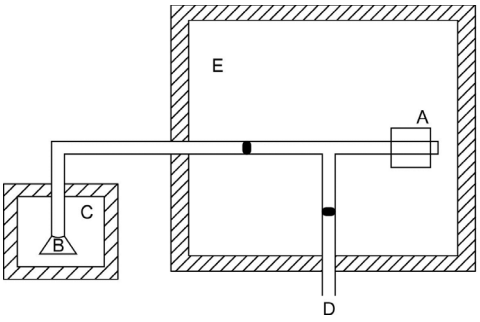
1.5.8.1. *Αρχή*

Η μέθοδος χρησιμοποιεί μετρητή ιξώδους με περιδινούμενο στροφέα, όπου το στοιχείο μέτρησης είναι μικρή χαλύβδινη σφαίρα η οποία, αιωρούμενη σε μαγνητικό πεδίο, τίθεται σε περιδίνηση από περιστρεφόμενα πεδία (26)(27)(28). Με πηνία λήψης είναι δυνατή η μέτρηση της ταχύτητας περιδίνησης. Όταν η σφαίρα αποκτήσει δεδομένη ταχύτητα περιστροφής, συνήθως περίπου 400 περιστροφές ανά δευτερόλεπτο, διακόπτεται ο εξαναγκασμός σε περιδίνηση και επέρχεται επιβράδυνση λόγω τριβής με το αέριο. Μετριέται η πτώση της ταχύτητας περιστροφής ως συνάρτηση του χρόνου. Η τάση ατμών συνάγεται από την εξαρτώμενη από την πίεση επιβράδυνση της χαλύβδινης σφαίρας. Η συνιστώμενη περιοχή τιμών είναι 10^{-4} έως 0,5 Pa.

1.5.8.2. *Συσκευές*

Σχηματικό διάγραμμα της πειραματικής διάταξης παρίσταται στο σχήμα 11. Η κεφαλή μέτρησης τοποθετείται εντός περιβλήματος υπό σταθερή θερμοκρασία ρυθμιζόμενη ανά 0,1 °C. Ο περιέκτης με το δείγμα τοποθετείται σε ξεχωριστό περίβλημα, επίσης υπό θερμοκρασία ρυθμιζόμενη ανά 0,1 °C. Όλα τα υπόλοιπα μέρη της διάταξης βρίσκονται σε υψηλότερη θερμοκρασία ώστε να αποτρέπεται η συμπύκνωση. Ολόκληρη η συσκευή συνδέεται με σύστημα υψηλού κενού.

Σχήμα 11



A: Κεφαλή αισθητήρα περιδινούμενου στροφήρα
B: Κυψελίδα δείγματος
C: Θερμοστάτης
D: Γραμμή κενού (Στροβιλωτή αντλία)
E: Θερμοστάτης αέρα

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

2.1. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Με οποιαδήποτε από τις μεθόδους που αναφέρθηκαν η τάση ατμών πρέπει να προσδιορίζεται για δύο τουλάχιστον θερμοκρασίες. Στην περιοχή από 0 έως 50 °C είναι προτιμότερες τρεις ή περισσότερες ώστε να ελέγχεται η γραμμικότητα της καμπύλης της τάσης ατμών. Στις περιπτώσεις της μεθόδου έκχυσης (κυψελίδα Knudsen και ισόθερμη θερμοβαρυμετρία) καθώς και της μεθόδου με κορεσμό αερίου, για τη θερμοκρασία μέτρησης συνιστάται η περιοχή 120 έως 150 °C αντί της περιοχής 0 έως 50 °C.

2.2. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιέχει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— χρησιμοποιηθείσα μέθοδος,

▼**M1**

— επακριβείς προδιαγραφές της ουσίας (ταυτότητα και προσμείξεις) και προκαταρκτική φάση καθαρισμού, εφόσον υπάρχει,

— τουλάχιστον δύο τιμές τάσης ατμών και θερμοκρασίας — και κατά προτίμηση τρεις η περισσότερες — απαιτούμενες στην περιοχή από 0 έως 50 °C (ή 120 έως 150 °C),

— τουλάχιστον μία από τις θερμοκρασίες πρέπει να είναι ίση ή μικρότερη από 25 °C, εφόσον αυτό είναι τεχνικώς δυνατό για την επιλεχθείσα μέθοδο,

— όλα τα αρχικά δεδομένα,

— καμπύλη του log p συναρτήσει του 1/Τα,

— κατ'εκτίμηση τιμή της τάσης ατμών σε θερμοκρασία 20 ή 25 °C.

Αν παρατηρήθηκε κάποια μεταβατική κατάσταση (μεταβολή κατάστασης, αποσύνθεση), πρέπει να παρέχονται οι ακόλουθες πληροφορίες:

— φύση της μεταβολής,

— θερμοκρασία στην οποία επέρχεται η μεταβολή υπό ατμοσφαιρική πίεση,

— τάση ατμών σε 10 και 20 °C κάτω από τη θερμοκρασία της μεταβατικής κατάστασης και 10 και 20 °C επάνω από τη θερμοκρασία αυτή (εκτός αν πρόκειται για μετάβαση από στερεό σε αέριο).

Πρέπει να αναφέρονται όλες οι πληροφορίες και παρατηρήσεις που έχουν σχέση με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, ιδιαίτερα όσον αφορά τις ακαθαρσίες και τη φυσική κατάσταση της ουσίας.

3. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων*, L 383 A, 26-47 (1992).

(2) Ambrose, D. (1975). Experimental Thermodynamics, Valhi, Vol. II, Le Neindre, B., and Vodar, B., Eds., Butterworths, Λονδίνο.

(3) Weissberger R., (1959). Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Vol. I, Part I. Chapter IX, Interscience Publ., Νέα Υόρκη.

(4) Glasstone, S. (1946). Textbook of Physical Chemistry, 2nd ed., Van Nostrand Company, Νέα Υόρκη.

(5) NF T 20-048 AFNOR (Σεπτέμβριος 1985). Chemical products for industrial use — Determination of vapour pressure of solids and liquids within a range from 10^{-1} to 10^{5} Pa — Static method.

(6) ASTM D 2879-86, Standard test method for vapour pressure — temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.

(7) NF T 20-047 AFNOR (Σεπτέμβριος 1985). Chemical products for industrial use –Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10^{-3} to 1 Pa — Vapour pressure balance method.

▼M1

(8) Knudsen, M. (1909). Ann. Phys. Lpz., 29, 1979; (1911), 34, 593.

(9) Ambrose, D., Lawrenson, I.J., Sprake, C.H.S. (1975). J. Chem. Thermodynamics 7, 1173.

(10) Schmuckler, M.E., Barefoot, A.C., Kleier, D.A., Cobranchi, D.P. (2000), Vapor pressures of sulfonylurea herbicides; Pest Management Science 56, 521-532.

(11) Tomlin, C.D.S. (ed.), The Pesticide Manual, Δωδέκατη έκδοση (2000).

(12) Friedrich, K., Stammbach, K., Gas chromatographic determination of small vapour pressures determination of the vapour pressures of some triazine herbicides. J. Chromatog. 16 (1964), 22-28.

(13) Grayson, B.T., Fosbraey, L.A., Pesticide Science 16 (1982), 269-278.

(14) Rordorf, B.F., Prediction of vapor pressures, boiling points and enthalpies of fusion for twenty-nine halogenated dibenzo-p-dioxins, Thermochimia Acta 112 Issue 1 (1987), 117-122.

(15) Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection; Pesticide Science 4 (1973) 137-147.

(16) Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection II. Application to Formulated Products; Pesticide Science 5 (1974) 393-400.

(17) Gückel, W., Kaestel, R., Lewerenz, J., Synnatschke, G., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection. Μέρος III: The Temperature Relationship between Vapour Pressure and Evaporation Rate; Pesticide Science 13 (1982) 161-168.

(18) Gückel, W., Kaestel, R., Kroehl, T., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Μέρος IV: An Improved Thermogravimetric Determination Based on Evaporation Rate; Pesticide Science 45 (1995) 27-31.

(19) Kroehl, T., Kaestel, R., Koenig, W., Ziegler, H., Koehle, H., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part V: Thermogravimetry Combined with Solid Phase MicroExtraction (SPME); Pesticide Science 53 (1998) 300-310.

(20) Tesconi, M., Yalkowsky, S.H., A Novel Thermogravimetric Method for Estimating the Saturated Vapor Pressure of Low-Volatility Compounds; Journal of Pharmaceutical Science 87(12) (1998) 1512-20.

(21) Lide, D.R. (ed.), CRC Handbook of Chemistry and Physics, 81th ed.(2000), Vapour Pressure in the Range -25 °C to 150 °C.

(22) Meister, R.T. (ed.), Farm Chemicals Handbook, Vol. 88 (2002).

(23) 40 CFR, 796. (1993). pp 148-153, Office of the Federal Register, Washington DC.

▼**M1**

(24) Rordorf B.F. (1985). Thermochimica Acta 85, 435.

(25) Westcott et al. (1981). Environ. Sci. Technol. 15, 1375.

(26) Messer G., Röhl, P., Grosse G., and Jitschin W. (1987). J. Vac. Sci. Technol. (A), 5(4), 2440.

(27) Comsa G., Fremerey J.K., and Lindenau, B. (1980). J. Vac. Sci. Technol. 17(2), 642.

(28) Fremerey, J.K. (1985). J. Vac. Sci. Technol. (A), 3(3), 1715.

▼**M1**

Προσάρτημα

Μέθοδος εκτίμησης

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κατ' εκτίμηση τιμές της τάσης ατμών είναι δυνατόν να χρησιμοποιούνται:

— για να αποφασισθεί ποια από τις πειραματικές μεθόδους είναι κατάλληλη,

— για να προκύψει μια κατ' εκτίμηση ή οριακή τιμή σε περιπτώσεις στις οποίες για τεχνικούς λόγους δεν είναι δυνατή η εφαρμογή της πειραματικής μεθόδου.

ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ

Η εκτίμηση της τάσης ατμών υγρών και στερεών είναι δυνατή με χρησιμοποίηση του τροποποιημένου συσχετισμού Watson (α). Το μοναδικό απαιτούμενο πειραματικό δεδομένο είναι το κανονικό σημείο ζέσεως. Η μέθοδος μπορεί να εφαρμόζεται για την περιοχή τιμών τάσης από 10^5 Pa έως 10^{-5} Pa.

Λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη μέθοδο δίδονται στο «Handbook of Chemical Property Estimation Methods» (Εγχειρίδιο μεθόδων εκτίμησης χημικών ιδιοτήτων) (β). Βλέπε επίσης OECD Environmental Monograph (Μονογραφία ΟΟΣΑ για το περιβάλλον) No.67 (γ).

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ

Η τάση ατμών υπολογίζεται με τους τύπους:

$$\ln P_{vp} \approx \frac{\Delta H_{vp}}{\Delta Z_b R T_b}\left[1 - \frac{\left(3 - 2\frac{T}{T_b}\right)^m}{\frac{T}{T_b}} - 2m\left(3 - 2\frac{T}{T_b}\right)^{m-1} \ln \frac{T}{T_b}\right]$$

όπου:

T = η ζητούμενη θερμοκρασία

T_b = το κανονικό σημείο ζέσεως

P_{vp} = η τάση ατμών σε θερμοκρασία T

ΔH_{Vb} = η θερμότητα εξάτμισης

ΔZ_b = ο συντελεστής συμπιεστότητας (κατ' εκτίμηση 0,97)

m = εμπειρικός συντελεστής εξαρτώμενος από τη φυσική κατάσταση στη ζητούμενη θερμοκρασία.

και, στη συνέχεια,

$$\frac{\Delta H_{vb}}{T_b} = K_F\ (8{,}75 + R \ln T_b)$$

όπου K_F εμπειρικός συντελεστής με τον οποίο λαμβάνεται υπόψη η πολικότητα της ουσίας. Για τους διάφορους τύπους ενώσεων οι συντελεστές K_F δίδονται στη βιβλιογραφική παραπομπή (β).

▼**M1**

Αρκετά συχνά είναι διαθέσιμα δεδομένα όπου περιλαμβάνεται σημείο ζέσεως για μειωμένη πίεση. Στην περίπτωση αυτή η τάση ατμών υπολογίζεται ως εξής:

$$\ln P_{vp} \approx \ln P_1 + \frac{\Delta H_{v1}}{\Delta Z_b R T_1}\left[1 - \left(3 - 2\frac{T}{T_1}\right)^m \frac{T_1}{T} - 2m\left(3 - 2\frac{T}{T_1}\right)^{m-1} \ln \frac{T}{T_1}\right]$$

όπου T_1 είναι το σημείο ζέσεως στη μειωμένη πίεση P_1.

ΕΚΘΕΣΗ

Εφόσον χρησιμοποιείται η μέθοδος της εκτίμησης, η έκθεση πρέπει να περιλαμβάνει εκτενή τεκμηρίωση του υπολογισμού.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

α) Watson, K.M. (1943). Ind. Eng. Chem, 35, 398.

β) Lyman, W.J., Reehl, W.F., Rosenblatt, D.H. (1982). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill.

γ) OECD Environmental Monograph No.67. Application of Structure-Activity Relationships to the Estimation of Properties Important in Exposure Assessment (1993).

▼B

Α.5. ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗ ΤΑΣΗ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Οι περιγραφόμενες μέθοδοι βασίζονται στην κατευθυντήρια οδηγία δοκιμών του ΟΟΣΑ (1). Οι βασικές αρχές δίνονται στη βιβλιογραφία (2).

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι περιγραφόμενες μέθοδοι εφαρμόζονται στη μέτρηση της επιφανειακής τάσης των υδατικών διαλυμάτων.

Είναι χρήσιμο να υπάρχουν προκαταρκτικές πληροφορίες για τη διαλυτότητα στο νερό, το συντακτικό τύπο, τις ιδιότητες υδρόλυσης και την κρίσιμη συγκέντρωση για τη δημιουργία μικκυλίων της ουσίας πριν από την εκτέλεση αυτών των δοκιμών.

Οι παρακάτω μέθοδοι είναι εφαρμόσιμες στις περισσότερες χημικές ουσίες, χωρίς οποιονδήποτε περιορισμό όσον αφορά το βαθμό καθαρότητας τους.

Η μέτρηση της επιφανειακής τάσης με τη μέθοδο του μετρητή τάσης με δακτύλιο, περιορίζεται για τα υδατικά διαλύματα με δυναμικό ιξώδες μικρότερο των 200 m Pa S περίπου.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Η ελεύθερη επιφανειακή ενθαλπία ανά μονάδα επιφάνεια; αναφέρεται σαν επιφανειακή τάση.

Η επιφανειακή τάση δίνεται σαν:

N/m (μονάδα SI) ή

mN/m (υπομονάδα SI)

1 N/m = 10^3 δύνες/cm

1 mN/m = 1 δύνη/cm στο σύστημα CGS που χρησιμοποιείτο παλαιά

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Δεν είναι απαραίτητο να χρησιμοποιούνται ουσίες αναφοράς σε όλες τις περιπτώσεις *κατά* τις οποίες διερευνάται μία νέα ουσία. Οι ουσίες αυτές πρέπει να χρησιμοποιούνται κυρίως για να ελέγχεται κατά διαστήματα η μέθοδος που εφαρμόζεται και για να γίνεται δυνατή η σύγκριση με αποτελέσματα από άλλες μεθόδους.

Στη βιβλιογραφία (1) και (3) δίνονται ουσίες αναφοράς που καλύπτουν μία μεγάλη περιοχή επιφανειακών τάσεων.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

Οι μέθοδοι βασίζονται στη μέτρηση της μέγιστης δύναμης που απαιτείται να ασκηθεί κάθετα σ' έναν αναβολέα ή σε ειδικό δακτύλιο που είναι σε επαφή με το εξεταζόμενο υγρό το οποίο βρίσκεται τοποθετημένο σε ένα δοχείο μέτρησης, με σκοπό την αποχώρισή του από αυτή την επιφάνεια ή σε ένα δίσκο, με τη μία πλευρά σε επαφή με την επιφάνεια, ώστε να επανέλθει κανονικά στη θέση της η μεμβράνη που σχηματίστηκε.

Ουσίες διαλυτές στο νερό σε συγκέντρωση τουλάχιστον 1 mg/l εξετάζονται σε υδατικό διάλυμα σε μία μόνη συγκέντρωση.

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Οι μέθοδοι αυτές είναι μεγαλύτερης ακρίβειας από αυτήν που φαίνεται να απαιτείται για περιβαλλοντική εκτίμηση.

▼B

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

Παρασκευάζεται διάλυμα της ουσίας σε απεσταγμένο νερό. Η συγκέντρωση του διαλύματος αυτού θα πρέπει να είναι το 90 % της διαλυτότητας κορεσμού της ουσίας σε νερό' όταν η συγκέντρωση κορεσμού υπερβαίνει το 1 g/l, χρησιμοποιείται συγκέντρωση 1 g/l για τη δοκιμή. Ουσίες με υδατοδιαλυτότητα μικρότερη από 1 mg/1 δεν απαιτείται να εξετάζονται.

1.6.1. **Μέθοδος δίσκου**

Βλέπε ISO 304 και NF T 73-060 (Επιφανειακά ενεργές ουσίες — Προσδιορισμός της επιφανειακής τάσης με σχηματισμό υγρών μεμβρανών).

1.6.2. **Μέθοδος αναβολέα**

Βλέπε ISO 304 και NF T 73-060 (Επιφανειακά ενεργές ουσίες — Προσδιορισμός της επιφανειακής τάσης με σχηματισμό υγρών μεμβρανών).

1.6.3. **Μέθοδος δακτυλίου**

Βλέπε ISO 304 και NF T 73-060 (Επιφανειακά ενεργές ουσίες — Προσδιορισμός της επιφανειακής τάσης με σχηματισμό υγρών μεμβρανών).

1.6.4. **Εναρμονισμένη μέθοδος δακτυλίου του OOLA**

1.6.4.1. *Συσκευή*

Οι μετρητές τάσης που κυκλοφορούν στο εμπόριο είναι κατάλληλοι για τη μέτρηση αυτή. Αποτελούνται από τα παρακάτω στοιχεία:

— κινητό τραπέζι δείγματος,

— σύστημα μέτρησης δύναμης,

— σώμα μέτρησης (δακτύλιος),

— δοχείο μέτρησης.

1.6.4.1.1. Κινητό τραπέζι δείγματος

Το κινητό τραπέζι δείγματος χρησιμοποιείται σαν υποστήριγμα για το δοχείο μέτρησης, ελεγχόμενης θερμοκρασίας, που περιέχει το υγρό που πρόκειται να εξεταστεί. Μαζί με το σύστημα μέτρησης της δύναμης, συναρμολογείται πάνω σε ένα βάθρο.

1.6.4.1.2. Σύστημα μέτρησης της δύναμης

Το σύστημα μέτρησης της δύναμης (βλέπε εικόνα) είναι τοποθετημένο πάνω από το τραπέζι του δείγματος. Το σφάλμα μέτρησης της δύναμης δεν πρέπει να υπερβαίνει το ± 0,6 mg, που αντιστοιχεί σε ένα όριο σφάλματος ± 0,1 mg σε μια μέτρηση μάζας. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η κλίμακα μέτρησης των μετρητών τάσης που κυκλοφορούν στο εμπόριο βαθμολογείται σε mN/m, έτσι ώστε η επιφανειακή τάση να μπορεί να μετρηθεί απευθείας σε mN/m, με μια ακρίβεια 0,1 mN/m.

▼B

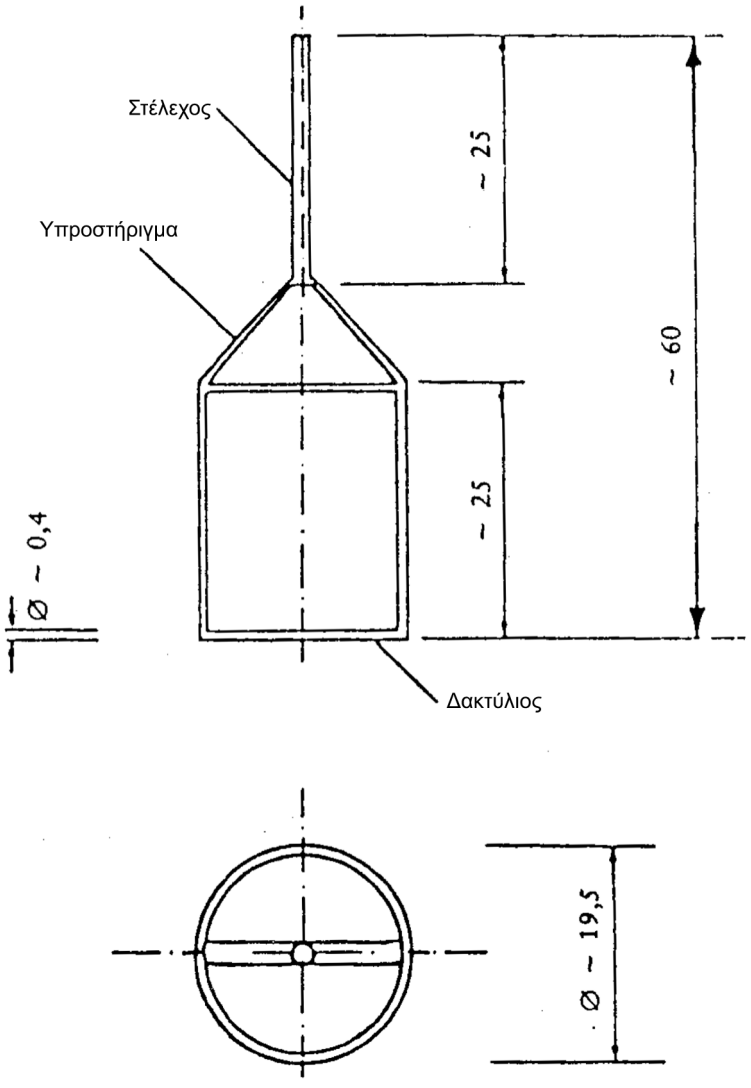
1.6.4.1.3. Σώμα μέτρησης (δακτύλιος)

Ο δακτύλιος αποτελείται συνήθως από ένα σύρμα από κράμα λευκοχρύσου-ιριδίου πάχους 0,4 mm περίπου και μέσης περιφέρειας 60 mm. Ο συρμάτινος δακτύλιος κρέμεται οριζόντια από ένα μεταλλικό στέλεχος και από ένα συρμάτινο υποστήριγμα για να αποκαθίσταται η σύνδεση με το σύστημα μέτρησης της δύναμης (βλέπε εικόνα).

Εικόνα

Σώμα μέτρησης

(Όλες οι διαστάσεις εκφρασμένες σε mm)



1.6.4.1.4. Δοχείο μέτρησης

Το δοχείο μέτρησης που περιέχει το διάλυμα το οποίο πρόκειται να μετρηθεί θα είναι ένα γυάλινο δοχείο με ελεγχόμενη θερμοκρασία. Θα σχεδιαστεί έτσι ώστε κατά τη διάρκεια της μέτρησης η θερμοκρασία του εξεταζόμενου υγρού διαλύματος και η αέρια φάση πάνω από την επιφάνεια του να παραμένουν σταθερές και το δείγμα να μην μπορεί να εξατμίζεται. Κυλινδρικά γυάλινα δοχεία που έχουν εσωτερική διάμετρο όχι μικρότερη των 45 mm είναι αποδεκτά.

▼B

1.6.4.2. *Προετοιμασία τη συσκευής*

1.6.4.2.1. Καθαρισμός

Τα γυάλινα δοχεία πρέπει να καθαρίζονται προσεκτικά. Εάν είναι ανάγκη θα πρέπει να πλένονται με ζεστό χρωμοθειικό οξύ και μετά με πυκνό φωσφορικό οξύ (83 έως 98 % κατά βάρος H_3PO_4), να ξεπλένονται πλήρως με τρεχούμενο νερό και τελικά να πλένονται με διπλά απεσταγμένο νερό μέχρι να παρθεί ουδέτερη αντίδραση, στη συνέχεια να ξηραίνονται ή να ξεπλένονται με μέρος από το υγρό που πρόκειται να μετρηθεί.

Ο δακτύλιος θα πρέπει αρχικά να ξεπλένεται πλήρως με νερό για την απομάκρυνση κάθε ουσίας διαλυτής στο νερό, να βυθίζεται για λίγο σε χρωμοθειικό οξύ, να πλένεται με διπλά απεσταγμένο νερό μέχρι να παρθεί ουδέτερη αντίδραση και τελικά να θερμαίνεται για λίγο πάνω από φλόγα μεθανόλης.

Σημείωση:

Οι τυχόν ουσίες που δεν διαλύονται ή δεν καταστρέφονται με χρωμοθειικό ή φωσφορικό οξύ, όπως οι σιλικόνες, θα πρέπει να απομακρύνονται με τη βοήθεια ενός κατάλληλου οργανικού διαλύτη.

1.6.4.2.2. Βαθμονόμηση της συσκευής

Η βαθμονόμηση της συσκευής συνίσταται στην επαλήθευση του μηδενικού σημείου ρυθμίζοντας το έτσι ώστε η ένδειξη του οργάνου να επιτρέπει αξιόπιστο προσδιορισμό σε mN/m.

Συναρμολόγηση:

Η συσκευή θα πρέπει να οριζοντιώνεται, π.χ. με τη βοήθεια μιας στάθμης οινοπνεύματος στη βάση του μετρητή τάσης, ρυθμίζοντας τις βίδες οριζοντίωσης στη βάση.

Ρύθμιση του μηδενικού σημείου:

Μετά τη συναρμολόγηση του δακτυλίου στη συσκευή και πριν τη βύθιση του στο υγρό θα. πρέπει να ρυθμιστεί η ένδειξη του μετρητή τάσης στο μηδέν και να ελεγχθεί ότι ο δακτύλιος είναι παράλληλος προς την επιφάνεια του υγρού. Για το σκοπό αυτό, η υγρή επιφάνεια μπορεί να χρησιμεύσει ως καθρέφτης.

Βαθμονομήσεις:

Ο έλεγχος βαθμονόμησης μπορεί να γίνει με μία από τις δύο παρακάτω μεθόδους:

α) Χρησιμοποίηση μιας μάζας: μέθοδος που χρησιμοποιεί ιππείς γνωστής μάζας μεταξύ 0,1 g και 1,0 g που τοποθετούνται πάνω στο δακτύλιο. Ο παράγοντας βαθμονόμησης $\Phi_,$, με τον οποίο πρέπει να πολλαπλασιάζονται όλες οι αναγνώσεις του οργάνου, θα πρέπει να καθορίζεται σύμφωνα με την εξίσωση (1):

$$\Phi_a = \frac{\sigma_r}{\sigma_a}$$

όπου:

$$\sigma_r = \frac{mg}{2b} \text{ (mN/m)}$$

m = μάζα του ιππέα (g)

g = επιτάχυνση βαρύτητας (981 cm s^{-2} στην επιφάνεια της θάλασσας)

b = μέση περιφέρεια του δακτυλίου (cm^1)

σ_a = ανάγνωση του μετρητή τάσης μετά την τοποθέτηση του ιππέα πάνω στο δακτύλιο (mN/m)

▼B

β) Χρησιμοποίηση νερού: μέθοδος που χρησιμοποιεί καθαρό νερό, του οποίου η επιφανειακή τάση π.χ. στους 23 °C είναι ίση με 72,3 mN/m. Αυτή η μέθοδος εκτελείται πιο γρήγορα από τη βαθμονόμηση βάρους, αλλά υπάρχει πάντα ο κίνδυνος να αλλοιωθεί η επιφανειακή τάση του νερού από ίχνη επιφανειακά ενεργών ουσιών.

Ο παράγοντας βαθμονόμησης Φ_b, με τον οποίο πρέπει να πολλαπλασιάζονται όλες οι ενδείξεις του οργάνου, πρέπει να προσδιορίζεται σύμφωνα με την εξίσωση (2):

$$\Phi_b = \frac{\sigma_o}{\sigma_g}$$

όπου:

σ_0 = τιμή αναφερόμενη στη βιβλιογραφία για την επιφανειακή τάση του νερού (mN/m),

σ_g = μετρηθείσα τιμή της επιφανειακής τάσης του νερού (mN/m), και οι δύο στην ίδια θερμοκρασία.

1.6.4.3. *Παρασκευή των δειγμάτων*

Θα πρέπει να παρασκευάζονται υδατικά διαλύματα των ουσιών που πρόκειται να εξεταστούν, χρησιμοποιώντας τις απαιτούμενες συγκεντρώσεις στο νερό και δε θα πρέπει να περιέχουν αδιάλυτες ουσίες.

Το διάλυμα πρέπει να διατηρείται σε σταθερή θερμοκρασία (± 0,5°C). Εάν η επιφανειακή τάση ενός διαλύματος μέσα στο δοχείο μέτρησης μεταβάλλεται με το χρόνο, θα πρέπει να εκτελούνται μερικές μετρήσεις σε διάφορους χρόνους και να χαράσσεται μια καμπύλη της επιφανειακής τάσης ως συνάρτηση του χρόνου. Όταν δεν παρατηρείται περαιτέρω μεταβολή, έχει επιτευχθεί μια κατάσταση ισορροπίας.

Σκόνη ή αέρια επιμόλυνση από άλλες ουσίες επηρεάζει τη μέτρηση. Γι' αυτό η εργασία θα πρέπει να γίνεται κάτω από προστατευτικό κάλυμμα.

1.6.5. **Συνθήκες δοκιμής**

Η μέτρηση θα πρέπει να γίνει στους 20 °C περίπου με αποκλίσεις όχι μεγαλύτερες από ± 0,5°C.

1.6.6. **Εκτέλεση της δοκιμής**

Τα διαλύματα που πρόκειται να μετρηθούν θα πρέπει να μεταφέρονται στο προσεκτικά καθαρισμένο δοχείο μέτρησης, προσέχοντας να αποφευχθεί τυχόν αφρισμός, και μετά το δοχείο μέτρησης θα πρέπει να τοποθετείται στο τραπέζι της συσκευής. Το πάνω μέρος του τραπεζιού με το δοχείο μέτρησης θα πρέπει να ανυψώνεται μέχρις ότου ο δακτύλιος να βυθιστεί κάτω από την επιφάνεια του διαλύματος που πρόκειται να μετρηθεί. Μετά θα πρέπει να χαμηλώνεται βαθμιαία και ομαλά (με μια ταχύτητα περίπου 0,5 cm/min) για να αποσπαστεί ο δακτύλιος από την επιφάνεια μέχρις ότου επιτευχθεί η μέγιστη δύναμη. Η υγρή στοιβάδα που είναι προσκολλημένη στο δακτύλιο δεν πρέπει να αποχωριστεί από το δακτύλιο. Μετά το τέλος των μετρήσεων, ο δακτύλιος θα πρέπει να βυθίζεται πάλι κάτω από την επιφάνεια και οι μετρήσεις να επαναλαμβάνονται μέχρις ότου επιτευχθεί μια σταθερή τιμή επιφανειακής τάσεως. Ο χρόνος από τη μεταφορά του διαλύματος στο δοχείο μέτρησης θα πρέπει να καταγράφεται για κάθε προσδιορισμό. Οι αναγνώσεις θα πρέπει να λαμβάνονται στη μέγιστη δύναμη που απαιτείται προκειμένου να αποσπαστεί ο δακτύλιος από την υγρή επιφάνεια.

▼B

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Προκειμένου να υπολογιστεί η επιφανειακή τάση, η τιμή ανάγνωσης, σε mN/m στη συσκευή, θα πρέπει να πολλαπλασιάζεται πρώτα με τον παράγοντα βαθμονόμησης Φ_a ή Φ_b (που εξαρτάται από τη μέθοδο βαθμονόμησης που έχει χρησιμοποιηθεί). Αυτό θα δώσει μια τιμή που ισχύει μόνο κατά προσέγγιση και γι' αυτό απαιτείται διόρθωση.

Οι Harkins και Jordan (4) έχουν εμπειρικά καθορίσει παράγοντες διόρθωσης για τις τιμές της επιφανειακής τάσης που μετράται με τη μέθοδο του δακτυλίου και που εξαρτώνται από τις διαστάσεις του δακτυλίου, την πυκνότητα του υγρού και την επιφανειακή του τάση.

Επειδή είναι κουραστικό να προσδιορίζεται ο συντελεστής διόρθωσης από τους πίνακες των Harkins και Jordan για κάθε ξεχωριστή μέτρηση, προκειμένου να υπολογίζεται η επιφανειακή τάση στα υδατικά διαλύματα, μπορεί να χρησιμοποιείται η απλοποιημένη μέθοδος ανάγνωσης των διορθωμένων τιμών της επιφανειακής τάσης απευθείας από τον πίνακα που ακολουθεί. (Για αναγνώσεις που περιλαμβάνονται μεταξύ των τιμών του πίνακα θα χρησιμοποιείται η μέθοδος υπολογισμού ενδιάμεσων τιμών).

Πίνακας

Διόρθωση της μετρηθείσας επιφανειακής τάσεως

Μόνο για υδατικά διαλύματα, $\rho = 1\ g/cm^3$

R	= 9,55 mm (μέση ακτίνα δακτυλίου),
r	= 0,185 mm (ακτίνα του σύρματος του δακτυλίου).

Πειραματική τιμή (mN/m)	Διορθωμένη τιμή (mN/m)	
	Βαθμονόμηση μάζας [βλέπε σημείο 1.6.4.2.2.(α)]	Βαθμονόμηση με χρήση νερού [Βλέπε σημείο 1.6.4.2.2.(β)]
20	16,9	18,1
22	18,7	20,1
24	20,6	22,1
26	22,4	24,1
28	24,3	26,1
30	26,2	28,1
32	28,1	30,1
34	29,9	32,1
36	31,8	34,1
38	33,7	36,1
40	35,6	38,2
42	37,6	40,3
44	39,5	42,3
46	41,4	44,4
48	43,4	46,5
50	45,3	48,6
52	47,3	50,7
54	49,3	52,8
56	51,2	54,9

▼B

Πειραματική τιμή (mN/m)	Διορθωμένη τιμή (mN/m)	
	Βαθμονόμηση μάζας [βλέπε σημείο 1.6.4.2.2.(α)]	Βαθμονόμηση με χρήση νερού [Βλέπε σημείο 1.6.4.2.2.(β)]
58	53,2	57,0
60	55,2	59,1
62	57,2	61,3
64	59,2	63,4
66	61,2	65,5
68	63,2	67,7
70	65,2	69,9
72	67,2	72,0
74	69,2	—
76	71,2	—
78	73,2	—

Ο πίνακας αυτός έγινε με βάση τη διόρθωση των Harkins-Jordan. Είναι παρόμοιος με εκείνον του DIN Standard (DIN 53914) για το νερό και τα υδατικά διαλύματα (πυκνότητα $\rho = 1\ g/cm^3$) και ισχύει για δακτύλιο του εμπορίου με διαστάσεις R = 9,55 mm (μέση ακτίνα δακτυλίου) και r = 0,185 mm (ακτίνα του σύρματος του δακτυλίου). Ο πίνακας παρέχει τις διορθωμένες τιμές για τις μετρήσεις της επιφανειακής τάσης που λαμβάνονται μετά από βαθμονόμηση με μάζα ή βαθμονόμηση με νερό.

Εναλλακτικά, χωρίς την προηγούμενη βαθμονόμηση, η επιφανειακή τάση μπορεί να υπολογιστεί σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$\sigma = \frac{f \times F}{4\pi R}$$

όπου:

F = η δύναμη που μετράται με δυναμόμετρο στο σημείο που θραύεται η μεμβράνη.

R = η ακτίνα του δακτυλίου,

f = ο συντελεστής διόρθωσης (1).

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει, αν είναι δυνατόν, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— χρησιμοποιηθείσα μέθοδος,

— τύπος του νερού ή του διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε,

— επακριβή καθορισμό της ουσίας (ταυτότητα και προσμείξεις),

— αποτελέσματα της μέτρησης: επιφανειακή τάση (ληφθείσα ένδειξη) που να περιλαμβάνει τόσο τις ληφθείσες ενδείξεις ξεχωριστά και τον αριθμητικό τους μέσο όρο όσο και το διορθωμένο μέσον όρο (λαμβάνοντας υπόψη το συντελεστή συσκευής και τον πίνακα διόρθωσης),

▼B

— συγκέντρωση του διαλύματος,

— θερμοκρασία τη δοκιμής,

— παλαιότητα του χρησιμοποιηθέντος διαλύματος, ιδιαίτερα τον χρόνος μεταξύ παρασκευής και μέτρησης του διαλύματος,

— περιγραφή της εξάρτησης από το χρόνο της επιφανειακής τάσης μετά τη μεταφορά του διαλύματος στο δοχείο μέτρησης,

— κάθε πληροφορία και παρατήρηση που έχει σχέση με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει να αναφέρεται, ιδιαίτερα όσον αφορά τις προσμείξεις και τη φυσική κατάσταση της ουσίας.

3.2. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Λαμβάνοντας υπόψη ότι το απεσταγμένο νερό έχει επιφανειακή τάση 72,75 mN/m στους 20 ^{o}C, ουσίες που παρουσιάζουν επιφανειακή τάση μικρότερη από 60 mN/m στις συνθήκες της μεθόδου αυτής, θα πρέπει να θεωρούνται ως επιφανειακώς ενεργές ουσίες.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 115, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) R. Weissberger ed., Technique of Qrganic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Pubh, New York, 1959, Vol. I, Part I, Chapter XIV.

(3) Pure Appl. Chem., 1976, vol. 48, 511.

(4) Harkins, W.D., Jordan, H.F., J. Amer. Chem. Soc, 1930, vol. 52, 1751.

▼M4

Α.6. **ΥΔΑΤΟΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 105 του ΟΟΣΑ (1995). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών αποτελεί αναθεωρημένη έκδοση της αρχικής κατευθυντήριας γραμμής δοκιμών 105 που εγκρίθηκε το 1981. Δεν υπάρχουν ουσιαστικές διαφορές μεταξύ της τρέχουσας έκδοσης και της έκδοσης του 1981. Έχει μεταβληθεί κυρίως η μορφή. Η αναθεώρηση βασίστηκε στη μέθοδο δοκιμών «Υδατοδιαλυτότητα» της ΕΕ ([1]).

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

2. Η διαλυτότητα μιας ουσίας στο νερό μπορεί να επηρεαστεί σημαντικά από την παρουσία ξένων προσμείξεων. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών αφορά τον προσδιορισμό της υδατοδιαλυτότητας κυρίως καθαρών ουσιών που είναι σταθερές στο νερό και μη πτητικές. Πριν από τον προσδιορισμό της υδατοδιαλυτότητας, είναι χρήσιμο να υπάρχουν προκαταρκτικές πληροφορίες για την ελεγχόμενη ουσία, όπως ο συντακτικός τύπος, η τάση ατμών, η σταθερά διάστασης και η υδρόλυση ως συνάρτηση του pH.

3. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών περιγράφονται δύο μέθοδοι, η μέθοδος έκλουσης στήλης και η μέθοδος της φιάλης, οι οποίες καλύπτουν τιμές διαλυτότητας κάτω και άνω των 10^{-2} g/l, αντιστοίχως. Περιγράφεται επίσης μια απλή προκαταρκτική δοκιμή. Αυτή επιτρέπει τον προσδιορισμό της κατά προσέγγιση κατάλληλης ποσότητας δείγματος που πρέπει να χρησιμοποιηθεί στην τελική δοκιμή, καθώς και τον χρόνο που είναι απαραίτητος για την επίτευξη κορεσμού.

ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

4. Η υδατοδιαλυτότητα μιας ουσίας ορίζεται ως η συγκέντρωση της μάζας κορεσμού της ουσίας στο νερό σε δεδομένη θερμοκρασία.

5. Η υδατοδιαλυτότητα εκφράζεται σε μάζα διαλυμένης ουσίας κατ' όγκο διαλύματος. Η μονάδα SI είναι kg/m^3 αλλά επιτρέπεται να χρησιμοποιείται και η μονάδα g/l.

ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

6. Δεν είναι απαραίτητο να χρησιμοποιούνται χημικές ουσίες αναφοράς κατά τη διερεύνηση μιας ελεγχόμενης ουσίας.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

Συνθήκες δοκιμής

7. Η δοκιμή εκτελείται κατά προτίμηση σε θερμοκρασία 20 ± 0,5 °C. Η επιλεγμένη θερμοκρασία θα πρέπει να διατηρείται σταθερή σε όλα τα σχετικά μέρη του εξοπλισμού.

Προκαταρκτική δοκιμή

8. Με μια κλιμακωτή διαδικασία, προστίθενται αυξανόμενοι όγκοι νερού σε περίπου 0,1 g δείγματος (οι στερεές ελεγχόμενες ουσίες πρέπει να κονιοποιούνται), σε θερμοκρασία δωματίου, μέσα σε ογκομετρικό κύλινδρο των 10 ml με γυάλινο πώμα. Μετά από κάθε προσθήκη ποσότητας νερού, το μείγμα ανακινείται επί 10 λεπτά και ελέγχεται οπτικά για τυχόν αδιάλυτα μέρη του δείγματος. Αν, μετά από προσθήκη 10 ml νερού, το δείγμα ή μέρη αυτού παραμένουν αδιάλυτα, το πείραμα συνεχίζεται σε ογκομετρικό κύλινδρο των 100 ml. Η κατά προσέγγιση διαλυτότητα δίδεται στον ακόλουθο πίνακα 1, κάτω από τον όγκο του νερού στον οποίο επέρχεται πλήρης διάλυση της ουσίας. Όταν η διαλυτότητα είναι χαμηλή, ενδέχεται να απαιτείται μεγάλο χρονικό διάστημα για να διαλυθεί μια ελεγχόμενη ουσία και

▼M4

θα πρέπει να προβλέπονται τουλάχιστον 24 ώρες. Εάν, μετά από 24 ώρες, η ελεγχόμενη ουσία είναι ακόμη αδιάλυτη, θα πρέπει να αφήνεται για περισσότερο χρόνο (96 ώρες κατ' ανώτατο όριο) ή θα πρέπει να επιχειρείται περαιτέρω αραίωση για να εξακριβωθεί αν θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος έκλουσης στήλης ή η μέθοδος της φιάλης.

Πίνακας 1

ml νερού για 0,1 g διαλυτής ουσίας	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
κατά προσέγγιση διαλυτότητα σε g/l	< 1 000	1 000 έως 200	200 έως 100	100 έως 50	50 έως 10	10 έως 1	< 1

Μέθοδος έκλουσης στήλης

Αρχή

9. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην έκλουση της ελεγχόμενης ουσίας με νερό από μία μικροστήλη που πληρούται με αδρανές υλικό στήριξης σαν υπόστρωμα, το οποίο έχει επιστρωθεί προηγουμένως με περίσσεια της ελεγχόμενης ουσίας (2). Η υδατοδιαλυτότητα προσδιορίζεται από την κατά μάζα συγκέντρωση του εκλούσματος, όταν οριζοντιοποιηθεί η καμπύλη της συγκέντρωσης συναρτήσει του χρόνου.

Συσκευές

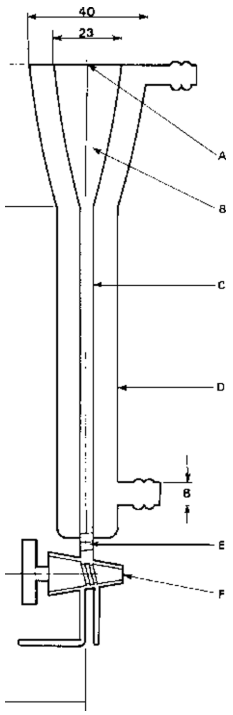
10. Η συσκευή που χρησιμοποιείται είναι μια μικροστήλη (σχήμα 1) η οποία διατηρείται σε σταθερή θερμοκρασία και είναι συνδεδεμένη με αντλία ανακυκλοφορίας (σχήμα 2) ή με δοχείο ισοστάθμισης (σχήμα 3). Η μικροστήλη περιέχει αδρανές υλικό στήριξης υπόστρωμα το οποίο συγκρατείται από ένα μικρό βύσμα από υαλοβάμβακα, που χρησιμεύει και ως φίλτρο σωματιδίων. Πιθανά υλικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη στήριξη είναι γυάλινα σφαιρίδια, γη διατόμων ή άλλα αδρανή υλικά.

11. Η μικροστήλη που απεικονίζεται στο σχήμα 1 είναι κατάλληλη για σύνδεση με αντλία ανακυκλοφορίας. Διαθέτει υπερκείμενο χώρο εισαγωγής για πέντε όγκους κλίνης (που απορρίπτονται στην αρχή του πειράματος) και για τον όγκο πέντε δειγμάτων (που λαμβάνονται για ανάλυση κατά τη διάρκεια του πειράματος). Εναλλακτικά, το μέγεθος μπορεί να μειωθεί, εάν είναι δυνατόν να προστεθεί νερό στο σύστημα κατά τη διάρκεια του πειράματος για να αντικαταστήσει τους αρχικούς πέντε όγκους κλίνης που απομακρύνονται με τις προσμείξεις. Η στήλη συνδέεται με σωληνώσεις από αδρανές υλικό με την αντλία ανακυκλοφορίας, η οποία μπορεί να αποδίδει περίπου 25 ml/ώρα. Η αντλία ανακυκλοφορίας μπορεί να είναι, για παράδειγμα, μια περισταλτική αντλία ή αντλία μεμβράνης. Πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για αποφυγή οποιασδήποτε μόλυνσης και/ή προσρόφησης με το υλικό του σωλήνα.

12. Μια σχηματική διάταξη με χρήση δοχείου ισοστάθμισης παρουσιάζεται στο σχήμα 3. Στη διάταξη αυτή, η μικροστήλη διαθέτει στρόφιγγα μονής κατεύθυνσης. Η σύνδεση με το δοχείο ισοστάθμισης επιτυγχάνεται με τη χρήση γυάλινου εσμυρισμένου συνδέσμου και σωληνώσεων από αδρανές υλικό. Η ταχύτητα ροής από το δοχείο ισοστάθμισης θα πρέπει να είναι περίπου 25 ml/ώρα.

▼**M4**

Σχήμα 1



Διαστάσεις σε mm

A. Σύνδεση για γυάλινο σμυρισμένο σύνδεσμο

B. Υπερκείμενος χώρος

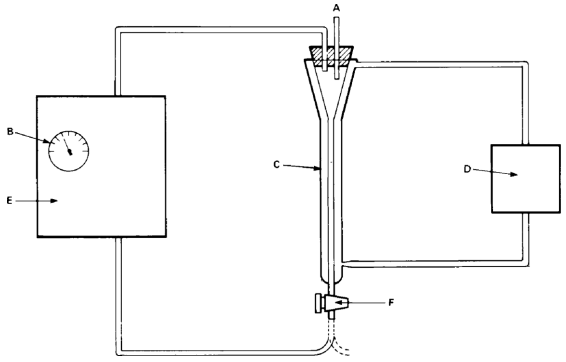
C. Εσωτερική διάμετρος 5

D. Εξωτερική διάμετρος 19

E. Βύσμα από υαλοβάμβακα

F. Στρόφιγγα

Σχήμα 2



A. Ατμοσφαιρική εξισορρόπηση

B. Ροόμετρο

C. Μικροστήλη

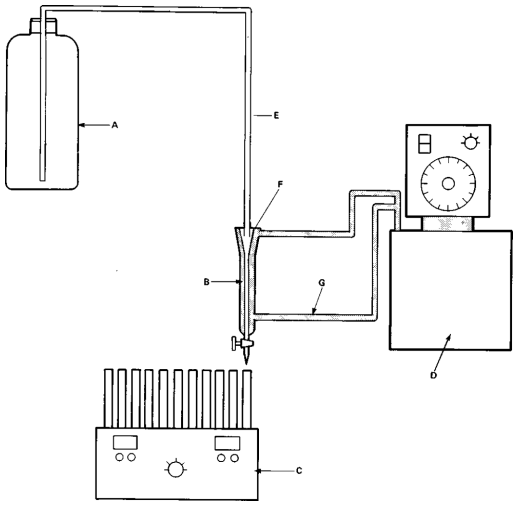
D. Θερμοστατούμενη αντλία κυκλοφορίας

E. Αντλία ανακυκλοφορίας

F. Αμφίδρομη βαλβίδα για δειγματοληψία

▼**M4**

Σχήμα 3



A. Δοχείο ισοστάθμισης (π.χ. χημική φιάλη των 2,5 λίτρων)

B. Στήλη

C. Συλλέκτης κλασμάτων

D. Θερμοστάτης

E. Σωλήνας από τεφλόν

F. Γυάλινος σμυρισμένος σύνδεσμος

G. Σωλήνας νερού (μεταξύ θερμοστάτη και στήλης, εσωτερικής διαμέτρου 8 mm περίπου)

13. Περίπου 600 mg υλικού στήριξης φέρονται σε φιάλη των 50 ml με σφαιρικό πυθμένα. Κατάλληλη ποσότητα της ελεγχόμενης ουσίας διαλύεται σε πτητικό διαλύτη αναλυτικής καθαρότητας και κατάλληλη ποσότητα του διαλύματος αυτού προστίθεται στο υλικό στήριξης. Ο διαλύτης εξατμίζεται πλήρως, π.χ. σε περιστροφικό εξατμιστήρα, καθώς, σε αντίθετη περίπτωση, δεν επιτυγχάνεται κορεσμός του υλικού στήριξης με νερό κατά το στάδιο έκλουσης, εξαιτίας της κατανομής του στην επιφάνεια. Το φορτισμένο υλικό στήριξης εμποτίζεται για δύο ώρες σε περίπου 5 ml νερού και το αιώρημα μεταγγίζεται στη μικροστήλη. Εναλλακτικά, ξηρό φορτισμένο υλικό στήριξης φέρεται στη μικροστήλη, η οποία έχει πληρωθεί με νερό, και αφήνεται να ισορροπήσει για δύο ώρες περίπου.

14. Η φόρτιση του υλικού στήριξης μπορεί να προκαλέσει προβλήματα, που οδηγούν σε εσφαλμένα αποτελέσματα, π.χ. αν η ελεγχόμενη ουσία αποτεθεί ως έλαιο. Τα προβλήματα αυτά θα πρέπει να εξετάζονται και οι λεπτομέρειες να αναφέρονται.

Διαδικασία με τη χρήση αντλίας ανακυκλοφορίας

15. Αρχίζει η ροή μέσω της στήλης. Συνιστάται να χρησιμοποιείται ταχύτητα ροής περίπου 25 ml/ώρα, που αντιστοιχεί σε 10 όγκους κλίνης ανά ώρα για την περιγραφείσα στήλη. Απορρίπτονται τουλάχιστον οι πέντε πρώτοι όγκοι κλίνης για να απομακρυνθούν οι υδατοδιαλυτές προσμείξεις. Στη συνέχεια, η αντλία τίθεται σε λειτουργία μέχρι να αποκατασταθεί ισορροπία, όπως καθορίζεται από πέντε διαδοχικά δείγματα των οποίων οι συγκεντρώσεις δεν διαφέρουν πάνω από ± 30 % κατά τυχαίο τρόπο. Τα δείγματα αυτά θα πρέπει να απέχουν μεταξύ τους κατά χρονικά διαστήματα που αντιστοιχούν με το πέρασμα τουλάχιστον δέκα όγκων κλίνης. Ανάλογα με τη μέθοδο ανάλυσης που χρησιμοποιείται, ενδέχεται να είναι προτιμότερο να σχεδιαστεί καμπύλη συγκέντρωσης-χρόνου για να αποδειχθεί η επίτευξη ισορροπίας.

▼M4

Διαδικασία με τη χρήση δοχείου ισοστάθμισης

16. Θα πρέπει να συλλέγονται διαδοχικά κλάσματα έκλουσης και να αναλύονται με τη μέθοδο που έχει επιλεγεί. Για τον προσδιορισμό της διαλυτότητας, χρησιμοποιούνται κλάσματα από τη μέση περιοχή του εκλούσματος στα οποία οι συγκεντρώσεις είναι σταθερές εντός εύρους ± 30 % σε πέντε τουλάχιστον διαδοχικά κλάσματα.

17. Προτιμότερο υγρό έκλουσης είναι το δισαπεσταγμένο νερό. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης απιονισμένο νερό με ειδική αντίσταση άνω των 10 megohm/cm και περιεκτικότητα σε ολικό οργανικό άνθρακα κάτω του 0,01 %.

18. Και στις δύο διαδικασίες, εκτελείται μια δεύτερη μέτρηση με τη μισή από την πρώτη ταχύτητα ροής. Εάν τα αποτελέσματα των δύο μετρήσεων συμφωνούν, η δοκιμή είναι ικανοποιητική. Εάν η μετρούμενη διαλυτότητα είναι μεγαλύτερη με τη χαμηλότερη ταχύτητα ροής, τότε η κατά το 50 % μείωση της ταχύτητας ροής πρέπει να συνεχίζεται, μέχρις ότου προκύψει η ίδια διαλυτότητα από δύο διαδοχικά περάσματα.

19. Και στις δύο περιπτώσεις, τα κλάσματα θα πρέπει να ελέγχονται για την παρουσία κολλοειδούς ύλης με την εξέταση του φαινομένου Tyndall. Η παρουσία σωματιδίων ακυρώνει τη δοκιμή, η οποία θα πρέπει να επαναλαμβάνεται αφού βελτιωθεί η διηθητική δράση της στήλης.

20. Το pH κάθε δείγματος θα πρέπει να μετράται, κατά προτίμηση με τη χρήση ειδικών ταινιών-δεικτών.

Μέθοδος της φιάλης

Αρχή

21. Η ελεγχόμενη ουσία (τα στερεά πρέπει να κονιοποιούνται) διαλύεται σε νερό σε θερμοκρασία λίγο μεγαλύτερη από τη θερμοκρασία δοκιμής. Όταν επιτευχθεί κορεσμός, το μείγμα ψύχεται και διατηρείται στη θερμοκρασία δοκιμής. Εναλλακτικά, αν εξακριβωθεί, με κατάλληλη δειγματοληψία, η επίτευξη της ισορροπίας κορεσμού, η μέτρηση μπορεί να πραγματοποιηθεί απευθείας στη θερμοκρασία δοκιμής. Στη συνέχεια, προσδιορίζεται με κατάλληλη αναλυτική μέθοδο, η κατά μάζα συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας στο υδατικό διάλυμα, το οποίο δεν πρέπει να περιέχει καθόλου αδιάλυτα σωματίδια (3).

Συσκευές

22. Απαιτείται ο ακόλουθος εξοπλισμός:

— συνήθη εργαστηριακά γυάλινα σκεύη και όργανα,

— συσκευή για την ανατάραξη των διαλυμάτων υπό ελεγχόμενη σταθερή θερμοκρασία,

— εάν είναι αναγκαίο για γαλακτώματα, μια φυγόκεντρος (κατά προτίμηση θερμοστατούμενη) και

— αναλυτικός εξοπλισμός.

Διαδικασία

23. Η αναγκαία ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας για τον κορεσμό του επιθυμητού όγκου νερού εκτιμάται από την προκαταρκτική δοκιμή. Ζυγίζεται περίπου το πενταπλάσιο της ποσότητας αυτής, σε καθένα από τρία γυάλινα δοχεία με γυάλινα πώματα (π.χ. σωλήνες φυγοκέντρου, φιάλες). Σε κάθε δοχείο προστίθεται όγκος νερού επιλεγμένος σε συνάρτηση με την αναλυτική μέθοδο και το εύρος διαλυτότητας. Τα δοχεία πωματίζονται ερμητικά και αναταράσσονται στους 30 °C. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται συσκευή ανατάραξης ή ανάδευσης ικανή να λειτουργεί σε σταθερή θερμοκρασία, π.χ. μαγνητικός αναδευτήρας σε θερμοστατούμενο υδατόλουτρο. Μετά από μία ημέρα το ένα από τα δοχεία εξισορροπείται για 24 ώρες στη θερμοκρασία δοκιμής με ανακίνηση κατά διαστήματα. Στη συνέχεια, το περιεχόμενο του δοχείου φυγοκεντρείται στη θερμοκρασία δοκιμής και η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας στη διαυγή υδατική φάση προσδιορίζεται με κατάλληλη αναλυτική μέθοδο. Οι άλλες δύο φιάλες υποβάλλονται στην ίδια κατεργασία

▼M4

μετά από αρχική εξισορρόπηση στους 30 °C για δύο και τρεις ημέρες, αντίστοιχα. Εάν οι μετρούμενες συγκεντρώσεις τουλάχιστον στα δύο τελευταία δοχεία δεν διαφέρουν κατά περισσότερο από 15 %, η δοκιμή είναι ικανοποιητική. Εάν τα αποτελέσματα από τα δοχεία 1, 2 και 3 δείχνουν τάση αύξησης των τιμών, όλη η δοκιμή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται με μεγαλύτερους χρόνους εξισορρόπησης.

24. Η δοκιμή μπορεί επίσης να διεξαχθεί και χωρίς προεπώαση στους 30 °C. Για να εκτιμηθεί η ταχύτητα αποκατάστασης της ισορροπίας κορεσμού, λαμβάνονται δείγματα μέχρις ότου ο χρόνος ανάδευσης να μην επηρεάζει πλέον τις συγκεντρώσεις που μετρούνται.

25. Το pH κάθε δείγματος θα πρέπει να μετράται, κατά προτίμηση με τη χρήση ειδικών ταινιών-δεικτών.

Αναλυτικοί προσδιορισμοί

26. Προτιμάται μια ειδική για την ουσία μέθοδος, καθώς μικρές ποσότητες διαλυτών ξένων προσμείξεων μπορούν να προκαλέσουν μεγάλα σφάλματα στη μετρούμενη διαλυτότητα. Παραδείγματα τέτοιων μεθόδων είναι: αεριοχρωματογραφία ή υγροχρωματογραφία, τιτλοδότηση, φωτομετρία, βολταμετρία.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Δεδομένα

Μέθοδος έκλουσης στήλης

27. Για κάθε μέτρηση, πρέπει να υπολογίζονται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση από πέντε τουλάχιστον διαδοχικά δείγματα λαμβανόμενα από την περιοχή κορεσμού. Οι μέσες τιμές που προκύπτουν από δύο δοκιμές με διαφορετικές ροές δεν πρέπει να διαφέρουν κατά περισσότερο από 30 %.

Μέθοδος της φιάλης

28. Υπολογίζεται ο μέσος όρος των επιμέρους αποτελεσμάτων από τις τρεις φιάλες, τα οποία δεν θα πρέπει να διαφέρουν κατά περισσότερο από 15 %.

Έκθεση δοκιμής

Μέθοδος έκλουσης στήλης

29. Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής δοκιμής,

— τη χημική ταυτότητα και τις προσμείξεις (τυχόν προκαταρκτικό στάδιο καθαρισμού),

— τις συγκεντρώσεις, τις ταχύτητες ροής και το pH κάθε δείγματος,

— τις μέσες τιμές και τις τυπικές αποκλίσεις από πέντε τουλάχιστον δείγματα που ελήφθησαν από την περιοχή κορεσμού κάθε μέτρησης,

— τον μέσο όρο τουλάχιστον δύο διαδοχικών μετρήσεων,

— τη θερμοκρασία του νερού κατά τη διαδικασία κορεσμού,

— τη μέθοδο ανάλυσης,

— τη φύση του υλικού στήριξης,

— τη φόρτιση του υλικού στήριξης,

— τον χρησιμοποιηθέντα διαλύτη,

— ενδείξεις τυχόν χημικής αστάθειας της ουσίας κατά τη διάρκεια της δοκιμής,

— κάθε πληροφορία που έχει σημασία για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, ιδιαίτερα όσον αφορά τις προσμείξεις και τη φυσική κατάσταση της ελεγχόμενης ουσίας.

▼**M4**

Μέθοδος της φιάλης

30. Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής δοκιμής,

— τη χημική ταυτότητα και τις προσμείξεις (τυχόν προκαταρκτικό στάδιο καθαρισμού),

— τους επιμέρους αναλυτικούς προσδιορισμούς και τον μέσο όρο, όταν έχουν προσδιοριστεί περισσότερες της μιας τιμές για κάθε φιάλη,

— το pH κάθε δείγματος,

— τον μέσο όρο των τιμών για τις διάφορες φιάλες που συμφωνούσαν μεταξύ τους,

— τη θερμοκρασία δοκιμής,

— την αναλυτική μέθοδο,

— ενδείξεις τυχόν χημικής αστάθειας της ουσίας κατά τη διάρκεια της δοκιμής,

— κάθε πληροφορία που έχει σημασία για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, ιδιαίτερα όσον αφορά τις προσμείξεις και τη φυσική κατάσταση της ελεγχόμενης ουσίας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) Οδηγία 92/69/ΕΟΚ της Επιτροπής, της 31ης Ιουλίου 1992, για την προσαρμογή στην τεχνική πρόοδο, για δέκατη έβδομη φορά, της οδηγίας 67/548/ΕΟΚ του Συμβουλίου σχετικά με την προσέγγιση των νομοθετικών, κανονιστικών και διοικητικών διατάξεων σε ό,τι αφορά την ταξινόμηση, τη συσκευασία και την επισήμανση των επικίνδυνων ουσιών (ΕΕ L 383 της 29.12.1992, σ. 113).

(2) NF T 20-045 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use — Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility — Column elution method.

(3) NF T 20-046 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use — Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility — Flask method.

▼B

Α.8. ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η περιγραφόμενη μέθοδος της «ανακινούμενης φιάλης» βασίζεται στην κατευθυντήρια οδηγία δοκιμών του ΟΟΣΑ(1).

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Για την εκτέλεση της δοκιμής αυτής, χρήσιμο είναι να έχουμε προκαταρκτικές πληροφορίες για τη δομή, τη σταθερά διάστασης, την υδατοδιαλυτότητα, την υδρόλυση, τη διαλυτότητα σε n-οκτανόλη και την επιφανειακή τάση της ουσίας.

Οι μετρήσεις σε ιονιζόμενες ουσίες θα πρέπει να εκτελούνται μόνο στη μη ιονισμένη μορφή τους (ελεύθερο οξύ ή ελεύθερη βάση) που παράγεται με τη χρησιμοποίηση κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος με pH τουλάχιστον κατά μία μονάδα κάτω (ελεύθερο οξύ) ή πάνω (ελεύθερη βάση) από το pK.

Αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει δύο ξεχωριστές διαδικασίες — τη μέθοδο ανακινούμενης φιάλης και την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Η πρώτη εφαρμόζεται όταν η τιμή του log P_{ow} (βλέπε παρακάτω για ορισμούς) είναι στην περιοχή - 2 έως 4 και η δεύτερη στην περιοχή 0 έως 6. Πριν από την πραγματοποίηση οποιασδήποτε από τις πειραματικές διαδικασίες, θα πρέπει πρώτα να γίνεται μία προκαταρκτική εκτίμηση του συντελεστή κατανομής.

Η μέθοδος της ανακινούμενης φιάλης εφαρμόζεται μόνο σε ουσιαστικά καθαρές ουσίες, διαλυτές στο νερό και σε n-οκτανόλη. Δεν έχει εφαρμογή σε επιφανειοδραστικές ουσίες (για τις οποίες θα πρέπει να προβλέπεται μία εξ υπολογισμού τιμή ή μία εξ εκτιμήσεως τιμή με βάση τις διαλυτότητες σε n-οκτανόλη και στο νερό).

Η μέθοδος HPLC δεν έχει εφαρμογή σε ισχυρά οξέα και βάσεις, σε σύμπλοκα μετάλλων, σε επιφανειοδραστικές ουσίες ή σε ουσίες που αντιδρούν με το μέσον έκλουσης. Για τα υλικά αυτά, θα πρέπει να προβλέπεται μία δια υπολογισμού ή δια εκτίμησης τιμή με βάση τις διαλυτότητες σε n-οκτανόλη και στο νερό.

Η μέθοδος HPLC είναι λιγότερο ευαίσθητη στην παρουσία προσμείξεων στην εξεταζόμενη ένωση απ' ό,τι η μέθοδος της ανακινούμενης φιάλης. Εντούτοις, σε ορισμένες περιπτώσεις οι προσμείξεις μπορεί να κάνουν δύσκολη την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, διότι ο διαχωρισμός των κορυφών είναι ασαφής. Για μείγματα που δεν παρέχουν καθορισμένη ζώνη, θα πρέπει να δηλώνεται ανώτερο και κατώτερο όριο log P.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Ως συντελεστής κατανομής (P) ορίζεται ο λόγος των συγκεντρώσεων ισορροπίας (c_i) μιας διαλελυμένης ουσίας σε ένα διφασικό σύστημα που αποτελείται από δύο σε μεγάλο βαθμό μη αναμείξιμους στην ουσία διαλύτες. Στην περίπτωση n-οκτανόλης και νερού:

$$P_{ow} = \frac{c_{\text{n-οκτανόλης}}}{c_{\text{νερού}}}$$

Κατά συνέπεια ο συντελεστής κατανομής (P) είναι το πηλίκον δύο συγκεντρώσεων και δίνεται συνήθως με τη μορφή του δεκαδικού λογαρίθμου του (log P).

▼B

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Μέθοδος ανακινούμενης φιάλης

Δεν απαιτείται να χρησιμοποιούνται ουσίες αναφοράς σε όλες τις περιπτώσεις κατά τις οποίες διερευνάται μία νέα ουσία. Αυτές θα πρέπει κατά βάση να χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο κατά διαστήματα της μεθόδου και για να γίνεται σύγκριση με τα αποτελέσματα από άλλες μεθόδους.

Μέθοδος HPLC

Για να συσχετισθούν τα δεδομένα, που λαμβάνονται από την HPLC, μιας ένωσης με την τιμή P αυτής, πρέπει να χαραχθεί καμπύλη βαθμονόμησης τιμών log P σαν συνάρτηση των χρωματογραφικών δεδομένων με τη χρησιμοποίηση, τουλάχιστον, 6 σημείων αναφοράς, Η επιλογή των κατάλληλων ουσιών αναφοράς εναπόκειται στον χρήστη. Όταν είναι δυνατό, τουλάχιστον μία ένωση αναφοράς θα πρέπει να έχει P_{ow} μεγαλύτερη από εκείνη της εξεταζόμενης ουσίας και μία άλλη τιμή P_{ow} κάτω από εκείνη της εξεταζόμενης ουσίας. Για τιμές log P μικρότερες του 4, η βαθμονόμηση μπορεί να βασίζεται σε δεδομένα λαμβανόμενα από τη μέθοδο της ανακινούμενης φιάλης. Για τιμές log P μεγαλύτερες από 4, η βαθμονόμηση μπορεί να βασίζεται σε έγκυρες βιβλιογραφικές τιμές αν αυτές συμφωνούν με τις τιμές που λαμβάνονται δια υπολογισμού. Για μεγαλύτερη ακρίβεια, είναι προτιμότερο να επιλέγονται ουσίες αναφοράς που σχετίζονται από πλευράς δομής με την εξεταζόμενη ουσία.

Για πολλές ομάδες χημικών ουσιών υπάρχουν εκτεταμένοι πίνακες τιμών του log P_{ow} (2) (3). Αν δεν υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία για τους συντελεστές κατανομής ουσιών σχετικών από πλευράς δομής, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μία γενικότερη βαθμονόμηση, που να στηρίζεται σε άλλες ουσίες αναφοράς.

Στο προσάρτημα 2 δίνεται πίνακας των ουσιών αναφοράς που συνιστώνται μαζί με τις P_{ow} τιμές τους.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.4.1. **Μέθοδος ανακινούμενης φιάλης**

Για να προσδιορισθεί ο συντελεστής κατανομής, πρέπει να επιτευχθεί ισορροπία μεταξύ όλων των αντιδρώντων συστατικών του συστήματος και να προσδιορισθούν οι συγκεντρώσεις των ουσιών που είναι διαλυμένες στις δύο φάσεις. Μελέτη της βιβλιογραφίας στο θέμα αυτό δείχνει ότι για την επίλυση του προβλήματος αυτού, δηλ. την επισταμένη ανάμειξη των δύο φάσεων και στη συνεχεία το διαχωρισμό τους προκειμένου να προσδιορισθεί η συγκέντρωση ισορροπίας της εξεταζόμενης ουσίας, μπορούν να χρησιμοποιηθούν αρκετές διαφορετικές τεχνικές.

1.4.2. **Μέθοδος HPLC**

Η HPLC διεξάγεται σε αναλυτικές στήλες που φέρουν μία στερεά φάση, διατιθέμενη στο εμπόριο, με μακριές αλυσίδες υδρογονανθράκων (π.χ. C_8, C_{18}) χημικώς ενωμένες με διοξείδιο του πυριτίου (silica). Οι χημικές ουσίες που φέρονται στη στήλη αυτή κινούνται κατά μήκος αυτής με διαφορετικές ταχύτητες εξαιτίας των διαφορετικών βαθμών κατανομής των, μεταξύ της κινητής φάσης και της υδρογονανθρακικής στατικής φάσης. Μείγματα χημικών ουσιών εκλούονται κατά σειρά υδροφοβίας, με τις υδατοδιαλυτές χημικές ουσίες να εκλούονται πρώτες και τις λιποδιαλυτές χημικές ουσίες τελευταίες, ανάλογα με το συντελεστή κατανομής τους σε υδρογονάνθρακα/νερό. Έτσι καθορίζεται η σχέση μεταξύ του χρόνου κατακράτησης στη στήλη αυτή (ανάστροφη φάση) και του συντελεστή κατανομής σε n-οκτανόλη/νερό. Ο συντελεστής κατανομής ευρίσκεται από τον παράγοντα χωρητικότητας k, που δίνεται από την έκφραση:

▼B

$$k = \frac{t_R - t_o}{t_o}$$

όπου, t_R = χρόνος κατακράτησης της εξεταζόμενης ουσίας και t_0 = μέσος χρόνος που χρειάζεται το μόριο ενός διαλύτη να περάσει από τη στήλη (νεκρός χρόνος).

Ποσοτικές αναλυτικές μέθοδοι δεν απαιτούνται. Αναγκαίος είναι μόνον ο προσδιορισμός των χρόνων έκλουσης.

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

1.5.1. **Επαναληψιμότητα**

Μέθοδοι ανακινούμενης φιάλης

Για να επιβεβαιωθεί η ορθότητα του συντελεστή κατανομής, πρέπει να εκτελούνται διπλοί προσδιορισμοί κάτω από τρεις διαφορετικές συνθήκες δοκιμής, στις οποίες μπορεί να διαφέρει τόσο η ποσότητα της εξεταζόμενης ουσίας, όσο και ο λόγος των όγκων των διαλυτών. Οι προσδιοριζόμενες τιμές του συντελεστή κατανομής που εκφράζονται υπό την μορφή κοινών λογάριθμών τους θα πρέπει να μη διαφέρουν περισσότερο από ± 0,3 λογαριθμικές μονάδες.

Μέθοδος HPLC

Για να αυξηθεί η αξιοπιστία της μέτρησης, πρέπει να εκτελούνται διπλοί προσδιορισμοί. Οι τιμές του log P που βρίσκονται από κάθε μέτρηση ξεχωριστά θα πρέπει να είναι μέσα στα όρια των ± 0,1 λογαριθμικών μονάδων.

1.5.2. **Ευαισθησία**

Μέθοδος ανακινούμενης φιάλης

Η περιοχή μέτρησης της μεθόδου προσδιορίζεται από το όριο ανίχνευσης της αναλυτικής διαδικασίας. Το όριο αυτό θα πρέπει να επιτρέπει την εκτίμηση τιμών log P_{DW} στην περιοχή από - 2 έως 4 (κατά περίπτωση, όταν το επιτρέπουν οι εφαρμοζόμενες συνθήκες, η κλίμακα αυτή μπορεί να επεκταθεί μέχρι log P_{ow} = 5) όταν η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας σε καθεμιά από τις φάσεις δεν είναι μεγαλύτερη από 0,01 mol ανά λίτρο,

Μέθοδος HFLC

Η μέθοδος HPLC δίνει τη δυνατότητα εκτίμησης των συντελεστών κατανομής των οποίων η τιμή του log P_{ow} είναι στην περιοχή από 0 έως 6.

Κανονικά, ο συντελεστής κατανομής μιας ένωσης μπορεί να εκτιμηθεί στα πλαίσια ± 1 λογαριθμικής μονάδας της τιμής της μεθόδου ανακινούμενης φιάλης. Τυπικοί συσχετισμοί μπορούν να βρεθούν στη βιβλιογραφία (4) (5) (6) (7) (8). Μεγαλύτερη ορθότητα μπορεί συνήθως να επιτευχθεί όταν οι καμπύλες συσχετισμού βασίζονται σε ουσίες αναφοράς σχετικές από πλευράς δομής (9).

▼B

1.5.3. **Εξειδίκευση**

Μέθοδοι ανακινούμενης φιάλης

Ο νόμος κατανομής του Nemst εφαρμόζεται μόνο σε σταθερή θερμοκρασία, πίεση και pH για αραιά διαλύματα. Εφαρμόζεται αυστηρά σε καθαρή ουσία διεσπαρμένη μεταξύ δύο καθαρών διαλυτών. Εάν στη μία ή και στις δύο φάσεις συναντώνται ταυτόχρονα περισσότερες διαφορετικές διαλυμένες ουσίες, αυτό μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα.

Τυχόν διάσταση ή συνένωση των διαλυμένων μορίων έχει ως αποτέλεσμα αποκλίσεις από το νόμο κατανομής του Nernst. Οι αποκλίσεις αυτές καταδεικνύονται από το γεγονός ότι ο συντελεστής κατανομής καταλήγει να εξαρτάται από τη συγκέντρωση του διαλύματος.

Εξαιτίας των πολλαπλών ισορροπιών που εμπερικλείει, η μέθοδος αυτή δεν θα πρέπει να εφαρμόζεται σε ενώσεις που ιονίζονται χωρίς να γίνεται κάποια διόρθωση. Σε περίπτωση τέτοιων ενώσεων θα πρέπει να εξετάζεται η χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων αντί του νερού' το pH του ρυθμιστικού διαλύματος θα πρέπει να απέχει τουλάχιστον 1 μονάδα pH από το pKa της ουσίας λαμβανομένης υπόψη και της σημασίας του pH αυτού για το περιβάλλον.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.6.1. **Προκαταρκτική εκτίμηση του συντελεστή κατανομής**

Ο συντελεστής κατανομής εκτιμάται κατά προτίμηση χρησιμοποιώντας μία μέθοδο υπολογισμού (βλέπε προσάρτημα 1), ή όπου είναι ενδεδειγμένο, από το λόγο των διαλυτοτήτων της εξεταζόμενης ουσίας στους καθαρούς διαλύτες (10).

1.6.2. **Μέθοδος ανακινούμενης φιάλης**

1.6.2.1. *Προπαρασκευή*

ν-οκτανόλη: Ο προσδιορισμός του συντελεστή κατανομής θα πρέπει να εκτελείται με αναλυτικά αντιδραστήρια υψηλής καθαρότητας.

Νερό: Θα πρέπει να χρησιμοποιείται νερό απεσταγμένο ή διπλά απεσταγμένο σε γυάλινη ή χαλαζιακή συσκευή. Για ιονιζόμενες ενώσεις, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται, εφόσον δικαιολογείται, αντί του νερού ρυθμιστικά διαλύματα.

Σημείωση:

Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται νερό λαμβανόμενο απευθείας από ιοντοανταλλάκτη.

1.6.2.1.1. Προκορεσμός των διαλυτών

Πριν από τον προσδιορισμό του συντελεστή κατανομής, οι φάσεις του συστήματος των διαλυτών κορένυνται αμοιβαία με ανατάραξη στη θερμοκρασία του πειράματος. Για να γίνει αυτό, είναι πρακτικό να αναταράσσονται δύο μεγάλες φιάλες αποθήκευσης με υψηλό βαθμό αναλυτικής καθαρότητας n-οκτανόλης ή νερού, η κάθε μία με αρκετή ποσότητα από τον άλλο διαλύτη, για 24 ώρες με ένα μηχανικό αναδευτήρα και μετά να αφήνονται σε ηρεμία για αρκετό χρόνο, μέχρι να χωριστούν οι φάσεις και να επιτευχθεί μία *κατάσταση* κορεσμού.

▼B

1.6.2.1.2. Προετοιμασία για τη δοκιμή

Ο συνολικός όγκος του διφασικού συστήματος θα πρέπει να γεμίζει σχεδόν το δοχείο δοκιμής. Αυτό θα βοηθάει στο να προλαμβάνεται απώλεια του υλικού που οφείλεται σε πτητικότητα. Η αναλογία όγκου και οι ποσότητες της ουσίας που χρησιμοποιούνται καθορίζονται από τα παρακάτω:

— την προκαταρκτική εκτίμηση του συντελεστή κατανομής (βλέπε ανωτέρω),

— την ελάχιστη ποσότητα που απαιτείται από τη εξεταζόμενη ουσία για την αναλυτική διαδικασία, και

— τον περιορισμό μιας μέγιστης συγκέντρωσης και στις δύο φάσεις 0,01 mol/l.

Διεξάγονται τρεις δοκιμές. Στην πρώτη, χρησιμοποιείται η υπολογισθείσα κατ' όγκο αναλογία n-οκτανόλης προς νερό στη δεύτερη, η αναλογία αυτή διαιρείται δια του δύο και στην τρίτη, η αναλογία αυτή πολλαπλασιάζεται με το δύο (π.χ. 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3. Εξεταζόμενη ουσία

Παρασκευάζεται διάλυμα για εναποθήκευση σε n-οκτανόλη προκορεσμένη με νερό. Η συγκέντρωση του εναποθηκευμένου διαλύματος θα πρέπει να προσδιορίζεται με ακρίβεια πριν να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του συντελεστή κατανομής. Το διάλυμα αυτό θα πρέπει να εναποθηκεύεται υπό συνθήκες που να εξασφαλίζουν τη σταθερότητα του.

1.6.2.2. *Συνθήκες δοκιμής*

Η θερμοκρασία δοκιμής θα πρέπει να διατηρείται σταθερή (± 1 °C) και να βρίσκεται στην περιοχή από 20 έως 25 °C.

1.6.2.3. *Διαδικασία μέτρησης*

1.6.2.3.1. Αποκατάσταση της ισορροπίας κατανομής

Για κάθε μια από τις συνθήκες δοκιμής πρέπει να ετοιμάζονται διπλά δοχεία περιέχονται τις απαιτούμενες, και με ακρίβεια μετρημένες, ποσότητες των δύο διαλυτών μαζί με την αναγκαία ποσότητα του διαλύματος εναποθήκευσης.

Οι φάσεις της n-οκτανόλης θα πρέπει να μετρούνται κατ' όγκο. Τα δοχεία δοκιμής πρέπει να τοποθετούνται είτε σε κατάλληλο αναδευτήρα είτε να ανακινούνται με το χέρι. Όταν χρησιμοποιείται ο σωλήνας φυγοκέντρησης η μέθοδος που συνιστάται είναι να περιστρέφεται ο σωλήνας γρήγορα κατά 180° περί τον εγκάρσιο άξονα του έτσι ώστε αν υπάρχει παγιδευμένος αέρας να διαφεύγει από τις δύο φάσεις. Η εμπειρία έχει δείξει ότι 50 τέτοιες περιστροφές επαρκούν συνήθως για την αποκατάσταση της ισορροπίας κατανομής. Για να είμαστε σίγουροι, συνιστώνται 100 περιστροφές σε πέντε λεπτά.

1.6.2.3.2. Διαχωρισμός φάσεων

Όταν είναι αναγκαίο, για να διαχωριστούν οι φάσεις, θα πρέπει να πραγματοποιείται φυγοκέντρηση του μείγματος. Αυτό πρέπει να γίνεται με εργαστηριακή φυγόκεντρο διατηρούμενη σε θερμοκρασία δωματίου, ή, αν χρησιμοποιείται μη ελεγχόμενη θερμοκρασιακά φυγόκεντρος, οι σωλήνες φυγοκέντρησης θα πρέπει να διατηρούνται στη θερμοκρασία δοκιμής για μία τουλάχιστον ώρα πριν από την ανάλυση προκειμένου να επέλθει θερμοκρασιακή εξισορρόπηση.

▼B

1.6.2.4. *Ανάλυση*

Για τον προσδιορισμό του συντελεστή κατανομής είναι αναγκαίο να προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις της εξεταζόμενης ουσίας και στις δύο φάσεις. Αυτό μπορεί να γίνει λαμβάνοντας ένα μέρος από καθεμία από τις δύο φάσεις από κάθε σωλήνα για καθεμία συνθήκη δοκιμής και αναλύοντας αυτά με τη διαδικασία που έχει επιλεγεί. Η ολική ποσότητα της ουσίας που βρίσκεται και στις δύο φάσεις θα πρέπει να υπολογίζεται και να συγκρίνεται με την ποσότητα της ουσίας που είχε εισαχθεί αρχικά.

Η λήψη των δειγμάτων από την υδατική φάση θα πρέπει να πραγματοποιείται με διαδικασία που να ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο να υπάρχουν ίχνη n-οκτανόλης: μπορεί να χρησιμοποιηθεί μία γυάλινη σύριγγα με βελόνα που αποσπάται για τη δειγματοληψία της υδατικής φάσης. Η σύριγγα αρχικά θα πρέπει να γεμίζεται μερικά με αέρα. Ο αέρας θα πρέπει να εκδιώκεται σιγά, ενώ θα βυθίζεται η βελόνα στη στιβάδα οκτανόλης. Κατάλληλος όγκος υδατικής φάσης εισάγεται στη σύριγγα. Η σύριγγα αποσύρεται γρήγορα από το διάλυμα και η βελόνα αποσπάται. Τα περιεχόμενα της σύριγγας μπορούν τότε να χρησιμοποιηθούν σαν το υδατικό δείγμα. Η συγκέντρωση στις δύο χωριστές φάσεις θα πρέπει να προσδιορίζεται κατά προτίμηση με μία ειδική για την ουσία μέθοδο. Παραδείγματα αναλυτικών μεθόδων που μπορεί να είναι κατάλληλες είναι:

— φωτομετρικές μέθοδοι,

— αέρια χρωματογραφία,

— υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.

1.6.3. **Μέθοδος HPLC**

1.6.3.1. *Προετοιμασία*

Συσκευή

Απαιτείται υγρή χρωματογραφία, εφοδιασμένη με μη παλμική αντλία και κατάλληλη διάταξη ανίχνευσης. Συνιστάται η χρησιμοποίηση βαλβίδας ένεσης με βρόχους (loops) ένεσης. Η παρουσία πολικών ομάδων στη στατική φάση μπορεί να επηρεάσει σοβαρά την απόδοση της στήλης HPLC. Κατά συνέπεια, οι στατικές φάσεις θα πρέπει να έχουν το ελάχιστο δυνατό ποσοστό πολικών ομάδων (11). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν διατιθέμενα στο εμπόριο λεπτά διαμερισμένα υλικά πλήρωσης ανάστροφης φάσης ή έτοιμες γεμισμένες στήλες. Μεταξύ του συστήματος ένεσης και της αναλυτικής στήλης μπορεί να τοποθετηθεί μία προφυλακτική στήλη.

Κινητή φάση

Για την παρασκευή του διαλύτη έκλουσης ο οποίος προηγουμένως απαερούται χρησιμοποιούνται μεθανόλη και νερό κατάλληλης καθαρότητας για HPLC. Πρέπει να χρησιμοποιείται ισοκρατική έκλουση. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται αναλογίες μεθανόλης/νερού με ελάχιστη περιεκτικότητα σε νερό 25 %. Συνήθως, μείγμα 3:1 (n/n) μεθανόλης-νερού είναι ικανοποιητικό για την έκλουση ενώσεων με log P 6 μέσα σε μία ώρα, με ταχύτητα ροής 1 ml/λεπτό. Για ενώσεις υψηλού log P μπορεί να απαιτείται μείωση του χρόνου έκλουσης (όπως και των ενώσεων αναφοράς) με μείωση της πολικότητας της κινητής φάσης ή του μήκους της στήλης.

Ενώσεις με πολύ μικρή διαλυτότητα σε n-οκτανόλη έχουν την τάση να παρέχουν ασυνήθιστα χαμηλές τιμές log P_0 με τη μέθοδο HPLC οι κορυφές των ενώσεων αυτών ακολουθούν μερικές φορές το μέτωπο του διαλύτη. Αυτό οφείλεται πιθανά στο γεγονός ότι η διαδικασία κατανομής είναι πολύ αργή για την επίτευξη της ισορροπίας μέσα στον χρόνο που απαιτείται κανονικά για το διαχωρισμό με HPLC. Για την επίτευξη μιας αξιόπιστης τιμής, μπορεί να είναι αποτελεσματικό να μειωθεί η ταχύτητα ροής ή/και να ελαττωθεί η αναλογία μεθανόλης/νερού.

▼B

Οι εξεταζόμενες και οι ουσίες αναφοράς θα πρέπει να είναι διαλυτές στην κινητή φάση σε βαθμό επαρκή για να μπορούν να ανιχνεύονται. Μόνο σε εξαιρετικές περιπτώσεις μπορεί να χρησιμοποιηθούν πρόσθετα με το μείγμα μεθανόλης/νερού, δεδομένου ότι τα πρόσθετα αλλάζουν τις ιδιότητες της στήλης. Για χρωματογραφήματα με πρόσθετα, είναι υποχρεωτικό να χρησιμοποιείται ξεχωριστή στήλη του ίδιου τύπου. Εάν το μείγμα μεθανόλης/νερού δεν είναι το ενδεδειγμένο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν μείγματα άλλων οργανικών διαλυτών με νερό, π.χ. αιθανόλη/νερό ή ακετονιτρίλιο/νερό.

Το pH του μέσου έκλουσης είναι σημαντικό για τις ιονιζόμενες ενώσεις. Θα πρέπει να είναι μέσα στην περιοχή του pH λειτουργίας της στήλης, που συνήθως είναι μεταξύ 2 και 8. Συνιστάται η χρήση ρυθμιστικού διαλύματος. Πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια να αποφεύγεται η καθίζηση αλάτων και η φθορά της στήλης γεγονός που συμβαίνει με ορισμένα μίγματα οργανικής φάσης/ρυθμιστικού διαλύματος. Δεν συνιστώνται οι μετρήσεις HPLC με στατικές φάσεις που έχουν σαν βάση silica για pH πάνω από 8, δεδομένου ότι η χρήση αλκαλικής κινητής φάσης μπορεί να προκαλέσει ταχεία ελάττωση της απόδοσης της στήλης.

Διαλυόμενες ουσίες

Οι ουσίες αναφοράς θα πρέπει να είναι της μεγαλύτερης διαθέσιμης καθαρότητας. Αν είναι δυνατόν, οι ενώσεις που χρησιμοποιούνται για τους σκοπούς της δοκιμής ή της βαθμονόμησης πρέπει να διαλύονται στην κινητή φάση.

Συνθήκες δοκιμής

Η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια των μετρήσεων δεν θα πρέπει να διαφέρει περισσότερο από ± 2K.

1.6.3.2. **Μέτρηση**

Υπολογισμός του νεκρού χρόνου t_0

Ο νεκρός χρόνος μπορεί να προσδιορισθεί χρησιμοποιώντας είτε μία ομόλογη σειρά (π.χ. n-αλκυλο μεθυλο κετόνες) είτε μη συγκροτούμενες οργανικές ενώσεις (π.χ. θειουρία η φορμαμίδιο). Για τον υπολογισμό του νεκρού χρόνου t_0 με τη χρησιμοποίηση ομόλογης σειράς, εγχύεται μία ομάδα 7 τουλάχιστον μελών μιας ομόλογης σειράς και προσδιορίζονται οι αντίστοιχοι χρόνοι κατακράτησης. Οι μεικτοί χρόνοι κατακράτησης $t_{r\ (n_c + 1)}$ σημειώνονται σαν συνάρτηση του $t_{r(n_c)}$, και προσδιορίζονται το τμήμα α και η κλίση b της εξίσωσης αναγωγής:

$$t_{r(n_c + 1)} = a + b\ t_{r(n_c)}$$

(n_c = αριθμός ατόμων άνθρακα). Ο νεκρός χρόνος t_0 δίνεται κατόπιν με τον τύπο:

$$t_0 = \alpha/(1 - b)$$

▼B

Καμπύλη αναφοράς

Το επόμενο βήμα είναι να χαραχθεί η καμπύλη των τιμών του log k σαν συνάρτηση του log P για μερικές ουσίες αναφοράς. Στην πράξη, εγχύεται ταυτόχρονα μία ομάδα από 5 έως 10 πρότυπες ουσίες αναφοράς των οποίων ο log P είναι της αναμενόμενης τάξης και προσδιορίζονται οι χρόνοι κατακράτησης, κατά προτίμηση με ένα καταγραφικό ολοκληρωτή συνδεόμενο με το σύστημα ανίχνευσης. Υπολογίζονται οι αντίστοιχοι λογάριθμοι των παραγόντων χωρητικότητας, log k, και σημειώνονται σαν συνάρτηση του log P που προσδιορίζεται με τη μέθοδο της ανακινούμενης φιάλης. Η βαθμονόμηση εκτελείται σε τακτά χρονικά διαστήματα, τουλάχιστον μία φορά την ημέρα, ώστε να λαμβάνονται υπόψη οι πιθανές αλλαγές στην απόδοση της στήλης.

Προσδιορισμός τον παράγοντα χωρητικότητας της εξεταζόμενης ουσίας

Η εξεταζόμενη ουσία εγχύεται σε όσο το δυνατόν μικρότερη ποσότητα της κινητής φάσης. Προσδιορίζεται ο χρόνος κατακράτησης (δύο φορές), πράγμα που επιτρέπει τον υπολογισμό του παράγοντα χωρητικότητας k. Από την καμπύλη των ουσιών αναφοράς, μπορεί να υπολογισθεί ο συντελεστής κατανομής της εξεταζόμενης ουσίας. Για πολύ χαμηλούς και πολύ υψηλούς συντελεστές είναι αναγκαία η προεκβολή. Στις περιπτώσεις αυτές, πρέπει να λαμβάνεται ιδιαίτερη μέριμνα για τα όρια εμπιστοσύνης της γραμμής αναγωγής.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Μέθοδος ανακινούμενης φιάλης

Η αξιοπιστία των προσδιοριζόμενων τιμών P μπορεί να ελεγχθεί κάνοντας σύγκριση του μέσου όρου των διπλών προσδιορισμών με το γενικό μέσον όρο.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

Η έκθεση δοκιμής πρέπει, αν είναι δυνατόν, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— επακριβείς προδιαγραφές της ουσίας (ταυτότητα και προσμείξεις),

— όταν οι μέθοδοι δεν έχουν εφαρμογή (π.χ. επιφανειοδραστικές ουσίες), πρέπει να παρέχεται μία τιμή, με υπολογισμό ή με εκτίμηση, με βάση τις διαλυτότητες σε n-οκτανόλη και νερό ανεξάρτητα,

— κάθε πληροφορία και παρατήρηση σχετική με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, ιδιαίτερα σχετικά με τις προσμείξεις και τη φυσική κατάσταση της ουσίας,

Για τη μέθοδο της ανακινούμενης φιάλης- το αποτέλεσμα της προκαταρκτικής εκτίμησης, εφόσον υπάρχει:

— το αποτέλεσμα της προκαταρκτικής εκτίμησης, εφόσον υπάρχει,

— θερμοκρασία του προσδιορισμού,

— στοιχεία για τις αναλυτικές διαδικασίες που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων,

— ο χρόνος και η ταχύτητα φυγοκέντρησης, εφόσον χρησιμοποιήθηκε,

▼B

— οι μετρηθείσες συγκεντρώσεις και στις δύο φάσεις για κάθε προσδιορισμό (αυτό σημαίνει ότι πρέπει να αναφερθούν συνολικά II συγκεντρώσεις),

— το βάρος της εξεταζόμενησ ουσίας, ο όγκος κάθε φάσης που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε δοχείο δοκιμής και η ολική υπολογισθείσα ποσότητα εξεταζόμενης ουσίας σε κάθε φάση μετά την εξισορρόπηση,

— οι υπολογισθείσες τιμές του συντελεστή κατανομής (P) και ο μέσος όρος θα πρέπει να αναφέρονται για κάθε ομάδα συνθηκών δοκιμής όπως πρέπει να αναφέρεται και ο μέσος όρος για όλους τους προσδιορισμούς. Αν υπάρχει ένδειξη εξάρτησης του συντελεστή κατανομής από τη συγκέντρωση, αυτό πρέπει να δηλώνεται στην έκθεση,

— η τυπική απόκλιση των ανεξάρτητων τιμών P ως προς το μέσον όρο τους πρέπει επίσης να αναφέρεται,

— ο μέσος όρος P από όλους τους προσδιορισμούς θα πρέπει επίσης να εκφράζεται σαν ο δεκαδικός λογάριθμός του,

— η υπολογισθείσα θεωρητική τιμή P_{ow} εφόσον προσδιορίσθηκε ή όταν η μετρηθείσα τιμή είναι $> 10^4$,

— το pH του χρησιμοποιηθέντος νερού και της υδατικής φάσης κατά τη διάρκεια του πειράματος,

— αν χρησιμοποιήθηκαν ρυθμιστικά διαλύματα, αιτιολόγηση της χρήσης ρυθμιστικών διαλυμάτων αντί νερού, σύνθεση, συγκέντρωση και pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων, pH της υδατικής φάσης πριν και μετά από το πείραμα.

Για τη μέθοδο HPLC:

— το αποτέλεσμα τυχόν προκαταρκτικής εκτίμησης,

— εξετασθείσες και ουσίες αναφοράς όπως και η καθαρότητα τους,

— περιοχή θερμοκρασιών στην οποία έγιναν οι προσδιορισμοί,

— pH στο οποίο έγιναν οι προσδιορισμοί,

— λεπτομερή στοιχεία για την αναλυτική και προφυλακτική στήλη, την κινητή φάση και το μέσον ανίχνευσης,

— στοιχεία κατακράτησης και βιβλιογραφικές τιμές log P για τις ουσίες αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν στη βαθμονόμηση,

— λεπτομερή στοιχεία για την καμπύλη αναγωγής (log k σαν συνάρτηση log P),

— δεδομένα μέσης κατακράτησης και ενδιάμεση τιμή log P για την εξεταζόμενη ουσία,

— περιγραφή του εξοπλισμού και των λειτουργικών συνθηκών,

— περιγραφικά στοιχεία για την έκλουση,

— ποσότητες της ελεγχόμενης ουσίας και της ουσίας αναφοράς που εισήχθησαν στη στήλη,

— νεκρός χρόνος και πως μετρήθηκε.

▼B

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 107, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) C. Hansen and A.j. Leu, Suustituem Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York 1979.

(3) Log P and Parameter Database, A tool for the quantitative prediction of bioactivity (C. Hansch, chairman; A.J. Leo, dir.) — Available from Pomona College Medical Chemistry Project 1982, Pomona College, Claremont, California 91711.

(4) L. Renberg, G. Sundstrom and K. Sundh—Nygard, Chemosphere, 1980, vol. 80, 683.

(5) H. Ellgehausen, C. D'Hondt and R. Fuerer, Pestic. Sci., 1981, vol. 12, 219 (1981).

(6) B. McDuffie, Chemosphere, 1981, vol. 10, 73.

(7) W.E. Hammers et al., J. Chromatogr., 1982, vol. 247, 1.

(8) J.E. Haky and A.M. Young, J. Liq. Chromat., 1984, vol. 7, 675.

(9) S. Fujisawa and E. Masuhara, J. Biomed. Mat. Res., 1981, vol. 15, 787.

(10) O. Jubermann, Verteilen und Extrahieren, in Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl), Allgemeine Laboratoriumpraxis (edited by E.Muller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958, Band 1/1, 223-339.

(11) R.F. Rekker and H.M. de Kort, Euro. J. Med. Chem., 1979, vol. 14, 479.

(12) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Partition coefficients and their uses. Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

(13) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Elsevier, Amsterdam, 1977.

(14) NF T 20-043 AFNOR (1985). Chemical products for industrial use — Determination of partition coefficient — Flask shaking method.

(15) C.V. Eadsforth and P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1459.

(16) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

(17) C. Hansch, A. Leo, S.H. Unger, K.H. Kim, D. Nikaitani and E.J. Lien, J. Med. Chem., 1973, vol. 16, 1207.

(18) W.B. Neely, D.R. Branson and G.E. Blau, Environ. Set. Technol., 1974, voi. g, 1113.

(19) D.S. Brown and E.W. Flagg, J. Environ. Qual., 1981, vol. 10, 382.

(20) J.K. Seydel and K.J. Schaper, Chemische Struktur und biologische Aktivitat von Wirkstoffen, Verlag Chemie, Weinheim, New York 1979.

▼B

(21) R. Franke, Theoretical Drug Design Methods, Elsevier, Amsterdam 1984.

(22) Y.C. Martin, Quantitative Drug Design, Marcel Dekker, New York, Basel 1978.

(23) N.S. Nirrlees, S.J. Noulton, C.T. Murphy, P.J. Taylor; J. Med. Chem., 1976, vol. 19, 615.

▼B

Προσάρτημα 1

ΜΕΘΟΔΟΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ/ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μια γενική εισαγωγή στις μεθόδους υπολογισμού, στοιχεία και παραδείγματα παρέχονται στο Handbook of Chemical Property Estimation Methods (a).

Οι δια υπολογισμού τιμές του P_{ow} μπορούν να χρησιμοποιηθούν:

— για να αποφασισθεί ποια από τις πειραματικές μεθόδους είναι η κατάλληλη (κλίμακα μεθόδου ανακινούμενης φιάλης: log P_{ow}: - 2 έως 4, κλίμακα μεθόδου HPLC: log P_{ow}: 0 έως 6),

— για να επιλεγούν οι κατάλληλες συνθήκες δοκιμής (π.χ. ουσίες αναφοράς για τις διαδικασίες της HPLC, αναλογία όγκων η-οκτανόλης/νερού για τη μέθοδο της ανακινούμενης φιάλης),

— ως εργαστηριακός εσωτερικός έλεγχος για πιθανά πειραματικά σφάλματα,

— για την παροχή μιας εκτίμησης του P_{ow} σε περιπτώσεις όπου οι πειραματικές μέθοδοι δεν μπορούν να εφαρμοσθούν για τεχνικούς λόγους.

ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ

Προκαταρκτική εκτίμηση του συντελεστή κατανομής

Η τιμή του συντελεστή κατανομής μπορεί να εκτιμηθεί με τη χρησιμοποίηση των διαλυτοτήτων της εξεταζόμενης ουσίας στους σταθερούς διαλύτες: Γι' αυτό:

$$P_{\text{εκαμ.}} = \frac{c_{\text{n – οκτανόλη κορεσμού}}}{c_{\text{νερό κορεσμού}}}$$

ΜΕΘΟΔΟΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ

Αρχή των μεθόδων υπολογισμού

Όλες οι μέθοδοι υπολογισμού βασίζονται στη συμβατική κατάτμηση του μορίου σε κατάλληλα δομικά τμήματα με γνωστές αξιόπιστες μεταβολές του log P_{ow}. Ο log P_{ow} του όλου μορίου υπολογίζεται στη συνέχεια σαν το άθροισμα των αντίστοιχων τμηματικών του τιμών συν το άθροισμα των διορθωτικών όρων για ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις.

Υπάρχουν πίνακες σταθερών και διορθωτικών όρων για τμήματα (b)(c)(d)(e). Ορισμένοι ενημερώνονται τακτικά (b).

Ποιοτικά κριτήρια

Γενικά, η αξιοπιστία της μεθόδου υπολογισμού μειώνεται όσο αυξάνει η πολυπλοκότητα της υπό μελέτη ένωσης. Στην περίπτωση απλών μορίων με μικρό μοριακό βάρος και μία ή δύο λειτουργικές ομάδες, μπορεί να αναμένεται μια απόκλιση 0,1 έως 0,3 μονάδων του log P_{ow} μεταξύ των αποτελεσμάτων των δια<(>όρων μεθόδων κατάτμησης και της μετρούμενης τιμής. Στην περίπτωση πολυπλοκότερων μορίων το περιθώριο σφάλματος μπορεί να είναι μεγαλύτερο. Αυτό εξαρτάται από την αξιοπιστία και την ύπαρξη σταθερών τμημάτων, όπως επίσης και από την ικανότητα αναγνώρισης ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων (π.χ. δεσμοί υδρογόνου) και την ορθή χρήση των διορθωτικών παραγόντων (το πρόβλημα μειώνεται με το πρόγραμμα για υπολογιστή CLOGP-3) (b). Στην περίπτωση ιονιζόμενων ενώσεων σημαντικό ρόλο παίζει το να ληφθεί σωστά υπόψη το φορτίο ή ο βαθμός ιονισμού.

▼B

Διαδικασίες υπολογισμού

Μέθοδος με το π του HANSCH

Η πρωτογενής σταθερά υδρόφοβου υποκατάστατη, π, που εισήχθη από τους Fujita et al. (f) ορίζεται από:

$\pi_x = \log P_{ow}$ (PhX) - $\log P_{ow}$ (PhH)

όπου P_{ow} (PhH) είναι ο συντελεστής κατανομής ενός αρωματικού παραγώγου και P_{ow} (PhH) ο συντελεστής κατανομής της μητρικής ένωσης

(π.χ. $\pi_{Cl} = \log P_{ow} (C_6H_5Cl) - \log P_{ow} (C_6H_6) = 2{,}84 - 2{,}13 = 0{,}71$).

Σύμφωνα με τον ορισμό της, η μέθοδος του π έχει εφαρμογή κυρίως σε περίπτωση αρωματικής υποκατάστασης. Οι τιμές του π για διάφορους υποκατάστατες υπάρχουν σε πίνακες (b)(c)(d). Χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό του $\log P_{ow}$ για αρωματικά μόρια ή μέρη αυτών.

Μέθοδος Rekker

Σύμφωνα με τον REKKER (g), η τιμή του $\log P_{ow}$ υπολογίζεται όπως παρακάτω:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{όροι αλληλεπίδρασης})$$

όπου το f_i παριστάνει τις σταθερές των διάφορων μοριακών τμημάτων και a_i τη συχνότητα με την οποία απαντώνται στο εξεταζόμενο μόριο. Οι διορθωτικοί παράγοντες μπορούν να εκφρασθούν σαν το ακέραιο πολλαπλάσιο μίας μόνης σταθεράς C_m (που καλείται κοινά «μαγική σταθερά»). Οι σταθερές τμημάτων f_i και C_m προσδιορίστηκαν από ένα κατάλογο 1 054 πειραματικών τιμών P_{ow} (825 ενώσεις) χρησιμοποιώντας ανάλυση πολλαπλής αναγωγής (c) (h). Ο προσδιορισμός των όρων αλληλεπίδρασης διενεργείται σύμφωνα με κανόνες που περιγράφονται στη βιβλιογραφία (c) (h) (i).

Μέθοδος Hansch-Leo

Σύμφωνα με τους Hansch και Leo (c), η τιμή του $\log P_{ow}$ υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j b_j F_j$$

όπου f_i παριστάνει τις σταθερές των διαφόρων μοριακών τμημάτων, F_j τους διορθωτικούς παράγοντες και a_i, Σ τις αντίστοιχες συχνότητες με τις οποίες απαντώνται. Με βάση πειραματικές τιμές P_{ow}, προσδιορίσθηκαν εμπειρικά ένας κατάλογος ατομικών και ομαδικών τιμών τμημάτων και ένας κατάλογος διορθωτικών όρων F_j (που καλούνται κοινώς «παράγοντες»). Οι διορθωτικοί όροι ταξινομήθηκαν σε πολλές διαφορετικές τάξεις (α) (c). Είναι σχετικώς πολύπλοκο και χρονοβόρο να ληφθούν υπόψη όλοι οι κανόνες και οι διορθωτικοί όροι. Για τον λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί πακέτα λογισμικού (b).

Συνδυασμένη μέθοδος

Ο υπολογισμός του $\log P_{ow}$ πολύπλοκων μορίων μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά, αν το μόριο χωρισθεί σε μεγαλύτερα τμήματα για τα οποία υπάρχουν αξιόπιστες τιμές $\log P_{ow}$, είτε από πίνακες (b) (c) είτε από ίδιες μετρήσεις. Τα τμήματα αυτά (ετεροκυκλικοί δακτύλιοι, ανθρακινόνη, αζωβενζόλιο) μπορούν να συνδυασθούν κατόπιν με τις τιμές π της μεθόδου HANSCH ή με τις σταθερές του REKKER ή του LEO.

Παρατηρήσεις

i) Οι μέθοδοι υπολογισμού μπορούν να εφαρμοσθούν σε μερικώς ή πλήρως ιονιζόμενες ενώσεις μόνον όταν είναι δυνατόν να ληφθούν υπόψη οι αναγκαίοι διορθωτικοί παράγοντες,

▼B

ii) Αν μπορεί να προϋποτεθεί η ύπαρξη ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου, πρέπει να προστεθούν οι αντίστοιχοι διορθωτικοί όροι (α) (περίπου + 0,6 έως + 1,0 log P_{ow} μονάδες). Ενδείξεις για την παρουσία τέτοιων δεσμών μπορούν να ληφθούν από στερεοχημικά μοντέλα ή φασματοσκοπικά δεδομένα του μορίου,

iii) Αν υπάρχει πιθανότητα ορισμένων ταυτομερών μορφών, σαν βάση του υπολογισμού θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί η πιο πιθανή μορφή,

iv) Θα πρέπει να ακολουθούνται προσεκτικά οι αναθεωρήσεις των πινάκων των σταθερών τμημάτων.

Έκθεση

Όταν χρησιμοποιούνται μέθοδοι υπολογισμού/εκτίμησης, η έκθεση δοκιμής πρέπει, αν είναι δυνατόν, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— περιγραφή της ουσίας (μείγμα, προσμείξεις, κ.λπ.),

— υπόδειξη για την ενδεχόμενη ύπαρξη ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου, διάστασης, φορτίου και οποιωνδήποτε άλλων μη συνηθισμένων φαινομένων (π.χ. ταυτομέρεια),

— περιγραφή της μεθόδου υπολογισμού,

— ταυτοποίηση ή παροχή βάσης δεδομένων,

— ιδιαιτερότητες στην επιλογή των τμημάτων,

— περιεκτική τεκμηρίωση του υπολογισμού.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(a) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (cd.), Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York, 1983.

(b) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).

(c) C. Hansen, A.j. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.

(d) A. Leo, C. Hansen, D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

(e) R.F. Rekker, H.M. de Kort, Eur. J. Med. Chem. — Chim. Ther. 1979, vol. 14, 479.

(f) T. Fujita, J. Iwasa and C. Hanseh, J. Amer. Chem. Soc, 1964, vol. 86, 5175.

(g) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, Elsevier, New York, 1977, vol. 1.

(h) C.V. Eadsforth, P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12 1459.

(i) R.A. Scherrer, ACS, American Chemical Society, Washington D.C., 1984, Symposium Series 255, p. 225.

▼B

Προσάρτημα 2

Συνιστώμενες ουσίες αναφοράς για τη μέθοδο HPLC

Αριθμός	Ουσία αναφοράς	log P_{ow}	pKa
1	2-Βουτανόνη	0,3	
2	4-Ακετυλοπυριδίνη	0,5	
3	Ανιλίνη	0,9	
4	Ακεταντλίδιο	1,0	
5	Βενζυλαλκοόλη	1,1	
6	ρ-Μεθοξυφαινόλη	1,3	pKa = 10,26
7	Φαινοξυ οξικό οξύ	1,4	pKa = 3,12
8	Φαινόλη	1,5	pKa = 9,92
9	2.4-Δινιτροφαινόλη	1,5	pKa = 3,96
10	Βενζονιτρίλιο	1,6	
11	Φαινυλακετονιτρίλιο	1,6	
12	4-Μεθυλοβενζυλ αλκοόλη	1,6	
13	Ακετοφαινόνη	1,7	
14	2-Νιτροφαινόλη	1,8	pKa = 7,17
15	3-Νιτροβενζοϊκό οξύ	1,8	pKa = 3,47
16	4-Χλωρανιλίνη	1,8	pKa = 4,15
17	Νιτροβενζόλιο	1,9	
18	Κινναμωμική αλκοόλη	1,9	
19	Βενζοϊκό οξύ	1,9	pKa = 4,19
20	ρ-Κρεζόλη	1,9	pKa = 10,17
21	Κινναμωμικό οξύ	2,1	pKa = 3,89 cis 4,44 trans
22	Ανιοόλη	2,1	
23	Βενζοϊκός μεθυλεστέρας	2,1	
24	Βενζόλιο	2,1	
25	3-Μεθυλοβενζοϊκό οξύ	2,4	pKa = 4,27
26	4-Χλωροφαινόλη	2,4	pKa = 9,1
27	Τριχλωραιθυλένιο	2,4	
28	Ατραζίνη	2,6	
29	Βενζοϊκός αιθυλεστέρας	2,6	
30	2.6-Διχλωροβενζονντρίλιο	2,6	
31	3-Χλωροβενζοϊκό οξύ	2,7	pKa = 3,82
32	Τολουόλιο	2,7	
33	1-Ναφθόλη	2,7	pKa = 9,34
34	2.3-Διχλωροανιλίνη	2,8	
35	Χλωροβενζόλιο	2,8	
36	Αλλυλο-φαινυλαιθέρας	2,9	
37	Βρωμοβενζόλιο	3,0	

▼B

Αριθμός	Ουσία αναφοράς	log P_{ow}	pKa
38	Αιθυλοβενζόλιο	3,2	
39	Βενζοφαινόνη	3,2	
40	4-Φαινυλοφαινόλη	3,2	pKa = 9,54
41	Θυμόλη	3,3	
42	1.4-Διχλωροβενζόλιο	3,4	
43	Διφαινυλαμίνη	3,4	pKa = 0,79
44	Ναφθαλένιο	3,6	
45	Βενζοϊκός φαινυλεστέρας	3,6	
46	Ισοπροπυλοβενζόλιο	3,7	
47	2.4.6-Τριχλωροφαινόλη	3,7	pKa = 6
48	Διφαινυλιο	4,0	
49	Βενζοϊκός βενζυλεστέρας	4,0	
50	2.4-Δινιτρο-6 σε π-βουτυλοφαινόλη	4,1	
51	1.2.4.-Τριχλωροβενζόλιο	4,2	
52	Δωδεκανοϊκό οξύ	4,2	
53	Διφαινυλαιθέρας	4,2	
54	η-Βουτυλοβενζόλιο	4,5	
55	Φαινανθρένιο	4,5	
56	Φλουορανθένιο	4,7	
57	Διβενζύλιο	4,8	
58	2.6-Διφαινυλοπυριδίνη	4,9	
59	Τριφαινυλαμίνη	5,7	
60	DDT	6,2	
	Άλλες ουσίες αναφοράς χαμηλού log P_{ow}		
1	Νικοτινικό οξύ	- 0,07	

▼B

Α.9. **ΣΗΜΕΙΟ ΑΝΑΦΛΕΞΗΣ**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πριν από την εκτέλεση της δοκιμής αυτής, χρήσιμο είναι να υπάρχουν προκαταρκτικές πληροφορίες για την αναφλεξιμότητα της ουσίας. Η δοκιμή μπορεί να εφαρμοσθεί σε υγρές ουσίες των οποίων οι ατμοί μπορούν να αναφλέγουν από πηγές ανάφλεξης. Οι μέθοδοι δοκιμής που περιλαμβάνονται στο κείμενο αυτό είναι αξιόπιστες μόνο σε περιοχές σημείων ανάφλεξης που καθορίζονται στις συγκεκριμένες μεθόδους.

Κατά την επιλογή της μεθόδου που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η πιθανότητα χημικών αντιδράσεων μεταξύ της ουσίας και του υποδοχέα του δείγματος.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Σημείο ανάφλεξης καλείται η χαμηλότερη θερμοκρασία, διορθωμένη για πίεση 101,325 kPa, στην οποία ένα υγρό εκλύει ατμούς, κάτω από τις συνθήκες που ορίζονται στη μέθοδο δοκιμής, σε τέτοια ποσότητα ώστε να παράγεται στο δοχείο δοκιμής αναφλέξιμο μείγμα ατμών/αέρα.

Μονάδες: ^{o}C

$t = T - 273,15$

(t σε ^{o}C και T σε K)

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Δεν απαιτείται να χρησιμοποιούνται ουσίες αναφοράς σε όλες τις περιπτώσεις κατά τις οποίες διερευνάται μία νέα ουσία. Οι ουσίες αυτές θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατά βάση για να ελέγχεται κατά διαστήματα η εφαρμοζόμενη μέθοδος και για να γίνεται σύγκριση με αποτελέσματα από άλλες μεθόδους.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η ουσία τοποθετείται σε δοχείο δοκιμής και θερμαίνεται ή ψύχεται στη θερμοκρασία δοκιμής ανάλογα με τη διαδικασία που περιγράφεται στη συγκεκριμένη μέθοδο δοκιμής. Για να εξακριβωθεί αν το δείγμα ανεφλέγη ή όχι στη θερμοκρασία δοκιμής, διενεργούνται δοκιμές ανάφλεξης.

1.5. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

1.5.1. **Επαναληψιμότητα**

Η επαναληψιμότητα ποικίλλει ανάλογα με την περιοχή του σημείου ανάφλεξης και τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο δοκιμής κατά μέγιστο 2 ^{o}C.

1.5.2. **Ευαισθησία**

Η ευαισθησία εξαρτάται από τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο δοκιμής.

1.5.3. **Εξειδίκευση**

Η δυνατότητα εφαρμογής μερικών μεθόδων δοκιμής περιορίζεται σε συγκεκριμένες περιοχές σημείων ανάφλεξης και εξαρτάται από δεδομένα που σχετίζονται με την ουσία (π.χ. υψηλό ιξώδες).

▼B

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.6.1. **Προετοιμασίες**

Δείγμα της εξεταζόμενης ουσίας τοποθετείται σε μια συσκευή δοκιμής σύμφωνα με το σημείο 1.6.3.1. ή/και 1.6.3.2.

Για λόγους ασφαλείας, συνιστάται να χρησιμοποιείται μέθοδος που απαιτεί μικρό δείγμα, περίπου 2 cm^3, στην περίπτωση ενεργητικών ή τοξικών ουσιών.

1.6.2. **Συνθήκες δοκιμής**

Η συσκευή θα πρέπει, στο βαθμό που συμβαδίζει με το θέμα της ασφάλειας, να τοποθετείται μακριά από ρεύματα αέρα.

1.6.3. **Εκτέλεση της δοκιμής**

1.6.3.1. *Μέθοδος ισορροπίας*

Βλέπε ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679,

1.6.3.2. *Μέθοδος μη ισορροπίας*

Συσκευή ABEL:

Βλέπε BS 2000 μέρος 170, NF MO7-011, NF T06-009.

Συσκευή Abel-Pensky:

Βλέπε EN 57, DIN 51755 μέρος 1 (για θερμοκρασίες από 5 έως 65 °C), DIN 51755 μέρος 2 (για θερμοκρασίες κάτω των 5 °C), NF MO7-036.

Συσκευή Tag:

Βλέπε ASTM D 56.

Συσκευή Pensky-Martens:

Βλέπε. ISO 2719, EN 11, DIN 51758, ASTM D 93, BS 2000-34, NF MO7-019.

Παρατηρήσεις:

Όταν το σημείο ανάφλεξης, προσδιοριζόμενο με μια μέθοδο μη ισορροπίας όπως αναφέρεται στο 1.6.3.2., βρίσκεται να είναι 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C ή 55 ± 2 °C, θα πρέπει να επαληθεύεται με μια μέθοδο ισορροπίας χρησιμοποιώντας την ίδια συσκευή.

Για γνωστοποίηση μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνον οι μέθοδοι που μπορούν να δώσουν τη θερμοκρασία του σημείου ανάφλεξης.

Για τον προσδιορισμό του σημείου ανάφλεξης ιξωδών υγρών (βαφές, κόμμεα και παρόμοια) που περιέχουν διαλύτες, μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο συσκευές και μέθοδοι δοκιμών κατάλληλες για τον προσδιορισμό του σημείου ανάφλεξης ιξωδών υγρών.

Βλέπε ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213 μέρος 1.

▼B

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

Η έκθεση δοκιμής πρέπει, αν είναι δυνατόν, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— τις επακριβείς προδιαγραφές της ουσίας (ταυτοποίηση και προσμείξεις)·

— η χρησιμοποιηθείσα μέθοδος θα πρέπει να δηλώνεται όπως επίσης και ενδεχόμενες αποκλίσεις·

— τα αποτελέσματα και τυχόν πρόσθετες παρατηρήσεις σχετικές με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Ουδεμία.

▼B

Α.10. ΑΝΑΦΛΕΞΙΜΟΤΗΤΑ, ΣΤΕΡΕΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πριν από την εκτέλεση της δοκιμής αυτής, χρήσιμο είναι να υπάρχουν προκαταρκτικές πληροφορίες για τις δυνητικές εκρηκτικές ιδιότητες της ουσίας.

Η δοκιμή αυτή θα πρέπει να εφαρμόζεται μόνο σε ουσίες με μορφή σκόνης, κόκκων ή πάστας.

Για να μη περιληφθούν όλες οι ουσίες που μπορούν να αναφλέγουν αλλά μόνον εκείνες που καίγονται γρήγορα ή εκείνες των οποίων η συμπεριφορά όταν καίγονται είναι σε οποιαδήποτε περίπτωση ιδιαίτερα επικίνδυνη, θεωρούνται σαν λίαν εύφλεκτες μόνον οι ουσίες των οποίων η ταχύτητα καύσης υπερβαίνει μία ορισμένη οριακή τιμή.

Ιδιαίτερα επικίνδυνη, λόγω των δυσκολιών που υπάρχουν στο σβήσιμο μιας τέτοιας φωτιάς, μπορεί να είναι η περίπτωση στην οποία η πυράκτωση διαδίδεται στη μάζα μιας μεταλλικής σκόνης. Οι μεταλλικές σκόνες θα πρέπει να θεωρούνται λίαν εύφλεκτες αν η πυράκτωση επεκτείνεται διαμέσου της μάζας τους μέσα σε ορισμένο χρονικό διάστημα.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Χρόνος καύσης εκφραζόμενος σε δευτερόλεπτα.

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑ

Δεν καθορίζονται.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η ουσία στρώνεται με τη μορφή συνεχούς λωρίδας ή γραμμής από σκόνη μήκους περίπου 250 mm και εκτελείται μία προκαταρκτική δοκιμή ελέγχου για να διαπιστωθεί αν, η έναυση με φλόγα αερίου, οδηγεί σε διάδοση της καύσης με φλόγα ή η ουσία σιγοκαίγεται. Εάν η διάδοση της καύσης σε μήκος 200 mm της γραμμής επέρχεται μέσα σε ορισμένο χρονικό διάστημα, τότε εκτελείται το πλήρες πρόγραμμα της δοκιμής για να προσδιορισθεί η ταχύτητα καύσης.

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Δεν δηλώνονται.

▼B

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.6.1. **Προκαταρκτική δοκιμή ελέγχου**

Η ουσία στρώνεται με τη μορφή συνεχούς λωρίδας ή γραμμής από σκόνη μήκους περίπου 250 mm, πλάτους 20 mm και ύφους 10 mm σε μία άκαυστη πλάκα, χωρίς πόρους και χαμηλής θερμοαγωγιμότητας. Στο ένα άκρο της γραμμής φέρεται θερμή φλόγα από καυστήρα αερίου (ελάχιστη διάμετρος 5 mm) μέχρι που η σκόνη να αναφλέγει ή για δύο λεπτά κατ' ανώτατο όριο (πέντε λεπτά για σκόνες μετάλλων ή μεταλλικών κραμάτων). Θα πρέπει να σημειωθεί αν η καύση διαδίδεται στα 200 mm της γραμμής μέσα σε χρονικό διάστημα τεσσάρων λεπτών δοκιμής (ή 40 λεπτών για μεταλλικές σκόνες;. Αν η ουσία δεν αναφλέγει και δεν διαδοθεί η καύση είτε με φλόγα είτε με σιγανή καύση σε μήκος 200 mm της γραμμής της σκόνης μέσα σε χρονικό διάστημα δοκιμής τεσσάρων λεπτών (ή 40 λεπτών), τότε η ουσία δεν θα πρέπει να θεωρείται σαν λίαν εύφλεκτη και δεν απαιτείται καμία περαιτέρω δοκιμασία. Αν η διάδοση της καύσης της ουσίας σε μήκος 200 mm της γραμμής επέρχεται σε λιγότερο από τέσσερα λεπτά ή σε λιγότερο από 40 λεπτά στην περίπτωση μεταλλικής σκόνης, θα πρέπει να πραγματοποιείται η δοκιμασία που περιγράφεται πιο κάτω (σημείο 1.6.2 και μετέπειτα).

1.6.2. **Δοκιμή ταχύτητας καύσης**

1.6.2.1. *Προετοιμασία*

Ουσίες με μορφή σκόνης ή κόκκων χύνονται χωρίς να συμπιέζονται μέσα σε ένα καλούπι μήκους 250 mm με τριγωνική διατομή εσωτερικού ύψους 10 mm και πλάτους 20 mm. Και στις δύο πλευρές του καλουπιού, κατά τη διαμήκη διεύθυνση, τοποθετούνται δύο μεταλλικές πλάκες σαν πλευρικά όρια που προεξέχουν 2 mm από την πάνω ακμή της τριγωνικής διατομής (εικόνα). Το καλούπι αφήνεται κατόπιν να πέσει τρεις φορές από ύψος 2 cm σε μια στερεή επιφάνεια. Αν χρειασθεί, το καλούπι γεμίζεται και πάλι. Οι πλευρικές πλάκες κατόπιν αφαιρούνται και η περίσσεια της ουσίας απομακρύνεται με ξύσιμο. Στο πάνω μέρος του καλουπιού τοποθετείται μία άκαυστη, χωρίς πόρους και χαμηλής θερμοαγωγιμότητας πλάκα, η διάταξη ανατρέπεται και το καλούπι απομακρύνεται.

Οι ουσίες που έχουν τη μορφή πάστας απλώνονται σε μία άκαυστη, χωρίς πόρους και χαμηλής θερμοαγωγιμότητας πλάκα με τη μορφή σχοινιού μήκους 250 mm και διατομής περίπου 1 cm^2.

1.6.2.2. *Συνθήκες δοκιμής*

Στην περίπτωση ουσίας που είναι ευαίσθητη στην υγρασία, η δοκιμή πρέπει να εκτελείται όσο το δυνατόν γρηγορότερα μετά από την απομάκρυνση της από το δοχείο.

1.6.2.3. *Εκτέλεση της δοκιμής*

Η στήλη της ουσίας φέρεται μέσα σε ένα απαγωγό.

Η ταχύτητα του αέρα (το «τράβηγμα») θα πρέπει να είναι αρκετή ώστε να εμποδίζεται η διαφυγή ατμών μέσα στο εργαστήριο ενώ δεν θα πρέπει να μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Γύρω από τη διάταξη πρέπει να τοποθετείται μια οθόνη ρεύματος.

Η στήλη ανάβεται στο ένα άκρο της χρησιμοποιώντας τη θερμή φλόγα ενός καυστήρα αερίου (ελάχιστη διάμετρος 5 mm). Όταν η καύση έχει προχωρήσει σε μήκος 80 mm της στήλης, μετριέται η ταχύτητα καύσης στα επόμενα 100 mm.

▼B

Η δοκιμή πραγματοποιείται έξι φορές, χρησιμοποιώντας κάθε φορά καθαρή κρύα πλάκα, εκτός κι αν παρατηρηθεί νωρίτερα κάποιο θετικό αποτέλεσμα.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Για την εκτίμηση λαμβάνονται υπόψη ο χρόνος καύσης από την προκαταρκτική δοκιμή ελέγχου (1.6.1) και ο βραχύτερος χρόνος καύσης στις μέχρι έξι δοκιμές (1.6.2.3).

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει, αν είναι δυνατόν να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— τις επακριβείς προδιαγραφές ουσίας (ταυτοποίηση και προσμείξεις),

— περιγραφή της εξεταζόμενης ουσίας, τη φυσική της κατάσταση συμπεριλαμβανόμενης και της περιεκτικότητας της σε υγρασία,

— αποτελέσματα από την προκαταρκτική δοκιμή ελέγχου και από τη δοκιμή ταχύτητας καύσης, εφόσον υπάρχουν,

— κάθε πρόσθετη παρατήρηση σχετική με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΟΥ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ

Οι ουσίες σε μορφή σκόνης, κόκκων ή πάστας πρέπει να θεωρούνται σαν λίαν εύφλεκτες όταν ο χρόνος καύσης σε οποιαδήποτε από τις δοκιμές που έγιναν σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στο 1.6.2 είναι μικρότερος από 45 δευτερόλεπτα. Οι σκόνες μετάλλων ή μεταλλικών κραμάτων θεωρούνται σαν λίαν εύφλεκτες όταν μπορούν να αναφλέγουν και η φλόγα ή η ζώνη αντίδρασης απλώνεται σε όλο το δείγμα μέσα σε δέκα λεπτά ή λιγότερο.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

NF T 20-042 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of solids.

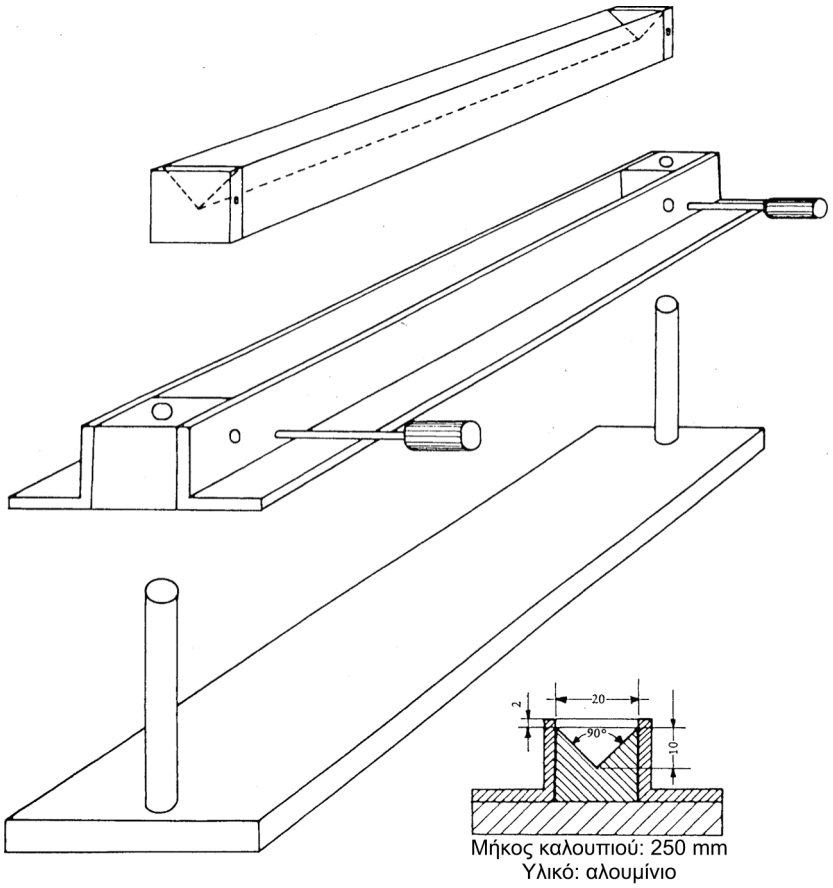
▼B

Προσάρτημα

Εικόνα

Καλούπι και εξαρτήματα για την παρασκευή της στήλης

(Όλες οι διαστάσεις σε mm)



▼B

Α.11. **ΑΝΑΦΛΕΞΙΜΟΤΗΤΑ (ΑΕΡΙΑ)**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίζεται το κατά πόσον αέρια αναμεμειγμένα με αέρα, σε θερμοκρασία δωματίου (περίπου 20 °C) και υπό ατμοσφαιρική πίεση, είναι εύφλεκτα και, σε θετική περίπτωση, σε ποια περιοχή συγκεντρώσεων. Μείγματα αυξανόμενων συγκεντρώσεων του ελεγχόμενου αερίου με αέρα εκτίθενται σε ηλεκτρικό σπινθήρα και παρατηρείται εάν συμβαίνει έναυση.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Η περιοχή αναφλεξιμότητας είναι η περιοχή συγκέντρωσης μεταξύ των χαμηλότερων και των υψηλότερων ορίων έκρηξης. Τα χαμηλότερα και τα υψηλότερα όρια έκρηξης είναι εκείνα τα όρια συγκέντρωσης του εύφλεκτου αερίου, σε μείγμα με αέρα, στα οποία δεν συμβαίνει διάδοση της φλόγας.

1.3. ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Δεν καθορίζεται.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η συγκέντρωση αερίου στον αέρα αυξάνεται βαθμιαία και το μείγμα, σε κάθε στάδιο, εκτίθεται σε ηλεκτρικό σπινθήρα.

1.5. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Δεν δηλώνονται.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.6.1. **Συσκευή**

Ως δοχείο δοκιμής χρησιμοποιείται όρθιος γυάλινος κύλινδρος με εσωτερική διάμετρο 50 mm κατ' ελάχιστο και ύψος 300 mm κατ' ελάχιστο. Τα ηλεκτρόδια έναυσης έχουν μεταξύ τους απόσταση 3 έως 5 mm και είναι τοποθετημένα 60 mm πάνω από τον πυθμένα του κυλίνδρου. Ο κύλινδρος φέρει άνοιγμα εκτόνωσης της πίεσης. Η συσκευή πρέπει να θωρακίζεται για να περιορίζεται οποιαδήποτε ζημιά από έκρηξη.

Ως πηγή έναυσης χρησιμοποιείται σταθερός επαγωγικός σπινθήρας διάρκειας 0,5 δευτερολέπτων, που παράγεται από μετασχηματιστή υψηλής τάσης με τάση εξόδου 10 έως 15 KV (μέγιστη ισχύς εισόδου 300 W). Ένα παράδειγμα κατάλληλης συσκευής περιγράφεται στην παραπομπή (2).

1.6.2. **Συνθήκες δοκιμής**

Η δοκιμή πρέπει να εκτελείται σε θερμοκρασία δωματίου (περίπου 20 °C).

▼B

1.6.3. **Εκτέλεση της δοκιμής**

Χρησιμοποιώντας αναλογικές αντλίες, εισάγεται στο γυάλινο κύλινδρο μείγμα γνωστής συγκέντρωσης αερίου σε αέρα. Διαμέσου του μίγματος διέρχεται σπινθήρας και παρατηρείται αν αποσπάται ή όχι από την πηγή έναυσης φλόγα και διαδίδεται ανεξάρτητα. Η συγκέντρωση του αερίου μεταβάλλεται κατά βαθμίδες της τάξης του 1 % κ.ο.κ. μέχρις ότου επέλθει ανάφλεξη όπως περιγράφεται πιο πάνω.

Εάν η χημική δομή του αερίου καταδεικνύει ότι αυτό θα πρέπει να είναι μη εύφλεκτο και ότι μπορεί να υπολογισθεί η σύσταση του στοιχειομετρικού μείγματος με αέρα, τότε, κατά βαθμίδες της τάξης του 1 % χρειάζεται να εξετασθούν μόνο μείγματα που εμπίπτουν στην κλίμακα που αντιστοιχεί από 10 % κάτω έως 10 % πάνω από τη στοιχειομετρική σύσταση.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Η ύπαρξη διάδοσης της φλόγας είναι το μόνο σχετικό πληροφοριακό στοιχείο για τον προσδιορισμό της ιδιότητας αυτής.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

Η έκθεση δοκιμής πρέπει, αν είναι δυνατόν, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— τις επακριβείς προδιαγραφές της ουσίας (ταυτοποίηση και προσμείξεις),

— μια περιγραφή, με διαστάσεις, της χρησιμοποιηθείσας συσκευής,

— τη θερμοκρασία στην οποία έγινε η δοκιμή,

— τις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν και τα ληφθέντα αποτελέσματα,

— το αποτέλεσμα της δοκιμής: μη εύφλεκτο αέριο ή λίαν εύφλεκτο αέριο,

— στην περίπτωση που συμπεραίνεται ότι το αέριο είναι μη εύφλεκτο, τότε θα πρέπει να δηλώνεται η περιοχή συγκεντρώσεων στην οποία πραγματοποιήθηκαν δοκιμές κατά βαθμίδες της τάξης του 1 %,

— πρέπει να αναφέρεται κάθε πληροφορία και παρατήρηση σχετική με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) NF T 20-041 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases.

(2) W.Berthold, D.Conrad, T.Grewer, H.Grosse-Wortmann, T.Redeker und H.Schacke. «Enrwicklung einer Standard—Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen». Chem.-Ing.-Tech. 1984, vol 56, 2, 126-127.

▼B

A.12. **ΑΝΑΦΛΕΞΙΜΟΤΗΤΑ (ΣΕ ΕΠΑΦΗ ΜΕ ΝΕΡΟ)**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Αυτή η μέθοδος δοκιμής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εξετασθεί αν η αντίδραση μιας ουσίας με νερό ή υγρό αέρα οδηγεί στην παραγωγή επικίνδυνων ποσοτήτων αερίου ή αερίων που μπορεί να είναι λίαν εύφλεκτα.

Η μέθοδος δοκιμής μπορεί να εφαρμοστεί και σε στερεές όπως και σε υγρές ουσίες. Δεν εφαρμόζεται για ουσίες που σε επαφή με τον αέρα αναφλέγονται αυθόρμητα.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Λίαν εύφλεκτες: ουσίες οι οποίες σε επαφή με το νερό ή με υγρό αέρα, εκλύουν λίαν εύφλεκτα αέρια σε επικίνδυνες ποσότητες με ελάχιστη ταχύτητα 1 λίτρο/χιλιόγραμμο ανά ώρα.

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η ουσία εξετάζεται σύμφωνα με τη σταδιακή διαδικασία που περιγράφεται πιο κάτω' αν σε κάποιο στάδιο επέρχεται ανάφλεξη, δεν χρειάζεται περαιτέρω εξέταση. Αν είναι γνωστό ότι η ουσία δεν αντιδρά βίαια με το νερό, τότε προχωρούμε στο στάδιο 4 (1.3.4).

1.3.1. **Στάδιο 1**

Η εξεταζόμενη ουσία τοποθετείται σε δοχείο που περιέχει απεσταγμένο νερό στους 20 °C και σημειώνεται αν το παραγόμενο αέριο αναφλέγεται ή όχι.

1.3.2. **Στάδιο 2**

Η εξεταζόμενη ουσία τοποθετείται πάνω σε διηθητικό χαρτί που επιπλέει στην επιφάνεια δοχείου το οποίο περιέχει απεσταγμένο νερό στους 20 °C και σημειώνεται αν το παραγόμενο αέριο αναφλέγεται ή όχι. Το διηθητικό χαρτί χρησιμοποιείται απλά για να κρατήσει την ουσία σε μία θέση, πράγμα που αυξάνει τις πιθανότητες για ανάφλεξη.

1.3.3. **Στάδιο 3**

Η εξεταζόμενη ουσία διαμορφώνεται σε σωρό ύφους περίπου 2 cm και διαμέτρου 3 cm. Στο σωρό προσθέτονται λίγες σταγόνες νερό και σημειώνεται αν το παραγόμενο αέριο αναφλέγεται ή όχι.

1.3.4. **Στάδιο 4**

Η εξεταζόμενη ουσία ανακατεύεται με απεσταγμένο νερό 20 °C και μετριέται η παραγωγή αερίου για περίοδο επτά ωρών ανά διαστήματα μίας ώρας. Αν ο ρυθμός παραγωγής του αερίου, μετά το επτάωρο, είναι ασταθής ή αυξάνεται, η περίοδος μετρήσεων θα έπρεπε να επεκταθεί σε ένα μέγιστο χρόνο πέντε ημερών. Ο έλεγχος πρέπει να διακοπεί αν η παραγωγή αερίου υπερβεί το 1 λίτρο/χιλιόγραμμο ανά ώρα.

▼B

1.4. ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Δεν καθορίζεται.

1.5. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Δεν δηλώνονται.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

1.6.1 **Στάδιο 1**

1.6.1.1. *Συνθήκες δοκιμής*

Η δοκιμή εκτελείται σε θερμοκρασία δωματίου {περίπου 20 °C).

1.6.1.2. *Εκτέλεση της δοκιμής*

Μικρή ποσότητα της ελεγχόμενης ουσίας (διαμέτρου περίπου 2 mm) τοποθετείται σε δοχείο που περιέχει απεσταγμένο νερό. Θα πρέπει να σημειωθεί (i) αν παράγεται κανένα αέριο και (Η) αν παρουσιάζεται ανάφλεξη του αερίου. Αν το αέριο αναφλέγει, δεν χρειάζεται περαιτέρω έλεγχος της ουσίας, δεδομένου ότι η ουσία θεωρείται επικίνδυνη.

1.6.2. **Στάδιο 2**

1.6.2.1. *Συσκευή*

Ένα διηθητικό χαρτί επιπλέει επίπεδο στην επιφάνεια απεσταγμένου νερού σε οποιοδήποτε κατάλληλο δοχείο, π.χ. ένα κρυσταλλωτήριο εξάτμισης διαμέτρου 100 mm.

1.6.2.2. *Συνθήκες δοκιμής*

Η δοκιμή εκτελείται σε θερμοκρασία δωματίου (περίπου 20 °C).

1.6.2.3. *Εκτέλεση της δοκιμής*

Μικρή ποσότητα της εξεταζόμενης ουσίας (διαμέτρου περίπου 2 mm) τοποθετείται στο κέντρο του διηθητικού χαρτιού. Θα πρέπει να σημειωθεί (i) αν παράγεται κανένα αέριο και (ii) αν παρουσιάζεται ανάφλεξη του αερίου. Αν το αέριο αναφλέγει, δε χρειάζεται περαιτέρω έλεγχος της ουσίας, δεδομένου ότι η ουσία θεωρείται επικίνδυνη.

1.6.3. **Στάδιο 3**

1.6.3.1. *Συνθήκες δοκιμής*

Η δοκιμή εκτελείται σε θερμοκρασία δωματίου (περίπου 20 °C).

1.6.3.2. *Εκτέλεση της δοκιμής*

Η εξεταζόμενη ουσία γίνεται μία σωρός ύψους περίπου 2 cm και διαμέτρου 3 cm με κοίλωμα στην κορυφή. Προσθέτονται στο κοίλωμα μερικές σταγόνες νερού και σημειώνεται αν (i) παράγεται κανένα αέριο και (ii) αν συμβεί ανάφλεξη του αερίου. Αν το αέριο αναφλέγει, δε χρειάζεται περαιτέρω έλεγχος της ουσίας, δεδομένου ότι η ουσία θεωρείται επικίνδυνη.

▼B

1.6.4. **Στάδιο 4**

1.6.4.1. *Συσκευή*

Η συσκευή στήνεται όπως εικονίζεται στην εικόνα.

1.6.4.2. *Συνθήκες δοκιμής*

Το δοχείο της εξεταζόμενης ουσίας ελέγχεται ως προς την τυχόν ύπαρξη σκόνης με μέγεθος σωματιδίων < 500 μm. Αν η σκόνη αποτελεί ποσοστό μεγαλύτερο από το 1 % w/w του συνόλου ή αν η σκόνη είναι εύθρυπτη, τότε η όλη ποσότητα της ουσίας θα πρέπει να αλέθεται σε μορφή σκόνης πριν από την δοκιμή, ώστε να μπορεί να επέλθει μείωση του μεγέθους των σωματιδίων κατά την αποθήκευση και χρησιμοποίηση διαφορετικά η ουσία πρέπει να εξετάζεται όπως παραλαμβάνεται. δοκιμή θα πρέπει να εκτελείται σε θερμοκρασία δωματίου (περίπου 20 ^{o}C) και υπό ατμοσφαιρική πίεση.

1.6.4.3. *Εκτέλεση της δοκιμής*

Στο σταγονομετρικό χωνί της συσκευής φέρονται 10 έως 20 ml νερό ενώ στην κωνική φιάλη τοποθετούνται 10 γραμμάρια της ουσίας. Ο όγκος του εκλυόμενου αερίου μπορεί να μετριέται με οποιοδήποτε κατάλληλο μέσον. Ανοίγεται η στρόφιγγα του χωνιού για να χυθεί το νερό μέσα στην κωνική φιάλη και τίθεται σε λειτουργία ένα χρονόμετρο με διακόπτη. Κάθε ώρα και για χρονικό διάστημα επτά ωρών μετριέται η έκλυση αερίου. Αν, κατά το χρονικό αυτό διάστημα, η έκλυση αερίου είναι ακανόνιστη ή αν, στο τέλος της χρονικής αυτής περιόδου, εμφανίζεται αυξανόμενος ρυθμός έκλυσης αερίου, τότε οι μετρήσεις θα πρέπει να συνεχισθούν για διάστημα πέντε ημερών. Εάν, κατά τη διάρκεια της μέτρησης, ο ρυθμός έκλυσης αερίου υπερβεί το 1 λίτρο/kg ανά ώρα, η δοκιμή μπορεί να διακόπτεται. Η δοκιμή αυτή θα πρέπει να εκτελείται τρεις φορές.

Εάν η χημική ταυτότητα του αερίου είναι άγνωστη, τότε θα πρέπει να γίνεται ανάλυση του αερίου. Όταν το αέριο περιέχει λίαν εύφλεκτα συστατικά και είναι άγνωστο αν το όλο μείγμα είναι λίαν εύφλεκτο, πρέπει να παρασκευάζεται μείγμα με την ίδια σύσταση και να εξετάζεται σύμφωνα με τη μέθοδο Α.11.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Η ουσία θεωρείται σαν επικίνδυνη αν:

— σε οποιοδήποτε στάδιο της διαδικασίας της δοκιμής επέλθει αυθόρμητη ανάφλεξη,

ή

— παρατηρηθεί έκλυση εύφλεκτου αερίου με ρυθμό μεγαλύτερο από 1 λίτρο/Kg της ουσίας ανά ώρα.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

Η έκθεση δοκιμής πρέπει, αν είναι δυνατόν, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— τις επακριβείς προδιαγραφές της ουσίας (ταυτοποίηση και προσμείξεις),

— λεπτομέρειες για οποιαδήποτε αρχική προετοιμασία της εξεταζόμενης ουσίας,

▼B

— τα αποτελέσματα των δοκιμών (στάδια 1, 2, 3 και 4),

— τη χημική ταυτότητα του εκλυόμενου αερίου,

— την ταχύτητα έκλυσης του αερίου εφόσον εκτελεσθεί το στάδιο 4 (1.6.4),

— κάθε πρόσθετη παρατήρηση σχετική με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, test and criteria, 1990, United Nations, New York.

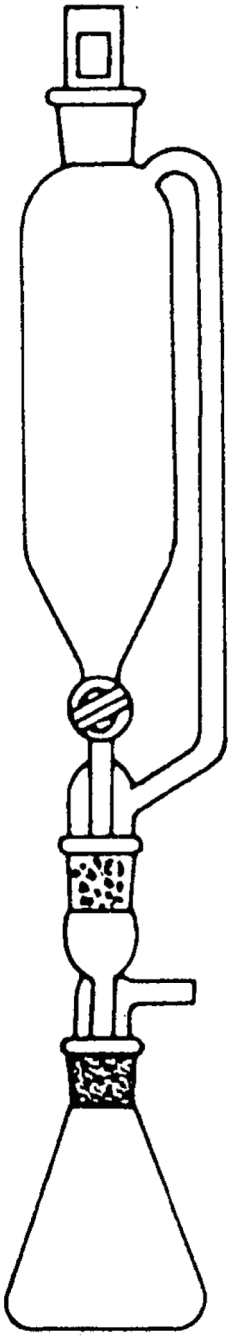
(2) NF T 20-040 (SEPT 85). Chemical products lor industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼B

Προσάρτημα

Εικόνα

Συσκευή



▼B

A.13. **ΠΥΡΟΦΩΣΦΟΡΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΣΤΕΡΕΩΝ ΚΑΙ ΥΓΡΩΝ**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η δοκιμή έχει εφαρμογή σε στερεές και υγρές ουσίες, που αναφλέγονται αυθόρμητα, λίγη ώρα αφότου έλθουν σε επαφή με τον αέρα σε θερμοκρασία δωματίου (περίπου 20 °C).

Ουσίες που χρειάζεται να εκτεθούν στον αέρα επί ώρες ή ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου ή σε υψηλές θερμοκρασίες πριν να αναφλέγουν, δεν καλύπτονται από αυτή τη μέθοδο δοκιμής,

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Οι ουσίες θεωρούνται ότι είναι πυροφωσφορικές αν αναφλέγονται ή προκαλούν απανθράκωση κάτω από τις συνθήκες που περιγράφονται στο 1.6.

Μπορεί επίσης να χρειασθεί να ελεγχθεί η αυτοαναφλεξιμότητα των υγρών χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Α.15 θερμοκρασία αυτοαναφλέξεως (υγρά και αέρια).

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Δεν καθορίζονται.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η ουσία, στερεά ή υγρά, προστίθεται σε αδρανή φορέα και φέρεται σε επαφή με τον αέρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για χρονικό διάστημα πέντε λεπτών. Αν οι υγρές ουσίες δεν αναφλέγονται, τότε αυτές προσροφούνται σε διηθητικό χαρτί και εκτίθενται στον αέρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (περίπου 20 °C) για πέντε λεπτά. Αν μια στερεά ή υγρά ουσία αναφλέγεται, ή μια υγρά ουσία αναφλέγεται ή απανθρακώνει ένα διηθητικό χαρτί, τότε η ουσία θεωρείται σαν πυροφωσφορική.

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Επαναληψιμότητα: εξαιτίας της σπουδαιότητας που παρουσιάζει σε σχέση με το θέμα «ασφάλεια», και ένα μόνο θετικό αποτέλεσμα είναι αρκετό για να θεωρηθεί μία ουσία σαν πυροφωσφορική.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.6.1. **Συσκευή**

Κάψα πορσελάνης με διάμετρο 10 cm περίπου γεμίζεται με γη διατομών μέχρι ένα ύφος περίπου 5 mm σε θερμοκρασία δωματίου (περίπου 20 °C).

Σημείωση:

Η γη διατομών, ή οποιαδήποτε άλλη παρόμοια αδρανής ουσία που γενικά μπορεί να ληφθεί, πρέπει να θεωρείται σαν αντιπροσωπευτική του εδάφους στο οποίο μπορεί να χύνεται η εξεταζόμενη ουσία, σε περίπτωση ατυχήματος.

Για την εξέταση υγρών που δεν αναφλέγονται σε επαφή με αέρα όταν ευρίσκονται σε επαφή με αδρανή φορέα, απαιτείται ξηρό διηθητικό χαρτί.

▼B

1.6.2. **Εκτέλεση της δοκιμής**

α) *Στερεά με μορφή σκόνης*

1 έως 2 cm^3 της εξεταζόμενης ουσίας χύνονται από ύψος 1 m περίπου πάνω σε μία άκαυστη επιφάνεια και παρατηρείται αν η ουσία αναφλέγεται κατά την απόχυση ή μέσα σε 5 λεπτά μετά την απόχυση.

Η δοκιμή εκτελείται έξι φορές εκτός κι αν επέλθει ανάφλεξη.

β) *Υγρά*

Περίπου 5 cm^3 του εξεταζόμενου υγρού χύνονται μέσα σε μια προετοιμασμένη κάφα πορσελάνης και παρατηρείται αν η ουσία αναφλέγεται *μέσα* σε 5 λεπτά.

Εάν και στις έξι δοκιμές δεν επέλθει ανάφλεξη, εκτελούνται οι ακόλουθες δοκιμές:

Δείγμα 0,5 ml της εξεταζόμενης ουσίας φέρεται με σύριγγα σε πτυχωτό διηθητικό χαρτί και παρατηρείται αν μέσα σε πέντε λεπτά από την προσθήκη του υγρού επέρχεται ανάφλεξη ή απανθράκωση του διηθητικού χαρτιού. Η δοκιμή εκτελείται τρεις φορές, εκτός κι αν το χαρτί αναφλέγει ή απανθρακωθεί.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αν σε κάποια από τις δοκιμές παρουσιάσει θετικό αποτέλεσμα, τότε η διαδικασία των δοκιμών μπορεί να διακοπεί.

2.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Αν μία ουσία αναφλέγει μέσα σε πέντε λεπτά από την προσθήκη της σε αδρανή φορέα και την έκθεση της στον αέρα, ή εάν υγρά ουσία προκαλέσει ανάφλεξη ή απανθράκωση διηθητικού χαρτιού μέσα σε πέντε λεπτά από την προσθήκη και έκθεση της στον αέρα, τότε η ουσία αυτή χαρακτηρίζεται σαν πυροφωσφορική.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

Η έκθεση δοκιμής πρέπει, αν είναι δυνατόν, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— τις επακριβείς προδιαγραφές της ουσίας (ταυτοποίηση και προσμείξεις),

— τα αποτελέσματα των δοκιμών,

— επιπρόσθετες παρατηρήσεις σχετικές με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, εφόσον υπάρχουν.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) NF T 20-039 {SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the spontaneous flammability of solids and liquids.

(2) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Test and criteria, 1990, United Nations, New York.

▼B

Α.14. ΕΚΡΗΚΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μέθοδος παρέχει ένα σχήμα δοκιμής για να προσδιορισθεί αν μία στερεά ή πολτώδης ουσία παρουσιάζει κίνδυνο έκρηξης όταν υφίσταται την επίδραση φλόγας (θερμική ευαισθησία) ή κρούσης ή τριβής (ευαισθησία σε μηχανικά ερεθίσματα) και αν μία υγρά ουσία παρουσιάζει κίνδυνο έκρηξης όταν υφίσταται την επίδραση φλόγας ή κρούσης.

Η μέθοδος περιλαμβάνει τρία μέρη:

α) δοκιμή θερμικής ευαισθησίας (1)·

β) δοκιμή μηχανικής ευαισθησίας όσον αφορά την κρούση (1)·

γ) δοκιμή μηχανικής ευαισθησίας όσον αφορά την τριβή (1).

Η μέθοδος παρέχει στοιχεία για την εκτίμηση της πιθανότητας πρόκλησης έκρηξης μέσω ορισμένων κοινών ερεθισμάτων. Η μέθοδος δεν αποσκοπεί στο να διαπιστωθεί αν μία ουσία είναι ικανή να εκραγεί κάτω από οποιεσδήποτε συνθήκες.

Η μέθοδος είναι κατάλληλη για να προσδιορισθεί αν μία ουσία παρουσιάζει κίνδυνο έκρηξης (θερμική και μηχανική ευαισθησία) κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες που καθορίζονται στην οδηγία. Βασίζεται σ' ένα αριθμό τύπων συσκευών που χρησιμοποιούνται ευρέως διεθνώς (1) και που παρέχουν συνήθως σοβαρά αποτελέσματα. Αναγνωρίζεται ότι η μέθοδος δεν είναι καθοριστική. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί συσκευή διαφορετική από την καθοριζόμενη υπό την προϋπόθεση ότι αυτή αναγνωρίζεται διεθνώς και τα αποτελέσματα μπορούν να συσχετισθούν κατάλληλα με τα αποτελέσματα που παρέχει η προδιαγραφόμενη συσκευή.

Οι δοκιμές δεν χρειάζεται να εκτελεστούν όταν τα διαθέσιμα θερμοδυναμικά δεδομένα (π.χ. η θερμότητα σχηματισμού, η θερμότητα αποσύνθεσης) ή/και η μη ύπαρξη ορισμένων δραστικών ομάδων (2) στο συντακτικό της τύπο πείθουν πέρα από κάθε αμφιβολία ότι η ουσία δεν μπορεί να υποστεί ταχεία αποσύνθεση με έκλυση αερίων ή απελευθέρωση θερμότητας (δηλ. το υλικό δεν παρουσιάζει κανένα κίνδυνο έκρηξης). Για τα υγρά δεν απαιτείται δοκιμή μηχανικής ευαισθησίας όσον αφορά την τριβή.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Εκρηκτικές:

Ουσίες που μπορεί να εκραγούν υπό την επίδραση φλόγας ή που είναι ευαίσθητες σε κρούση ή τριβή στην προδιαγραφόμενη συσκευή (ή είναι περισσότερο ευαίσθητες μηχανικά από το 1,3-δινιτροβενζόλιο σε εναλλακτική συσκευή).

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

1,3- δινιτροβενζόλιο, τεχνητό κρυσταλλικό προϊόν που μπορεί να διέρχεται από κόσκινο με οπές 0,5 mm, για τη μέθοδο της τριβής και της κρούσης.

1,3,5-τριαζίνη, εξαϋδρο-1,3,5-τρινιτρο- (RDX, εξογόνο, κυκλονίτης — CAS 121-82-4), ανακρυσταλλωμένη από υδατική κυκλοεξανόνη, διερχόμενη υπό υγρά μορφή από κόσκινο με οπές 250 μm και συγκροτούμενη από κόσκινο με οπές 150 μm, ξηραμένη δε στους 103 ± 2 ^{o}C (επί 4 ώρες) για τη δεύτερη σειρά δοκιμών τριβής και κρούσης.

▼B

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Προκειμένου να διαμορφωθούν ασφαλείς συνθήκες για την πραγματοποίηση των τριών δοκιμών ευαισθησίας, απαιτούνται ορισμένες προκαταρκτικές δοκιμές.

1.4.1. **Δοκιμές ασφαλούς χειρισμού (3)**

Για λόγους ασφαλείας, πριν να εκτελεστούν οι βασικές δοκιμές, πολύ μικρά δείγματα (περίπου 10 mg) της ουσίας υποβάλλονται σε θέρμανση χωρίς περιορισμό σε φλόγα αερίου, σε κρούση σε οποιαδήποτε κατάλληλης μορφής συσκευή και σε τριβή χρησιμοποιώντας τη μέθοδο «σφυρί σε αμόνι» ή οποιαδήποτε μορφή μηχανής τριβής. Σκοπός είναι να διαπιστωθεί αν η ουσία είναι τόσο ευαίσθητη και εκρηκτική ώστε οι καθοριζόμενες δοκιμές ευαισθησίας, ιδιαίτερα η δοκιμή της θερμικής ευαισθησίας, να πρέπει να εκτελεστούν με ιδιαίτερες προφυλάξεις ώστε να αποφευχθεί τραυματισμός του χειριστή.

1.4.2. **Θερμική ευαισθησία**

Η μέθοδος περιλαμβάνει θέρμανση της ουσίας σε ένα χαλύβδινο σωλήνα, που κλείνεται με τρυπημένες πλάκες με οπές διαφορετικής διαμέτρου, για να διαπιστωθεί αν η ουσία μπορεί να εκραγεί κάτω από συνθήκες έντονης θέρμανσης και καθορισμένου περιορισμού χώρου.

1.4.3. **Μηχανική ευαισθησία (κρούση)**

Η μέθοδος περιλαμβάνει κτύπημα της ουσίας από μία συγκεκριμένη μάζα που πέφτει από καθορισμένο ύψος.

1.4.4. **Μηχανική ευαισθησία (τριβή)**

Η μέθοδος περιλαμβάνει την υποβολή στερεών ή πολτωδών ουσιών σε τριβή μεταξύ τυποποιημένων επιφανειών κάτω από καθορισμένες συνθήκες φορτίου και σχετικής κίνησης.

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Δεν δηλώνονται.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.6.1. **Θερμική ευαισθησία (επίδραση φλόγας)**

1.6.1.1. *Συσκευή*

Η συσκευή αποτελείται από ένα χαλύβδινο σωλήνα μιας χρήσης που κλείνεται με μια επαναχρησιμοποιούμενη διάταξη (εικόνα 1) και τοποθετείται μέσα σε μια θερμαντική και προστατευτική διάταξη. Κάθε σωλήνας είναι κατασκευασμένος από χαλύβδινο έλασμα με κυπελοειδή έλαση (βλέπε προσάρτημα) και έχει εσωτερική διάμετρο 24 mm, μήκος 75 mm και πάχος τοιχώματος 0,5 mm. Οι σωλήνες φέρουν στο ανοικτό άκρο φλάντζα ώστε να κλείνουν καλά με τη διάταξη κλεισίματος. Η διάταξη αυτή αποτελείται από μία, ανθεκτική στην πίεση τρυπητή πλάκα με μία τρύπα στο κέντρο, η οποία προσαρμόζεται σφικτά στο σωλήνα με τη βοήθεια ενός βιδωτού συνδέσμου που αποτελείται από δύο μέρη (παξιμάδι και κοχλιοτομημένο κολλάρο). Το παξιμάδι και το κοχλιοτομημένο κολλάρο είναι κατασκευασμένα από χρωμιομαγγανιούχο χάλυβα (βλέπε προσάρτημα) που μέχρι τους 800 ^{o}C δεν δημιουργεί σπινθήρα. Οι τρυπητές πλάκες έχουν πάχος 6 mm, είναι κατασκευασμένες από θερμοανθεκτικό χάλυβα (βλέπε προσάρτημα) και είναι διαθέσιμες με τρύπες διαφόρων διαμέτρων.

▼B

1.6.1.2. *Συνθήκες δοκιμής*

Κανονικά η ουσία υποβάλλεται στη δοκιμή όπως έχει, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις, π.χ. αν είναι συμπιεσμένη, χυτή ή με κάποιο άλλο τρόπο συμπυκνωμένη, μπορεί να χρειάζεται να υποβληθεί στη δοκιμή μετά από θρυμματισμό.

Στα στερεά, η μάζα του υλικού που χρησιμοποιείται σε κάθε δοκιμή προσδιορίζεται χρησιμοποιώντας μία διαδικασία ξηράς δοκιμής δύο σταδίων. Προζυγισμένος σωλήνας γεμίζεται με 9 cm^3 ουσίας και η ουσία συμπιέζεται με δύναμη 80 N που εφαρμόζεται στην όλη διατομή του σωλήνα. Για λόγους ασφάλειας ή σε περιπτώσεις όπου η φυσική μορφή του δείγματος μπορεί να αλλοιωθεί με συμπίεση, μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλες διαδικασίες γεμίσματος' π.χ. αν η ουσία είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στην τριβή, τότε δεν προσφέρεται για συμπίεση. Αν το υλικό είναι συμπιέσιμο τότε προστίθεται κι άλλο και συμπιέζεται μέχρις ότου ο σωλήνας να γεμίσει μέχρι τα 55 mm από την κορυφή. Προσδιορίζεται η συνολική μάζα που χρησιμοποιείται για να γεμίσει ο σωλήνας μέχρι του επιπέδου των 55 mm και γίνονται δύο ακόμη προσθήκες, που κάθε μία συμπιέζεται με δύναμη 80 N. Κατόπιν, ανάλογα, είτε προστίθεται είτε αφαιρείται υλικό ώστε ο σωλήνας να παραμείνει γεμισμένος μέχρι τα 15 mm από την κορυφή. Εκτελείται μία δεύτερη ξηρά δοκιμασία, ξεκινώντας με μία συμπιεσμένη ποσότητα ίση με το ένα τρίτο της συνολικής μάζας που χρησιμοποιήθηκε κατά την πρώτη ξηρά δοκιμασία. Πραγματοποιούνται δύο ακόμη προσθήκες ουσίας με συμπίεση 80 N και το επίπεδο της ουσίας στο σωλήνα προσαρμόζεται στα 15 mm από την κορυφή προσθέτοντας ή αφαιρώντας ανάλογα υλικό. Η ποσότητα του στερεού που προσδιορίζεται στη δεύτερη ξηρά δοκιμασία χρησιμοποιείται για κάθε δοκιμή' το γέμισμα πραγματοποιείται σε τρεις ίσες ποσότητες, που κάθε μία συμπιέζεται μέχρι τα 9 cm^3 με την απαιτούμενη γι' αυτό δύναμη. (Αυτό μπορεί να διευκολυνθεί χρησιμοποιώντας διαχωριστικούς δακτυλίους).

Τα υγρά και οι πάστες φέρονται στο σωλήνα μέχρι ένα ύφος 60 mm προσέχοντας ιδιαίτερα τις πηκτές ουσίες για την αποφυγή δημιουργίας κενών. Το κοχλιοτομημένο κολλάρο τοποθετείται από κάτω στο σωλήνα, η κατάλληλη τρυπητή πλάκα εισάγεται και το παξιμάδι σφίγγεται αφού προστεθεί λίγο λιπαντικό από δισουλφίδιο του μολυβδαινίου. Ιδιαίτερη σημασία έχει να προσεχθεί ώστε μεταξύ της φλάντζας και της πλάκας, ή στο σπείρωμα, να μη παγιδευτεί καθόλου ουσία.

Η θέρμανση επιτυγχάνεται με προπάνιο από βιομηχανική οβίδα, εφοδιασμένη με ρυθμιστή πίεσης (60 έως 70 mbar), μέσω μετρητή και το οποίο προπάνιο κατανέμεται σε ίσα μέρη (όπως διαπιστώνεται οπτικά παρατηρώντας τις φλόγες από τους καυστήρες) με μία πολλαπλή βάνα στους τέσσερεις καυστήρες. Οι καυστήρες τοποθετούνται γύρω από το θάλαμο δοκιμής όπως εικονίζεται στην εικόνα 1. Οι τέσσερεις καυστήρες έχουν συνολική κατανάλωση περίπου 3,2 λίτρα προπανίου ανά λεπτό. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά και άλλα αέρια ή καυστήρες, η θέρμανση όμως πρέπει να είναι αυτή που καθορίζεται στην εικόνα 3. Σ' όλες τις συσκευές, η θέρμανση πρέπει να ελέγχεται κατά διαστήματα χρησιμοποιώντας σωλήνες γεμισμένους με φθαλικό διβουτυλεστέρα όπως εικονίζεται στην εικόνα 3.

1.6.1.3. *Εκτέλεση των δοκιμών*

Κάθε δοκιμή διαρκεί μέχρις ότου ο σωλήνας είτε θρυμματιστεί ή θερμανθεί επί πέντε λεπτά. Μια δοκιμή που έχει σαν αποτέλεσμα το θραύσιμο του σωλήνα σε τρία ή περισσότερα κομμάτια, τα οποία σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να συνδέονται το ένα με το άλλο με στενές λωρίδες μετάλλου, όπως εικονίζεται στην εικόνα 2, αξιολογείται σαν δοκιμή που έχει σαν αποτέλεσμα έκρηξη. Δοκιμή που καταλήγει σε λιγότερα θραύσματα ή κατά την οποία δεν δημιουργούνται καθόλου θραύσματα, θεωρείται σαν δοκιμή που δεν δίνει έκρηξη.

▼B

Στην αρχή εκτελείται μία σειρά τριών δοκιμών με τρυπητή πλάκα διαμέτρου οπής 6,0 mm και, εφόσον δεν παρατηρηθούν εκρήξεις, εκτελείται μία δεύτερη σειρά τριών δοκιμών με τρυπητές πλάκες διαμέτρου οπής 2,0 mm. Εάν σε οποιαδήποτε από τις δύο σειρές δοκιμών παρατηρηθεί έκρηξη, δεν απαιτούνται άλλες δοκιμές.

1.6.1.4. *Αξιολόγηση*

Το αποτέλεσμα της δοκιμής θεωρείται θετικό αν σε οποιαδήποτε από τις πιο πάνω σειρές δοκιμών, παρατηρηθεί έκρηξη.

1.6.2. **Μηχανική ευαισθησία (κρούση)**

1.6.2.1. *Συσκευή (εικόνα 4)*

Τα βασικά μέρη μιας τυπικής συσκευής πτώσης σφύρας είναι ένα μπλοκ από χυτό χάλυβα με βάση, αμόνι, στήλη, οδηγούς, πίπτοντα βάρη, διάταξη απελευθέρωσης και υποδοχή δείγματος. Το χαλύβδινο αμόνι διαμέτρου 100 mm και ύφους 70 mm βιδώνεται στο πάνω μέρος ενός χαλύβδινου μπλοκ ύψους 200 mm, μήκους 230 mm και πλάτους 250 mm με μία χυτή βάση μήκους 450 mm, πλάτους 450 mm και ύφους 60 mm. Σε υποδοχέα βιδωμένο στο πίσω μέρος του χαλύβδινου μπλοκ στερεώνεται μία στήλη, κατασκευασμένη από ελατό χάλυβα χωρίς ραφή. Η συσκευή στερεώνεται σε ένα στερεό συμπαγές τεμάχιο 60 x 60 χ 60 cm με τέσσερις βίδες, έτσι ώστε οι οδηγοί να είναι απολύτως κατακόρυφοι και τα βάρη να πέφτουν ελεύθερα. Χρησιμοποιούνται βάρη 5 και 10 χιλιόγραμμων, κατασκευασμένα από στερεό χάλυβα. Η κεφαλή κρούσης κάθε βάρους είναι από βαμμένο χάλυβα, HRC 60 έως 63, και έχει ελάχιστη διάμετρο 25 mm.

Το εξεταζόμενο δείγμα τοποθετείται μέσα σε μία διάταξη κρούσης που αποτελείται από δύο ομοαξονικούς συμπαγείς χαλύβδινους κυλίνδρους, τον ένα πάνω στον άλλο, σε ένα κοίλο κυλινδρικό χαλύβδινο δακτύλιο/οδηγό. Οι συμπαγείς χαλύβδινοι κύλινδροι πρέπει να είναι διαμέτρου 10 (- 0,003, - 0,005) mm και ύψους 10 mm με γυαλισμένες επιφάνειες, στρογγυλεμένες ακμές (ακτίνα καμπυλώματος 0,5 mm) και σκληρότητας HRC 58 έως 65. Ο κοίλος κύλινδρος πρέπει να έχει εξωτερική διάμετρο 16 mm, στιλβωμένο διάτρημα 10 (+ 0,005, + 0,010) mm και ύψος 13 mm. Η διάταξη κρούσης προσαρμόζεται σε ένα ενδιάμεσο αμόνι (26 mm διάμετρος και 26 mm ύψος) κατασκευασμένο από χάλυβα και κεντράρεται με ένα δακτύλιο με τρύπες για να μπορούν να διαφεύγουν οι καπνοί.

1.6.2.2. *Συνθήκες δοκιμής*

Ο όγκος του δείγματος θα πρέπει να είναι 40 mm^2 ή τέτοιος που να ταιριάζει σε οποιαδήποτε εναλλακτική συσκευή. Οι στερεές ουσίες πρέπει να υποβάλλονται στη δοκιμή σε ξηρά κατάσταση και να παρασκευάζονται με τον πιο κάτω τρόπο:

α) οι ουσίες σε μορφή σκόνης κοσκινίζονται (μέγεθος οπών: 0,5 mm)· αυτό που περνάει από το κόσκινο χρησιμοποιείται για τη δοκιμή·

β) οι συμπιεσμένες, χυτές ή κατ' άλλο τρόπο συμπυκνωμένες ουσίες θραύονται σε μικρά τεμάχια και κοσκινίζονται· για τη δοκιμή χρησιμοποιείται το κλάσμα κοσκινίσματος διαμέτρου 0,5 έως 1 mm το οποίο και θα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικό της αρχικής ουσίας.

Οι ουσίες που προμηθεύονται σε μορφή πάστας πρέπει να δοκιμάζονται κατά το δυνατόν σε στεγνή κατάσταση ή σε οποιαδήποτε περίπτωση, αφού αφαιρεθεί όσο το δυνατόν περισσότερη ποσότητα αραιωτικού. Οι υγρές ουσίες υποβάλλονται στη δοκιμή με διάκενο 1 mm μεταξύ του πάνω και του κάτω κυλίνδρου.

▼B

1.6.2.3. *Εκτέλεση δοκιμών*

Πραγματοποιείται μία σειρά έξι δοκιμών με πτώση της μάζας των 10 χιλιόγραμμων από 0,40 m (40 J). Εάν κατά τις έξι αυτές δοκιμές των 40 J παρατηρηθεί έκρηξη, πρέπει να εκτελεστεί ακόμη μία σειρά 6 δοκιμών, με πτώση της μάζας των 5 kg από 0,15 m (7,5 J). Σε άλλες συσκευές, το δείγμα συγκρίνεται με την επιλεγείσα ουσία αναφοράς χρησιμοποιώντας μία καθιερωμένη διαδικασία (π.χ. τεχνική του επάνω-κάτω, κλπ.).

1.6.2.4. *Αξιολόγηση*

Το αποτέλεσμα της δοκιμής θεωρείται θετικό, αν παρατηρηθεί έκρηξη (σκάσιμο με φλόγα ή/και κρότο είναι ισοδύναμο με έκρηξη) σε μία τουλάχιστον από τις δοκιμές με την προδιαγεγραμμένη συσκευή κρούσης ή το δείγμα είναι πιο ευαίσθητο από 1,3-δινιτροβενζόλιο ή RDX σε εναλλακτικό τεστ κρούσης.

1.6.3. **Μηχανική ευαισθησία (τριβή)**

1.6.3.1. *Συσκευή (εικόνα 5)*

Η συσκευή τριβής αποτελείται από μία χαλύβδινη χυτή πλάκα σαν βάση στην οποία στερεώνεται η διάταξη τριβής. Αυτή αποτελείται από ένα σταθερό πάσσαλο πορσελάνης και κινούμενες πορσελάνινες πλάκες. Η πορσελάνινη πλάκα συγκρατείται σε ένα φορείο που κινείται σε δύο οδηγούς. Το φορείο συνδέεται με ένα ηλεκτρικό κινητήρα μέσω μιας συνδετικής ράβδου, μιας έκκεντρης τροχαλίας και κατάλληλης μετάδοσης κίνησης έτσι ώστε η πορσελάνινη πλάκα να κινείται, μια φορά μόνο, μπρος-πίσω κάτω από τον πάσσαλο πορσελάνης για διάστημα 10 mm. Ο πορσελάνινος πάσσαλος πρέπει να φορτισθεί, π.χ. με 120 ή 360 N.

Οι επίπεδες πορσελάνινες πλάκες κατασκευάζονται από λευκή τεχνητή πορσελάνη (τραχύτητα 9 έως 32 μm) και έχουν διαστάσεις 25 mm (μήκος) × 25 mm (πλάτος) × 5 mm (ύψος). Ο κυλινδρικός πορσελάνινος πάσσαλος είναι επίσης κατασκευασμένος από λευκή τεχνητή πορσελάνη και έχει μήκος 15 mm, διάμετρο 10 mm και τραχείες σφαιρικές ακραίες επιφάνειες με ακτίνα καμπύλωσης 10 mm.

1.6.3.2. *Συνθήκες δοκιμής*

Ο όγκος του δείγματος θα πρέπει να είναι 10 mm^3 ή ο κατάλληλος για την εναλλακτική συσκευή όγκος.

Οι στερεές ουσίες υποβάλλονται στη δοκιμή σε ξηρά κατάσταση και προετοιμάζονται όπως παρακάτω:

α) οι ουσίες με μορφή σκόνης κοσκινίζονται (μέγεθος οπών κοσκινού 0,5 mm) για τη δοκιμασία χρησιμοποιείται το κλάσμα που περνάει διαμέσου του κοσκινού·

β) οι συμπιεσμένες, χυτές; ή κατ' άλλον τρόπο συμπυκνωμένες ουσίες θραύονται σε μικρά τεμάχια και κοσκινίζονται για τη δοκιμή χρησιμοποιείται το κλάσμα κοσκινίσματος με διάμετρο < 0,5 mm.

Οι ουσίες που προμηθεύονται κανονικά σε μορφή πάστας πρέπει να δοκιμάζονται κατά το δυνατόν σε ξηρή κατάσταση. Αν μια ουσία δεν μπορεί να παρασκευαστεί σε ξηρή κατάσταση, η πάστα (αφού αφαιρεθεί όσο το δυνατόν περισσότερη ποσότητα αραιωτικού) υποβάλλεται σε δοκιμασία με τη μορφή φιλμ πάχους 0,5 mm, πλάτους 2 mm και μήκους 10 mm το οποίο παρασκευάζεται με κατάλληλο καλούπι.

▼B

1.6.3.3. *Εκτέλεση των δοκιμών*

Ο πορσελάνινος πάσσαλος φέρεται πάνω στο δείγμα και εφαρμόζεται το φορτίο. Κατά την εκτέλεση της δοκιμής, τα σημάδια του σπόγγου της πορσελάνινης πλάκας πρέπει να είναι εγκάρσια προς τη διεύθυνση κίνησης. Πρέπει να φροντίζεται ώστε ο πάσσαλος να ακουμπά στο δείγμα, να υπάρχει αρκετό υλικό κάτω από τον πάσσαλο και η πλάκα να κινείται σωστά κάτω από τον πάσσαλο. Στην περίπτωση των ουσιών με μορφή πάστας, χρησιμοποιείται για την επίθεση της ουσίας στην πλάκα παχυμετρικό πάχους 0,5 mm με μία σχισμή 2 × 10 mm. Η πορσελάνινη πλάκα πρέπει να κινείται μπρος-πίσω σε μία απόσταση 10 mm κάτω από τον πάσσαλο σε χρονικό διάστημα 0,44 δευτερολέπτων. Κάθε τμήμα της επιφάνειας της πλάκας και του πασσάλου πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο μία φορά τα δύο άκρα κάθε πασσάλου εξυπηρετούν δύο δοκιμασίες και οι δύο επιφάνειες της πλάκας εξυπηρετούν καθεμιά τρεις δοκιμασίες.

Εκτελείται μία σειρά έξι δοκιμών με φόρτιση 360 N. Εάν κατά τη διάρκεια των έξι αυτών δοκιμών έχουμε κάποιο θετικό αποτέλεσμα, πρέπει να εκτελείται μία ακόμη σειρά έξι δοκιμών με φόρτιση 120 N. Σε άλλες συσκευές, το δείγμα συγκρίνεται με την επιλεγείσα ουσία αναφοράς χρησιμοποιώντας μία καθιερωμένη διαδικασία (π.χ. τεχνική πάνω-κάτω, κ.λπ.).

1.6.3.4. *Αξιολόγηση*

Το αποτέλεσμα της δοκιμής θεωρείται θετικό αν γίνει αντιληπτή έκρηξη (τριγμός ή/και κρότος ή σκάσιμο με φλόγα είναι ισοδύναμα με έκρηξη) τουλάχιστον μία φορά σε οποιαδήποτε από τις δοκιμές με την καθορισμένη συσκευή τριβής ή ικανοποιούνται τα ισοδύναμα κριτήρια σε εναλλακτική δοκιμή τριβής.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Κατά κανόνα, μία ουσία θεωρείται ότι παρουσιάζει κίνδυνο έκρηξης κατά την έννοια της οδηγίας, αν υπάρξει θετικό αποτέλεσμα στη δοκιμή θερμικής ευαισθησίας, κρούσης ή τριβής.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— ταυτότητα, σύνθεση, καθαρότητα, υγρασία, κλπ., της εξεταζόμενης ουσίας,

— τη φυσική μορφή του δείγματος και αν έχει ή όχι, θρυμματισθεί, θραυσθεί ή/και κοσκινιστεί,

— παρατηρήσεις κατά τη διάρκεια των δοκιμών θερμικής ευαισθησίας (π.χ. μάζα δείγματος, αριθμό θραυσμάτων, κλπ.),

— παρατηρήσεις κατά τη διάρκεια των δοκιμών μηχανικής ευαισθησίας (π.χ. σχηματισμό σημαντικών ποσοτήτων καπνού ή πλήρη αποσύνθεση με κρότο, φλόγες, σπινθήρες, τριγμούς, κ.λπ.),

— αποτελέσματα κάθε τύπου δοκιμής,

— αν έχει χρησιμοποιηθεί εναλλακτική συσκευή, επιστημονική αιτιολόγηση, όπως επίσης και αποδείξεις συσχέτισης μεταξύ των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται από την τυποποιημένη συσκευή και των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με την ισοδύναμη συσκευή,

▼B

— κάθε χρήσιμο σχόλιο, όπως αναφορά σε δοκιμές με παρόμοια προϊόντα που μπορεί να είναι χρήσιμα για τη σωστή ερμηνεία των αποτελεσμάτων,

— κάθε πρόσθετη παρατήρηση σχετική με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να αναφέρεται κάθε αποτέλεσμα που θεωρείται εσφαλμένο, ανώμαλο ή μη αντιπροσωπευτικό. Αν κάποιο από τα αποτελέσματα πρέπει να απορριφθεί, θα πρέπει να δίδεται μία εξήγηση και τα αποτελέσματα κάθε εναλλακτικής ή συμπληρωματικής δοκιμής. Κάθε ανώμαλο αποτέλεσμα, εκτός κι αν μπορεί να εξηγηθεί, πρέπει να γίνεται δεκτό κατ' ονομαστική τιμή και να χρησιμοποιείται για την ανάλογη ταξινόμηση της ουσίας.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods: Tests and criteria, 1990, United Nations, New York.

(2) Brethenck, L., Handbook of Reactive Chemical Hazards, 4th edition, Butterworths, London, ISBN 0-750-60103-5, 1990.

(3) Koenen, H., Ide, K.H. and Swart, K.H., Explosivstoffe, 1961, vol.3, 6-13 and 30-42.

(4) NF T 20-038 (Sept. 85). Chemical products for industrial use — Determination of explosion risk.

▼B

Προσάρτημα

Παράδειγμα προδιαγραφής υλικού για τη δοκιμή θερμικής ευαισθησίας (βλέπε DIN 1623)

(1) Σωλήνας: Προδιαγραφή υλικού αριθ. 1.0336.505 g

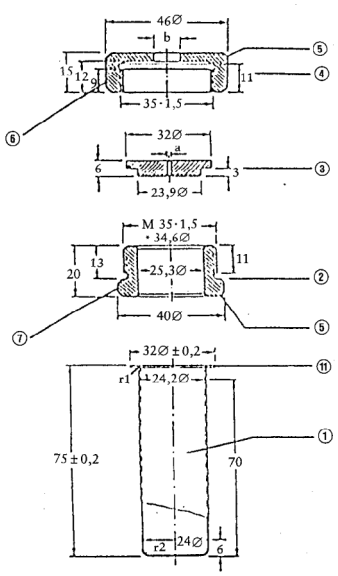
(2) Τρυπημένη πλάκα: Προδιαγραφή υλικού αριθ. 1.4873

(3) Κοχλιοτομημένο κολλάρο και παξιμάδι: Προδιαγραφή υλικού αριθ. 1.3817

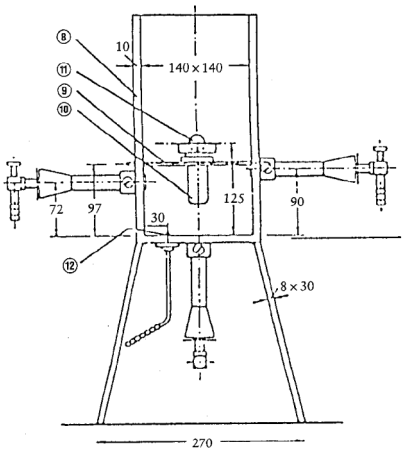
Εικόνα 1

Συσκευή δοκιμής θερμικής ευαισθησίας

(όλες οι διαστάσεις σε χιλιοστόμετρα)



Εικ. 1α Χαλύβδινος σωλήνας και εξαρτήματα



Εικ. 1β Προστατευτική καί θερμαντική διάταξη

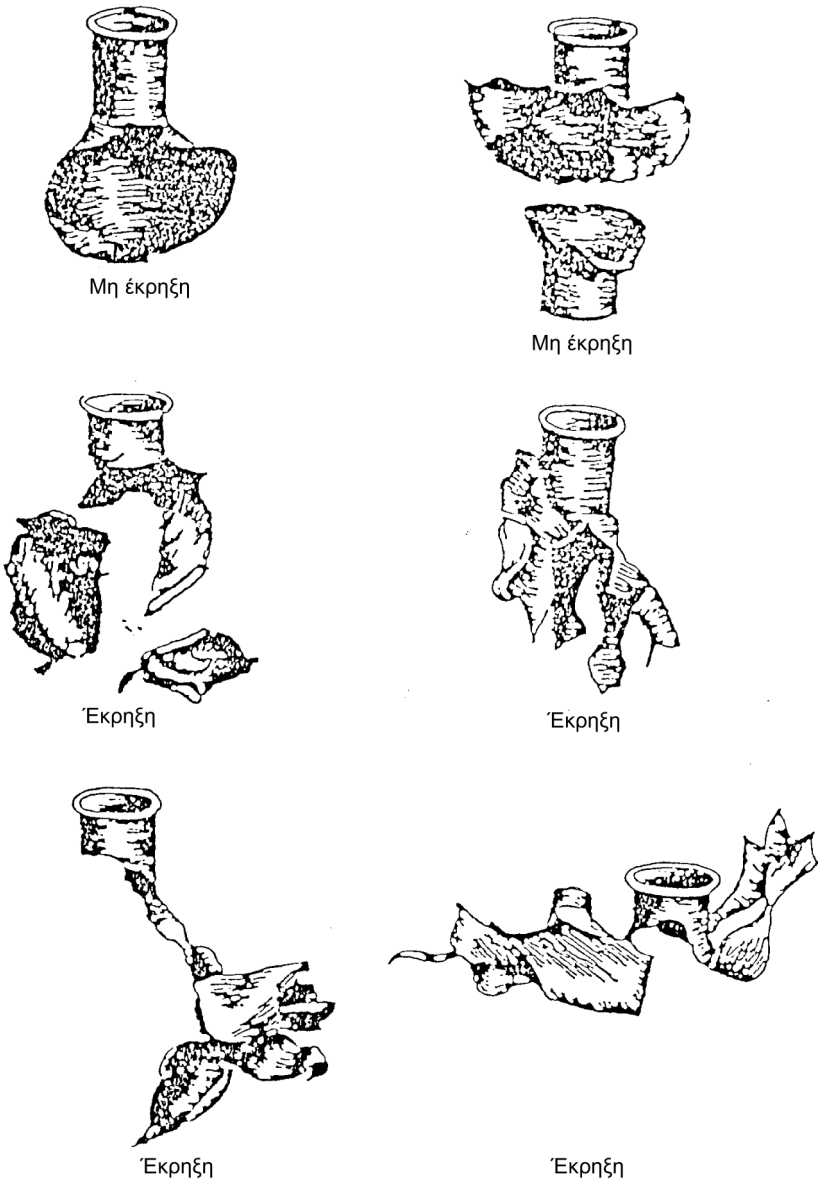
(1) σωλήνας
(1a) εξωτερική φλάντζα
(2) κοχλιοτομημένο κολλάρο σπείρωμα χαμηλής τριβής
(3) τρυπημένη πλάκα α = 2,0 ή 6 mm διάμετρος
(4) παξιμάδι β = 10 mm διάμετρος
(5) λοξοτομημένη επιφάνεια
(6) 2 παξιμάδια για κλειδί No 41
(7) 2 παξιμάδια για κλειδί No 36
(8) δοχείο αδιαπέρατο από θραύσματα
(9) 2 ράβδοι υποστήριξης για το σωλήνα
(10) συναρμολογημένος σωλήνας
(11) θέση οπίσθιου καυστήρα. Οι άλλοι καυστήρες είναι ορατοί
(12) πίδακας-πιλότος

▼B

Εικόνα 2

Δοκιμή θερμικής ευαισθησίας

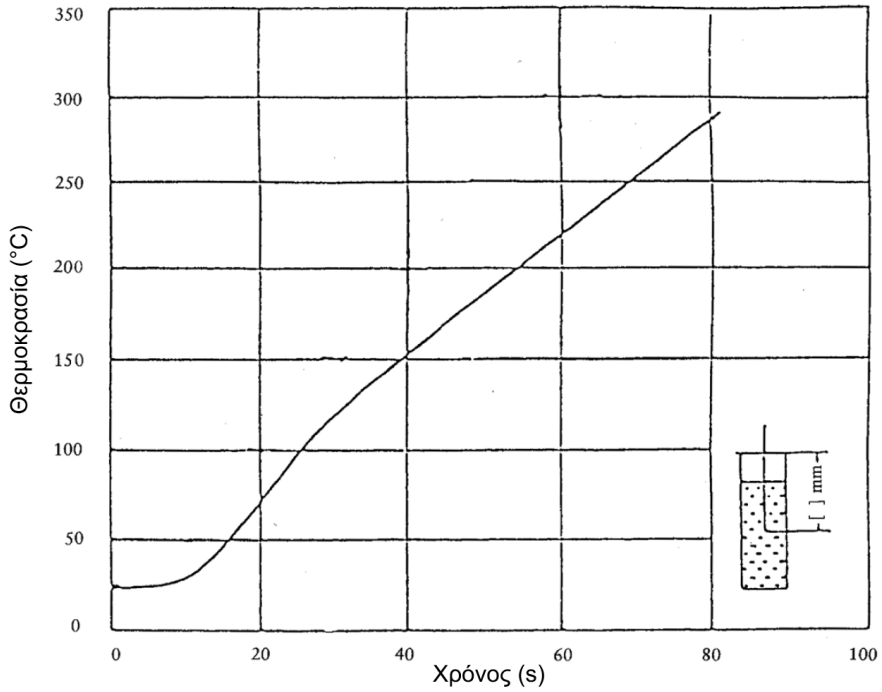
Παραδείγματα θραυσματοποίησης



▼B

Εικόνα 3

Βαθμονόμηση ταχύτητας θέρμανσης για τη δοκιμή θερμικής ευαισθησίας



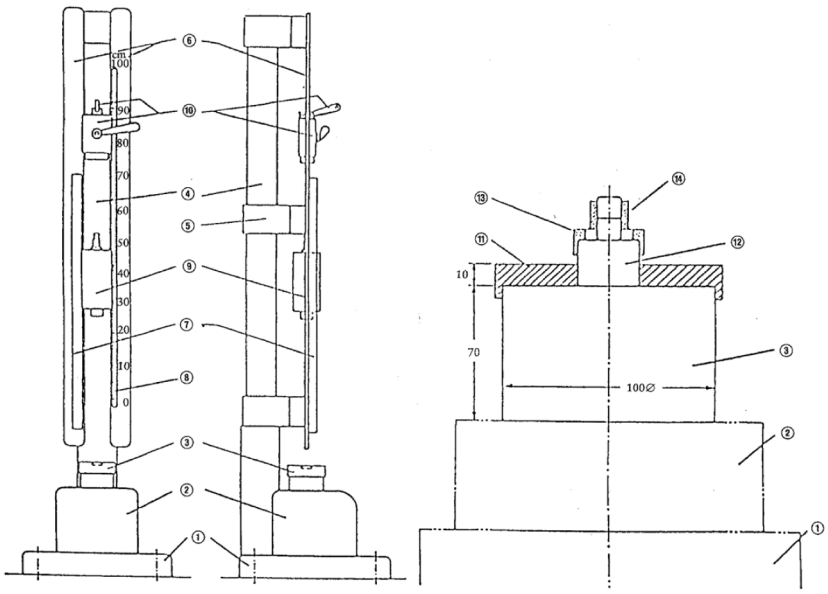
Καμπύλη θερμοκρασίας/χρόνου που λαμβάνεται θερμαίνοντας φθαλικό διβουτυλεστέρα (27 cm^3) σε κλειστό (τρυπητή πλάκα 1,5 mm) σωλήνα χρησιμοποιώντας προπάνιο με ταχύτητα ροής 3,2 λίτρα ανά λεπτό. Η θερμοκρασία μετριέται με ένα θερμοστοιχείο χρωμίου/αλουμινίου σε θήκη από ανοξείδωτο χάλυβα διαμέτρου 1 mm, τοποθετημένο κεντρικά 43 mm κάτω από το περιστόμιο του σωλήνα. Η ταχύτητα θέρμανσης μεταξύ 135 και 285 °C θα πρέπει να είναι μεταξύ 185 και 215 K/min.

▼B

Εικόνα 4

Συσκευή δοκιμής κρούσης

(όλες οι διαστάσεις σε χιλιοστόμετρα)



Εικ. 4α Συσκευή πίπτουσας σφύρας, εμπρόσθια και πλαγία όψη, γενική άποψη
(1) βάση, 450 x 450 x 60
(2) χαλύβδινος κορμός, 230 x 250 x 200
(3) αμόνι, 100 διάμετρος x 70
(4) στήλη
(5) μεσαίο εγκάρσιο στέλεχος
(6) 2 οδηγοί
(7) οδοντωτός κανόνας

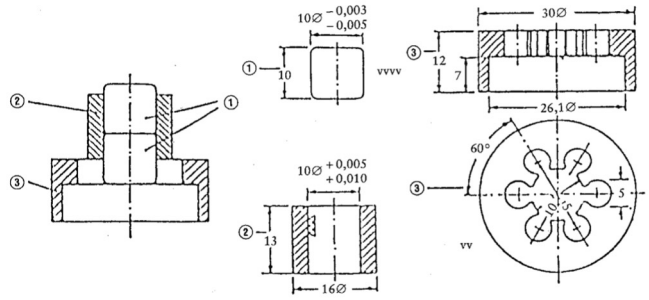
Εικ. 4β Πίπτουσα σφύρα, κάτω μέρος

(8) βαθμολογημένη κλίμακα
(9) πίπτουσα σφύρα (πίπτουσα μάζα)
(10) διάταξη συγκράτησης και απελευθέρωσης
(11) πλάκα στερέωσης
(12) ενδιάμεσο αμόνι (εναλλάξιμο), 26 διάμετρος x 26
(13) δακτύλιος στερέωσης με τρύπες
(14) διάταξη κρούσης

▼B

Εικόνα 4

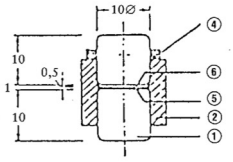
(Συνέχεια)

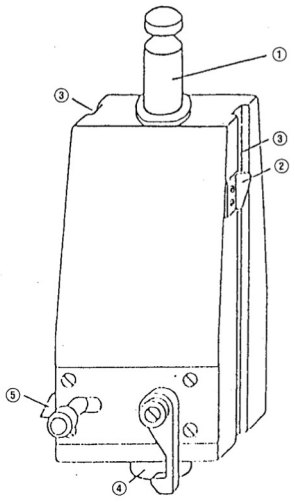


Εικ. 4γ Διάταξη κρούσης για ουσίες με μορφή σκόνης ή πάστας

(1) χαλύβδινοι κύλινδροι
(2) δακτύλιος οδηγός για χαλύβδινους κυλίνδρους
(3) δακτύλιος τοποθέτησης με τρύπες
(a) κατακόρυφη διατομή
(b) επίπεδη
(4) ελαστικός δακτύλιος
(5) υγρή ουσία (40 mm^3)
(6) χώρος χωρίς υγρό

Εικ. 4δ Διάταξη κρούσης για υγρές ουσίες





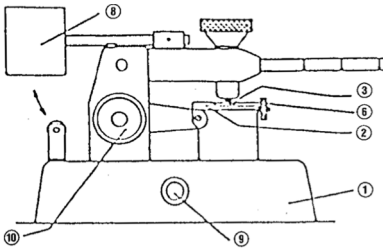
Εικ. 4ε Σφύρα (πίπτουσα μάζα 5 Kg)

(1) Πείρος ανάρτησης
(2) δείκτης ύψους
(3) χαραγή καθορισμού θέσης
(4) κυλινδρική κεφαλή κρούσης
(5) επαναφερόμενο μάνδαλο

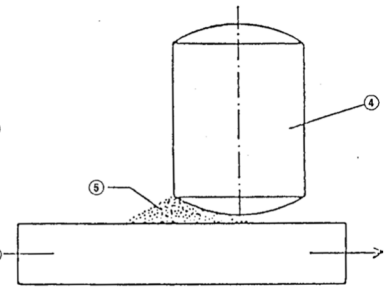
▼B

Εικόνα 5

Συσκευή ευαισθησίας σε τριβή



Εικ. 5α Συσκευή τριβής Κάθετη και οριζόντια όψη



Εικ. 5β Αρχική θέση πασσάλου στο δείγμα

(1) χαλύβδινη βάση
(2) κινούμενο φορείο
(3) πορσελάνινη πλάκα, 25 x 25 x 5 mm, συγκροτούμενη στο φορείο
(4) σταθερός πορσελάνινος πασσαλίσκος, 10 διάμετρος x 15 mm
(5) δείγμα υπό δοκιμή, περίπου 10 mm^3
(6) υποδοχή πασσαλίσκου
(7) βραχίονας φόρτισης
(8) αντίβαρο
(9) διακόπτης
(10) τροχός για την τοποθέτηση του φορείου σε θέση εκκίνησης
(11) διεύθυνση προς τον ηλεκρικό κινητήρα

▼B

Α.15. ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΑΥΤΑΝΑΦΛΕΞΗΣ ΓΙΑ ΥΓΡΑ ΚΑΙ ΑΕΡΙΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι εκρηκτικές ουσίες και οι ουσίες που αναφλέγονται αυθόρμητα σε επαφή με τον αέρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος δεν θα πρέπει να υποβάλλονται στη δοκιμή αυτή. Η δοκιμή αυτή εφαρμόζεται σε αέρια, υγρά και ατμούς που, παρουσία αέρα, μπορούν να αναφλέγουν από μία θερμή επιφάνεια.

Η θερμοκρασία αυτανάφλεξης μπορεί να μειωθεί σημαντικά εξαιτίας παρουσίας προσμείξεων που δρουν καταλυτικά, από το επιφανειακό υλικό ή εξαιτίας μεγαλύτερου όγκου του δοχείου δοκιμής.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Ο βαθμός αυτοαναφλεξιμότητας εκφράζεται με βάση τη θερμοκρασία αυτανάφλεξης. Θερμοκρασία αυτανάφλεξης είναι η χαμηλότερη θερμοκρασία στην οποία αναφλέγεται η εξεταζόμενη ουσία όταν αναμειγνύεται με αέρα υπό τις συνθήκες που καθορίζονται στη μέθοδο δοκιμής.

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Ουσίες αναφοράς αναφέρονται στα πρότυπα (βλέπε 1.6.3). Οι ουσίες αυτές θα πρέπει πρωταρχικά να χρησιμοποιούνται για να ελέγχεται η απόδοση της μεθόδου κατά διαστήματα και να γίνεται δυνατή η σύγκριση με αποτελέσματα από άλλες μεθόδους.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέθοδος προσδιορίζει την ελάχιστη θερμοκρασία της εσωτερικής επιφάνειας κλειστού χώρου που οδηγεί σε ανάφλεξη ενός αερίου, ατμών ή υγρού που εγχύεται στον κλειστό αυτό χώρο.

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Η επαναληψιμότητα ποικίλλει ανάλογα με την περιοχή των θερμοκρασιών αυτανάφλεξης και με την χρησιμοποιούμενη μέθοδο δοκιμής.

Η ευαισθησία και η εξειδίκευση εξαρτάται από τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο δοκιμής.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.6.1. **Συσκευή**

Η συσκευή περιγράφεται στη μέθοδο που αναφέρεται στο σημείο 1.6.3.

1.6.2. **Συνθήκες δοκιμής**

Δείγμα της εξεταζόμενης ουσίας δοκιμάζεται σύμφωνα με τη μέθοδο που αναφέρεται στο σημείο 1.6.3.

1.6.3. **Εκτέλεση της δοκιμής**

Βλέπε IEC 79-4, DIN 51794, ASTM-E 659-78, BS 4056, NF T 20-037.

▼B

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Καταγράφεται η θερμοκρασία δοκιμής, η ατμοσφαιρική πίεση, η ποσότητα του χρησιμοποιούμενου δείγματος και ο χρόνος μέχρι να επέλθει ανάφλεξη.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

Η έκθεση δοκιμής πρέπει, αν είναι δυνατόν, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— τις επακριβείς προδιαγραφές της ουσίας (ταυτοποίηση και προσμείξεις),

— την ποσότητα του χρησιμοποιηθέντος δείγματος και την ατμοσφαιρική πίεση,

— τη χρησιμοποιηθείσα συσκευή,

— τα αποτελέσματα μετρήσεων (θερμοκρασία δοκιμής, αποτελέσματα που αφορούν την ανάφλεξη, αντίστοιχους χρόνους),

— κάθε πρόσθετη παρατήρηση σχετική με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Ουδεμία.

▼B

A.16. **ΣΧΕΤΙΚΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΑΥΤΑΝΑΦΛΕΞΗΣ ΓΙΑ ΣΤΕΡΕΑ**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Εκρηκτικές ουσίες και ουσίες που αναφλέγονται αυθόρμητα σε επαφή με τον αέρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος δεν θα πρέπει να υποβάλλονται στη δοκιμή αυτή.

Σκοπός της δοκιμής αυτής είναι να δίνει προκαταρκτικές πληροφορίες για την αυτοαναφλεξιμότητα των στερεών ουσιών σε υψηλές θερμοκρασίες.

Αν η θερμότητα που αναπτύσσεται είτε από αντίδραση της ουσίας με οξυγόνο είτε από εξώθερμη αποσύνθεση δεν διαχέεται αρκετά γρήγορα στον περιβάλλοντα χώρο, επέρχεται αυτοθέρμανση που οδηγεί σε αυτανάφλεξη. Κατά συνέπεια, αυτανάφλεξη συμβαίνει όταν η ταχύτητα παραγωγής θερμότητας υπερβαίνει την ταχύτητα διάχυσης της θερμότητας.

Η δοκιμή είναι χρήσιμη σαν μία προκαταρκτική ερευνητική δοκιμή για τις στερεές ουσίες. Εξαιτίας της πολύπλοκης φύσης της ανάφλεξης και καύσης των στερεών, η θερμοκρασία αυτανάφλεξης που προσδιορίζεται με τη μέθοδο της δοκιμής αυτής, θα πρέπει να χρησιμοποιείται για συγκριτικούς και μόνον σκοπούς.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Η θερμοκρασία αυτανάφλεξης, όπως λαμβάνεται κατά τη μέθοδο αυτή, είναι η χαμηλότερη θερμοκρασία περιβάλλοντος σε ^{o}C στην οποία ένας ορισμένος όγκος μιας ουσίας αυτοαναφλέγεται κάτω από καθορισμένες συνθήκες.

1.3. ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Ουδεμία.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ορισμένος όγκος της εξεταζόμενης ουσίας τοποθετείται σε φούρνο σε θερμοκρασία δωματίου' καταγράφεται η καμπύλη μεταβολής της θερμοκρασίας στο κέντρο του δείγματος ως συνάρτηση του χρόνου, ενώ η θερμοκρασία του φούρνου αυξάνεται στους 400 ^{o}C ή μέχρι του σημείου τήξεως αν αυτό είναι χαμηλότερο, με ρυθμό 0,5^{o}C/min. Για τον σκοπό της δοκιμής αυτής, η θερμοκρασία του φούρνου στην οποία η θερμοκρασία του δείγματος φτάνει τους 400 ^{o}C με αυτοθέρμανση, καλείται θερμοκρασία αυτανάφλεξης.

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Ουδέν.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.6.1. **Συσκευή**

1.6.1.1. *Φούρνος*

Εργαστηριακός φούρνος προγραμματιζόμενης θερμοκρασίας (όγκος περίπου 2 λίτρα), με φυσική κυκλοφορία αέρα και διέξοδο για περίπτωση έκρηξης. Για την αποφυγή πιθανού κινδύνου έκρηξης, αέρια προερχόμενα από τυχόν αποσύνθεση δεν πρέπει να μπορούν να έλθουν σε επαφή με τα ηλεκτρικά θερμαντικά στοιχεία.

▼B

1.6.1.2. *Κύβος με συρμάτινο πλέγμα*

Τεμάχιο συρμάτινου πλέγματος από ανοξείδωτο χάλυβα με ανοίγματα 0,045 mm κόβεται σύμφωνα με το υπόδειγμα της εικόνας 1. Το πλέγμα διπλώνεται και στερεώνεται με σύρμα σε μορφή κύβου ανοικτού στο πάνω μέρος.

1.6.1.3. *Θερμοστοιχεία*

Κατάλληλα θερμοστοιχεία.

1.6.1.4. *Καταγραφέας*

Οποιοσδήποτε καταγραφέας δύο καναλιών βαθμονομημένος από 0 °C έως 600 °C ή αντίστοιχη τάση.

1.6.2. **Συνθήκες δοκιμής**

Οι ουσίες εξετάζονται όπως παραλαμβάνονται.

1.6.3. **Εκτέλεση της δοκιμής**

Ο κύβος γεμίζεται με την εξεταζόμενη ουσία και κτυπιέται ελαφρά, προσθέτοντας κι άλλη ουσία μέχρις ότου ο κύβος να γεμίσει τελείως. Ο κύβος κατόπιν κρεμιέται στο κέντρο του φούρνου σε θερμοκρασία δωματίου. Στο κέντρο του κύβου τοποθετείται ένα θερμοστοιχείο ενώ το άλλο τοποθετείται μεταξύ του κύβου και του τοιχώματος του φούρνου για την καταγραφή της θερμοκρασίας του φούρνου.

Οι θερμοκρασίες του φούρνου και του δείγματος καταγράφονται συνεχώς ενώ η θερμοκρασία του φούρνου αυξάνεται στους 400 °C ή μέχρι του σημείου τήξεως αν αυτό είναι χαμηλότερο, με ρυθμό 0,5°C/min.

Όταν η ουσία αναφλέγεται, το θερμοστοιχείο του δείγματος δείχνει μία ιδιαίτερα οξεία αύξηση της θερμοκρασίας πάνω από τη θερμοκρασία του φούρνου.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Για την αξιολόγηση, σημασία έχει η θερμοκρασία του φούρνου στην οποία η θερμοκρασία του δείγματος φθάνει τους 400 °C με αυτοθέρμανση (βλέπε εικόνα 2).

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

Η έκθεση δοκιμής πρέπει, αν είναι δυνατόν, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— περιγραφή της προς εξέταση ουσίας,

— τα αποτελέσματα μετρήσεων συμπεριλαμβανομένης και της καμπύλης θερμοκρασίας/χρόνου,

— κάθε πρόσθετη παρατήρηση σχετική με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

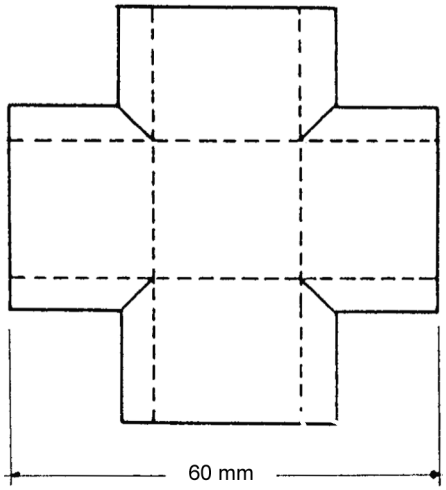
4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

NF T 20-036 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the relative temperature of the spontaneous flammability of solids.

▼B

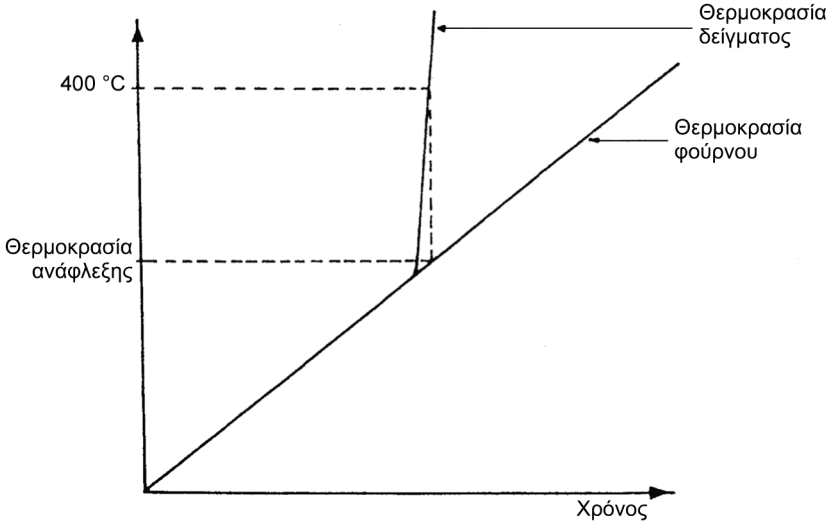
Εικόνα 1

Υπόδειγμα κύβου ελέγχου 20 mm



Εικόνα 2

Τυπική καμπύλη θερμοκρασίας/χρόνου



▼B

Α.17. **ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ (ΣΤΕΡΕΑ)**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πριν να εκτελεστεί αυτή η δοκιμή, χρήσιμο είναι να έχουμε προκαταρκτικές πληροφορίες για την τυχόν ύπαρξη

Η δοκιμή αυτή δεν εφαρμόζεται σε υγρά, αέρια, εκρηκτικές ή λίαν εύφλεκτες ουσίες ή οργανικά υπεροξείδια.

Η δοκιμή αυτή δεν χρειάζεται να εκτελείται όταν ο συντακτικός τύπος της ουσίας δείχνει πέρα από κάθε αμφιβολία ότι η ουσία δεν μπορεί να αντιδράσει εξώθερμα με ένα καύσιμο υλικό.

Για να διαπιστωθεί αν η δοκιμή πρέπει να εκτελείται με κάποιες ειδικές προφυλάξεις, θα πρέπει να εκτελείται μία προκαταρκτική δοκιμή.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Χρόνος καύσης: ο χρόνος αντίδρασης, σε δευτερόλεπτα, που απαιτείται για να διαδοθεί η ζώνη αντίδρασης κατά μήκος μιας στήλης, σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στο σημείο 1.6.

Ταχύτητα καύσης: εκφραζόμενη σε mm/s.

Μέγιστη ταχύτητα καύσης: η υψηλότερη τιμή από τις ταχύτητες καύσης που λαμβάνονται με μείγματα που περιέχουν 10 % έως 90 % κατά βάρος οξειδωτικό.

1.3. ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Ως ουσία αναφοράς για τη δοκιμή και την προκαταρκτική δοκιμή χρησιμοποιείται νιτρικό βάριο (αναλυτικού βαθμού καθαρότητας).

Μείγμα αναφοράς είναι το μείγμα εκείνο νιτρικού βαρίου με κονιοποιημένη κυτταρίνη, που παρασκευάζεται σύμφωνα με το σημείο 1.6, το οποίο έχει τη μέγιστη ταχύτητα καύσης (συνήθως μείγμα με 60 % νιτρικό βάριο κατά βάρος).

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Για λόγους ασφάλειας εκτελείται μια προκαταρκτική δοκιμή. Όταν η προκαταρκτική δοκιμή δείχνει ξεκάθαρα ότι η εξεταζόμενη ουσία έχει οξειδωτικές ιδιότητες δεν απαιτείται περαιτέρω δοκιμασία. Σε αντίθετη περίπτωση, η ουσία θα πρέπει τότε να υποβάλλεται σε πλήρη δοκιμή.

Στην πλήρη δοκιμή, αναμειγνύονται σε διάφορες αναλογίες η εξεταζόμενη ουσία και μία ορισμένη καύσιμη ουσία. Κατόπιν, σε κάθε μείγμα δίνεται η μορφή στήλης και η στήλη αναφλέγεται στη μια άκρη. Η προσδιοριζόμενη μέγιστη ταχύτητα καύσης συγκρίνεται με τη μέγιστη ταχύτητα καύσης του μείγματος αναφοράς.

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Εάν είναι απαραίτητο, κάθε μέθοδος άλεσης και ανάμειξης θεωρείται κατάλληλη, εφόσον η διαφορά στη μέγιστη ταχύτητα καύσης στις έξι διαφορετικές δοκιμές δεν διαφέρει από τη μέση αριθμητική τιμή περισσότερο από 10 %.

▼B

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.6.1. **Προετοιμασία**

1.6.1.1. *Εξεταζόμενη ουσία*

Το εξεταζόμενο δείγμα μετατρέπεται σε σωματίδια μεγέθους < 0,125 mm με την ακόλουθη διαδικασία: η εξεταζόμενη ουσία κοσκινίζεται, το εναπομένον κλάσμα αλέθεται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρις ότου να περάσει από το κόσκινο όλη η ουσία.

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε μέθοδος άλεσης και κοσκινίσματος που ικανοποιεί τα ποιοτικά κριτήρια.

Πριν από την παρασκευή του μείγματος, η ουσία ξηραίνεται στους 105 °C μέχρι σταθερού βάρους. Αν η θερμοκρασία αποσύνθεσης της εξεταζόμενης ουσίας είναι μικρότερη από 105 °C, η ουσία πρέπει να ξηρανθεί σε κατάλληλη χαμηλότερη θερμοκρασία.

1.6.1.2. *Καύσιμη ουσία*

Ως καύσιμη ουσία χρησιμοποιείται σκόνη κυτταρίνης. Η κυτταρίνη θα πρέπει να είναι του τύπου εκείνου που χρησιμοποιείται για χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας ή χρωματογραφία στήλης. Έχει αποδειχθεί ότι είναι κατάλληλος εκείνος ο τύπος του οποίου τα μήκη των ινών σε ποσοστά μεγαλύτερο από 85 % είναι μεταξύ 0,020 και 0,075 mm. Η σκόνη κυτταρίνης διέρχεται από κόσκινο που έχει τρύπες μεγέθους 0,125 mm. Σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής πρέπει να χρησιμοποιείται η ίδια παρτίδα κυτταρίνης.

Πριν από την παρασκευή του μείγματος, η σκόνη της κυτταρίνης πρέπει να ξηραίνεται στους 105 °C μέχρι σταθερού βάρους.

Αν στην προκαταρκτική δοκιμή χρησιμοποιείται ξυλάλευρο, τότε παρασκευάζεται ξυλάλευρο από μαλακό ξύλο συλλέγοντας το κλάσμα που διέρχεται από κόσκινο με διάμετρο τρυπών 1,6 mm, ανακατεύοντας το καλά και κατόπιν ξηραίνοντας το στους 105 °C επί 4 ώρες σε στρώμα πάχους όχι περισσότερο από 25 mm. Το προϊόν ψύχεται και φυλάσσεται σε αεροστεγές δοχείο που γεμίζεται όσο είναι πρακτικά δυνατό μέχρι τη χρησιμοποίηση του, κατά προτίμηση μέσα σε 24 ώρες από την ξήρανση.

1.6.1.3. *Πηγή έναυσης*

Ως πηγή έναυσης θα πρέπει να χρησιμοποιείται θερμαντική φλόγα από καυστήρα αερίου (ελάχιστη διάμετρος 5 mm). Αν χρησιμοποιηθεί άλλη πηγή έναυσης (π.χ. όταν η δοκιμή πραγματοποιείται σε αδρανή ατμόσφαιρα), τότε θα πρέπει να αναφέρεται η περιγραφή και η αιτιολόγηση.

1.6.2. **Εκτέλεση της δοκιμής**

Σημείωση:

Μείγματα οξειδωτικών με κυτταρίνη ή ξυλάλευρο πρέπει να αντιμετωπίζονται ως πιθανά εκρηκτικά και ο χειρισμός τους να γίνεται με την πρέπουσα προσοχή.

1.6.2.1. *Προκαταρκτική δοκιμή*

Η ξηρανθείσα ουσία ανακατεύεται καλά με την ξηρανθείσα κυτταρίνη ή ξυλάλευρο υπό αναλογία εξεταζόμενης ουσίας προς κυτταρίνη ή ξυλάλευρο 2:1 κατά βάρος και το μίγμα μορφοποιείται σε μικρό σωρό κωνικού σχήματος διαστάσεων 3,5 cm (διάμετρος βάσης) × 2,5 cm (ύφος) χύνοντας το, χωρίς να το συμπιέσουμε, μέσα σε ένα καλούπι κωνικού σχήματος (π.χ. ένα εργαστηριακό γυάλινο χωνί με βουλωμένο το σωλήνα).

▼B

Ο σωρός τοποθετείται σε μία κρύα, άκαυστη, χωρίς πόρους και χαμηλής θερμοαγωγιμότητας πλάκα. Η δοκιμή θα πρέπει να πραγματοποιείται μέσα σε απαγωγό όπως στο σημείο 1.6.2.2.

Η πηγή έναυσης φέρεται σε επαφή με τον κώνο. Παρατηρούνται και καταγράφονται η ισχύς και η διάρκεια της προκύπτουσας αντίδρασης.

Η ουσία θεωρείται οξειδωτική αν η αντίδραση είναι ισχυρή.

Στην περίπτωση που το αποτέλεσμα αφήνει αμφιβολίες, τότε είναι αναγκαίο να εκτελείται όλη η διαδικασία δοκιμής που περιγράφεται πιο κάτω.

1.6.2.2. *Διαδικασία δοκιμής*

Παρασκευάζονται μείγματα οξειδωτικού—κυτταρίνης που περιέχουν από 10 έως 90 % οξειδωτικό με διαδοχικές αυξήσεις 10 %. Σε οριακές περιπτώσεις, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται και ενδιάμεσα μείγματα οξειδωτικού/κυτταρίνης προκειμένου να μετρηθεί ακριβέστερα η μέγιστη ταχύτητα καύσης.

Ο σωρός μορφοποιείται με τη βοήθεια καλουπιού. Το καλούπι είναι κατασκευασμένο από μέταλλο, έχει μήκος 250 mm και τριγωνική διατομή με εσωτερικό ύψος 10 mm και εσωτερικό πλάτος 20 mm. Στις δύο πλευρές του καλουπιού, κατά τη διαμήκη διεύθυνση, τοποθετούνται σαν πλευρικές περιοριστικές επιφάνειες δύο μεταλλικές πλάκες που προεξέχουν 2 mm από την πάνω ακμή της τριγωνικής διατομής (εικόνα). Η κατασκευή αυτή γεμίζεται χωρίς αυτό να «πατηθεί» με ελαφρά περίσσεια μείγματος. Αφού το καλούπι αφεθεί να πέσει μία φορά από ύψος 2 cm σε μία στερεή επιφάνεια, η παραμένουσα περίσσεια ουσίας απομακρύνεται με ξύσιμο με ένα φύλλο που μετακινείται λοξά. Οι πλευρικές περιοριστικές επιφάνειες απομακρύνονται και η παραμένουσα σκόνη λειαίνεται με τη βοήθεια κυλίνδρου. Στο πάνω μέρος του καλουπιού τοποθετείται τότε μία άκαυστη, χωρίς πόρους και χαμηλής θερμοαγωγιμότητας πλάκα, η συσκευή ανατρέπεται και το καλούπι απομακρύνεται.

Ο σωρός τοποθετείται στο ρεύμα απαγωγού εστίας.

Η ταχύτητα του αέρα πρέπει να είναι αρκετή ώστε οι καπνοί να εμποδίζονται να διαφεύγουν στο εργαστήριο και δεν θα πρέπει να μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Γύρω από τη συσκευή θα πρέπει να τοποθετείται ένας ανεμοθώρακας.

Εξαιτίας της υγροσκοπικότητας της κυτταρίνης και ορισμένων εξεταζομένων ουσιών, η δοκιμή θα πρέπει να γίνεται όσο το δυνατόν γρηγορότερα.

Η μία άκρη του σωρού αναφλέγεται ακουμπώντας εκεί τη φλόγα.

Μετριέται ο χρόνος της αντίδρασης για μία απόσταση 200 mm, αφού η ζώνη αντίδρασης έχει μετακινηθεί σε μία αρχική απόσταση 30 mm.

Η δοκιμή εκτελείται με την ουσία αναφοράς και μία τουλάχιστον φορά με καθεμία από τη σειρά των μειγμάτων της εξεταζόμενης ουσίας με την κυτταρίνη.

Αν η μέγιστη ταχύτητα καύσης βρεθεί να είναι σημαντικά μεγαλύτερη από εκείνη του μείγματος αναφοράς, η δοκιμή μπορεί να διακοπεί' διαφορετικά, η δοκιμή θα πρέπει να επαναληφθεί πέντε φορές για καθένα από τα τρία μείγματα που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη ταχύτητα καύσης.

▼B

Αν υπάρχει η υποψία ότι το αποτέλεσμα είναι εσφαλμένα θετικό, τότε η δοκιμή θα πρέπει να επαναληφθεί χρησιμοποιώντας μία αδρανή ουσία με παρόμοιο μέγεθος σωματιδίων, όπως π.χ. kieselguhr, αντί της κυτταρίνης. Εναλλακτικά, το μείγμα εξεταζόμενης ουσίας/κυτταρίνης με τη μεγαλύτερη ταχύτητα καύσης, θα πρέπει να ξαναϋποβληθεί σε δοκιμή σε αδρανή ατμόσφαιρα (< 2 % v/v περιεκτικότητα σε οξυγόνο).

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Για λόγους ασφάλειας η μέγιστη ταχύτητα καύσης —όχι η μέση τιμή— θα πρέπει να θεωρείται ως χαρακτηριστική οξειδωτική ιδιότητα της εξεταζόμενης ουσίας.

Για αξιολόγηση λαμβάνεται η μεγαλύτερη τιμή ταχύτητας καύσης από μία σειρά έξι δοκιμών ενός δεδομένου μείγματος.

Χαράσσεται καμπύλη της μέγιστης τιμής ταχύτητας καύσης για κάθε μείγμα ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του οξειδωτικού. Από την καμπύλη λαμβάνεται η μέγιστη ταχύτητα καύσης.

Οι έξι τιμές ταχύτητας καύσης που λαμβάνονται από μία σειρά μετρήσεων του μείγματος με τη μέγιστη ταχύτητα καύσης, δεν πρέπει να διαφέρουν από τη μέση αριθμητική τιμή περισσότερο από 10 % διαφορετικά, πρέπει οι μέθοδοι άλεσης και ανάμειξης να βελτιωθούν.

Συγκρίνεται η λαμβανομένη μέγιστη ταχύτητα καύσης με τη μέγιστη ταχύτητα καύσης του μίγματος αναφοράς (βλέπε σημείο 1.3).

Αν οι δοκιμές διεξαχθούν σε αδρανή ατμόσφαιρα, η μέγιστη ταχύτητα αντίδρασης συγκρίνεται με την αντίστοιχη του μείγματος αναφοράς σε αδρανή ατμόσφαιρα.

3. **ΕΚΘΕΣΗ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει, αν είναι δυνατόν, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— την ταυτότητα, σύνθεση, καθαρότητα, υγρασία, κ.λπ., της εξεταζόμενης ουσίας,

— κάθε επεξεργασία του δείγματος δοκιμής (π.χ. άλεση, ξήρανση, κ.λπ.),

— την πηγή έναυσης που χρησιμοποιείται στις δοκιμές,

— τα αποτελέσματα των μετρήσεων,

— τον τρόπο αντίδρασης (π.χ. επιφανειακή καύση, καύση σε όλη τη μάζα, κάθε πληροφορία σχετικά με τα προϊόντα καύσης, κ.λπ.),

— κάθε πρόσθετη παρατήρηση σχετική με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, συμπεριλαμβανόμενης και μιας περιγραφής της ισχύος (καύση με φλόγα, με σπινθήρες, με καπνό, σιγανή καύση, κ.λπ.) και η κατά προσέγγιση διάρκεια στην προκαταρκτική δοκιμή ασφάλειας/διερεύνησης και τόσο για την εξεταζόμενη ουσία όσο και για την ουσία αναφοράς,

— τα αποτελέσματα από δοκιμές με αδρανή ουσία, αν υπάρχουν,

— τα αποτελέσματα από δοκιμές σε αδρανή ατμόσφαιρα, αν υπάρχουν.

▼B

3.2. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΟΥ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ

Μία ουσία πρέπει να θεωρείται ως οξειδωτική ουσία όταν:

α) στην προκαταρκτική δοκιμή, εμφανίζεται ισχυρή αντίδραση·

β) στη ολοκληρωμένη δοκιμή, η μέγιστη ταχύτητα καύσης των εξεταζόμενων μειγμάτων, είναι μεγαλύτερη ή ίση με τη μέγιστη ταχύτητα καύσης του μείγματος αναφοράς κυτταρίνης και νιτρικού βαρίου.

Για να αποφευχθεί η συναγωγή εσφαλμένου θετικού αποτελέσματος, τα αποτελέσματα που λαμβάνονται όταν εξετάζεται η ουσία αναμεμειγμένη με ένα αδρανές υλικό ή/και όταν εξετάζεται σε κάποια αδρανή ατμόσφαιρα θα πρέπει επίσης να λαμβάνονται υπόψη όταν ερμηνεύονται τα αποτελέσματα.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. NF T 20-035 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the oxidizing properties of solids.

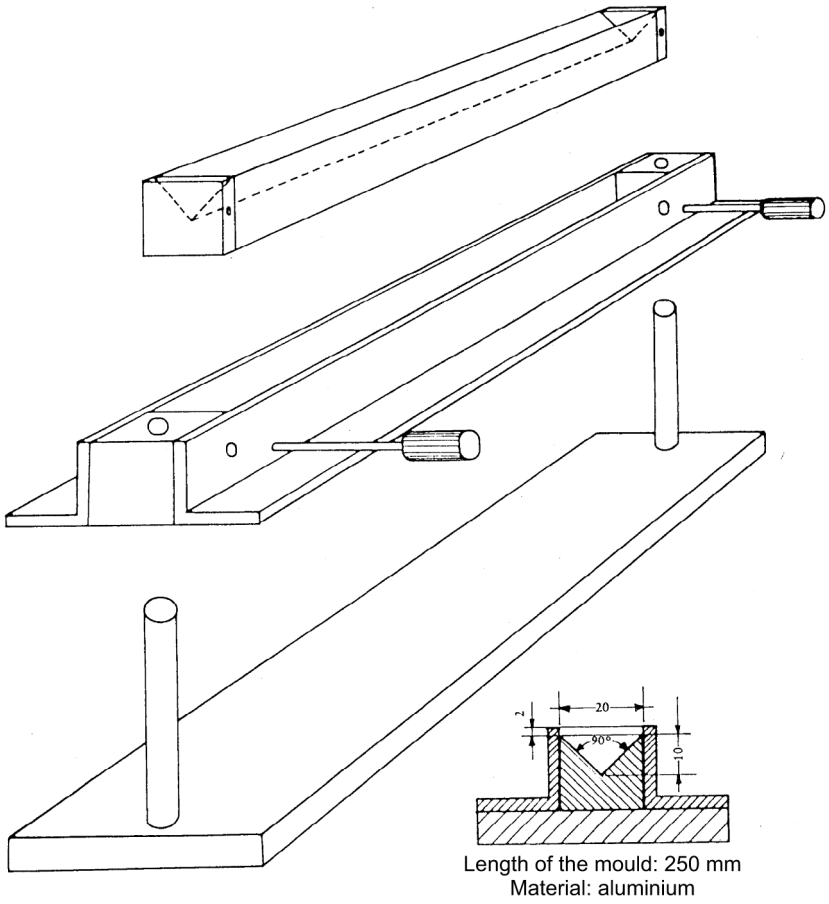
▼B

Προσάρτημα

Εικόνα

Καλούπι και εξαρτήματα για την ετοιμασία της στήλης

(Όλες οι διαστάσεις εκφράζονται σε mm)



▼B

Α.18. ΑΡΙΘΜΗΤΙΚΟ — ΜΕΣΟ ΜΟΡΙΑΚΟ ΒΑΡΟΣ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΒΑΡΩΝ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η χρωματογραφική αυτή μέθοδος διείσδυσης πηκτής αποτελεί αντιγραφή της OECD TGG 118 (1996). Οι βασικές αρχές και άλλες τεχνικές πληροφορίες παρέχονται στην παραπομπή 1.

1.1. Εισαγωγή

Επειδή οι ιδιότητες των πολυμερών διαφέρουν πάρα πολύ, είναι αδύνατον να περιγραφεί μία μοναδική μέθοδος στην οποία να καθορίζονται επακριβώς οι συνθήκες για τον διαχωρισμό και την αξιολόγηση που να καλύπτουν όλες τις πιθανότητες και ειδικές περιπτώσεις που συναντώνται στο διαχωρισμό πολυμερών. Συχνά μάλιστα, σε ορισμένα πολύπλοκα πολυμερών συστήματα, δεν μπορεί να εφαρμοστεί η χρωματογραφία διείσδυσης πηκτής (GPC). Όταν η GPC είναι πρακτικά ανεφάρμοστη, το μοριακό βάρος μπορεί να προσδιοριστεί με άλλες μεθόδους (βλέπε παράρτημα). Στις περιπτώσεις αυτές, θα πρέπει να δίδονται πλήρεις λεπτομέρειες και αιτιολόγηση για τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο.

Η περιγραφόμενη μέθοδος βασίζεται στο πρότυπο DIN 55672 (1). Λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με την εκτέλεση των πειραμάτων και την αξιολόγηση των δεδομένων μπορούν να αναζητηθούν σε αυτό το πρότυπο DIN. Στην περίπτωση που χρειάζονται τροποποιήσεις των πειραματικών συνθηκών, οι αλλαγές αυτές πρέπει να αιτιολογούνται. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα πρότυπα, εφόσον όμως γίνεται πλήρης αναφορά σε αυτά. Στην περιγραφόμενη μέθοδο χρησιμοποιούνται δείγματα πολυστυρολίου γνωστής πολυδιασπαρσιμότητας για διακρίβωση ενώ μπορεί να χρειάζεται να τροποποιηθούν για να είναι κατάλληλα για ορισμένα πολυμερή, π.χ. υδατοδιαλυτά και διακλαδισμένα με μακριές αλυσίδες πολυμερή.

1.2. Ορισμοί και μονάδες

Το αριθμητικό μέσο μοριακό βάρος M_n και το σταθμικό μέσο μοριακό βάρος M προσδιορίζονται χρησιμοποιώντας τις ακόλουθες εξισώσεις:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i / M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

όπου:

H_i είναι το επίπεδο του σήματος του ανιχνευτή από τη βασική γραμμή για τον όγκο κατακράτησης V_i,

M_i είναι το μοριακό βάρος του κλάσματος του πολυμερούς στον όγκο κατακράτησης V_i και

n είναι ο αριθμός των σημείων δεδομένων.

Το εύρος της κατανομής των μοριακών βαρών, το οποίο αποτελεί μέτρο της διασπαρσιμότητας του συστήματος, δίδεται από το λόγο M_w/M_n.

▼B

1.3. Ουσίες αναφοράς

Επειδή η GPC είναι μία σχετική μέθοδος, πρέπει να γίνεται διακρίβωση. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται συνήθως πρότυπα πολυστυρολίου, κατανεμημένα σε μία στενή περιοχή με γραμμική διαμόρφωση. με γνωστά μέσα μοριακά βάρη M_η και M_w και γνωστή κατανομή μοριακών βαρών. Η καμπύλη διακρίβωσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί στον προσδιορισμό του μοριακού βάρους του άγνωστου δείγματος μόνον εάν οι συνθήκες για το διαχωρισμό του δείγματος και τα πρότυπα έχουν επιλεγεί με ταυτόσημο τρόπο.

Κάθε προσδιοριζόμενη σχέση μεταξύ του μοριακού βάρους και του όγκου εκλούσεως είναι έγκυρη μόνον υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες του συγκεκριμένου πειράματος. Στις συνθήκες περιλαμβάνονται, κυρίως η θερμοκρασία, ο διαλύτης (ή μείγμα διαλυτών), οι χρωματογραφικές συνθήκες και *τ* στήλη ή το σύστημα στηλών διαχωρισμού.

Τα μοριακά βάρη του δείγματος που προσδιορίζονται με τον τρόπο αυτό είναι σχετικές; τιμές και χαρακτηρίζονται ως «ισοδύναμα μοριακά βάρη πολυστυρολίου». Αυτό σημαίνει ότι ανάλογα με τις δομικές και χημικές διαφορές μεταξύ του δείγματος και των προτύπων, τα μοριακά βάρη μπορούν να αποκλίνουν από τις απόλυτες τιμές κατά ένα μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό. Εάν χρησιμοποιούνται άλλα πρότυπα, π.χ. πολυαιθυλενογλυκόλη, πολυαιθυλενοξείδιο, μεθακρυλικός πολυμεθυλεστέρας. πολυακρυλικό οξύ, θα πρέπει να δηλώνεται ο λόγος.

1.4. Αρχή της μεθόδου δοκιμής

Και η κατανομή των μοριακών βαρών του δείγματος και τα μέσα μοριακά βάρη (M_w και M_η μπορούν να προσδιοριστούν χρησιμοποιώντας GPC. Η GPC είναι ένας ειδικός τύπος υγρής χρωματογραφίας στην οποία το δείγμα διαχωρίζεται ανάλογα με τους υδροδυναμικούς όγκους των επιμέρους συστατικών (2).

Ο διαχωρισμός επιτελείται καθώς το δείγμα διέρχεται από στήλη γεμισμένη με πορώδες υλικό, συνήθως μία οργανική πηκτή. Τα μικρά μόρια μπορούν να διεισδύουν στους πόρους ενώ τα μεγάλα μόρια αδυνατούν. Έτσι η διαδρομή των μεγάλων μορίων είναι μικρότερη και εκλούονται πρώτα. Τα μεσαίου μεγέθους μόρια διεισδύουν κάπως στους πόρους και εκλούονται αργότερα. Τα μικρότερα μόρια, με μέση υδροδυναμική ακτίνα μικρότερη από τους πόρους της πηκτής μπορούν να διεισδύουν σε όλους τους πόρους. Αυτά εκλούονται τελευταία.

Θεωρητικά, ο διαχωρισμός εξαρτάται αποκλειστικά από το μέγεθος των μορίων, στην πράξη όμως είναι δύσκολο να αποφευχθεί η παρεμβολή, τουλάχιστον σε κάποιο βαθμό, ορισμένων φαινομένων προσρόφησης. Η κατάσταση μπορεί να χειροτερεύσει από τυχόν μη ομοιόμορφη πλήρωση της στήλης και ύπαρξη κενών όγκων (2).

Η ανίχνευση πραγματοποιείται με τη βοήθεια π.χ. του δείκτη διάθλασης ή της απορρόφησης στο LJV, λαμβάνεται δε μία καμπύλη απλής κατανομής. Εντούτοις, για να παρέχει η καμπύλη πραγματικές τιμές μοριακών βαρών, είναι αναγκαίο η στήλη να διακριβώνεται διοχετεύοντας μέσα από αυτή πολυμερή γνωστού μοριακού βάρους και. στην ιδανική περίπτωση, παρόμοιας όσο το δυνατόν δομής π.χ. διάφορα πρότυπα πολυστυρολίου Συνήθως λαμβάνεται μία καμπύλη Gauss, παραμορφωμένη μερικές φορές από μία μικρή ουρά προς την πλευρά των χαμηλών μοριακών βαρών. Ο κατακόρυφος άξονας δείχνει την κατά βάρος ποσότητα των με διάφορα βάρη εκλουόμενων κλασμάτων ενώ ο οριζόντιος άξονας δείχνει το λογαριθμικό μοριακό βάρος.

▼B

1.5. Κριτήρια ποιότητας

Η επαναληψιμότητα (σχετική τυπική απόκλιση: ΣΤΑ) του όγκου έκλουσης θα πρέπει να είναι καλύτερη του 0,3 %. Εάν ένα χρωματογράφημα αξιολογείται σε εξάρτηση από το χρόνο και δεν πληροί το ανωτέρω αναφερθέν κριτήριο (1), η απαιτούμενη για την ανάλυση επαναληψιμότητα πρέπει να διασφαλίζεται διορθώνοντας την με ένα εσωτερικό πρότυπο. Οι πολυδιασπαρσιμότητες εξαρτώνται από τα μοριακά βάρη των προτύπων. Στην περίπτωση των προτύπων πολυστυρολίου οι συνήθεις τιμές είναι:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 < M_p < 10^{'}$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p είναι το μοριακό βάρος του προτύπου στο ανώτατο σημείο της κορυφής).

1.6. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμής

1.6.1. **Παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων πολυστυρολίου**

Τα πρότυπα πολυστυρολίου διαλύονται με επισταμένη ανάμειξη στο επιλεγμένο εκλουστικό μέσον. Κατά την παρασκευή των διαλυμάτων πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι οδηγίες του κατασκευαστή.

Οι συγκεντρώσεις των επιλεγόμενων προτύπων εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες, π.χ. από τον όγκο έγχυσης, το ιξώδες του διαλύματος και την ευαισθησία του αναλυτικού ανιχνευτή. Ο μέγιστος όγκος έγχυσης πρέπει να προσαρμόζεται στο μήκος της στήλης για να αποφεύγεται τυχόν υπερφόρτιση. Οι συνήθεις όγκοι έγχυσης για αναλυτικούς διαχωρισμούς με GPC και στήλη 30 cm × 7,8 mm, είναι κανονικά μεταξύ 40 και 100 μl. Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν και μεγαλύτεροι όγκοι, αυτοί όμως δεν πρέπει να υπερβαίνουν τα 250 μl. Πριν από τη διακρίβωση της στήλης πρέπει να προσδιορίζεται ποια είναι η άριστη σχέση μεταξύ του όγκου έγχυση; και της συγκεντρώσεως.

1.6.2. **Παρασκευή του διαλύματος του δείγματος**

Για την παρασκευή των διαλυμάτων του δείγματος ισχύουν κατ' αρχήν οι ίδιες απαιτήσεις. Το δείγμα διαλύεται σε κατάλληλο διαλύτη, π.χ. τετραϋδροφουράνιο (THF), με προσεκτική ανακίνηση. Σε καμία περίπτωση δεν θα πρέπει να διαλύεται με χρήση λουτρού υπερήχων. Εφόσον απαιτείται, το διάλυμα του δείγματος καθαρίζεται μέσω φίλτρου μεμβράνης με μέγεθος πόρων μεταξύ 0,2 και 2 μm.

Εάν υπάρχουν αδιάλυτα σωματίδια, αυτό πρέπει να αναγράφεται στην τελική έκθεση γιατί αυτά μπορεί να οφείλονται σε κλάσματα υψηλού μοριακού βάρους. Για τον προσδιορισμό του κατά βάρος ποσοστού των αδιάλυτων σωματιδίων θα πρέπει να χρησιμοποιείται μία κατάλληλη μέθοδος. Τα διαλύματα θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μέσα σε 24 ώρες.

1.6.3. **Συσκευές**

— δοχείο διαλύτη

— απαεριωτής (όπου χρειάζεται)

— αντλία

▼B

— αποσβεστήρας παλμών (όπου χρειάζεται)

— σύστημα εγχύσεως

— στήλες χρωματογραφίας

— ανιχνευτής

— ροόμετρο (όπου χρειάζεται)

— καταγραφέας-επεξεργαστής δεδομένων

— δοχείο αποβλήτων.

Πρέπει να διασφαλίζεται ότι το σύστημα GPC είναι αδρανές έναντι των χρησιμοποιουμένων διαλυτών (π.χ. χρησιμοποιώντας χαλύβδινα τριχοειδή για το διαλύτη THF).

1.6.4. **Έγχυση και σύστημα παροχής διαλύτη**

Ορισμένος όγκος του διαλύματος του δείγματος φέρεται στη στήλη χρησιμοποιώντας είτε αυτόματο δειγματολήπτη είτε με τα χέρια σε μία επακριβώς καθορισμένη ζώνη. Εάν η εργασία γίνεται με τα χέρια. πρέπει να αποφεύγεται κάθε απότομο τράβηγμα ή πίεση του εμβόλου της σύριγγας γιατί κάτι τέτοιο μπορεί να προκαλέσει μεταβολές στη μετρούμενη κατανομή μοριακών βαρών. Τα σύστημα παροχής του διαλύτη θα πρέπει, όσο το δυνατόν, να μην επηρεάζεται θεωρητικά από παλμούς με τη βοήθεια ενός αποσβεστήρα παλμών. Η ταχύτητα ροής είναι της τάξης του 1 ml/mi n.

1.6.5. **Στήλη**

Η αναγνώριση του πολυμερούς γίνεται, ανάλογα με το δείγμα, είτε με μία απλή στήλη είτε με περισσότερες από μία στήλες συνδεδεμένες διαδοχικά. Στο εμπόριο υπάρχουν διαθέσιμα αρκετά πορώδη για στήλες υλικά με καθορισμένες ιδιότητες (π.χ. μέγεθος πόρων, όρια αποκλεισμού). Η επιλογή της πηκτής διαχωρισμού ή του μήκους της στήλης εξαρτάται τόσον από τις ιδιότητες του δείγματος (υδροδυναμικός όγκος, κατανομή μοριακών βαρών) όσο και από τις ειδικές συνθήκες για το διαχωρισμό όπως ο διαλύτης, η

1.6.6. **Θεωρητικές πλάκες**

Η στήλη ή ο συνδυασμός των στηλών που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό πρέπει να χαρακτηρίζονται από τον αριθμό των θεωρητικών πλακών. Αυτό σημαίνει ότι στην περίπτωση όπου ως διαλύτης εκλούσεως χρησιμοποιείται THF, θα πρέπει να γίνεται φόρτιση στήλης γνωστού μήκους με διάλυμα αιθυλοβενζολίου ή άλλου κατάλληλου μη πολικού διαλυμένου σώματος. Ο αριθμός των θεωρητικών πλακών δίδεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$N = 5{,}54 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \qquad \text{ή} \qquad N = 16 \left(\frac{V_e}{W} \right)^2$$

όπου;

N είναι ο αριθμός *των* θεωρητικών πλακών

V_e είναι ο όγκος εκλούσεως στο ανώτατο σημείο της κορυφής

▼B

W είναι το πλάτος της γραμμής βάσεως της κορυφής

$W_{1/2}$ είναι το πλάτος της κορυφής στο ήμισυ του ύψους της.

1.6.7. **Ικανότητα διαχωρισμού**

Εκτός από τον αριθμό των θεωρητικών πλακών, που είναι ένα μέγεθος που προσδιορίζει το εύρος της ζώνης, ένα μέρος εξαρτάται και από την ικανότητα διαχωρισμού, μέγεθος που προσδιορίζεται από το βαθμό κλίσεως της καμπύλης διακριβώσεως. Η ικανότητα διαχωρισμού μίας στήλης βρίσκεται από την ακόλουθη σχέση:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{εμβαδόν εγκάρσιας διατομής στήλης}} \geq 6{,}0 \left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

όπου,

V_{eMx} είναι ο όγκος εκλούσεως για πολυστυρόλιο με μοριακό βάρος M_X

$V_{e(10M_x)}$) είναι ο όγκος εκλούσεως νια πολυστυρόλιο με δεκαπλάσιο μοριακό βάρος.

Η αναλυτική ικανότητα του συστήματος ορίζεται συνήθως ως εξής:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

όπου:

V_{e1}, V_{e2} είναι οι όγκοι εκλούσεως των δύο προτύπων πολυστυρολίου στο μέγιστο της κορυφής,

W_1, W_2 είναι τα πλάτη της κορυφής στη γραμμή βάσεως

M_1, M_2 είναι τα μοριακά βάρη στο μέγιστο της κορυφής (που πρέπει να διαφέρουν κατά ένα συντελεστή 10).

Η τιμή R για το σύστημα στηλών θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 1,7 (4).

1.6.8 **Διαλύτες**

Όλοι οι διαλύτες πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας (για το THF απαιτείται καθαρότητα 99,5 %). Το δοχείο του διαλύτη (το οποίο, εφόσον χρειάζεται, πρέπει να είναι σε ατμόσφαιρα αδρανούς αερίου) πρέπει να είναι αρκετά μεγάλο για τη διακρίβωση της στήλης και την ανάλυση αρκετών δειγμάτων Ο διαλύτης πρέπει να απαεριώνεται πριν μεταφερθεί στη στήλη μέσω της αντλίας.

1.6.9. **Έλεγχος θερμοκρασίας**

Η θερμοκρασία των κρίσιμων εσωτερικών εξαρτημάτων (βρόχος εγχύσεως, στήλες, ανιχνευτής και σωληνώσεις) θα πρέπει να είναι σταθερή και κατάλληλη για τον επιλεγέντα διαλύτη.

▼B

1.6.10. **Ανιχνευτής**

Σκοπός του ανιχνευτή είναι να καταγράφει ποσοτικώς τη συγκέντρωση του δείγματος που εκλούζεται από τη στήλη. Για να αποφεύγεται άσκοπη διεύρυνση των κορυφών, ο όγκος της κυψελίδας του ανιχνευτή πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μικρότερος. Η τιμή του όγκου δεν θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 10 ml εκτός από την περίπτωση ανιχνευτών διάχυσης του φωτός και ιξώδους. Για την ανίχνευση χρησιμοποιείται συνήθως διαφορική διαθλασιμετρία. Εντούτοις, εφόσον το επιβάλλουν οι συγκεκριμένες ιδιότητες του δείγματος ή του διαλύτη εκλούσεως. μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι τύποι ανιχνευτών, π.χ. UV/VIS-, IR-, ανιχνευτές ιξώδους κ.λπ.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

2.1. Δεδομένα

Για τα λεπτομερή κριτήρια αξιολόγησης καθώς επίσης και τις απαιτήσεις που σχετίζονται με τη συλλογή και επεξεργασία των δεδομένων, θα πρέπει να γίνεται αναφορά στο πρότυπο DIN (1).

Για κάθε δείγμα πρέπει να πραγματοποιούνται δύο ανεξάρτητα πειράματα και να γίνονται επιμέρους αναλύσεις.

Σε κάθε μέτρηση πρέπει να παρέχονται τα $M_{_}$, M_w, M_u/M_h και M_p και να αναφέρεται ρητώς, ότι οι μετρούμενες τιμές είναι σχετικές τιμές ισοδύναμε; με τα μοριακά βάρη του χρησιμοποιούμενου προτύπου.

Μετά τον προσδιορισμό των όγκων κατακράτησης ή των χρόνων κατακράτησης (διορθωμένων πιθανόν με βάση ένα εσωτερικό πρότυπο), κατασκευάζεται γραφική παράσταση των τιμών log M (M είναι τα ανώτατα σημεία των κορυφών των προτύπων διακριβώσεως) συναρτήσει μίας από τις ποσότητες αυτές. Για κάθε δεκάδα μοριακών βαρών απαιτούνται τουλάχιστον δύο σημεία διακρίβωσης ενώ. για τη συνολική καμπύλη, απαιτούνται τουλάχιστον πέντε σημεία μετρήσεως, σημεία που θα πρέπει να καλύπτουν το εκτιμώμενο μοριακό βάρος του δείγματος. Το προς τα χαμηλά μοριακά βάρη ακραίο σημείο της καμπύλης διακριβώσεως ορίζεται από η-εξυλοβενζόλιο ή άλλη κατάλληλη μη πολική διαλυμένη ουσία. Το αριθμητικό μέσο και το σταθμικό μέσο μοριακό βάρος προσδιορίζονται εν γένει μέσω επεξεργασίας ηλεκτρονικών δεδομένων, με βάση τους τύπους του σημείου 1.2. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται διά χειρός ψηφιοποίηση, μπορεί κανείς να κάνει χρήση του ASTM D 3536-91 (3).

Η καμπύλη κατανομής πρέπει να παρέχεται με τη μορφή πίνακα ή εικόνας (διαφορική συχνότητα ή αθροιστικά ποσοστά συναρτήσει του log M). Στη γραφική παράσταση, μία δεκάδα μοριακών βαρών θα πρέπει κανονικά να αντιστοιχεί σε πλάτος περίπου 4 cm ενώ το μέγιστο της κορυφής θα πρέπει να είναι σε ύψος περίπου 8 cm. Στην περίπτωση ολοκληρωμένων καμπυλών κατανομής η διαφορά στην τεταγμένη μεταξύ 0 και 100 % θα πρέπει να είναι περίπου 10 cm.

2.2. Έκθεση δοκιμής

Στην έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνονται οι ακόλουθες πληροφορίες:

2.2.1. **Υπό δοκιμή ουσία**

— υπάρχουν στοιχεία για την υπό δοκιμή ουσία (ταυτότητα, πρόσθετα, προσμείξεις),

▼B

— περιγραφή της κατεργασίας του δείγματος, παρατηρήσεις, προβλήματα.

2.2.2. **Εξοπλισμός**

— περιέκτης εκλουστικού μέσου, αδρανές αέριο, απαερίωση του εκλουστικού μέσου, σύσταση του εκλουστικού μέσου, προσμείξεις,

— αντλία, αποσβεστήρας παλμών, σύστημα εγχύσεως,

— στήλες διαχωρισμού (κατασκευαστής, όλα τα σχετικά με τα χαρακτηριστικά των στηλών όπως μέγεθος πόρων, είδος υλικού διαχωρισμού κ.λπ., αριθμός, μήκος και σειρά των χρησιμοποιηθεισών στηλών),

— αριθμός των θεωρητικών πλακών της στήλης (ή συνδυασμού), ικανότητα διαχωρισμού (αναλυτική ικανότητα του συστήματος),

— πληροφορίες για τη συμμετρία των κορυφών,

— θερμοκρασία στηλών, τρόπος ελέγχου της θερμοκρασίας,

— ανιχνευτής (αρχή μετρήσεως, τύπος, όγκος κυψελίδας),

— ροόμετρο, εφόσον χρησιμοποιείται (κατασκευαστής, αρχή μετρήσεως),

— σύστημα καταγραφής και επεξεργασίας δεδομένων (υλικό και λογισμικό).

2.2.3. **Διακρίβωση τον συστήματος**

— λεπτομερής περιγραφή της μεθόδου που χρησιμοποιείται για τη χάραξη της καμπύλης διακρίβωσης,

— πληροφορίες για τα κριτήρια ποιότητας της μεθόδου (π.χ. συντελεστής συσχέτισης, άθροισμα σφαλμάτων τετραγώνων κ.λπ.),

— στοιχεία σχετικά με κάθε περίπτωση παρέκτασης, υποθέσεων και προσεγγίσεων που έγιναν κατά την πειραματική διαδικασία και την αξιολόγηση και επεξεργασία δεδομένων,

— Κάθε μέτρηση που χρησιμοποιείται για τη χάραξη της καμπύλης διακριβώσεως πρέπει να τεκμηριώνεται σε ένα πίνακα που να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία νια κάθε σημείο διακρίβωσης:

  — ονομασία του δείγματος,

  — παρασκευαστής του δείγματος,

  — χαρακτηριστικές τιμές των προτύπων M_p, M_n, M_w, M_w/M_n όπως δίδονται από τον κατασκευαστή ή λαμβάνονται από διαδοχικές μετρήσεις, μαζί με λεπτομέρειες για τη μέθοδο προσδιορισμού:

  — όγκος εγχύσεως και συγκέντρωση εγχύσεως,

▼B

— τιμή M_p που χρησιμοποιείται νια τη διακρίβωση,

— όγκος εκλούσεως ή διορθωμένος χρόνος κατακράτησης που μετράται στα ανώτατα σημεία των κορυφών,

— M_p που υπολογίζεται στο ανώτατο σημείο της κορυφής,

— ποσοστιαίο σφάλμα της υπολογιζόμενης τιμής M_p και της τιμής διακρίβωσης.

2.2.4. **Αξιολόγηση**

— αξιολόγηση με βάση το χρόνο: μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για να διασφαλιστεί η απαιτούμενη αναπαραγωγιμότητα (μέθοδος διόρθωσης, εσωτερικό πρότυπο κ.λπ.),

— πληροφορίες για το εάν η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε με βάση τον όγκο εκλούσεως ή το χρόνο κατακράτησης,

— πληροφορίες σχετικά με τα όρια της αξιολόγησης εάν μία κορυφή δεν αναλύεται πλήρως,

— περιγραφή μεθόδων αμβλύνσεως, εάν χρησιμοποιήθηκαν,

— διαδικασία παρασκευής και προκατεργασίας του δείγματος,

— η παρουσία αδιάλυτων σωματιδίων, εάν υπήρχαν,

— όγκος εγχύσεως (ml) και συγκέντρωση εγχύσεως (mg/ml),

— παρατηρήσεις που δείχνουν επιδράσεις που οδηγούν σε αποκλίσεις από το θεωρητικό προφίλ GPC,

— λεπτομερή περιγραφή κάθε τροποποίησης των διαδικασιών δοκιμής,

— λεπτομέρειες για τις περιοχές σφαλμάτων,

— κάθε άλλη πληροφορία και παρατήρηση σχετικά με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

(1) DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Eutions-mittel, Teil 1.

(2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D. D. eds. (1979). Modern Size Exlcusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

(3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia. Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92 (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia. Pennsylvania.

▼B

Προσάρτημα

Παραδείγματα άλλων μεθόδων για τον προσδιορισμό του αριθμητικού μέσου μοριακού βάρους ($M_η$) για πολυμερή

Η μέθοδος που προτιμάται για τον προσδιορισμό του $M_η$, ιδιαίτερα όταν υπάρχει διαθέσιμη σειρά από πρότυπα των οποίων η δομή είναι συγκρίσιμη με τη δομή του πολυμερούς, είναι η χρωματογραφία διεισδύσεως πηκτής (GPC). Εντούτοις, όπου υπάρχουν πρακτικές δυσκολίες στη χρήση της GPC ή είναι εκ των προτέρων αναμενόμενο ότι η ουσία δεν θα πληροί κάποιο θεσπισμένο κριτήριο $M_η$ (και το οποίο χρειάζεται επιβεβαίωση), υπάρχουν και εναλλακτικές διαθέσιμες μέθοδοι όπως

1. **Χρήση φυσικοχημικών ιδιοτήτων**

1.1. Ζεσεοσκοπία/Κρυοσκοπία:

Συνίσταται στη μέτρηση της ανύψωσης του σημείου ζέσεως (ζεσεοσκοπία) ή του υποβιβασμού του σημείου πήξεως (κρυοσκοπία) ενός διαλύτη, όταν προστίθεται το πολυμερές. Η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός ότι η επίδραση του διαλυόμενου πολυμερούς στο σημείο ζέσεως/πήξεως του υγρού εξαρτάται από το μοριακό βάρος του πολυμερούς (1)(2).

Δυνατότητα εφαρμογής: $M_n < 20\,000$.

1.2. Υποβιβασμός της τάσεως ατμών:

Συνίσταται στη μέτρηση της τάσεως ατμών ενός επιλεγμένου υγρού αναφοράς πριν και μετά την προσθήκη γνωστών ποσοτήτων πολυμερούς (1)(2).

Δυνατότητα εφαρμογής: $M_n < 20\,000$ (θεωρητικά, αφού στην πράξη υπάρχει περιορισμός).

1.3. Οσμομετρία μεμβράνης:

Βασίζεται στην αρχή της όσμωσης δηλαδή της φυσικής τάσης των μορίων των διαλυτών να διέρχονται διαμέσου ημιπερατής μεμβράνης από ένα αραιό σε ένα πυκνό διάλυμα για την επίτευξη ισορροπίας. Στη δοκιμή, το αραιό διάλυμα έχει μηδενική συγκέντρωση, ενώ το πυκνό διάλυμα περιέχει το πολυμερές. Το γεγονός της διέλευσης του διαλύτη διαμέσου της μεμβράνης προκαλεί την ανάπτυξη διαφορικής πιέσεως που εξαρτάται από τη συγκέντρωση και το μοριακό βάρος του πολυμερούς (1)(3)(4).

Δυνατότητα εφαρμογής M_n μεταξύ 20 000 και 200 000.

1.4. Οσμομετρία φάσης ατμών:

Συνίσταται στη σύγκριση της ταχύτητας εξατμίσεως αερολύματος καθαρού διαλύτη προς τρία τουλάχιστον αερολύματα που περιέχουν το πολυμερές σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (1) (5) (6).

Δυνατότητα εφαρμογής $M < 20\,000$

▼B

2. **Ανάλυση τερματικών ομάδων**

Για να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος αυτή απαιτείται να είναι γνωστή τόσο η όλη δομή του πολυμερούς όσο και η φύση των τερματικών ομάδων της αλυσίδας (πράγμα που πρέπει να διακρίνεται από τον βασικό σκελετό με τη βοήθεια π.χ. NMR ή τιτλοδότησης/παραγωγοποίησης). Ο προσδιορισμός της μοριακής συγκεντρώσεως των τερματικών ομάδων που υπάρχουν στο πολυμερές μπορεί να οδηγήσει στην ανεύρεση μιας τιμής για το μοριακό βάρος (7)(8)(9).

Δυνατότητα εφαρμογής: M_n μέχρι 50 000 (με φθίνουσα αξιοπιστία).

3. **Παραπομπές**

(1) Billmeyer. F.W. Jr.. (1984) Textbook of Polymeer Science. 3rd Edn., John Wiley, New York

(2) Glover. C.A., (1975). Absolute Colligative Property Methods. Chapter 4. In: Polymer Molecular Weights. Part I, P.E.. Slade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.

(3) ASTM D 3750-79, (1979). Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane Osmometry. American Society for Testing and Materials. Philadelphia. Pennsvlvania.

(4) Coll. H. (1989). Membrane Osmometry. In: Determination of Molecular Weight. A.R. Cooper ed.. J. Wiley and Sons. pp. 25o2.

(5) ASTMD 3592-77. (1977). Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure. American Society for Testing and Materials, Philadelphia. Pennsylvania.

(6) Morris, C.E.M., (1989). Vapour Pressure Osmometry'. In: Determination of Molecular Weight A.R. Cooper ed., John Wiley and Sons.

(7) Schroder, E. Muller. G., and Arndt, K-F., (1989). Polymer Characterisation, Carl Hanser Verlag. Munich.

(8) Garmon, R.G., (1975). End-Group Determinations, Chapter 3 In: Polymer Molecular Weights, Part I, P.E. Slade, Jr. ed. Marcel Dekker, New York.

(9) Amiya, S, et al. (1990). Pure and Applied Chemistry, 62, 2139-2146.

▼B

Α.19. ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΣΕ ΚΛΑΣΜΑΤΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η χρωμοτογραφική αυτή μέθοδος διείσδυσης πηκτής αποτελεί αντιγραφή της OECD TG 119 (1996). Οι βασικές αρχές και άλλες τεχνικές πληροφορίες παρέχονται στην παραπομπή 1.

1.1. Εισαγωγή

Επειδή οι ιδιότητες των πολυμερών διαφέρουν πάρα πολύ, είναι αδύνατον να περιγραφεί μία μοναδική μέθοδος στην οποία να καθορίζονται επακριβώς οι συνθήκες για τον διαχωρισμό και την αξιολόγηση που να καλύπτουν όλες τις πιθανότητες και ειδικές περιπτώσεις που συναντώνται στο διαχωρισμό πολυμερών. Συχνά μάλιστα, σε ορισμένα πολύπλοκα πολυμερών συστήματα, δεν μπορεί να εφαρμοστεί η χρωματογραφία διείσδυσης πηκτής (GPC). Όταν η GPC είναι πρακτικά ανεφάρμοστη, το μοριακό βάρος μπορεί να προσδιοριστεί με άλλες μεθόδους (βλέπε παράρτημα). Στις περιπτώσεις αυτές, θα πρέπει να δίδονται πλήρεις λεπτομέρειες και αιτιολόγηση.

Η περιγραφόμενη μέθοδος βασίζεται στο πρότυπο DIN 55672 (1). Λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με την εκτέλεση των πειραμάτων και την αξιολόγηση των δεδομένων μπορούν να αναζητηθούν σε αυτό το πρότυπο DIN. Στην περίπτωση που χρειάζονται τροποποιήσεις των πειραματικών συνθηκών, οι αλλαγές αυτές πρέπει να αιτιολογούνται. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα πρότυπα, εφόσον όμως γίνεται πλήρης αναφορά σε αυτά. Στην περιγραφόμενη μέθοδο χρησιμοποιούνται δείγματα πολυστυρολίου γνωστής πολυδιασπαρσιμότητας για διακρίβωση ενώ μπορεί να χρειάζεται να τροποποιηθούν για να είναι κατάλληλη για ορισμένα πολυμερή, π.χ. υδατοδιαλυτά και διακλαδισμένα με μακριές αλυσίδες πολυμερή.

1.2. Ορισμοί και μονάδες

Χαμηλό μοριακό βάρος ορίζεται αυθαίρετα ως το μοριακό βάρος το μικρότερο των 1 000 dalton.

Το αριθμητικό μέσο μοριακό βάρος (MJ και το σταθμικό μέσο μοριακό βάρος (M) προσδιορίζονται χρησιμοποιώντας τις ακόλουθες εξισώσεις:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i / M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

όπου:

H_i = είναι το επίπεδο του σήματος του ανιχνευτή από τη βασική γραμμή για τον όγκο κατακράτησης V_i,

M_i = είναι το μοριακό βάρος του κλάσματος του πολυμερούς στον όγκο κατακράτησης V_i και n είναι ο αριθμός των σημείων δεδομένων.

Το εύρος της κατανομής των μοριακών βαρών, το οποίο αποτελεί μέτρο της διασπαρσιμότητας του συστήματος, δίδεται από τη σχέση M_w/M_n.

▼B

1.3. Ουσίες αναφοράς

Επειδή η GPC είναι μία σχετική μέθοδος, πρέπει να γίνεται διακρίβωση. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται συνήθως πρότυπα πολυστυρολίου. κατανεμημένα σε μία στενή περιοχή με γραμμική διαμόρφωση. με γνωστά μέσα μοριακά βάρη M_n και M_w και γνωστή κατανομή μοριακών βαρών. Η καμπύλη διακρίβωσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί στον προσδιορισμό του μοριακού βάρους του άγνωστου δείγματος μόνον εάν οι συνθήκες για το διαχωρισμό του δείγματος και των προτύπων έχουν επιλεγεί με ταυτόσημο τρόπο.

Κάθε προσδιοριζόμενη σχέση μεταξύ του μοριακού βάρους και του όγκου εκκλούσεως είναι έγκυρη μόνον υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες του συγκεκριμένου πειράματος. Στις συνθήκες περιλαμβάνονται, κυρίως. η θερμοκρασία, ο διαλύτης (ή μείγμα διαλυτών), οι χρωματογραφικές συνθήκες και η στήλη ή το σύστημα στηλών διαχωρισμού.

Τα μοριακά βάρη του δείγματος που προσδιορίζονται με τον τρόπο αυτό είναι σχετικές τιμές και χαρακτηρίζονται ως «ισοδύναμα μοριακά βάρη πολυστυρολίου». Αυτό σημαίνει ότι ανάλογα με τις δομικές και χημικές διαφορές μεταξύ του δείγματος και των προτύπων, τα μοριακά βάρη μπορούν να αποκλίνουν από τις απόλυτες τιμές κατά ένα μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό. Εάν χρησιμοποιούνται άλλα πρότυπα, π.χ. πολυαιθυλενογλυκόλη, πολυαιθυλενοξείδιο, μεθακρυλικός πολυμεθυλεστέρας, πολυακρυλικό οξύ, θα πρέπει να δηλώνεται ο λόγος.

1.4. Αρχή της μεθόδου δοκιμής

Η κατανομή των μοριακών βαρών του δείγματος και τα μέσα μοριακά βάρη (M_w και M_n) μπορούν να προσδιοριστούν χρησιμοποιώντας GPC. Η GPC είναι ένας ειδικός τύπος υγρής χρωματογραφίας στην οποία το δείγμα διαχωρίζεται ανάλογα με τους υδροδυναμικούς όγκους των επιμέρους συστατικών (2).

Ο διαχωρισμός επιτελείται καθώς το δείγμα διέρχεται από στήλη γεμισμένη με πορώδες υλικό, συνήθως μία οργανική πηκτή. Τα μικρά μόρια μπορούν να διεισδύουν στους πόρους ενώ τα μεγάλα μόρια αδυνατούν. Έτσι η διαδρομή των μεγάλων μορίων είναι μικρότερη και εκλούονται πρώτα. Τα μεσαίου μεγέθους μόρια διεισδύουν κάπως στους πόρους και εκλούονται αργότερα. Τα μικρότερα μόρια, με μέση υδροδυναμική ακτίνα μικρότερη από τους πόρους της πηκτής, μπορούν να διεισδύουν σε όλους τους πόρους. Αυτά εκλούονται τελευταία.

Θεωρητικά, ο διαχωρισμός εξαρτάται αποκλειστικά από το μέγεθος των μορίων, στην πράξη όμως είναι δύσκολο να αποφευχθεί η παρεμβολή, τουλάχιστον σε κάποιο βαθμό, ορισμένων φαινομένων προσρόφησης. Η κατάσταση μπορεί να χειροτερεύσει από τυχόν μη ομοιόμορφη πλήρωση της στήλης και ύπαρξη κενών όγκων (2).

Η ανίχνευση πραγματοποιείται με τη βοήθεια π.χ. του δείκτη διάθλασης η της απορρόφησης στο UV, λαμβάνεται δε μία καμπύλη απλής κατανομής. Εντούτοις, για να παρέχει η καμπύλη πραγματικές τιμές μοριακών βαρών, είναι αναγκαίο η στήλη να διακριβώνεται διοχετεύοντας μέσα από αυτή πολυμερή γνωστού μοριακού βάρους και, στην ιδανική περίπτωση, παρόμοιας όσο το δυνατόν δομής π.χ. διάφορα πρότυπα πολυστυρολίου. Συνήθως λαμβάνεται μία καμπύλη Gauss, παραμορφωμένη μερικές φορές από μία μικρή ουρά προς την πλευρά των χαμηλών μοριακών βαρών. Ο κατακόρυφος άξονας δείχνει την κατά βάρος ποσότητα των με διάφορα βάρη εκλουζόμενων κλασμάτων ενώ ο οριζόντιος άξονας δείχνει το λογαριθμικό μοριακό βάρος.

▼B

Η περιεκτικότητα σε χαμηλού μοριακού βάρους κλάσματα λαμβάνεται από αυτή την καμπύλη. Ο υπολογισμός μπορεί να είναι ορθός μόνον εφόσον τα χαμηλού μοριακού βάρους κλάσματα έχουν ισοδύναμη κατά μάζα αντιστοιχία με το πολυμερές ως σύνολο.

1.5. Κριτήριο ποιότητας

Η επαναληψιμότητα (σχετική τυπική απόκλιση: ΣΤΑ) του όγκου έκλουσης θα πρέπει να είναι καλύτερη του 0,3 %. Εάν ένα χρωματογράφημα αξιολογείται σε εξάρτηση από το χρόνο και δεν πληροί το ανωτέρω αναφερθέν κριτήριο (1), η απαιτούμενη για την ανάλυση επαναληψιμότητα πρέπει να διασφαλίζεται διορθώνοντας την με ένα εσωτερικό πρότυπο. Οι πολυδιασπαρσιμότητες εξαρτώνται από τα μοριακά βάρη των προτύπων. Στην περίπτωση των προτύπων πολυστυρολίου οι συνήθεις τιμές είναι:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 < M_p < 10$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10'$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p είναι το μοριακό βάρος του προτύπου στο ανώτατο σημείο της κορυφής).

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.6.1. **Παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων πολυστυρολίου**

Τα πρότυπα πολυστυρολίου διαλύονται με επισταμένη ανάμειξη στο επιλεγμένο εκλουστικό μέσον. Κατά την παρασκευή των διαλυμάτων πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι οδηγίες του κατασκευαστή

Οι συγκεντρώσεις των επιλεγόμενων προτύπων εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες, π.χ. από τον όγκο έγχυσης, το ιξώδες του διαλύματος και την ευαισθησία του αναλυτικού ανιχνευτή. Ο μέγιστος όγκος έγχυσης πρέπει να προσαρμόζεται στο μήκος της στήλης για να αποφεύγεται τυχόν υπερφόρτιση. Οι συνήθεις όγκοι έγχυσης για αναλυτικούς διαχωρισμούς με GPC και στήλη 30 cm × 7,8 mm, είναι κανονικά μεταξύ 40 και 100 ml. Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν και μεγαλύτεροι όγκοι, αυτοί όμως δεν πρέπει να υπερβαίνουν τα 250 ml. Πριν από τη διακρίβωση της στήλης πρέπει να προσδιορίζεται ποια είναι η άριστη σχέση μεταξύ του όγκου έγχυσης και της συγκεντρώσεως.

1.6.2. **Παρασκευή του διαλύματος του δείγματος**

Για την παρασκευή των διαλυμάτων του δείγματος ισχύουν κατ' αρχήν οι ίδιες απαιτήσεις. Το δείγμα διαλύεται σε κατάλληλο διαλύτη, π.χ. τετραϋδροφουράνιο (THF), με προσεκτική ανακίνηση. Σε καμία περίπτωση δεν 5α πρέπει να διαλύεται με χρήση λουτρού υπερήχων. Εφόσον απαιτείται, το διάλυμα του δείγματος καθαρίζεται μέσω φίλτρου μεμβράνης με μέγεθος πόρων μεταξύ 0,2 και 2 μm.

Εάν υπάρχουν αδιάλυτα σωματίδια, αυτό πρέπει να αναγράφεται στην τελική έκθεση γιατί αυτά μπορεί να οφείλονται σε κλάσματα υψηλού μοριακού βάρους. Για τον προσδιορισμό του κατά βάρος ποσοστού των αδιάλυτων σωματιδίων θα πρέπει να χρησιμοποιείται μία κατάλληλη μέθοδος. Τα διαλύματα θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μέσα σε 24 ώρες.

▼B

1.6.3. **Διόρθωση για να ληφθεί υπόψη η ύπαρξη προσθέτων και προσμείξεων**

Συνήθως είναι αναγκαίο να γίνεται διόρθωση της περιεκτικότητας σε κλάσματα με M < 1 000 προκειμένου να ληφθεί υπόψη η παρουσία μη πολυμερών ειδικών συστατικών (π.χ. προσμείξεις ή/και πρόσθετα), εκτός κι αν η μετρούμενη περιεκτικότητα είναι ήδη < 1 %. Αυτό γίνεται με άμεση ανάλυση του διαλύματος του πολυμερούς ή του εκλούσματος GPC.

Στις περιπτώσεις όπου το έκλουσμα, μετά τη διέλευση από τη στήλη, είναι πολύ αραιό για να μπορέσει να γίνει περαιτέρω προσδιορισμός, τότε αυτό πρέπει να συμπυκνώνεται. Μπορεί επίσης να χρειάζεται το έκλουσμα να εξατμιστεί μέχρι ξηρού και να επαναδιαλυθεί. Η συμπύκνωση του εκλούσματος πρέπει να γίνεται υπό συνθήκες που να διασφαλίζουν ότι δεν πρόκειται να υπάρξει καμία αλλαγή στο έκλουσμα. Η κατεργασία του εκλούσματος μετά το στάδιο της GPC εξαρτάται από τη μέθοδο που χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό.

1.6.4. **Συσκευές**

Η συσκευή GPC συμπεριλαμβάνει τα ακόλουθα:

— δοχείο διαλύτη

— απαεριωτής (όπου χρειάζεται)

— αντλία

— αποσβεστήρας παλμών (όπου χρειάζεται)

— σύστημα εγχύσεων

— στήλες χρωματογραφίας

— ανιχνευτής

— ροόμετρο (όπου χρειάζεται)

— καταγραφέας-επεξεργαστής δεδομένων

— δοχείο αποβλήτων.

Πρέπει να διασφαλίζεται ότι το σύστημα GPC είναι αδρανές έναντι των χρησιμοποιουμένων διαλυτών (π.χ. χρησιμοποιώντας χαλύβδινα τριχοειδή για το διαλύτη THF).

1.6.5. **Έγχυση και σύστημα παροχής διαλύτη**

Ορισμένος όγκος του διαλύματος του δείγματος φέρεται στη στήλη χρησιμοποιώντας είτε αυτόματο δειγματολήπτη είτε με τα χέρια σε μία επακριβώς καθορισμένη ζώνη. Εάν η εργασία γίνεται με τα χέρια. πρέπει να αποφεύγεται κάθε απότομο τράβηγμα ή πίεση του εμβόλου της σύριγγας γιατί κάτι τέτοιο μπορεί να προκαλέσει μεταβολές στη μετρούμενη κατανομή μοριακών βαρών. Τα σύστημα παροχής του διαλύτη θα πρέπει, όσο το δυνατόν, να μην επηρεάζεται θεωρητικά από παλμούς με τη βοήθεια ενός αποσβεστήρα παλμών. Η ταχύτητα ροής είναι της τάξης του 1 ml/min.

1.6.6. **Στήλη**

Η αναγνώριση του πολυμερούς γίνεται, ανάλογα με το δείγμα, είτε με μία απλή στήλη είτε με περισσότερες από μία στήλες συνδεδεμένες διαδοχικά. Στο εμπόριο υπάρχουν διαθέσιμα αρκετά πορώδη για στήλες υλικά με καθορισμένες ιδιότητες (π.χ. μέγεθος πόρων, όρια αποκλεισμού). Η επιλογή της πηκτής διαχωρισμού ή του μήκους της στήλης εξαρτάται τόσον από τις ιδιότητες του δείγματος (υδροδυναμικός όγκος, κατανομή μοριακών βαρών) όσο και από τις ειδικές συνθήκες για το διαχωρισμό όπως ο διαλύτης, η θερμοκρασία και η ταχύτητα ροής (I) (2) (3).

▼B

1.6.7. **Θεωρητικές πλάκες**

Η στήλη ή ο συνδυασμός των στηλών που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό πρέπει να χαρακτηρίζονται από τον αριθμό των θεωρητικών πλακών. Αυτό σημαίνει ότι στην περίπτωση όπου ως διαλύτης εκλούσεως χρησιμοποιείται THF, θα πρέπει να γίνεται φόρτιση στήλης γνωστού μήκους με διάλυμα αιθυλοβενζολίου ή άλλου κατάλληλου μη πολικού διαλελυμένου σώματος. Ο αριθμός των θεωρητικών πλακών δίδεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$N = 5{,}54\left(\frac{V_e}{W_{1/2}}\right)^2 \qquad \text{ή} \qquad N = 16\left(\frac{V_e}{W}\right)^2$$

όπου:

N = είναι ο αριθμός των θεωρητικών πλακών

V_e = είναι ο όγκος εκλούσεως στο ανώτατο σημείο της κορυφής

W = είναι το πλάτος της γραμμής βάσεως της κορυφής

$W_{1/2}$ = είναι το πλάτος της κορυφής στο ήμισυ του ύψους της.

1.6.8. **Ικανότητα διαχωρισμού**

Εκτός από τον αριθμό των θεωρητικών πλακών, που είναι ένα μέγεθος που προσδιορίζει το εύρος της ζώνης, ένα μέρος εξαρτάται και από την ικανότητα διαχωρισμού, μέγεθος που προσδιορίζεται από το βαθμό κλίσεως της καμπύλης διακριβώσεως. Η ικανότητα διαχωρισμού μίας στήλης βρίσκεται από την ακόλουθη σχέση:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{εμβαδόν εγκάρσιας διατομής στήλης}} \geq 6{,}0\left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

όπου:

V_{eM_x} = είναι ο όγκος εκλούσεως για πολυστυρόλιο με μοριακό βάρος M_χ

$V_{e(10M_x)}$ = είναι ο όγκος εκλούσεως για πολυστυρόλιο με δεκαπλάσιο μοριακό βάρος.

Η αναλυτική ικανότητα του συστήματος ορίζεται συνήθως ως εξής:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

όπου:

V_{e1}, V_{e2} = είναι οι όγκοι εκλούσεως των δύο προτύπων πολυστυρολίου στο μέγιστο της κορυφής,

W_1, W_2 = είναι τα πλάτη της κορυφής στη γραμμή βάσεως

M_1, M_2 = είναι τα μοριακά βάρη στο μέγιστο της κορυφής (που πρέπει να διαφέρουν κατά ένα συντελεστή 10)

Η τιμή R για το σύστημα στηλών θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 1,7 (4).

▼B

1.6.9. **Διαλύτες**

Όλοι οι διαλύτες πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας (για το THF απαιτείται καθαρότητα 99,5 %). Το δοχείο του διαλύτη (το οποίο, εφόσον χρειάζεται, πρέπει να είναι σε ατμόσφαιρα αδρανούς αερίου) πρέπει να είναι αρκετά μεγάλο για τη διακρίβωση της στήλης και την ανάλυση αρκετών δειγμάτων. Ο διαλύτης πρέπει να απαεριώνεται πριν μεταφερθεί στη στήλη μέσω της αντλίας

1.6.10. **Έλεγχος θερμοκρασίας**

Η θερμοκρασία των κρίσιμων εσωτερικών εξαρτημάτων (βρόχος εγχύσεως, στήλες, ανιχνευτής και σωληνώσεις) 5α πρέπει να είναι σταθερή και κατάλληλη για τον επιλεγέντα διαλύτη.

1.6.11. **Ανιχνευτής**

Σκοπός του ανιχνευτή είναι να καταγράφει ποσοτικώς τη συγκέντρωση του δείγματος που εκλούζεται από τη στήλη. Για να αποφεύγεται άσκοπη διεύρυνση των κορυφών, ο όγκος της κυψελίδας του ανιχνευτή πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μικρότερος. Η τιμή του όγκου δεν θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 10 ml εκτός από την περίπτωση ανιχνευτών διάχυσης του φωτός και ιξώδους. Για την ανίχνευση χρησιμοποιείται συνήθως διαφορική διαθλασιμετρία. Εντούτοις, εφόσον το επιβάλλουν οι συγκεκριμένες ιδιότητες του δείγματος ή του διαλύτη εκλούσεως, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι τύποι ανιχνευτών, π.χ. UV/VIS, IR, ανιχνευτές ιξώδους κ.λπ.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

2.1. Δεδομένα

Για τα λεπτομερή κριτήρια αξιολόγησης καθώς επίσης και τις απαιτήσεις που σχετίζονται με τη συλλογή και επεξεργασία των δεδομένων, θα πρέπει να γίνεται αναφορά στο πρότυπο DIN (1).

Για κάθε δείγμα πρέπει να πραγματοποιούνται δύο ανεξάρτητα πειράματα και να γίνονται επιμέρους αναλύσεις. Σε όλες τις περιπτώσεις, παίζει σημαντικό ρόλο το να λαμβάνονται επίσης μετρήσεις και από τυφλά τα οποία έχουν υποβληθεί σε κατεργασία από τις ίδιες συνθήκες με εκείνες του δείγματος.

Είναι αναγκαίο να αναφέρεται ρητώς, ότι οι μετρούμενες τιμές είναι σχετικές τιμές ισοδύναμες με *τα* μοριακά βάρη του χρησιμοποιούμενου προτύπου.

Μετά τον προσδιορισμό των όγκων κατακράτησης ή των χρόνων κατακράτησης (διορθωμένων πιθανόν με βάση ένα εσωτερικό πρότυπο), κατασκευάζεται γραφική παράσταση των τιμών log M (M είναι τα ανώτατα σημεία των κορυφών των προτύπων διακριβώσεως) συναρτήσει μίας από τις ποσότητες αυτές. Για κάθε δεκάδα μοριακών βαρών απαιτούνται τουλάχιστον δύο σημεία διακρίβωσης ενώ, για τη συνολική καμπύλη, απαιτούνται τουλάχιστον πέντε σημεία μετρήσεως, σημεία που θα πρέπει να καλύπτουν το εκτιμώμενο μοριακό βάρος του δείγματος. Το προς τα χαμηλά μοριακά βάρη ακραίο σημείο της καμπύλης διακριβώσεως ορίζεται από η-εξυλοβενζόλιο ή άλλη κατάλληλη μη πολική διαλυμένη ουσία. Προσδιορίζεται το τμήμα της καμπύλης που αντιστοιχεί σε μοριακά βάρη κάτω του 1 000 και διορθώνεται κατάλληλα ώστε να ληφθούν υπόψη τα πρόσθετα και οι προσμείξεις. Οι καμπύλες εκλούσεως αξιολογούνται εν γένει με επεξεργασία ηλεκτρονικών δεδομένων. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται διά χειρός ψηφιοποίηση, μπορεί κανείς να κάνει χρήση του ASTM D 3536-91 (3).

▼B

Αν στη στήλη κατακρατηοεί τυχόν αδιάλυτο πολυμερές, το μοριακό του βάρος είναι πιθανό να είναι υψηλότερο από εκείνο του διαλυτού κλάσματος και εάν δεν ληφθεί υπόψη αυτό μπορεί να οδηγήσει σε υπερεκτίμηση της περιεκτικότητας σε κλάσματα χαμηλού μοριακού βάρους. Οδηγίες για τη διόρθωση της περιεκτικότητας σε κλάσματα χαμηλού μοριακού βάρους προκειμένου να ληφθεί υπόψη τυχόν αδιάλυτο πολυμερές δίδονται στο παράρτημα.

Η καμπύλη κατανομής πρέπει να παρέχεται με τη μορφή πίνακα ή εικόνας (διαφορική συχνότητα ή αθροιστικά ποσοστά συναρτήσει του log M). Στη γραφική παράσταση, μία δεκάδα μοριακών βαρών θα πρέπει κανονικά να αντιστοιχεί σε πλάτος περίπου 4 cm ενώ το μέγιστο της κορυφής θα πρέπει να είναι σε ύψος περίπου 8 cm. Στην περίπτωση ολοκληρωμένων καμπυλών κατανομής η διαφορά στην τεταγμένη μεταξύ 0 και 100 % θα πρέπει να είναι περίπου 10 cm.

2.2. Έκθεση δοκιμής

Στην έκθεση δοκιμή; πρέπει να περιλαμβάνονται οι ακόλουθες πληροφορίες:

2.2.1. **Υπό δοκιμή ουσία**

— υπάρχουν στοιχεία για την υπό δοκιμή ουσία (ταυτότητα, πρόσθετα, προσμείξεις)

— περιγραφή της κατεργασίας του δείγματος, παρατηρήσεις, προβλήματα.

2.2.2. **Εξοπλισμός**

— περιέκτης εκλουστικού μέσου, αδρανές αέριο, απαερίωση του εκλουστικού μέσου, σύσταση του εκλουστικού μέσου, προσμείξεις,

— αντλία, αποσβεστήρας παλμών, σύστημα εγχύσεως,

— στήλες διαχωρισμού (κατασκευαστής, όλα τα σχετικά με τα χαρακτηριστικά των στηλών όπως μέγεθος πόρων, είδος υλικού διαχωρισμού κ.λπ., αριθμός, μήκος και σειρά των χρησιμοποιηθεισών στηλών),

— αριθμός των θεωρητικών πλακών της στήλης (ή συνδυασμού), ικανότητα διαχωρισμού (αναλυτική ικανότητα του συστήματος),

— πληροφορίες για τη συμμετρία των κορυφών,

— θερμοκρασία στηλών, τρόπος ελέγχου της θερμοκρασίας,

— ανιχνευτής (αρχή μετρήσεως, τύπος, όγκος κυψελίδας),

— ροόμετρο, εφόσον χρησιμοποιείται (κατασκευαστής, αρχή μετρήσεως),

— σύστημα καταγραφής και επεξεργασίας δεδομένων (υλικό και λογισμικό).

2.2.3. **Διακρίβωση του συστήματος**

— λεπτομερής περιγραφή της μεθόδου που χρησιμοποιείται για τη χάραξη της καμπύλης διακρίβωσης,

▼B

— πληροφορίες για τα κριτήρια ποιότητας της μεθόδου (π.χ. συντελεστής συσχέτισης, άθροισμα σφαλμάτων τετραγώνων κ.λπ.),

— στοιχεία σχετικά με κάθε περίπτωση παρέκτασης, υποθέσεων και προσεγγίσεων που έγιναν κατά την πειραματική διαδικασία και την αξιολόγηση και επεξεργασία δεδομένων,

— κάθε μέτρηση που χρησιμοποιείται για τη χάραξη της καμπύλης διακριβώσεως πρέπει να τεκμηριώνεται σε ένα πίνακα που να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία για κάθε σημείο διακρίβωσης:

  — ονομασία του δείγματος,

  — παρασκευαστής του δείγματος,

  — χαρακτηριστικές τιμές των προτύπων M, M, M, M/M_{η}, όπως δίδονται από τον κατασκευαστή ή λαμβάνονται από διαδοχικές μετρήσεις, μαζί με λεπτομέρειες για τη μέθοδο προσδιορισμού,

  — όγκος εγχύσεως και συγκέντρωση εγχύσεως,

  — τιμή M_p που χρησιμοποιείται για τη διακρίβωση,

  — όγκος εκλούσεως ή διορθωμένος χρόνος κατακράτησης που μετράται στα ανώτατα σημεία των κορυφών,

  — M_p που υπολογίζεται στο ανώτατο σημείο της κορυφής

  — ποσοστιαίο σφάλμα της υπολογιζόμενης τιμής M_p και της τιμής διακρίβωσης.

2.2.4. **Πληροφορίες για την περιεκτικότητα σε χαμηλού μοριακού βάρους πολυμερές**

— περιγραφή των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση και του τρόπου με τον οποίο διεξήχθησαν τα πειράματα,

— πληροφορίες σχετικά με το ποσοστό των χαμηλού βάρους κλασμάτων (w/w) σε σχέση με το συνολικό δείγμα,

— πληροφορίες για τυχόν προσμείξεις, πρόσθετα και άλλες μη πολυμερείς ουσίες ως ποσοστό κατά βάρος του συνολικού δείγματος.

2.2.5. **Αξιολόγηση**

— αξιολόγηση με βάση το χρόνο: μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για να διασφαλιστεί η απαιτούμενη αναπαραγωγιμότητα (μέθοδος διόρθωσης, εσωτερικό πρότυπο κ.λπ.),

— πληροφορίες για το εάν η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε με βάση τον όγκο εκλούσεως ή το χρόνο κατακράτησης,

— πληροφορίες σχετικά με τα όρια της αξιολόγησης εάν μία κορυφή δεν αναλύεται πλήρως,

— περιγραφή μεθόδων αμβλύνσεως. εάν χρησιμοποιήθηκαν,

— διαδικασία παρασκευή; και προκατεργασίας του δείγματος,

— η παρουσία αδιάλυτων σωματιδίων, εάν υπήρχαν,

▼B

— όγκος εγχύσεως (ml) και συγκέντρωση εγχύσεως (mg/ml),

— παρατηρήσεις που δείχνουν επιδράσεις που οδηγούν σε αποκλίσεις από το θεωρητικό προφίλ GPC,

— λεπτομερή περιγραφή κάθε τροποποίησης των διαδικασιών δοκιμής,

— λεπτομέρειες για τις περιοχές σφαλμάτων,

— κάθε άλλη πληροφορία και παρατήρηση σχετικά με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

(1) DIN 55672 (1995). Geidpermeationschromaiographie (GPC) luit Tetfahydrofuran (THF) als Elu-tionsmittel, Teil 1

(2) Yau. W.W, Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds, (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography. J.Wiley and Sons.

(3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystvrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia. Pennsylvania.

▼B

Προσάρτημα

Οδηγίες για τη διόρθωση της περιεκτικότητας σε κλάσματα χαμηλού μοριακού βάρους λόγω της παρουσίας αδιάλυτου πολυμερούς

Όταν σε ένα δείγμα υπάρχει αδιάλυτο πολυμερές, το γεγονός αυτό απολήγει σε απώλεια μάζας κατά τη διάρκεια της ανάλυσης GPC. Το αδιάλυτο πολυμερές κατακρατείται ανεπίστρεπτα στη στήλη ή στο φίλτρο του δείγματος ενώ το διαλυτό τμήμα του δείγματος διέρχεται διαμέσου της στήλης. Στην περίπτωση όπου μπορεί να εκτιμηθεί ή να μετρηθεί η διαφορική αύξηση (dn/dc) του δείκτη διαθλάσεως του πολυμερούς, μπορούμε να εκτιμήσουμε την απωλεσθείσα μάζα μείγματος τη στήλη. Στην περίπτωση αυτή, προβαίνουμε σε διόρθωση χρησιμοποιώντας μία εξωτερική διακρίβωση με πρότυπα υλικά γνωστής συγκεντρώσεως και dn/dc για τη διακρίβωση της απόκρισης του διαθλασιμέτρου. Στο παράδειγμα που ακολουθεί, χρησιμοποιείται πρότυπο πολύ (μεθακρυλικού μεθυλεστέρα) (ρMMA).

Στην εξωτερική διακρίβωση για την ανάλυση ακρυλικών πολυμερών, αναλύεται με GPC ένα πρότυπο ρPMMA γνωστής συγκεντρώσεως σε τετραϋδραφουράνιο και τα προκύπτοντα δεδομένα χρησιμοποιούνται για την εύρεση της σταθεράς του διαθλασιμέτρου σύμφωνα με την εξίσωση:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

όπου

K = είναι η σταθερά διαθλασιμέτρου (σε microvolt.seconde/ml)

R = είναι η απόκριση του προτύπου pMMA (σε microvolt.second)

C = είναι η συγκέντρωση του προτύπου pMMA (σε mg/ml)

V = είναι ο όγκος εγχύσεως (σε ml)

dn/dc = είναι η διαφορική αύξηση του δείκτη διαθλάσεως για το pMMA σε τετραϋδροφουράνιο (σε ml/mg).

Τα δεδομένα που ακολουθούν αποτελούν συνήθη δεδομένα για ένα πρότυπο pMMA

R = 2 937 891

C = 1,07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg.

Η προκύπτουσα για το K τιμή ($3{,}05 \times 10^{11}$) χρησιμοποιείται κατόπιν για τον υπολογισμό της θεωρητικής απόκρισης του ανιχνευτή εφόσον μέσω του ανιχνευτή έχουν εκλουστεί το 100 % του εγχυθέντος πολυμερούς.

▼B

A.20. **ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΔΙΑΛΥΣΕΩΣ/ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΣΕ ΝΕΡΟ**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

Η περιγραφόμενη μέθοδος αποτελεί αντιγραφή της αναθεωρημένης έκδοσης του OECD TG 120 (1997). Περισσότερες τεχνικές πληροφορίες δίδονται στην παραπομπή (1).

1.1. Εισαγωγή

Για ορισμένα πολυμερή, όπως τα πολυμερή γαλακτώματος, πριν να χρησιμοποιηθεί η παρακάτω περιγραφόμενη μέθοδος μπορεί να χρειάζεται κάποια αρχική προκαταρκτική εργασία. Η μέθοδος δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε υγρά πολυμερή και σε πολυμερή που αντιδρούν με το νερό υπό τις συνθήκες της δοκιμής.

Όταν η μέθοδος δεν είναι δυνατή ή πρακτικά εφαρμόσιμη, η συμπεριφορά διαλύσεως/εκχύλισης μπορεί να μελετηθεί με άλλες μεθόδους. Στις περιπτώσεις αυτές, θα πρέπει να δίδονται πλήρεις λεπτομέρειες και αιτιολόγηση της χρησιμοποιούμενης μεθόδου.

1.2. Ουσίες αναφοράς

Καμία.

1.3. Αρχή της μεθόδου δοκιμής

Η συμπεριφορά διαλύσεως/εκχύλισης των πολυμερών σε υδατικό μέσον προσδιορίζεται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της σφαιρικής φιάλης (βλέπε Α.6. Υδατοδιαλυτότητα — μέθοδος σφαιρικής φιάλης) με τις τροποποιήσεις που περιγράφονται παρακάτω.

1.4. Κριτήρια ποιότητας

Κανένα.

1.5. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμής

1.5.1. **Εξοπλισμός**

Για τη μέθοδο απαιτείται ο ακόλουθος εξοπλισμός:

— συσκευή κονιορτοποίησης π.χ. αλεστικό μηχάνημα για την παραγωγή σωματιδίων γνωστού μεγέθους,

— συσκευή ανακίνησης με δυνατότητα ελέγχου της θερμοκρασίας,

— σύστημα με φίλτρο μεμβράνης,

— κατάλληλος αναλυτικός εξοπλισμός,

— τυποποιημένα κόσκινα.

1.5.2. **Παρασκευή δείγματος**

Κατ' αρχήν πρέπει να λαμβάνεται ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα με μέγεθος σωματιδίων μεταξύ 0,125 και 0,25 mm χρησιμοποιώντας κατάλληλα κόσκινα. Για τη σταθερότητα του δείγματος ή για τη διαδικασία αλέσεως μπορεί να απαιτείται ψύξη. Υλικά ελαστικής φύσεως μπορούν να αλέθονται σε θερμοκρασία υγρού αζώτου (Γ).

Εάν δεν μπορεί να ληφθεί το απαιτούμενο σε μέγεθος σωματιδίων κλάσμα, θα πρέπει να γίνεται όσο το δυνατόν μεγαλύτερη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων και να αναφέρεται στην έκθεση το αποτέλεσμα. Στην έκθεση πρέπει να αναφέρεται και ο τρόπος με τον οποίο το αλεσθέν δείγμα αποθηκεύτηκε πριν από τη δοκιμή.

▼B

1.5.3. **Διαδικασία**

Σε τρεις φιάλες με γυάλινα πώματα ζυγίζεται σε κάθε μία από ένα δείγμα των 10 g της υπό δοκιμή ουσίας και σε κάθε φιάλη προστίθενται 1 000 ml νερό. Εάν ο χειρισμός μίας τέτοιας ποσότητας 10 g πολυμερούς είναι πρακτικώς αδύνατος, θα πρέπει να χρησιμοποιείται η αμέσως επόμενη δυνατή μεγαλύτερη ποσότητα και να προσαρμόζεται ανάλογα ο όγκος του νερού.

Οι Φιάλες πωματίζονται ερμητικά και στη συνέχεια ανακινούνται στους 20 °C. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται συσκευή ανακίνησης ή ανάδευσης που να μπορεί να λειτουργεί σε σταθερή θερμοκρασία. Μετά από 24 ώρες, το περιεχόμενο κάθε φιάλης φυγοκεντρείται ή διηθείται και προσδιορίζεται η συγκέντρωση του πολυμερούς στη διαυγή υδατική Φάση με μία κατάλληλη αναλυτική μέθοδο. Εάν δεν υπάρχουν κατάλληλες αναλυτικές μέθοδοι για την υδατική φάση, η συνολική διαλυτότητα/εκχυλισιμότητα μπορεί να εκτιμηθεί από το ξηρό βάρος του υπολείμματος του φίλτρου ή του φυγοκεντρημένου ιζήματος.

Συνήθως, είναι αναγκαίο να γίνεται ξεχωριστός ποσοτικός προσδιορισμός των προσμείξεων και προσθέτων αφενός και του χαμηλού μοριακού βάρους πολυμερούς αφετέρου. Στην περίπτωση σταθμικού προσδιορισμού, σημαντικό ρόλο παίζει επίσης να εκτελείται και ένα λευκό πείραμα χωρίς υπό δοκιμή ουσία για να υπολογίζονται τα υπολείμματα που προέρχονται από την πειραματική διαδικασία.

Η συμπεριφορά διαλύσεως/εκχύλισης των πολυμερών στο νερό στους 37 °C σε pH2 και pH9 μπορεί να προσδιοριστεί όπως περιγράφτηκε για την διεξαγωγή του πειράματος στους 20 °C. Οι τιμές του pH μπορούν να επιτευχθούν με την προσθήκη είτε κατάλληλων ρυθμιστικών διαλυμάτων είτε με κατάλληλα οξέα ή βάσεις όπως το υδροχλωρικό οξύ, το οξικό οξύ, υδροξείδιο του νατρίου ή καλίου αναλυτικής καθαρότητας ή με NH_3.

Ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο αναλύσεως, θα πρέπει να εκτελούνται μία ή δυο δοκιμές. Όταν για το πολυμερές υπάρχουν διαθέσιμες επαρκώς εξειδικευμένες μέθοδοι για την άμεση ανάλυση της υδατικής φάσης, αρκεί συνήθως μία δοκιμή όπως περιγράφεται παραπάνω. Εντούτοις, όταν δεν υπάρχουν διαθέσιμες τέτοιες μέθοδοι και ο προσδιορισμός της συμπεριφοράς διαλύσεως/'εκχυλίσεως του πολυμερούς περιορίζεται σε έμμεση ανάλυση με προσδιορισμό μόνον της συνολικής περιεκτικότητας του υδατικού εκχυλίσματος σε οργανικό άνθρακα (TOC), θα πρέπει να διεξάγεται και μία πρόσθετη δοκιμή. Η πρόσθετη αυτή δοκιμή θα πρέπει επίσης να γίνεται εις τριπλούν, χρησιμοποιώντας υποδεκαπλάσιου μεγέθους δείγμα πολυμερούς και τις ίδιες ποσότητες νερού με εκείνες που χρησιμοποιούνται στην πρώτη δοκιμή.

1.5.4. **Ανάλυση**

1.5.4.1. *Δοκιμή εκτελούμενη με δείγμα ενός μεγέθους*

Για την άμεση ανάλυση του πολυμερούς στην υδατική φάση ενδέχεται να υπάρχουν κάποιες διαθέσιμοι μέθοδοι. Εναλλακτικά, μπορεί να εξεταστεί επίσης και η εφαρμογή έμμεσης ανάλυσης του διαλελυμένου/εκχυλισμένου πολυμερούς, με τον προσδιορισμό της συνολικής περιεκτικότητας σε διαλυτά μέρη και διόρθωση της τιμής ώστε να ληφθούν υπόψη τα μη πολυμερή συστατικά.

Ανάλυση της υδατικής φάσης για την ανεύρεση της συνολικής περιεκτικότητας σε πολυμερή μπορεί να γίνει:

είτε με μία επαρκώς ευαίσθητη μέθοδο, π.χ.:

— προσδιορισμό του TOC με διάσπαση με υπερθειικά ή διχρωμικά για *τη* λήψη CO, και εύρεση στη συνέχεια της περιεκτικότητας με IR ή με χημική ανάλυση,

▼B

— φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης (AAS) ή την ισοδύναμη της ICP (Inductively Coupled Piasma) για πολυμερή που περιέχουν πυρίτιο ή μέταλλα,

— απορρόφηση στο υπεριώδες ή φασματοφθορισμομετρία για ακρυλικά πολυμερή,

— LC-MS για δείγματα χαμηλού μοριακού βάρους,

είτε με εξάτμιση υπό κενό μέχρι ξηράνσεως του υδατικού εκχυλίσματος και φασματοσκοπική (IR, UV κ.λπ.) ή AAS/ICP ανάλυση του υπολείμματος.

Εάν δεν είναι πρακτικώς δυνατή η ανάλυση της υδατικής φάσης με τον τρόπο αυτό. το υδατικό εκχύλισμα θα πρέπει να εκχυλίζεται με ένα μη αναμείξιμο με το νερό οργανικό διαλύτη π.χ. με κάποιο χλωριωμένο υδρογονάνθρακα. Ο διαλύτης κατόπιν εξατμίζεται και το υπόλειμμα αναλύεται ως ανωτέρω για την εύρεση της περιεκτικότητας του πολυμερούς. Τυχόν συστατικά του υπολείμματος αυτού που ταυτοποιούνται ως προσμείξεις ή πρόσθετα πρέπει να αφαιρούνται προκειμένου να προσδιοριστεί ο βαθμός διαλύσεως- εκχυλίσεως του ίδιου του πολυμερούς.

Όταν υπάρχουν παρούσες σχετικά μεγάλες ποσότητες τέτοιων υλικών, μπορεί να είναι αναγκαίο το υπόλειμμα να υποβληθεί σε ανάλυση π.χ. με HPLC ή GC για τη διαφοροποίηση των προσμείξεων από το μονομερές και τις εκ του μονομερούς περιεχόμενες ουσίες έτσι ώστε να μπορεί να προσδιοριστεί η πραγματική συγκέντρωση του τελευταίου.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να αρκεί απλή εξάτμιση του οργανικού διαλύτη μέχρι ξηρού και ζύγιση του ξηρού υπολείμματος.

1.5.4.2. *Δοκιμή εκτελούμενη με δύο διαφορετικά μεγέθη δειγμάτων*

Όλα τα υδατικά εκχυλίσματα αναλύονται για TOC.

Εκτελείται σταθμικός προσδιορισμός στο αδιάλυτο/μη εκχυλισθέν μέρος του δείγματος. Εάν, μετά τη φυγοκέντρηση ή τη διήθηση του περιεχομένου κάθε Φιάλης, στο τοίχωμα της φιάλης παραμένουν προσκολλημένα υπολείμματα πολυμερούς, η φιάλη θα πρέπει να εκπλύνεται με το διήθημα μέχρις ότου στη φιάλη να μη φαίνεται ίχνος υπολείμματος. Ακολούθως, το διήθημα επαναφυγοκεντρείται ή επαναδιηθείται. Τα υπολείμματα που παραμένουν στο φίλτρο ή στο σωλήνα φυγοκεντρήσεως ξηραίνονται στους 40 °C υπό κενό και ζυγίζονται. Η ξήρανση συνεχίζεται μέχρις επιτεύξεως σταθερού βάρους.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1. Δοκιμή εκτελούμενη με δείγμα ενός μεγέθους

Θα πρέπει να δίδονται τα επιμέρους αποτελέσματα για κάθε μία από τις τρεις φιάλες και οι μέσες τιμές εκφρασμένες σε μονάδες μάζας κατ' όγκο του διαλύματος (συνήθως mg/1) ή σε μονάδες μάζας κατά μάζα του δείγματος του πολυμερούς (συνήθως mg/g). Επιπλέον, θα πρέπει να δίδεται και η απώλεια βάρους του δείγματος (υπολογιζόμενη ως βάρος του διαλελυμένου σώματος διηρημένο διά του βάρους του αρχικού δείγματος), ενώ θα πρέπει να υπολογίζονται και οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις (ΣΤΑ). Επίσης θα πρέπει να δίδονται επιμέρους στοιχεία αφενός για το σύνολο της ουσίας (πολυμερές + βασικά πρόσθετα κ.λπ.) και αφετέρου αποκλειστικά και μόνο για το πολυμερές (δηλαδή έπειτα από αφαίρεση της συνεισφοράς των προσθέτων αυτών).

▼B

2.2. Δοκιμή εκτελούμενη με δύο διαφορετικά μεγέθη δειγμάτων

Θα πρέπει να δίδονται οι επιμέρους τιμές TOC των υδατικών εκχυλισμάτων των δύο τριπλών πειραμάτων και η μέση τιμή για κάθε πείραμα, εκφρασμένες σε μονάδες μάζας κατ' όγκο του διαλύματος (συνήθως mgC/1), καθώς επίσης και σε μονάδες μάζας ανά μονάδα βάρους του αρχικού δείγματος (συνήθως mgC/1).

Εάν, μεταξύ των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται υπό την υψηλή και χαμηλή αναλογία δείγματος/νερού δεν υπάρχει καμία διαφορά, αυτό μπορεί να σημαίνει ότι εκχυλίστηκαν πράγματι όλα τα εκχυλίσιμα συστατικά. Σε μία τέτοια περίπτωση, δεν χρειάζεται κανονικά να πραγματοποιηθεί άμεση ανάλυση.

Θα πρέπει να δίδονται τα επιμέρους βάρη των υπολειμμάτων εκφρασμένα ως εκατοστιαίο ποσοστό των αρχικών βαρών των δειγμάτων, ενώ ανά πείραμα θα πρέπει να υπολογίζεται η μέση τιμή. Οι διαφορές που βρίσκονται μεταξύ 100 και των εκατοστιαίων ποσοστών αντιπροσωπεύουν τα ευρεθέντα ποσοστά διαλυτού και εκχυλίσιμου υλικού στο αρχικό δείγμα.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΤΗΣ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. Έκθεση δοκιμής

Στην έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνονται οι ακόλουθες πληροφορίες:

3.1.1. **Υπό δοκιμή ουσία**

— υπάρχουσες πληροφορίες για την υπό δοκιμή ουσία (ταυτότητα, πρόσθετα, προσμείξεις, περιεκτικότητα σε πολυμερές χαμηλού μοριακού βάρους).

3.1.2. **Πειραματικές συνθήκες**

— περιγραφή των χρησιμοποιηθεισών διαδικασιών και των πειραματικών συνθηκών

— περιγραφή των μεθόδων αναλύσεως και ανιχνεύσεως.

3.1.3. **Αποτελέσματα**

— Αποτελέσματα διαλυτότητας εκχυλισιμότητας σε mg/1· επιμέρους και μέσες τιμές για δοκιμές εκχυλίσεως στα διάφορη διαλύματα, ξεχωριστά για την περιεκτικότητα σε πολυμερές και προσμείξεις. πρόσθετα κ.λπ.

— Αποτελέσματα διαλυτότητας εκχυλισιμότητας σε mg/g πολυμερούς

— Τιμές TOC των υδατικών εκχυλισμάτων, βάρος του διαλελυμένου σώματος και υπολογιζόμενα ποσοστά, εφόσον μετρήθηκαν

— Το pH κάθε δείγματος

— Πληροφορίες για τις τιμές των λευκών δειγμάτων

— Όπου απαιτείται, αναφορές στη χημική σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας, τόσο κατά τη διάρκεια της διαδικασίας δοκιμής όσο και κατά τη διάρκεια της αναλυτικής διαδικασίας

— Κάθε πληροφορία που έχει σημασία για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

(1) DIN 53733 (1976) Zerkleinerung von Kunststofferzeugnissen für Prüfzwecke.

▼B

A.21. **ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ (ΥΓΡΑ)**

I. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μέθοδο¦ δοκιμής σχεδιάστηκε για τη μέτρηση της εν δυνάμει ικανότητας μίας υγρής ουσίας *να αυξήσει* την ταχύτητα καύσης ή την ένταση καύσης μιας καύσιμης ουσίας ή να σχηματίσει μείγμα με μια καύσιμη ουσία το οποίο να αναφλέγεται αυθόρμητα. Όταν οι δύο ουσίες αναμειχθούν επισταμένως. Βασίζεται στη δοκιμή των ΗΕ για τα οξειδωτικά υγρά (1) και είναι ισοδύναμη με αυτή. Ωστόσο, δεδομένου ότι η παρούσα μέθοδος Α-21 έχει σχεδιαστεί πρωταρχικώς για την εκπλήρωση των απαιτήσεων της οδηγίας 67/548/ΕΟΚ, απαιτείται σύγκριση με μία μόνον ουσία αναφοράς. Μπορεί να είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθεί δοκιμή και σύγκριση και με άλλες ουσίες αναφοράς, όταν τα αποτελέσματα της δοκιμής προβλέπεται να χρησιμοποιηθούν και για άλλους σκοπούς. ([1])

Η παρούσα δοκιμή δεν εφαρμόζεται σε στερεά, αέρια, εκρηκτικές ή λίαν εύφλεκτες ουσίες ή οργανικά υπεροξείδια.

Χρήσιμα είναι, πριν από την εκτέλεση της παρούσας δοκιμής, να έχουμε προκαταρκτικές πληροφορίες για τυχόν εν δυνάμει εκρηκτικές ιδιότητες της ουσίας.

Η παρούσα δοκιμή δεν εφαρμόζεται σε στερεά, αέρια, εκρηκτικές ή λίαν εύφλεκτες ουσίες ή οργανικά υπεροξείδια.

Η παρούσα δοκιμή δεν χρειάζεται να εκτελείται όταν υπάρχουν ήδη διαθέσιμα αποτελέσματα για την υπό δοκιμή ουσία από τη δοκιμή των ΗΕ για τα οξειδωτικά υγρά (1).

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Μέσος χρόνος αύξησης της πιέσεως είναι ο μέσος ορός των μετρούμενων χρόνων σε ένα υπό δοκιμή μείγμα για την αύξηση της πίεσης από 690 kPa σε 2 070 kPa πάνω από την ατμοσφαιρική πίεση.

1.3. ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Ως ουσία αναφοράς χρησιμοποιείται υδατικό διάλυμα 65 % w/w) νιτρικού οξέος (αναλυτικής καθαρότητας). ([2])

([1]) Όπως, για παράδειγμα, στα πλαίσια των κανονισμών του ΟΗΕ για τις μεταφορές.

([2]) Το οξύ θα πρέπει να τιτλοδοτείται πριν από τη δοκιμή για να επιβεβαιώνεται η συγκέντρωσή του.

▼B

Προαιρετικώς, εάν ο εκτελών το πείραμα προβλέπει ότι τα αποτελέσματα της παρούσας δοκιμής μπορεί ενδεχομένως να χρησιμοποιηθούν και για άλλους σκοπούς, ([1]) μπορεί να είναι σκόπιμη η δοκιμασία και έναντι άλλων ουσιών αναφοράς. ([2])

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Το προς δοκιμή υγρό μειγνύεται σε αναλογία 1 προς 1 κατά βάρος, με ίνες κυτταρίνης και εισάγεται σε δοχείο πιέσεως. Εάν κατά τη διάρκεια *της* μείξεως ή της πλήρωσης επέλθει αυθόρμητη ανάφλεξη, δεν χρειάζεται περαιτέρω δοκιμασία.

Εάν δεν επέλθει αυθόρμητη ανάφλεξη, τότε εκτελείται η πλήρης δοκιμή. Το μείγμα θερμαίνεται σε δοχείο πιέσεως και προσδιορίζεται ο μέσος χρόνος που απαιτείται για να αυξηθεί η πίεση από 690 kPa σε 2 070 kPa πάνω από την ατμοσφαιρική. Η τιμή συγκρίνεται με το μέσο χρόνο αύξησης της πίεσης για μείγμα 1:1 της ή των ουσιών αναφοράς και κυτταρίνης.

1.5. ΚΡΙΤΉΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Σε μια σειρά πέντε δοκιμών για μια ουσία, κανένα αποτέλεσμα δεν θα πρέπει να διαφέρει περισσότερο από 30 % από τον αριθμητικό μέσο. Αποτελέσματα που διαφέρουν περισσότερο του 30 % από τον μέσον όρο θα πρέπει να απορρίπτονται, η διαδικασία μείξεως και πληρώσεως να βελτιώνεται και η δοκιμασία να επαναλαμβάνεται.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.6.1. **Παρασκευή**

1.6.1.1. *Καύσιμη ουσία*

Ως καύσιμο υλικό χρησιμοποιείται ξηρά, ινώδης κυτταρίνη με μήκος ινών μεταξύ 50 και 250 μm και μέση διάμετρο 25 μm. ([3]) Ξηραίνεται μέχρι σταθερού βάρους σε στιβάδα πάχους το πολύ 25 mm στους 105 °C για 4 ώρες και φυλάσσεται σε ξηραντήρα, με ξηραντικό, μέχρι να κρυώσει και να χρησιμοποιηθεί. Η περιεκτικότητα σε υγρασία της αποξηραμένης κυτταρίνης θα πρέπει να είναι κάτω του 0,5 % επί ξηράς μάζας ([4]). Εάν είναι ανάγκη, ο χρόνος ξήρανσης θα πρέπει να παρατείνεται μέχρι να επιτευχθεί το εν λόγω ποσοστό ([5]). Καθ' όλη τη δοκιμή πρέπει να χρησιμοποιείται η ίδια παρτίδα κυτταρίνης.

([1]) Όπως, για παράδειγμα, στα πλαίσια των κανονισμών του ΟΗΕ για τις μεταφορές.
([2]) Π.χ.: στην παραπομπή χρησιμοποιείται 50% (w/w) υπερχλωρικό οξύ και 40 % (w/w) χλωρικό νάτριο.
([3]) Π.χ. σκόνη κυτταρίνης CF 11 για στήλη χρωματογραφίας Whatman, κατάλογος αριθ. 4021 050.
([4]) Επιβεβαιούμενη με π.χ. τιτλοδότηση Karl-Fisher.
([5]) Εναλλακτικώς, το εν λόγω ποσοστό υγρασίας μπορεί επίσης να επιτευχθεί με π.χ. θέρμανση στους 105 °C υπό κενό για 24 ώρες.

▼B

1.6.1.2. *Εξοπλισμός*

1.6.1.2.1. Δοχείο πιέσεως

Απαιτείται δοχείο πιέσεως. Το δοχείο είναι χαλύβδινο κυλινδρικό δοχείο πιέσεως με μήκος 89 mm και εξωτερική διάμετρο 60 mm (βλέπε εικόνα 1). Εξ απεναντίας στο δοχείο υπάρχουν χαραγμένες δύο έδρες (με αποτέλεσμα τη μείωση της διατομής του δοχείου στα 50 mm) για να διευκολύνεται το πιάσιμο κατά την προσαρμογή του βύσματος πυροδότησης και του βύσματος της οπής εξαέρωσης. Το δοχείο, το οποίο φέρει οπή διαμέτρου 20 mm είναι αμβλυμμένο εσωτερικώς σε κάθε άκρο μέχρι βάθους 19 mm και σπειροτομημένο ώστε να δέχεται σωλήνα 1 (British Standard Pipe — BSP) ή αναλόγου κατά το μετρικό σύστημα διαμετρήματος. Στην καμπύλη επιφάνεια του δοχείου πιέσεως σε απόσταση 35 mm από το ένα άκρο και υπό γωνία 90 ^{o} σε σχέση με τις χαραγμένες έδρες βιδώνεται ένας απαγωγός πιέσεως ο οποίος έχει τη μορφή πλευρικού βραχίονα. Η εσοχή για την υποδοχή του έχει βάθος 12 mm και είναι σπειροτομημένη ώστε να δέχεται το σπείρωμα διαμετρήματος ½ ίντσας BSP (ή ισοδυνάμου διαμετρήματος στο μετρικό σύστημα) του άκρου του πλευρικού βραχίονα. Εάν είναι αναγκαίο προσαρμόζεται ένα αδρανές στεγανωτικό για διασφάλιση της αεροστεγανότητας. Ο πλευρικός βραχίονας εκτείνεται σε απόσταση 55 mm από το σώμα του δοχείου και φέρει οπή 6 mm. Το άκρο του πλευρικού βραχίονα είναι αμβλυμένο και σπειροτομημένο ώστε να δέχεται μορφοτροπέα πιέσεως τύπου διαφράγματος. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε διάταξη μέτρησης της πιέσεως, υπό την προϋπόθεση ότι δεν επηρεάζεται από τα θερμά αέρια ή από τα προϊόντα αποσύνθεσης και μπορεί να ανταποκριθεί σε ταχύτητες αύξησης της πίεσης 690-2 070 kPa μέσα σε 5 ms.

Το απώτερο από τον πλευρικό βραχίονα άκρο του δοχείου πιέσεως κλείνει με ένα βύσμα πυροδότησης εφοδιασμένο με δύο ηλεκτρόδια, το ένα μονωμένο και το άλλο γειωμένο στο σώμα του βύσματος. Το άλλο άκρο του δοχείου πιέσεως σφραγίζεται με ένα διαρρηγνυόμενο δίσκο (πίεση διαρρήξεως περίπου 2 200 kPa), ο οποίος κρατιέται στη θέση του με ένα βύσμα συγκράτησης που φέρει οπή 20 mm. Εάν είναι αναγκαίο για το βύσμα πυροδότησης χρησιμοποιείται και ένα αδρανές στεγανωτικό για να διασφαλίζεται το αεροστεγές του δοχείου. Κατά τη διάρκεια της χρήσης το όλο σύστημα κρατιέται στη σωστή θέση με έναν υποστάτη (εικόνα 2). Αυτός συνήθως αποτελείται από μια πλάκα από μαλακό χάλυβα διαστάσεων 235 × 184 × 6 mm, που χρησιμεύει ως βάση και από ένα ευθύγραμμο στέλεχος μήκους 185 mm τετραγωνικής κοίλης διατομής (S.H.S.) 70 × 70 × 4 mm.

Στο ένα άκρο του ευθύγραμμου στελέχους S.H.S. από κάθε μία από τις δύο εξ απεναντίας πλευρές, είναι αποκομμένο ένα τμήμα έτσι ώστε να δημιουργείται μια κατασκευή με δύο επίπεδα πλευρικώς σκέλη, πάνω από τα οποία υπάρχει ένα άθικτο κυτιοειδές τμήμα μήκους 86 mm. Τα άκρα των επίπεδων πλευρών είναι κομμένα κατά τρόπον ώστε ο σωλήνας να σχηματίζει γωνία 60^{o} ως προς το οριζόντιο επίπεδο όταν έχει συγκολληθεί στην επίπεδη βάση. Σε μια πλευρά του πάνω άκρου της βάσης είναι χαραγμένη μια εγκοπή πλάτους 22 mm × 46 mm βάθος, έτσι ώστε όταν το σύστημα του δοχείου πιέσεως αρχίζει να κατεβαίνει, προηγουμένου του άκρου με το βύσμα πυροδότησης, προς το κυτιοειδές υποστήριγμα, ο πλευρικός βραχίονας να κάθεται στην εγκοπή. Στην κάτω εσωτερική επιφάνεια του κυτιόμορφου τμήματος υπάρχει συγκολλημένο ένα κομμάτι χάλυβα 30 mm πλάτους και 6 mm πάχους το οποίο δρα ως διαχωριστικό. Για τη συγκράτηση του δοχείου πιέσεως σταθερά στη θέση του, χρησιμοποιούνται δύο πεταλούδες 7 mm, ευρισκόμενες στην αντίθετη πλευρά. Στις πλευρές που καταλήγουν στη βάση του κυτιοειδούς τμήματος, είναι συγκολλημμένες δύο λωρίδες πλάτους 12 mm από χάλυβα πάχους 6 mm, που στηρίζουν το δοχείο πιέσεως από κάτω.

▼B

1.6.1.2.2 Σύστημα ανάφλεξης

Το σύστημα ανάφλεξης αποτελείται από σύρμα Ni/Cr μήκους 25 cm με διάμετρο 0,6 mm και ειδική αντίσταση 3,85 ohm/m. Το σύρμα είναι περιελιγμένο υπό μορφή πηνίου σε κυλινδρική ράβδο διαμέτρου 5 mm και συνδεδεμένο με τα ηλεκτρόδια του βύσματος πυροδότησης. Το πηνίο θα πρέπει να έχει μια από τις μορφές που εμφαίνονται στην εικόνα 3. Η απόσταση μεταξύ τον πυθμένα του δοχείου και της κάτω πλευράς του πηνίου ανάφλεξης θα πρέπει νια είναι 20 mm. Εάν δεν υπάρχει δυνατότητα προσαρμογής των ηλεκτροδίων τα άκρα του σύρματος ανάφλεξης μεταξύ του πηνίου και του πυθμένα του δοχείου θα πρέπει να μονώνονται με κεραμικό περίβλημα. Το σύρμα θερμαίνεται με σταθερή παροχή ρεύματος τουλάχιστον 10 A.

1.6.2 **Διεξαγωγή της δοκιμής** ([1])

Η διάταξη σε πλήρη συναρμολόγηση με τον μορφοτροπέα πιέσεως και το σύστημα θερμάνσεως αλλά χωρίς το διαρρηγνυόμενο δίσκο, στηρίζεται με το άκρο που φέρει το βύσμα πυροδότησης προς τα κάτω. 2,5 g του προς δοκιμή υγρού μειγνύονται με 2,5*g* ξηρής κυτταρίνης σε δοχείο ζέσεως χρησιμοποιώντας γυάλινη ράβδο ανάδευσης ([2]). Για ασφάλεια, η μείξη θα πρέπει va γίνεται τοποθετώντας ένα προστατευτικό θώρακα μεταξύ χειριστή και μείγματος. Εάν το μείγμα αναφλέγει κατά τη διάρκεια της μείξης ή της πλήρωσης, δεν χρειάζεται περαιτέρω δοκιμασία. Το μείγμα προστίθεται στο δοχείο πιέσεως, σε μικρές ποσότητες, προσέχοντας ώστε το μείγμα *να* σωρεύεται γύρω από το πηνίο ανάφλεξης και να είναι σε καλή επαφή με αυτό. Είναι σημαντικό το πηνίο να μην παραμορφώνεται κατά τη διάρκεια της συσσώρευσης, καθώς κάτι τέτοιο μπορεί να, οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα ([3]). Ο διαρρηγνυόμενος δίσκος τοποθετείται στη θέση του και το βύσμα συγκράτησης βιδώνεται σφικτά. Το γεμάτο δοχείο μεταφέρεται στον υποστάτη για πυροδότηση, με *το* δίσκο από την πάνω πλευρά, ο οποίος υποστάτης θα πρέπει να βρίσκεται μέσα σε κατάλληλο θωρακισμένο αεριοαπαγωγό ή στοιχείο πυροδότησης. Η παροχή ρεύματος συνδέεται με τους εξωτερικούς ακροδέκτες του βύσματος πυροδότησης και εφαρμόζεται ρεύμα 10 A. Το χρονικό διάστημα μεταξύ της έναρξης της μείξεως και της έναρξης παροχής ρεύματος δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 10 λεπτά.

Το παρεχόμενο από τον μορφοτροπέα πιέσεως σήμα καταγράφεται με κατάλληλο σύστημα το οποίο έχει τη δυνατότητα εκτίμησης και καταγραφής της λαμβανομένης εικόνας της πιέσεως συναρτήσει του χρόνου (π.χ. καταγραφέας μεταβατικών καταστάσεων συνδεδεμένος με καταγραφικό χαρτί). Το μείγμα θερμαίνεται μέχρι διαρραγής του δίσκου ή για διάστημα τουλάχιστον 60 s. Εάν ο δίσκος δεν διαρραγεί, το μείγμα θα πρέπει να αφήνεται να ψυχθεί πριν αποσυναρμολογηθεί προσεκτικά η συσκευή, λαμβάνοντας πρόνοια για το ενδεχόμενο να επέλθει αύξηση της πιέσεως. Εκτελούνται πέντε δοκιμές με την υπό δοκιμή ουσία και την ή τις ουσίες αναφοράς. Σημειώνεται ο χρόνος που απαιτείται για την αύξηση της πιέσεως από 690 kPa σε 2 070 kPa πάνω από την ατμοσφαιρική. Υπολογίζεται ο μέσος χρόνος αύξησης της πιέσεως.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, ουσίες μπορεί να οδηγήσουν σε αύξηση πιέσεως (πολύ υψηλή ή πολύ χαμηλή) προκαλούμενη από χημικές αντιδράσεις μη χαρακτηριστικές των οξειδωτικών ιδιοτήτων της ουσίας. Στις περιπτώσεις αυτές μπορεί να είναι αναγκαίο να επαναληφθεί η δοκιμή με μια αδρανή ουσία, *π.χ.* γη διατόμων (kieselguhr), *αντί* κυτταρίνης για να διευκρινιστεί το είδος της αντίδρασης.

([1]) Μείγματα οξειδωτικών με κυτταρίνη πρέπει να αντιμετωπίζονται ως εν δυνάμει εκρηκτικά και ο χειρισμός τους να γίνεται με τη δέουσα προσοχή.

([2]) Στην πράξη, αυτό μπορεί να γίνεται παρασκευάζοντας μείγμα 1:1 του προς δοκιμή υγρού και κυτταρίνης σε μεγαλύτερη ποσότητα από την απαιτούμενη για τη δοκιμή και μεταφέροντας 5 ± 0,1 g στο δοχείο πιέσεως. Το μείγμα πρέπει να είναι πρόσφατα παρασκευασμένο για κάβε δοκιμή.

([3]) Ιδιαίτερα, η επαφή μεταξύ των προσκείμενων σπειρών του πηνίου πρέπει να αποφεύγεται.

▼B

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Χρόνοι αύξησης πιέσεως τόσο για την υπό δοκιμή ουσία, όσο και για την ή τις ουσίες αναφοράς. Χρόνοι αύξησης πιέσεως για τις δοκιμές με αδρανή ουσία, εφόσον γίνουν.

2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Υπολογίζονται οι μέσοι χρόνοι αύξησης πιέσεως τόσο για την υπό δοκιμή, όσο και για την ή τις ουσίες αναφοράς.

Υπολογίζεται ο μέσος χρόνος αύξησης πιέσεως για τις δοκιμές με αδρανή ουσία (εφόσον γίνουν).

Ορισμένα παραδείγματα αποτελεσμάτων εμφαίνονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1

Παραδείγματα αποτελεσμάτων (α)

Ουσία (β)	Μέσος χρόνος αύξησης πιέσεως για μείγμα 1:1 μι κυτταρίνη (ms)
Διχρωμικό αμμώνιο, κορεσμένο υδατικό διάλυμα	20 800
Νιτρικό ασβέστιο, κορεσμένο υδατικό διάλυμα	6 700
Νιτρικός σίδηρος III, κορεσμένο υδατικό διάλυμα	4 133
Υπερχλωρικό λίθιο, κορεσμένο υδατικό διάλυμα	1 686
Υπερχλωρικό μαγνήσιο, κορεσμένο υδατικό διάλυμα	777
Νιτρικό νικέλιο, κορεσμένο υδατικό διάλυμα	6 250
Νιτρικό οξύ 65 %	4 767 (γ)
Υπερχλωρικό οξύ, 50 %	121 (γ)
Υπερχλωρικό οξύ, 55 %	59
Νιτρικό κάλιο, 30 % υδατικό διάλυμα	26 690
Νιτρικός άργυρος, κορεσμένο υδατικό διάλυμα	(δ)
Χλωρικό νάτριο 40 % υδατικό διάλυμα	2 555 (γ)
Νιτρικό νάτριο, 45 % υδατικό διάλυμα	4 133
Αδρανής ουσία	
Νερό: κυτταρίνη	(γ)

(α) Βλέπε παραπομπή (1) για ταξινόμηση βάσει του σχήματος των ΗΕ για τις μεταφορές.
(β) Τα κορεσμένα διαλύματα θα πρέπει να παρασκευάζονται στους 20 °C.
(γ) Μέγιστη τιμή από διεργαστηριακές συγκριτικές δοκιμές.
(δ) Μέγιστη πίεση 2 070 kPa μη επιτευχθείσα.

▼B

3. **ΕΚΘΕΣΗ**

3.1 ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται οι ακόλουθες πληροφορίες:

— η ταυτότητα, η σύσταση, η καθαρότητα, κ.λπ. της υπό δοκιμή ουσίας,

— η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας,

— η διαδικασία ξήρανσης της χρησιμοποιούμενης κυτταρίνης,

— η υγρασία της χρησιμοποιούμενης κυτταρίνης,

— τα αποτελέσματα των μετρήσεων,

— τα αποτελέσματα δοκιμών με αδρανή ουσία εάν υπάρχουν,

— οι υπολογισθέντες μέσοι χρόνοι αύξησης της πίεσης,

— τυχόν παρεκκλίσεις από την παρούσα μέθοδο και οι λόγοι που τις επέβαλαν,

— κάθε πρόσθετη πληροφορία ή παρατήρηση σχετική με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2 ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ([1])

Τα αποτελέσματα δοκιμής αξιολογούνται με βάση:

α) το εάν το μείγμα της υπό δοκιμή ουσίας και της κυτταρίνης αναφλέγεται αυθόρμητα, και

β) τη σύγκριση του μέσου χρόνου που χρειάζεται για την αύξηση της πιέσεως από 690 kPa σε 2 070 kPa με εκείνον της ή των ουσιών αναφοράς.

Οι υγρές ουσίες πρέπει να θεωρούνται ως οξειδωτικές όταν:

α) μείγμα 1:1, κατά βάρος, της ουσίας και της κυτταρίνης αναφλέγεται αυθόρμητα, ή

β) μείγμα 1:1 κατά βάρος της ουσίας και της κυτταρίνης εμφανίζει μέσο χρόνο αύξησης πιέσεως μικρότερο ή ίσο με το μέσο χρόνο αύξησης πιέσεως μείγματος 1:1 κατά βάρος υδατικού διαλύματος 65 % (w/w) νιτρικού οξέος και κυτταρίνης.

Για την αποφυγή εσφαλμένου θετικού αποτελέσματος εάν είναι αναγκαίο κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων θα πρέπει επίσης να λαμβάνονται υπόψη και τα αποτελέσματα από δοκιμή της ουσίας με αδρανές υλικό.

([1]) Βλέπε παραπομπή 1 για ερμηνεία των αποτελεσμάτων βάσει των κανονισμών των ΗΕ για τις μεταφορές με χρήση διάφορων ουσιών αναφοράς.

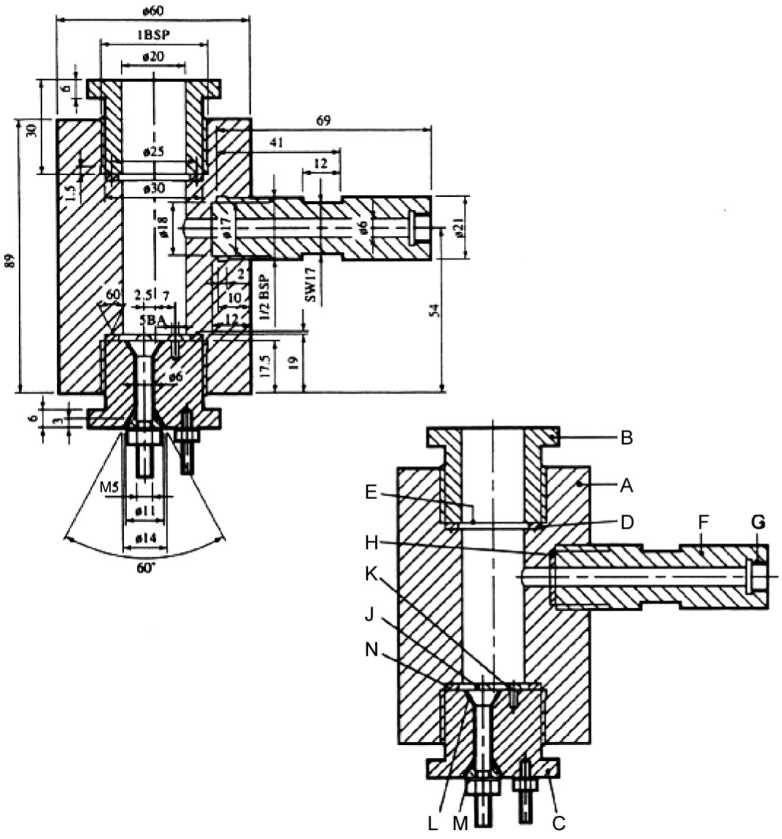
▼B

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria, 3rd revised edition. UN Publication No: ST/SG/AC.10/11/Rev. 3, 1999, page 342, Test 0.2: Test for oxidizing liquids.

Εικόνα 1

Δοχείο πίεσης



(A) Σώμα δοχείου πιέσεως

(B) Βύσμα συγκράτησης δίσκου

(C) Βύσμα πυροδότησης

(D) Ροδέλα μαλακού μολύβδου

(E) Διαρρηγνυόμενος δίσκος

(F) Πλευρικός βραχίονας

(G) Κεφαλή μορφοτροπέα πιέσεως

(H) Ροδέλα

(J) Μονωμένο ηλεκτρόδιο

(K) Γειωμένο ηλεκτρόδιο

(L) Μόνωση

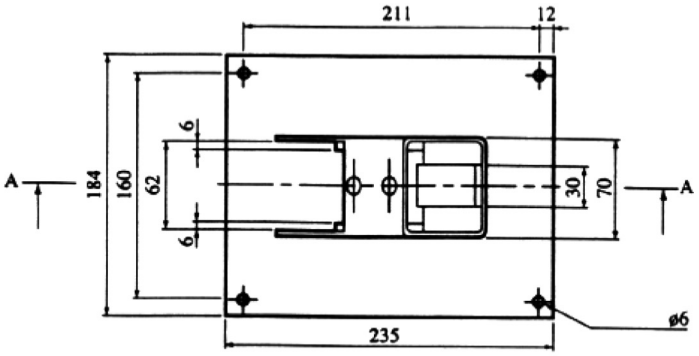
(M) Χαλύβδινος κώνος

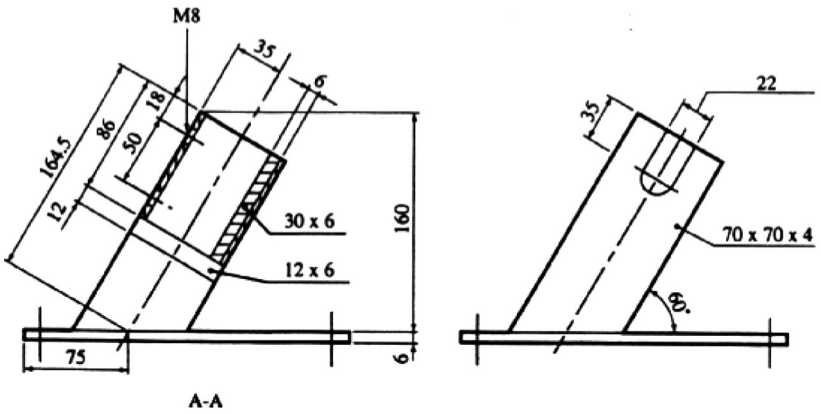
(N) Χαραγή οτρέβλωσης ροδέλας

▼B

Εικόνα 2

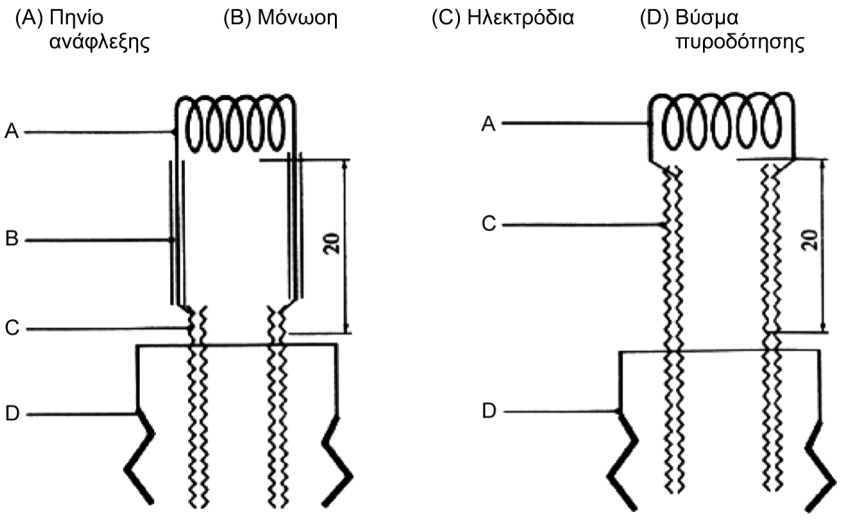
Υποστάτης





Εικόνα 3

Σύστημα ανάφλεξης



Σημείωση: Οποιοδήποτε από αυτά τα δύο συστήματα μπορεί να χρησιμοποιηθεί.

▼M1

A.22. **ΣΤΑΘΜΙΣΜΕΝΟΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΜΗΚΟΣ, ΓΕΩΜΕΤΡΙΚΟΣ ΜΕΣΟΣ ΤΩΝ ΔΙΑΜΕΤΡΩΝ ΤΩΝ ΙΝΩΝ**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην παρούσα μέθοδο περιγράφεται διαδικασία για τη μέτρηση του σταθμισμένου ως προς το μήκος, γεωμετρικού μέσου των διαμέτρων (σΜΓΜΔ) τεχνητών ορυκτών ινών (ΤΟΡΙ) χύμα. Δεδομένου ότι υπάρχει πιθανότητα 95 % να περικλείεται η ΣΜΓΜΔ του πληθυσμού εντός των ορίων εμπιστοσύνης 95 % (σΜΓΜΔ ± [2 × Τυπικό σφάλμα]) του δείγματος, η αναφερόμενη τιμή (η τιμή που προκύπτει από τη δοκιμή) είναι το κατώτερο όριο εμπιστοσύνης του δείγματος (δηλαδή ΣΜΓΜΔ — [2 × Τυπικό σφάλμα]). Η μέθοδος βασίζεται σε επικαιροποίηση (Ιούνιος 1994) ενός σχεδίου διαδικασίας για τη βιομηχανία, της βρετανικής Υπηρεσίας Υγείας και Ασφάλειας στην Εργασία (HSE), το οποίο εγκρίθηκε σε σύσκεψη της ECFIA (Ευρωπαϊκή Ένωση Βιομηχανιών Κεραμικών Ινών) και της HSE στο Chester στις 26.9.1993 και εκπονήθηκε για μια δεύτερη διεργαστηριακή δοκιμή, της οποίας τα αποτελέσματα ελήφθησαν υπόψη (1, 2). Η εν λόγω μέθοδος μετρήσεων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το χαρακτηρισμό της διαμέτρου των ινών σε ουσίες ή προϊόντα χύμα που περιέχουν ΤΟΡΙ, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται οι πυρίμαχες κεραμικές ίνες, οι τεχνητές υαλώδεις ίνες, οι κρυσταλλικές και πολυκρυσταλλικές ίνες.

Η στάθμιση ως προς το μήκος είναι ένας τρόπος αντιστάθμισης της επίδρασης που έχει στην κατανομή των διαμέτρων που προκύπτει από τη η θραύση των μεγάλου μήκους ινών κατά τη δειγματοληψία ή το χειρισμό του υλικού. Για τη μέτρηση της κατανομής μεγέθους των διαμέτρων των ΤΟΡΙ χρησιμοποιείται γεωμετρική στατιστική (γεωμετρικός μέσος), επειδή οι εν λόγω διάμετροι εμφανίζουν συνήθως κατανομές μεγέθους που προσεγγίζουν το λογάριθμο της κανονικής κατανομής.

Η μέτρηση και του μήκους, και της διαμέτρου είναι και επίπονη και χρονοβόρος, αλλά εάν μετρηθούν μόνον οι ίνες που εφάπτονται με μια απειροστού πάχους γραμμή σε ένα οπτικό πεδίο ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM), τότε η πιθανότητα επιλογής μιας δεδομένης ίνας είναι ανάλογη με το μήκος της. Δεδομένου ότι, με τον τρόπο αυτό, το μήκος συνεκτιμάται στους υπολογισμούς στάθμισης ως προς το μήκος, η μόνη μέτρηση που απαιτείται είναι της διαμέτρου, οπότε είναι δυνατόν να υπολογιστεί η τιμή ΣΜΓΜΔ-(2 × Τυπικό σφάλμα), όπως περιγράφεται.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Σωματίδιο: σώμα με λόγο μήκους προς πλάτος μικρότερο από 3:1.

Ίνα: σώμα με λόγο μήκους προς πλάτος (λόγος όψεως) τουλάχιστον 3:1.

1.3. ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Η μέθοδος έχει σχεδιαστεί για την εξέταση κατανομών διαμέτρου στις περιπτώσεις όπου η διάμεσος των διαμέτρων κυμαίνεται από 0,5 μm έως 6 μm. Μεγαλύτερες διάμετροι μπορούν να μετρηθούν με μικρότερη μεγέθυνση του SEM, ενώ η ισχύς της μεθόδου περιορίζεται για τις κατανομές λεπτότερων ινών. Εάν η διάμεσος των διαμέτρων είναι μικρότερη από 0,5 μm, συνιστάται η μέτρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (ΤΕΜ).

▼M1

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Από τον μανδύα ινών ή από ελεύθερες ίνες χύμα λαμβάνονται ορισμένα αντιπροσωπευτικά δείγματα πυρήνα. Το μήκος των ινών χύμα ελαττώνεται με διαδικασία σύνθλιψης και σχηματίζεται κολλοειδές διάλυμα αντιπροσωπευτικού μερικού δείγματος σε νερό. Λαμβάνονται κατάλληλες ποσότητες, διηθούνται με ηθμό από πολυανθρακικό πολυμερές με μέγεθος πόρων 0,2 μm και παρασκευάζεται δοκίμιο για εξέταση με τεχνικές ηλεκτρονικού μικροσκόπιου σάρωσης (SEM). Οι διάμετροι των ινών μετριούνται με μεγέθυνση οθόνης ×10 000 ή μεγαλύτερη ([1]) με χρήση μεθόδου τομής με οριζόντια γραμμή για την αμερόληπτη εκτίμηση της διαμέσου των διαμέτρων. Υπολογίζεται το κατώτερο διάστημα εμπιστοσύνης 95 % (με βάση μονόπλευρη δοκιμή) για να εκτιμηθεί η χαμηλότερη τιμή του γεωμετρικού μέσου των διαμέτρων των ινών του υλικού.

1.5. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

1.5.1. **Ασφάλεια/Προφυλάξεις**

Θα πρέπει να ελαχιστοποιείται η έκθεση ατόμων σε αερόφερτες ίνες και να χρησιμοποιείται απαγωγός εστία ή συσκευή με χειριστήρια (glove box) για τις εργασίες με ξηρές ίνες. Θα πρέπει να παρακολουθείται κατά περιόδους η έκθεση των ατόμων για να διαπιστώνεται η αποτελεσματικότητα των μεθόδων ελέγχου. Οι εργασίες με TOPI θα πρέπει να εκτελούνται με γάντια μιας χρήσης για τον περιορισμό του ερεθισμού του δέρματος και την αποτροπή της έμμεσης μόλυνσης.

1.5.2. **Όργανα/έξοπλισμός**

— Πιεστήριο (πρέσα) και μήτρες (ικανό να αποδίδει 10 MPa)

— Τριχοειδείς πορώδεις ηθμοί από πολυανθρακικό πολυμερές με μέγεθος πόρων 0,2 μm (διάμετρος 25 mm)

— Διηθητική μεμβράνη από εστέρα κυτταρίνης με μέγεθος πόρων 5 μm, προοριζόμενη να χρησιμοποιηθεί ως ενισχυτικός ηθμός

— Γυάλινη συσκευή διήθησης (ή συστήματα διήθησης μίας χρήσης), ικανή να δέχεται ηθμούς διαμέτρου 25 mm (π.χ. γυάλινο kit μικροανάλυσης Millipore, τύπος XX10 025 00)

— Πρόσφατα απεσταγμένο νερό, που έχει διηθηθεί με ηθμό με μέγεθος πόρων 0,2 μm για την απαλλαγή του από μικροοργανισμούς

— Συσκευή εναπόθεσης υλικού με κονιορτοποίηση (sputter coater) με στόχο χρυσού ή χρυσού/παλλαδίου

— Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης με διακριτική ικανότητα 10 nm και ικανότητα λειτουργίας με μεγέθυνση × 10 000

— Διάφορα: σπαθίδες (σπάτουλες), λεπίδα νυστεριού τύπου 24, λαβίδες, σωλήνες SEM, κόλλα ή κολλητική ταινία άνθρακα, κολλοειδής άργυρος

— Καθετήρας υπερήχων ή επιτραπέζιο λουτρό υπερήχων

— Πυρηνολήπτης ή φελλοτρυπητήρας για τη λήψη δειγμάτων πυρήνα από μανδύες TOPI

([1]) Αυτή η τιμή μεγέθυνσης υποδεικνύεται για ίνες 3 μm, ενώ στην περίπτωση των ινών 6 μm μπορεί να ενδείκνυται περισσότερο η μεγέθυνση ×5 000.

▼**M1**

1.5.3. **Διαδικασία δοκιμής**

1.5.3.1. *Δειγματοληψία*

Για τους μανδύες και τα πιλήματα χρησιμοποιείται πυρηνολήπτης ή φελλοτρυπητήρας των 25 mm, προκειμένου να συλλεγούν δείγματα της ενεργού διατομής. Τα εν λόγω δείγματα θα πρέπει να είναι κατανεμημένα ισομερώς σε όλο το πλάτος ενός μικρού μήκους του μανδύα ή να λαμβάνονται από τυχαία σημεία, εάν είναι διαθέσιμα μεγάλα μήκη του μανδύα. Ο ίδιος εξοπλισμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απόσπαση τυχαίων δειγμάτων από ελεύθερες ίνες. Εφόσον είναι εφικτό, θα πρέπει να λαμβάνονται έξι δείγματα για να αντιπροσωπεύουν τις χωρικές διακυμάνσεις του χύμα υλικού.

Τα έξι δείγματα πυρήνα θα πρέπει να συνθλίβονται μέσα σε μήτρα διαμέτρου 50 mm με την άσκηση πίεσης 10 MPa. Το υλικό αναμιγνύεται με σπαθίδα, συμπιέζεται εκ νέου με 10 Mpa και, κατόπιν, απομακρύνεται από τη μήτρα και φυλάσσεται σε σφραγισμένη γυάλινη φιάλη.

1.5.3.2. *Παρασκευή δοκιμίου*

Εάν είναι απαραίτητο, το οργανικό συνδετικό μέσο μπορεί να αφαιρεθεί με θέρμανση των ινών σε κλίβανο στους 450 °C για μία ώρα περίπου.

Το δείγμα χωρίζεται σε μερίδια με αποκοπή τεταρτημορίων κύκλου (η εργασία αυτή θα πρέπει να εκτελείται σε απαγωγό εστία).

Με τη βοήθεια σπαθίδας, προστίθεται μια μικρή ποσότητα (< 0,5 g) δείγματος σε 100 ml πρόσφατα απεσταγμένου νερού, το οποίο έχει διηθηθεί με διηθητική μεμβράνη των 0,2 μm (μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικές πηγές εξαιρετικά καθαρού νερού, εάν είναι αποδεδειγμένα ικανοποιητικές). Το δείγμα διασπείρεται πλήρως με τη βοήθεια καθετήρα υπερήχων, που λειτουργεί σε ισχύ 100 W και είναι ρυθμισμένος έτσι ώστε να επιτυγχάνει σπηλαίωση. (Εάν δεν διατίθεται καθετήρας, εφαρμόζεται η εξής μέθοδος: επανειλημμένη ανακίνηση και αναστροφή για 30 δευτερόλεπτα, τοποθέτηση σε επιτραπέζιο λουτρό υπερήχων για πέντε λεπτά και επανειλημμένη ανακίνηση και αναστροφή για 30 δευτερόλεπτα ακόμη).

Αμέσως μετά τη διασπορά των ινών, λαμβάνονται κατάλληλες ποσότητες (π.χ. τρεις ποσότητες 3, 6 και 10 ml) με σιφώνιο με ευρύ στόμιο (χωρητικότητας 2-5 ml).

Κάθε κατάλληλη ποσότητα διηθείται υπό κενό με ηθμό από πολυανθρακικό πολυμερές των 0,2 μm, τοποθετημένο μέσα σε διηθητική μεμβράνη από εστέρα κυτταρίνης με μέγεθος πόρων 5 μm, σε γυάλινη χοάνη διήθησης με κυλινδρικό υποδοχέα. Στη χοάνη θα πρέπει να φέρονται περίπου 5 ml διηθημένου απεσταγμένου νερού και η κατάλληλη ποσότητα να εισάγεται στο νερό με αργή αναρρόφηση, διατηρώντας το ρύγχος του σιφωνίου κάτω από το μηνίσκο. Το σιφώνιο και ο υποδοχέας πρέπει να εκπλύνονται σχολαστικά μετά την αναρρόφηση, δεδομένου ότι οι λεπτές ίνες τείνουν να συγκεντρώνονται στην επιφάνεια.

Ο ηθμός απομακρύνεται με προσοχή και χωρίζεται από τον ενισχυτικό ηθμό, πριν τοποθετηθεί σε δοχείο για να ξηρανθεί.

▼**M1**

Από το ίζημα της διήθησης αποκόπτεται με λεπίδα νυστεριού τύπου 24 ένα τμήμα που αντιστοιχεί σε ένα τέταρτο ή στο ήμισυ του ηθμού, με παλινδρομική κίνηση. Το κομμένο τμήμα στερεώνεται με προσοχή σε στήριγμα δοκιμίου (stub) του SEM με τη βοήθεια κολλητικής ταινίας άνθρακα ή κόλλας άνθρακα. Για τη βελτίωση της ηλεκτρικής επαφής στα άκρα του ηθμού και του στηρίγματος, θα πρέπει να τοποθετείται κολλοειδής άργυρος σε τρεις τουλάχιστον θέσεις. Αφού στεγνώσουν η κόλλα και ο κολλοειδής άργυρος, η επιφάνεια το ιζήματος επικαλύπτεται με ένα στρώμα χρυσού ή χρυσού/παλλαδίου πάχους περίπου 50 nm με την ειδική συσκευή.

1.5.3.3. *Βαθμονόμηση και λειτουργία του SEM*

1.5.3.3.1. Βαθμονόμηση

Η βαθμονόμηση του SEM θα πρέπει να ελέγχεται τουλάχιστον ανά εβδομάδα (θεωρητικά, καθημερινά) με πιστοποιημένο κάναβο βαθμονόμησης. Η βαθμονόμηση θα πρέπει να συγκρίνεται με πιστοποιημένο πρότυπο και εάν η μετρηθείσα τιμή (SEM) δεν περικλείεται εντός των ορίων ± 2 % της πιστοποιημένης τιμής, πρέπει να ρυθμίζεται το SEM και να επανελέγχεται η βαθμονόμηση.

Το SEM θα πρέπει να είναι ικανό να διακρίνει τουλάχιστον μια ελάχιστη ορατή διάμετρο 0,2 μm σε πραγματικό βασικό υλικό δείγματος με μεγέθυνση × 2 000.

1.5.3.3.2. Λειτουργία

Το SEM θα πρέπει να λειτουργεί με μεγέθυνση × 10 000 ([1]) σε συνθήκες που εξασφαλίζουν ικανοποιητική διακριτική ικανότητα με αποδεκτή εικόνα σε χαμηλές ταχύτητες σάρωσης της τάξεως, λόγου χάριν, των 5 δευτερολέπτων ανά πλαίσιο. Αν και οι απαιτήσεις λειτουργίας των διαφόρων SEM μπορεί να ποικίλλουν, για να επιτευχθεί γενικά η καλύτερη δυνατή ορατότητα και διακριτική ικανότητα, όταν εξετάζονται υλικά σχετικά μικρού ατομικού βάρους, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται επιταχυντικά δυναμικά των 5-10 keV με ρύθμιση μικρής κηλίδας και μικρή απόσταση εργασίας. Κατά τη γραμμική όδευση θα πρέπει να χρησιμοποιείται κλίση 0^{o} για την ελαχιστοποίηση της επανεστίασης ή, εφόσον το SEM διαθέτει ευκεντρωμένο (eucentric) αντικειμενικό σύστημα, θα πρέπει να χρησιμοποιείται η ευκεντρωτική απόσταση εργασίας. Εάν το υλικό δεν περιέχει ίνες μικρής διαμέτρου και οι διάμετροι των ινών είναι μεγάλες (> 5 μm), μπορεί να χρησιμοποιηθεί μικρότερη μεγέθυνση.

1.5.3.4. *Προσδιορισμός του μεγέθους*

1.5.3.4.1. Εξέταση με μικρή μεγέθυνση για την αξιολόγηση του δοκιμίου

Το δοκίμιο θα πρέπει πρώτα να εξετάζεται με μικρή μεγέθυνση για να διαπιστωθεί αν έχουν σχηματιστεί τολύπες μεγάλων ινών και να εκτιμηθεί η πυκνότητα των ινών. Σε περίπτωση υπέρμετρου σχηματισμού τολυπών, συνιστάται η παρασκευή νέου δοκιμίου.

Για λόγους στατιστικής ακρίβειας, είναι απαραίτητη η μέτρηση ενός ελάχιστου αριθμού ινών και η μεγάλη πυκνότητα ινών μπορεί να φαίνεται επιθυμητή, δεδομένου ότι η εξέταση κενών πεδίων είναι χρονοβόρος και δεν εξυπηρετεί την ανάλυση. Εν τούτοις, η υπερφόρτωση του ηθμού δυσχεραίνει τη μέτρηση του συνόλου των μετρήσιμων ινών και ενέχει τον κίνδυνο να παραλειφθούν οι μικρές ίνες, επειδή μπορεί να σκιάζονται από τις μεγάλες.

([1]) Για τις ίνες 3 μm, βλέπε προηγούμενη υποσημείωση.

▼**M1**

Πυκνότητες μεγαλύτερες από 150 ίνες ανά χιλιοστόμετρο γραμμικής όδευσης ενδέχεται να έχουν ως αποτέλεσμα συστηματικού σφάλματος την υπερεκτίμηση της ΣΜΓΜΔ. Από την άλλη πλευρά, οι χαμηλές συγκεντρώσεις ινών αυξάνουν το χρόνο που απαιτείται για την ανάλυση· για το λόγο αυτό, συχνά είναι οικονομικά αποδοτικότερη η παρασκευή δοκιμίου με πυκνότητα ινών που να προσεγγίζει το άριστο αντί της εμμονής στη μέτρηση ιζημάτων χαμηλής συγκέντρωσης. Η βέλτιστη πυκνότητα ινών θα πρέπει να δίδει κατά μέσον όρο μία ή δύο μετρήσιμες ίνες ανά οπτικό πεδίο σε μεγέθυνση × 5 000. Ωστόσο, η βέλτιστη πυκνότητα εξαρτάται από το μέγεθος (διάμετρος) των ινών και, συνεπώς, είναι απαραίτητο να απευθυνθεί ο τεχνικός σε εμπειρογνώμονα, πριν κρίνει κατά πόσον η πυκνότητα ινών προσεγγίζει το άριστο.

1.5.3.4.2. Στάθμιση των διαμέτρων των ινών ως προς το μήκος

Μετριούνται μόνον οι ίνες που εφάπτονται (ή τέμνονται) με μια λεπτή (απειροστού πάχους) γραμμή, που χαράσσεται στην οθόνη του SEM. Για το λόγο αυτό, χαράσσεται οριζόντια (ή κάθετη) γραμμή, διερχόμενη από το κέντρο της οθόνης.

Εναλλακτική δυνατότητα είναι η τοποθέτηση ενός και μόνο σημείου στο κέντρο της οθόνης και η συνεχής σάρωση του ηθμού προς μία κατεύθυνση. Μετριέται και καταγράφεται η διάμετρος κάθε ίνας με λόγο όψεως μεγαλύτερο από 3:1, που εφάπτεται ή τέμνεται με το σημείο αυτό.

1.5.3.4.3. Προσδιορισμός του μεγέθους των ινών

Συνιστάται η μέτρηση τουλάχιστον 300 ινών. Κάθε ίνα μετριέται μόνο μία φορά στο σημείο τομής με τη γραμμή ή το σημείο που έχει χαραχθεί στην εικόνα (ή κοντά στο σημείο τομής, εάν τα άκρα της ίνας είναι σκοτεινά). Σε περίπτωση συνάντησης με ίνες που έχουν ανομοιόμορφες ενεργούς διατομές, θα πρέπει να χρησιμοποιείται μια μέτρηση αντιπροσωπευτική του μέσου όρου διαμέτρων των ινών. Θα πρέπει να ορίζεται με προσοχή το άκρο και να μετριέται η πιο σύντομη απόσταση ανάμεσα στα άκρα των ινών. Ο προσδιορισμός του μεγέθους μπορεί να εκτελείται απευθείας (on-line) ή μετά την εξέταση των ινών, σε αποθηκευμένες εικόνες ή φωτογραφίες. Συνιστάται η χρήση ημιαυτόματων συστημάτων μέτρησης εικόνων, τα οποία μεταφέρουν τα δεδομένα κατευθείαν σε λογιστικά φύλλα, επειδή με τον τρόπο αυτό εξοικονομείται χρόνος, εκλείπουν τα σφάλματα μεταγραφής και μπορούν να αυτοματοποιηθούν οι υπολογισμοί.

Τα άκρα των ινών μεγάλου μήκους θα πρέπει να ελέγχονται με μικρή μεγέθυνση για να εξακριβώνεται ότι δεν συστρέφονται με αποτέλεσμα να επανέρχονται στο οπτικό πεδίο μέτρησης και ότι μετριούνται μόνο μία φορά.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Οι διάμετροι των ινών συνήθως δεν εμφανίζουν κανονική κατανομή. Ωστόσο, είναι δυνατόν να ληφθεί μια κατανομή που προσεγγίζει την κανονική με λογαριθμική μετατροπή.

Υπολογίζονται ο αριθμητικός μέσος (μέση τιμή lnD) και η τυπική απόκλιση (SD_{lnD}) του νεπερίου λογαρίθμου των τιμών (lnD) διαμέτρου (D) των n ινών.

$$\text{mean } \ln D = \frac{\sum \ln D}{n} \qquad (1)$$

▼**M1**

$$SD_{lnD} = \sqrt{\frac{\Sigma(lnD - \text{mean } lnD)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Η τυπική απόκλιση διαιρούμενη δια της τετραγωνικής ρίζας του αριθμού των μετρήσεων (n) παρέχει το τυπικό σφάλμα (SE_{lnD}).

$$SE_{lnD} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Αφαιρώντας το διπλάσιο του τυπικού σφάλματος από τον αριθμητικό μέσο και αντικαθιστώντας την τιμή αυτή (μέσος όρος μείον το διπλάσιο του τυπικού σφάλματος) στην ακόλουθη εκθετική σχέση, προκύπτει ο γεωμετρικός μέσος μειωμένος κατά το διπλάσιο του γεωμετρικού τυπικού σφάλματος.

$$\Sigma\text{ΜΓΜΔ} - 2SE = e^{(\text{mean } lnD - 2SE_{lnd})} \quad (4)$$

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ**

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον τα ακόλουθα στοιχεία:

— την τιμή ΣΜΓΜΔ-2SE,

— κάθε διαφορά και ιδίως εκείνες που ενδέχεται να έχουν επηρεάσει την επαναληπτικότητα ή την ακρίβεια των αποτελεσμάτων, με κατάλληλη αιτιολόγηση.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. February 1999.

2. G. Burdett and G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weigthed geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/07. Project R42.75 HPD. Health and Safety Executive. Research and Laboratory Services Division, 1994.

▼M4

Α.23 ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ (ΟΚΤΑΝΟΛΗ-1/ΝΕΡΟ): ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΗΣ ΑΡΓΗΣ ΑΝΑΔΕΥΣΗΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 123 του ΟΟΣΑ (2006). Με τη μέθοδο της αργής ανάδευσης έχουν προσδιοριστεί με ακρίβεια τιμές του συντελεστή κατανομής σε μείγμα οκτανόλης-1/νερού (P_{OW}) μέχρι λογαρίθμου του P_{OW} ίσου με 8,2 (1). Συνεπώς, αποτελεί κατάλληλη πειραματική προσέγγιση για τον άμεσο προσδιορισμό του P_{OW} εξαιρετικά υδρόφοβων ουσιών.

2. Άλλες μέθοδοι προσδιορισμού του συντελεστή κατανομής σε μείγμα οκτανόλης-1/νερού (P_{OW}) είναι η μέθοδος της «ανακινούμενης φιάλης» (2) και ο προσδιορισμός του P_{OW} από τη συμπεριφορά κατακράτησης σε χρωματογραφία HPLC αντίστροφης φάσης (3). Η μέθοδος της «ανακινούμενης φιάλης» είναι επιρρεπής σε τεχνητές ενδείξεις (artifacts) λόγω της μετακίνησης μικροσταγονιδίων οκτανόλης στην υδατική φάση. Όσο αυξάνονται οι τιμές P_{OW}, η παρουσία αυτών των σταγονιδίων στην υδατική φάση οδηγεί σε αυξανόμενη υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας στο νερό. Συνεπώς, η χρήση της περιορίζεται σε ουσίες με λογάριθμο του $P_{OW} < 4$. Η δεύτερη μέθοδος βασίζεται σε αξιόπιστα δεδομένα απευθείας προσδιορισμένων τιμών P_{OW} για τη βαθμονόμηση της σχέσης μεταξύ της συμπεριφοράς κατακράτησης σε HPLC και των μετρούμενων τιμών P_{OW}. Για τον προσδιορισμό των συντελεστών κατανομής σε μείγμα οκτανόλης-1/νερού των ιονιζόμενων ουσιών ήταν διαθέσιμο ένα σχέδιο κατευθυντήριων γραμμών του ΟΟΣΑ ([4]), το οποίο όμως δεν χρησιμοποιείται πλέον.

3. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών αναπτύχθηκε στις Κάτω Χώρες. Η ακρίβεια των περιγραφόμενων μεθόδων έχει επαληθευτεί και βελτιστοποιηθεί μέσω μελέτης επικύρωσης με κυκλική δοκιμή (ring-test) στην οποία συμμετείχαν 15 εργαστήρια (5).

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

Σημασία και χρήση

4. Στην περίπτωση αδρανών οργανικών ουσιών, έχουν διαπιστωθεί εξαιρετικά σημαντικές σχέσεις μεταξύ των συντελεστών κατανομής σε μείγμα οκτανόλης-1/νερού (P_{OW}) και της βιοσυσσώρευσής τους στα ψάρια. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι ο P_{OW} σχετίζεται με την ιχθυοτοξικότητα, καθώς και με τη ρόφηση χημικών ουσιών σε στερεά, π.χ. στο έδαφος και σε ιζήματα. Εκτεταμένη ανασκόπηση των σχέσεων παρουσιάζεται στη βιβλιογραφική παραπομπή (6).

5. Έχει διαπιστωθεί ευρύ φάσμα σχέσεων μεταξύ του συντελεστή κατανομής σε μείγμα οκτανόλης-1/νερού και άλλων, σημαντικών για την περιβαλλοντική τοξικολογία και χημεία, ιδιοτήτων των ουσιών. Κατά συνέπεια, ο συντελεστής κατανομής σε μείγμα οκτανόλης-1/νερού έχει εξελιχθεί σε βασική παράμετρο της εκτίμησης της περιβαλλοντικής επικινδυνότητας των χημικών ουσιών, καθώς και της πρόβλεψης της πορείας τους στο περιβάλλον.

Πεδίο εφαρμογής

6. Το πείραμα αργής ανάδευσης θεωρείται ότι μειώνει τον σχηματισμό μικροσταγονιδίων από σταγονίδια οκτανόλης-1 στην υδατική φάση. Κατά συνέπεια, δεν υπερεκτιμάται η συγκέντρωση στο νερό λόγω σύνδεσης μορίων της ελεγχόμενης ουσίας με τα εν λόγω σταγονίδια. Ως εκ τούτου, η μέθοδος της αργής ανάδευσης είναι ιδιαιτέρως κατάλληλη για τον προσδιορισμό του P_{OW} ουσιών με αναμενόμενες τιμές λογαρίθμου του P_{OW} της τάξης του 5 ή υψηλότερες, για τις οποίες η μέθοδος της ανακινούμενης φιάλης (2) συχνά οδηγεί σε εσφαλμένα αποτελέσματα.

▼M4

ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

7. Ο συντελεστής κατανομής μιας ουσίας μεταξύ νερού και λιπόφιλου διαλύτη (οκτανόλη-1) χαρακτηρίζει την κατανομή της χημικής ουσίας μεταξύ των δύο φάσεων σε κατάσταση ισορροπίας. Ο συντελεστής κατανομής μεταξύ νερού και οκτανόλης-1 (P_{OW}) ορίζεται ως ο λόγος των συγκεντρώσεων ισορροπίας της ελεγχόμενης ουσίας σε οκτανόλη-1 κορεσμένη με νερό (C_O) και σε νερό κορεσμένο με οκτανόλη-1 (C_W).

$$P_{OW} = C_O/C_W$$

Δεδομένου ότι πρόκειται για λόγο συγκεντρώσεων, είναι αδιάστατο μέγεθος. Συνήθως δίδεται με τη μορφή δεκαδικού λογαρίθμου (log P_{OW}). Ο P_{OW} εξαρτάται από τη θερμοκρασία και στα αναφερόμενα δεδομένα θα πρέπει να περιλαμβάνεται η θερμοκρασία μέτρησης.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

8. Για να προσδιοριστεί ο συντελεστής κατανομής, το νερό, η οκτανόλη-1 και η ελεγχόμενη ουσία εξισορροπούνται σε σταθερή θερμοκρασία. Στη συνέχεια, προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας στις δύο φάσεις.

9. Οι πειραματικές δυσκολίες που σχετίζονται με τον σχηματισμό μικροσταγονιδίων κατά το πείραμα ανακινούμενης φιάλης μπορούν να μειωθούν στο προτεινόμενο πείραμα αργής ανάδευσης. Στο πείραμα αργής ανάδευσης, το νερό, η οκτανόλη-1 και η ελεγχόμενη ουσία φέρονται σε ισορροπία σε έναν θερμοστατούμενο αναδευόμενο αντιδραστήρα. Η ανταλλαγή μεταξύ των φάσεων επιταχύνεται με την ανάδευση. Η ανάδευση προκαλεί περιορισμένη τυρβώδη ροή που βελτιώνει την ανταλλαγή μεταξύ οκτανόλης-1 και νερού χωρίς να σχηματίζονται μικροσταγονίδια (1).

ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

10. Δεδομένου ότι η παρουσία ουσιών πέραν της ελεγχόμενης ουσίας ενδέχεται να επηρεάσει τον συντελεστή δραστικότητας της ελεγχόμενης ουσίας, η ελεγχόμενη ουσία θα πρέπει να υποβάλλεται σε δοκιμή ως καθαρή ουσία. Για το πείραμα κατανομής σε μείγμα οκτανόλης-1/νερού θα πρέπει να χρησιμοποιείται η υψηλότερη καθαρότητα που είναι διαθέσιμη στο εμπόριο.

11. Η παρούσα μέθοδος εφαρμόζεται σε καθαρές ουσίες που δεν διίστανται ούτε συνδέονται και δεν εμφανίζουν σημαντική δραστικότητα στη μεσεπιφάνεια. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του λόγου κατανομής σε οκτανόλη-1/νερό τέτοιων ουσιών και μειγμάτων. Όταν η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για μείγματα, οι προσδιοριζόμενοι λόγοι κατανομής σε οκτανόλη-1/νερό εξαρτώνται από τη χημική σύνθεση του ελεγχόμενου μείγματος και τη σύνθεση του ηλεκτρολύτη που χρησιμοποιείται ως υδατική φάση. Εφόσον λαμβάνονται πρόσθετα μέτρα, η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται επίσης σε διιστάμενες ή συνδεόμενες ενώσεις (παράγραφος 12).

12. Εξαιτίας των πολλαπλών ισορροπιών σε νερό και οκτανόλη-1 που υπεισέρχονται στην κατανομή σε μείγμα οκτανόλης-1/νερού διιστάμενων ουσιών, όπως οργανικών οξέων και φαινολών, οργανικών βάσεων και οργανομεταλλικών ουσιών, ο λόγος κατανομής σε οκτανόλη-1/νερό αποτελεί συμβατική (καταστατική) σταθερά, η οποία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμός από τη σύνθεση των ηλεκτρολυτών (7)(8). Ως εκ τούτου, για τον προσδιορισμό του λόγου κατανομής σε μείγμα οκτανόλης-1/νερού, θα πρέπει να ελέγχονται στο πείραμα το pH και η σύνθεση του ηλεκτρολύτη και να αναφέρονται. Οι εν λόγω λόγοι κατανομής πρέπει να αξιολογούνται με βάση την κρίση των ειδικών. Με τη βοήθεια της σταθεράς (των σταθερών) διάστασης, πρέπει να επιλέγονται κατάλληλες τιμές pH ώστε να προσδιορίζεται λόγος κατανομής για κάθε κατάσταση ιοντισμού. Κατά τη δοκιμή οργανομεταλλικών ενώσεων πρέπει να χρησιμοποιούνται μη συμπλεκτικά ρυθμιστικά διαλύματα (8). Λαμβανομένων υπόψη των υφιστάμενων γνώσεων στον τομέα της υδατικής χημείας (σταθερές συμπλοκοποίησης, σταθερές διάστασης), οι πειραματικές συνθήκες πρέπει να επιλέγονται κατά τρόπο ώστε να μπορούν να εκτιμηθούν οι διαφορετικές μορφές της ελεγχόμενης ουσίας στην υδατική φάση. Η ιοντική ισχύς θα πρέπει να είναι η ίδια σε όλα τα πειράματα με τη χρήση ηλεκτρολύτη υποβάθρου.

▼M4

13. Ενδέχεται να ανακύψουν δυσκολίες κατά τη διεξαγωγή της δοκιμής με ουσίες χαμηλής υδατοδιαλυτότητας ή υψηλού P_{OW}, διότι οι συγκεντρώσεις στο νερό είναι τόσο χαμηλές ώστε είναι δύσκολο να προσδιοριστούν με ακρίβεια. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών παρέχει κατευθύνσεις για την αντιμετώπιση του προβλήματος αυτού.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ

14. Τα χημικά αντιδραστήρια πρέπει να είναι αναλυτικού βαθμού καθαρότητας ή υψηλότερου. Συνιστάται η χρήση μη ραδιοσημασμένων ελεγχόμενων ουσιών γνωστής χημικής σύνθεσης και, κατά προτίμηση, καθαρότητας τουλάχιστον 99 % ή ραδιοσημασμένων ελεγχόμενων ουσιών γνωστής χημικής σύνθεσης και ραδιοχημικής καθαρότητας. Στην περίπτωση των ιχνηθετών με μικρό χρόνο υποδιπλασιασμού, πρέπει να εφαρμόζονται διορθώσεις για τη διάσπαση. Στην περίπτωση των ραδιοσημασμένων ελεγχόμενων ουσιών, θα πρέπει να χρησιμοποιείται ειδική για τη χημική ουσία αναλυτική μέθοδος, ώστε να εξασφαλίζεται ότι η μετρούμενη ραδιενέργεια σχετίζεται άμεσα με την ελεγχόμενη ουσία.

15. Ο λογάριθμος του P_{OW} μπορεί να εκτιμηθεί με τη χρήση είτε διαθέσιμου στο εμπόριο λογισμικού για την εκτίμηση του λογαρίθμου του P_{OW} είτε του λόγου των διαλυτοτήτων στους δύο διαλύτες.

16. Πριν από την εκτέλεση πειράματος αργής ανάδευσης για τον προσδιορισμό του P_{OW}, θα πρέπει να είναι διαθέσιμες οι ακόλουθες πληροφορίες σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία:

α) συντακτικός τύπος·

β) κατάλληλες αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ουσίας στο νερό και σε οκτανόλη-1·

γ) σταθερά (σταθερές) διάστασης ιονιζόμενων ουσιών [κατευθυντήρια γραμμή 112 του ΟΟΣΑ (9)]·

δ) υδατοδιαλυτότητα (10)·

ε) αβιοτική υδρόλυση (11)·

στ) άμεση βιοαποικοδομησιμότητα (12)·

ζ) τάση ατμών (13).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Εξοπλισμός και συσκευές

17. Απαιτείται συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός, και ειδικότερα:

— μαγνητικοί αναδευτήρες και μαγνητικές ράβδοι ανάδευσης επενδυμένες με Teflon για την ανάδευση της υδατικής φάσης,

— όργανα ανάλυσης κατάλληλα για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας στα αναμενόμενα επίπεδα,

— δοχείο ανάδευσης με στρόφιγγα στον πυθμένα. Ανάλογα με την εκτίμηση του λογαρίθμου του P_{OW} και το όριο ανίχνευσης (LOD) της ελεγχόμενης ουσίας, πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης ενός δοχείου αντίδρασης του ίδιου σχήματος, χωρητικότητας άνω του ενός λίτρου, ώστε να μπορεί να ληφθεί επαρκής όγκος νερού για χημική εκχύλιση και ανάλυση. Έτσι επιτυγχάνονται υψηλότερες συγκεντρώσεις στο υδατικό εκχύλισμα και, συνεπώς, πιο αξιόπιστος αναλυτικός προσδιορισμός. Στο προσάρτημα 1 παρατίθεται πίνακας με εκτιμήσεις του ελάχιστου απαιτούμενου όγκου, του LOD της ένωσης, του εκτιμώμενου λογαρίθμου του P_{OW} και της διαλυτότητάς της. Ο πίνακας βασίζεται στη σχέση μεταξύ του λογαρίθμου του P_{OW} και του λόγου των διαλυτοτήτων σε οκτανόλη και σε νερό, κατά Pinsuwanet al. (14):

$$\log P_{OW} = 0,\ 88 \log SR + 0,\ 41$$

▼M4

όπου

$SR = S_{oct}/S_w$ (σε γραμμομοριακότητα κατ' όγκο),

και η σχέση που παρέχει ο Lyman (15) για την πρόβλεψη της υδατοδιαλυτότητας. Οι διαλυτότητες στο νερό που υπολογίζονται μέσω της αναφερόμενης στο προσάρτημα 1 εξίσωσης πρέπει να θεωρούνται ως πρώτη εκτίμηση. Επισημαίνεται ότι ο χρήστης είναι ελεύθερος να προβεί σε εκτίμηση της υδατοδιαλυτότητας μέσω οιασδήποτε σχέσης θεωρείται ότι παριστά πληρέστερα τη σχέση μεταξύ υδρόφοβου χαρακτήρα και διαλυτότητας. Για τις στερεές ουσίες συνιστάται, π.χ., η συνεκτίμηση του σημείου τήξεως στην πρόβλεψη της διαλυτότητας. Σε περίπτωση χρήσης τροποποιημένης εξίσωσης, πρέπει να ελέγχεται αν εξακολουθεί να ισχύει η εξίσωση για τον υπολογισμό της διαλυτότητας σε οκτανόλη. Μια σχηματική απεικόνιση ενός δοχείου ανάδευσης με γυάλινο χιτώνιο, χωρητικότητας περίπου ενός λίτρου, παρουσιάζεται στο προσάρτημα 2. Οι αναλογίες του δοχείου που παρουσιάζονται στο προσάρτημα 2 έχουν αποδειχθεί ευνοϊκές και θα πρέπει να διατηρούνται όταν χρησιμοποιείται συσκευή άλλου μεγέθους,

— κατά το πείραμα αργής ανάδευσης, είναι απαραίτητη η ύπαρξη μέσου διατήρησης της θερμοκρασίας σε σταθερά επίπεδα.

18. Τα δοχεία θα πρέπει να είναι κατασκευασμένα από αδρανές υλικό, έτσι ώστε η προσρόφηση στις επιφάνειες του δοχείου να είναι αμελητέα.

Παρασκευή των διαλυμάτων δοκιμής

19. Ο προσδιορισμός του P_{OW} θα πρέπει να εκτελείται με την υψηλότερης καθαρότητας οκτανόλη-1 που είναι διαθέσιμη στο εμπόριο (τουλάχιστον + 99 %). Συνιστάται καθαρισμός της οκτανόλης-1 μέσω εκχύλισης με οξύ, βάση και νερό και, ακολούθως, ξήρανση. Επιπροσθέτως, είναι δυνατή η απόσταξη για τον καθαρισμό της οκτανόλης-1. Η καθαρισμένη οκτανόλη-1 πρέπει να χρησιμοποιείται για την παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων των ελεγχόμενων ουσιών. Το νερό που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί στον προσδιορισμό του P_{OW} πρέπει να είναι νερό απεσταγμένο σε γυάλινη ή χαλαζιακή συσκευή ή νερό που έχει ληφθεί από σύστημα καθαρισμού ή νερό βαθμού HPLC. Απαιτείται διήθηση μέσω ηθμού των 0,22 μm για το απεσταγμένο νερό και θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται τυφλά διαλύματα ώστε να εξακριβώνεται ότι δεν υπάρχουν προσμείξεις στα συμπυκνωμένα εκχυλίσματα που να παρεμποδίζουν την ελεγχόμενη ουσία. Αν χρησιμοποιείται ηθμός από ίνες γυαλιού, αυτός πρέπει να καθαρίζεται με θέρμανση στους 400 °C για τρεις ώρες τουλάχιστον.

20. Οι δύο διαλύτες υποβάλλονται σε αμοιβαίο κορεσμό πριν από το πείραμα, αφηνόμενοι να φθάσουν σε κατάσταση ισορροπίας σε ένα αρκούντως μεγάλο δοχείο. Αυτό επιτυγχάνεται με αργή ανάδευση του διφασικού συστήματος για δύο ημέρες.

21. Επιλέγεται κατάλληλη συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας και διαλύεται σε οκτανόλη-1 (που έχει κορεσθεί με νερό). Ο συντελεστής κατανομής σε μείγμα οκτανόλης-1/νερού πρέπει να προσδιορίζεται σε αραιά διαλύματα σε οκτανόλη-1 και νερό. Ως εκ τούτου, η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας δεν πρέπει να υπερβαίνει το 70 % της διαλυτότητάς της, με μέγιστη συγκέντρωση 0,1 M και στις δύο φάσεις (1). Τα διαλύματα οκτανόλης-1 που χρησιμοποιούνται για το πείραμα πρέπει να είναι απηλλαγμένα αιωρούμενης στερεάς ελεγχόμενης ουσίας.

22. Κατάλληλη ποσότητα της ελεγχόμενης ουσίας διαλύεται σε οκτανόλη-1 (που έχει κορεσθεί με νερό). Εάν η εκτίμηση του λογαρίθμου του P_{OW} υπερβαίνει το πέντε, θα πρέπει να εξασφαλίζεται ότι τα διαλύματα οκτανόλης-1 που χρησιμοποιούνται για το πείραμα είναι απαλλαγμένα αιωρούμενης στερεάς ελεγχόμενης ουσίας. Για τον σκοπό αυτό, εφαρμόζεται η ακόλουθη διαδικασία για χημικές ουσίες με εκτιμώμενη τιμή λογαρίθμου του $P_{OW} > 5$:

— η ελεγχόμενη ουσία διαλύεται σε οκτανόλη-1 (που έχει κορεσθεί με νερό),

▼M4

— παρέχεται επαρκές χρονικό διάστημα στο διάλυμα ώστε να καθιζήσει η αιωρούμενη στερεά ουσία. Κατά την περίοδο της καθίζησης, παρακολουθείται η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας,

— όταν οι μετρούμενες συγκεντρώσεις στο διάλυμα οκτανόλης-1 φθάσουν σε σταθερές τιμές, το διάλυμα παρακαταθήκης αραιώνεται με κατάλληλο όγκο οκτανόλης-1,

— μετράται η συγκέντρωση του αραιωμένου διαλύματος παρακαταθήκης. Εάν η μετρούμενη συγκέντρωση ανταποκρίνεται στην αραίωση, το αραιωμένο διάλυμα παρακαταθήκης μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο πείραμα αργής ανάδευσης.

Εκχύλιση και ανάλυση των δειγμάτων

23. Για τη δοκιμασία της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να χρησιμοποιείται επικυρωμένη αναλυτική μέθοδος. Οι αναλυτές οφείλουν να αποδεικνύουν ότι οι συγκεντρώσεις στην κορεσμένη με νερό οκτανόλη-1, καθώς και στην κορεσμένη με οκτανόλη-1 υδατική φάση, κατά τη διάρκεια του πειράματος, υπερβαίνουν το μεθοδολογικό όριο ποσοτικού προσδιορισμού των χρησιμοποιούμενων αναλυτικών διαδικασιών. Οι αναλυτικές ανακτήσεις της ελεγχόμενης ουσίας από την υδατική φάση και από τη φάση της οκτανόλης-1 πρέπει να έχουν καθοριστεί πριν από την εκτέλεση του πειράματος, στις περιπτώσεις όπου είναι αναγκαία η εφαρμογή μεθόδων εκχύλισης. Το αναλυτικό σήμα πρέπει να διορθώνεται για να ληφθούν υπόψη τα τυφλά διαλύματα, ενώ πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να είναι αδύνατη η μεταφορά αναλυόμενης ουσίας από το ένα δείγμα στο άλλο.

24. Ενδέχεται να απαιτείται, πριν από την ανάλυση, εκχύλιση της υδατικής φάσης με οργανικό διαλύτη και προσυμπύκνωση του εκχυλίσματος, λόγω των σχετικά χαμηλών συγκεντρώσεων των υδρόφοβων ελεγχόμενων ουσιών στην υδατική φάση. Για τον ίδιο λόγο, είναι αναγκαίο να μειώνονται οι ενδεχόμενες συγκεντρώσεις στα τυφλά διαλύματα. Προς τον σκοπό αυτό, είναι αναγκαίο να χρησιμοποιούνται διαλύτες υψηλής καθαρότητας, κατά προτίμηση διαλύτες για ανάλυση καταλοίπων. Επιπλέον, η χρησιμοποίηση προσεκτικά προκαθαρισμένων γυάλινων σκευών (π.χ. έκπλυση με διαλύτες ή θέρμανση σε αυξημένες θερμοκρασίες) μπορεί να συμβάλει στην αποφυγή διασταυρούμενης μόλυνσης.

25. Εκτίμηση του λογαρίθμου του P_{OW} είναι δυνατόν να ληφθεί μέσω προγράμματος εκτιμήσεων ή με βάση την κρίση των ειδικών. Εάν η τιμή είναι υψηλότερη του έξι, πρέπει να παρακολουθούνται επισταμένως τόσο οι διορθώσεις για το τυφλό διάλυμα, όσο και η μεταφορά της αναλυόμενης ουσίας. Ομοίως, εάν η εκτίμηση του λογαρίθμου P_{OW} υπερβαίνει το έξι, είναι υποχρεωτική η χρήση υποκατάστατου προτύπου για τη διόρθωση της ανάκτησης, ώστε να είναι δυνατή η επίτευξη υψηλών συντελεστών προσυμπύκνωσης. Υπάρχουν στο εμπόριο αρκετά προγράμματα λογισμικού για την εκτίμηση του λογαρίθμου του P_{OW} [1], π.χ. Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) και ACD log P (19). Περιγραφές των προσεγγίσεων εκτίμησης είναι διαθέσιμες στη βιβλιογραφία (20-22).

26. Τα όρια ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) για τον προσδιορισμό της ελεγχόμενης ουσίας σε οκτανόλη-1 και νερό καθορίζονται με τη χρήση αποδεκτών μεθόδων. Κατά γενικό κανόνα, το μεθοδολογικό όριο ποσοτικού προσδιορισμού μπορεί να οριστεί ως η συγκέντρωση σε νερό ή σε οκτανόλη-1 που παράγει λόγο σήματος προς θόρυβο ίσο προς δέκα. Πρέπει να επιλέγεται κατάλληλη μέθοδος εκχύλισης και προσυμπύκνωσης και να καθορίζονται οι αναλυτικές ανακτήσεις. Επιλέγεται κατάλληλος συντελεστής προσυμπύκνωσης, προκειμένου να λαμβάνεται, στον αναλυτικό προσδιορισμό, σήμα του απαιτούμενου μεγέθους.

[1] Η πληροφορία αυτή παρέχεται μόνο για τη διευκόλυνση των χρηστών. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλα, ισοδύναμα προγράμματα υπολογιστών, εφόσον έχει αποδειχθεί ότι αποδίδουν τα ίδια αποτελέσματα.

▼M4

27. Βάσει των παραμέτρων της αναλυτικής μεθόδου και των αναμενόμενων συγκεντρώσεων, καθορίζεται ένα κατά προσέγγιση απαιτούμενο μέγεθος δείγματος για τον ακριβή προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ένωσης. Πρέπει να αποφεύγεται η χρήση υδατικών δειγμάτων των οποίων το μέγεθος είναι υπερβολικά μικρό για τη λήψη κατάλληλου αναλυτικού σήματος. Επίσης, θα πρέπει να αποφεύγεται η χρήση υπερβολικά μεγάλων υδατικών δειγμάτων, καθώς, σε αντίθετη περίπτωση, ενδέχεται να απομένει πολύ λίγο νερό για τον ελάχιστο απαιτούμενο αριθμό αναλύσεων (n = 5). Στο προσάρτημα 1, η ελάχιστη απαιτούμενη ποσότητα δείγματος υποδεικνύεται σε συνάρτηση με τη χωρητικότητα του δοχείου, καθώς και με το LOD και τη διαλυτότητα της ελεγχόμενης ουσίας.

28. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ελεγχόμενων ουσιών διενεργείται με σύγκριση με τις καμπύλες βαθμονόμησης (διακρίβωσης) της αντίστοιχης ένωσης. Οι συγκεντρώσεις των αναλυόμενων δειγμάτων πρέπει να περικλείονται από τις συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων.

29. Για ελεγχόμενες ουσίες με εκτίμηση λογαρίθμου του P_{OW} υψηλότερη του έξι, θα πρέπει να εισάγεται στο υδατικό δείγμα ένα υποκατάστατο πρότυπο πριν από την εκχύλιση, ώστε να καταγράφονται οι απώλειες που προκύπτουν κατά την εκχύλιση και την προ-συγκέντρωση των υδατικών δειγμάτων. Προκειμένου η διόρθωση ανάκτησης να είναι ακριβής, τα υποκατάστατα πρέπει να έχουν ιδιότητες παρεμφερείς ή πανομοιότυπες με αυτές της ελεγχόμενης ουσίας. Κατά προτίμηση, χρησιμοποιούνται για τον σκοπό αυτό (σταθερά) ανάλογα των ουσιών που ενδιαφέρουν, τα οποία είναι σημασμένα με ισότοπα (π.χ. υπερδευτεριωμένα ή σημασμένα με ^{13}C). Εάν δεν είναι δυνατή η χρήση σταθερών αναλόγων τα οποία είναι σημασμένα με ισότοπα, π.χ. ^{13}C ή ^{2}H, θα πρέπει να αποδεικνύεται, με αξιόπιστα στοιχεία από τη βιβλιογραφία, ότι οι φυσικοχημικές ιδιότητες του υποκατάστατου είναι σχεδόν πανομοιότυπες με αυτές της ελεγχόμενης ουσίας. Κατά την εκχύλιση υγρού-υγρού της υδατικής φάσης, είναι δυνατόν να σχηματιστούν γαλακτώματα. Ο σχηματισμός τους μπορεί να περιοριστεί με την προσθήκη άλατος, μετά την οποία το γαλάκτωμα αφήνεται σε ηρεμία κατά τη διάρκεια της νύχτας. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση και την προσυμπύκνωση των δειγμάτων πρέπει να αναφέρονται.

30. Τα δείγματα που λαμβάνονται από τη φάση της οκτανόλης-1 μπορούν, εάν χρειαστεί, να αραιωθούν με κατάλληλο διαλύτη πριν από την ανάλυση. Επίσης, συνιστάται να χρησιμοποιούνται υποκατάστατα πρότυπα για τη διόρθωση ανάκτησης στην περίπτωση των ουσιών για τις οποίες τα πειράματα ανάκτησης έχουν δείξει υψηλό βαθμό διακύμανσης (σχετική τυπική απόκλιση > 10 %).

31. Πρέπει να αναφέρονται οι λεπτομέρειες της αναλυτικής μεθόδου. Μεταξύ αυτών συγκαταλέγονται η μέθοδος εκχύλισης, οι συντελεστές προσυμπύκνωσης και αραίωσης, οι παράμετροι των οργάνων, οι πάγιες πρακτικές βαθμονόμησης, η κλίμακα βαθμονόμησης, η αναλυτική ανάκτηση της ελεγχόμενης ουσίας από το νερό, η προσθήκη υποκατάστατων προτύπων για τη διόρθωση ανάκτησης, οι τιμές των τυφλών διαλυμάτων, τα όρια ανίχνευσης και τα όρια ποσοτικού προσδιορισμού.

Εκτέλεση της δοκιμής

Βέλτιστοι λόγοι όγκων οκτανόλης-1/νερού

32. Κατά την επιλογή των όγκων νερού και οκτανόλης-1, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη το LOQ σε οκτανόλη-1 και σε νερό, οι συντελεστές προσυμπύκνωσης που χρησιμοποιούνται στα υδατικά δείγματα, οι όγκοι των δειγμάτων οκτανόλης-1 και νερού και οι αναμενόμενες συγκεντρώσεις. Για πειραματικούς λόγους, ο όγκος της οκτανόλης-1 στο σύστημα αργής ανάδευσης πρέπει να επιλέγεται κατά τρόπον ώστε η στιβάδα της να έχει ικανοποιητικό πάχος (> 0,5 cm), προκειμένου να καθίσταται δυνατή η δειγματοληψία από τη φάση της οκτανόλης-1, χωρίς αυτή να διαταράσσεται.

33. Οι τυπικοί λόγοι φάσεων που χρησιμοποιούνται για τους προσδιορισμούς ενώσεων με λογάριθμο του P_{OW} 4,5 και άνω, είναι 20 έως 50 ml οκτανόλης-1 και 950 έως 980 ml νερού σε δοχείο χωρητικότητας ενός λίτρου.

▼M4

Συνθήκες δοκιμής

34. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, το δοχείο αντίδρασης θερμοστατείται ώστε να μειώνεται η διακύμανση της θερμοκρασίας σε λιγότερο από 1 °C. Η δοκιμασία θα πρέπει να εκτελείται σε θερμοκρασία 25 °C.

35. Το πειραματικό σύστημα πρέπει να προφυλάσσεται από το φως της ημέρας, είτε με την εκτέλεση του πειράματος σε σκοτεινό θάλαμο, είτε με την κάλυψη του δοχείου αντίδρασης με φύλλο αλουμινίου.

36. Το πείραμα πρέπει να εκτελείται σε περιβάλλον απαλλαγμένο, στο μέτρο του δυνατού, από σκόνη.

37. Το σύστημα οκτανόλης-1/νερού αναδεύεται έως ότου επιτευχθεί ισορροπία. Σε ένα πιλοτικό πείραμα, υπολογίζεται η διάρκεια της περιόδου εξισορρόπησης με την εκτέλεση πειράματος αργής ανάδευσης και τη λήψη δειγμάτων νερού και οκτανόλης-1 ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Οι χρόνοι δειγματοληψίας πρέπει να απέχουν μεταξύ τους τουλάχιστον πέντε ώρες.

38. Για κάθε προσδιορισμό του P_{OW} θα πρέπει να εκτελούνται τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα αργής ανάδευσης.

Προσδιορισμός του χρόνου εξισορρόπησης

39. Θεωρείται ότι επιτυγχάνεται ισορροπία όταν η παλινδρόμηση του λόγου συγκεντρώσεων σε οκτανόλη-1/νερό συναρτήσει του χρόνου κατά τη διάρκεια μιας χρονικής περιόδου τεσσάρων χρονικών σημείων δίνει κλίση που δεν διαφέρει σημαντικά από το μηδέν στο επίπεδο p του 0,05. Ο ελάχιστος χρόνος εξισορρόπησης είναι μία ημέρα πριν από την έναρξη της δειγματοληψίας. Κατά κανόνα, η δειγματοληψία ουσιών με εκτιμώμενο λογάριθμο του P_{OW} μικρότερο του πέντε μπορεί να πραγματοποιείται τη δεύτερη και την τρίτη ημέρα. Όταν πρόκειται για περισσότερο υδρόφοβες ενώσεις, ενδέχεται να πρέπει να παραταθεί η εξισορρόπηση. Για μια ένωση με λογάριθμο του P_{OW} της τάξης του 8,23 (δεκαχλωροδιφαινύλιο), 144 ώρες ήταν αρκετές για την εξισορρόπηση. Η ισορροπία εκτιμάται με επανειλημμένη δειγματοληψία από ένα και μόνο δοχείο.

Έναρξη του πειράματος

40. Στην αρχή του πειράματος, το δοχείο αντίδρασης πληρούται με νερό κορεσμένο με οκτανόλη-1. Πρέπει να εξασφαλίζεται επαρκές χρονικό διάστημα για την επίτευξη της ρυθμισμένης θερμοκρασίας.

41. Προστίθεται προσεκτικά στο δοχείο αντίδρασης η επιθυμητή ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας (διαλυμένης στον απαιτούμενο όγκο κορεσμένης με νερό οκτανόλης-1). Πρόκειται για κρίσιμο στάδιο του πειράματος, δεδομένου ότι πρέπει να αποφεύγεται η τυρβώδης ανάμειξη των δύο φάσεων. Προς τον σκοπό αυτό, η φάση της οκτανόλης-1 φέρεται αργά με σιφώνιο που ακουμπά στο τοίχωμα του δοχείου του πειράματος, κοντά στην επιφάνεια του νερού. Στη συνέχεια. αυτή κυλά κατά μήκος του γυάλινου τοιχώματος και σχηματίζει υμένιο πάνω από την υδατική φάση. Πρέπει πάντοτε να αποφεύγεται η μετάγγιση της οκτανόλης-1 απευθείας στο δοχείο· απαγορεύεται η άμεση πτώση σταγόνων οκτανόλης-1 στο νερό.

42. Μετά την έναρξη της ανάδευσης, πρέπει να αυξάνεται με αργούς ρυθμούς η ταχύτητα ανάδευσης. Εάν οι συσκευές ανάδευσης δεν μπορούν να ρυθμιστούν καταλλήλως, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μετασχηματιστής. Η ταχύτητα ανάδευσης πρέπει να ρυθμίζεται κατά τρόπο ώστε να δημιουργείται στρόβιλος βάθους 0,5 έως 2,5 cm στη μεσεπιφάνεια νερού/οκτανόλης-1. Η ταχύτητα ανάδευσης θα πρέπει να μειώνεται εάν το βάθος του στροβίλου υπερβεί τα 2,5 cm. Σε αντίθετη περίπτωση, ενδέχεται να σχηματιστούν μικροσταγονίδια οκτανόλης-1 στην υδατική φάση, προκαλώντας υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας στο νερό. Η μέγιστη ταχύτητα ανάδευσης των 2,5 cm συνιστάται βάσει των ευρημάτων της μελέτης επικύρωσης με κυκλική δοκιμή (5). Αποτελεί συμβιβασμό μεταξύ της επίτευξης ταχείας εξισορρόπησης και του περιορισμού του σχηματισμού μικροσταγονιδίων οκτανόλης-1.

▼**M4**

Δειγματοληψία και κατεργασία δείγματος

43. Ο αναδευτήρας πρέπει να τίθεται εκτός λειτουργίας πριν από τη δειγματοληψία και πρέπει να επιτυγχάνεται η ακινησία των υγρών. Μετά την ολοκλήρωση της δειγματοληψίας, ο αναδευτήρας τίθεται εκ νέου σε λειτουργία με αργούς ρυθμούς, όπως περιγράφεται ανωτέρω, και στη συνέχεια η ταχύτητα ανάδευσης αυξάνεται σταδιακά.

44. Τα δείγματα της υδατικής φάσης λαμβάνονται από στρόφιγγα που βρίσκεται στον πυθμένα του δοχείου αντίδρασης. Πάντοτε πρέπει να απορρίπτεται ο νεκρός όγκος νερού που περιέχεται στη στρόφιγγα (περίπου 5 ml στο δοχείο που εμφαίνεται στο προσάρτημα 2). Το νερό στις στρόφιγγες δεν αναδεύεται και, ως εκ τούτου, δεν βρίσκεται σε ισορροπία με τον κύριο όγκο. Σημειώνεται ο όγκος των υδατικών δειγμάτων και εξασφαλίζεται ότι η ποσότητα της ελεγχόμενης ουσίας που περιέχεται στο απορριπτόμενο νερό συνυπολογίζεται στο ισοζύγιο μάζας. Οι απώλειες μέσω εξάτμισης πρέπει να ελαχιστοποιούνται, με μέριμνα για την ομαλή ροή του νερού στη διαχωριστική χοάνη, ώστε να μη διαταράσσεται η στιβάδα νερού/οκτανόλης-1.

45. Τα δείγματα οκτανόλης-1 λαμβάνονται με την αφαίρεση γνωστού κλάσματος (περίπου 100 μl) από τη στιβάδα της οκτανόλης-1, με τη βοήθεια σύριγγας των 100 μικρολίτρων από γυαλί και μέταλλο. Πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μη διαταράσσεται η οριακή στιβάδα. Καταγράφεται ο όγκος του υγρού δείγματος. Επαρκεί μικρό γνωστό κλάσμα, δεδομένου ότι το δείγμα οκτανόλης-1 θα αραιωθεί.

46. Πρέπει να αποφεύγονται οι περιττές μεταφορές των δειγμάτων. Προς τον σκοπό αυτό, η ποσότητα του δείγματος πρέπει να προσδιορίζεται με σταθμική ανάλυση. Σε περίπτωση υδατικών δειγμάτων, αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη συλλογή του υδατικού δείγματος σε διαχωριστική χοάνη, η οποία ήδη περιέχει τον απαιτούμενο όγκο διαλύτη.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

47. Σύμφωνα με την παρούσα μέθοδο δοκιμών, ο P_{OW} προσδιορίζεται με την εκτέλεση τριών πειραμάτων αργής ανάδευσης (τρεις πειραματικές μονάδες) με την ελεγχόμενη ένωση, υπό τις ίδιες συνθήκες. Η παλινδρόμηση που χρησιμοποιείται για να καταδειχθεί η επίτευξη ισορροπίας θα πρέπει να βασίζεται στα αποτελέσματα τουλάχιστον τεσσάρων προσδιορισμών του C_O/C_W σε διαδοχικά χρονικά σημεία. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατόν να υπολογιστεί η διασπορά, ως μέτρο της αβεβαιότητας της μέσης τιμής που λαμβάνεται από κάθε πειραματική μονάδα.

48. Ο P_{OW} μπορεί να χαρακτηριστεί από τη διασπορά των δεδομένων που λαμβάνονται από κάθε πειραματική μονάδα. Η πληροφορία αυτή χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του P_{OW} ως σταθμισμένου μέσου όρου των αποτελεσμάτων των επιμέρους πειραματικών μονάδων. Προς τον σκοπό αυτόν, χρησιμοποιείται ως στάθμιση το αντίστροφο της διασποράς των αποτελεσμάτων των πειραματικών μονάδων. Κατά συνέπεια, τα δεδομένα που παρουσιάζουν μεγάλη μεταβλητότητα (εκφραζόμενη ως διασπορά) και, συνεπώς, χαρακτηρίζονται από χαμηλότερη αξιοπιστία, επηρεάζουν λιγότερο τα αποτελέσματα απ' ό,τι τα δεδομένα με χαμηλή διασπορά.

49. Κατ' αναλογία, υπολογίζεται η σταθμισμένη τυπική απόκλιση, η οποία χαρακτηρίζει την επαναληψιμότητα της μέτρησης του P_{OW}. Μια χαμηλή τιμή σταθμισμένης τυπικής απόκλισης υποδηλώνει ότι ο προσδιορισμός του P_{OW} εμφανίζει μεγάλη ενδοεργαστηριακή επαναληψιμότητα. Η επίσημη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων περιγράφεται κατωτέρω.

▼M4

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Κατάδειξη της επίτευξης ισορροπίας

50. Υπολογίζεται για κάθε χρόνο δειγματοληψίας ο λογάριθμος του λόγου των συγκεντρώσεων της ελεγχόμενης ουσίας σε οκτανόλη-1 και σε νερό [log (C_O/C_w)]. Η επίτευξη χημικής ισορροπίας καταδεικνύεται με γραφική παράσταση του λόγου αυτού συναρτήσει του χρόνου. Το οριζόντιο τμήμα της συγκεκριμένης γραφικής παράστασης, που στηρίζεται σε τέσσερα τουλάχιστον διαδοχικά χρονικά σημεία, υποδηλώνει ότι έχει επιτευχθεί ισορροπία και ότι η ένωση έχει όντως διαλυθεί στην οκτανόλη-1. Εάν αυτό δεν συμβαίνει, η δοκιμή θα πρέπει να συνεχίζεται έως ότου τέσσερα διαδοχικά χρονικά σημεία να δίνουν κλίση που δεν διαφέρει σημαντικά από το 0 στο επίπεδο p του 0,05, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο λογάριθμος του C_o/C_w είναι ανεξάρτητος του χρόνου.

Υπολογισμός του λογαρίθμου του P_{OW}

51. Η τιμή του λογαρίθμου του P_{OW} της πειραματικής μονάδας υπολογίζεται ως η σταθμισμένη μέση τιμή του λογαρίθμου του C_o/C_w για το τμήμα της καμπύλης του λογαρίθμου του C_o/C_w συναρτήσει του χρόνου, για το οποίο έχει καταδειχθεί ισορροπία. Ο σταθμισμένος μέσος όρος υπολογίζεται με στάθμιση των δεδομένων με το αντίστροφο της διασποράς, ώστε η επίδρασή τους στο τελικό αποτέλεσμα να είναι αντιστρόφως ανάλογη της αβεβαιότητάς τους.

Μέσος λογάριθμος του P_{OW}

52. Η μέση τιμή του λογαρίθμου του P_{OW} των διαφόρων πειραματικών μονάδων υπολογίζεται ως ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων των επιμέρους πειραματικών μονάδων, σταθμισμένων με τις αντίστοιχες διασπορές.

Ο υπολογισμός πραγματοποιείται ως εξής:

$$\log P_{OW,Av} = (\Sigma w_i \times \log P_{OW,i}) \times (\Sigma w_i)^{-1}$$

όπου

$\log P_{OW,i}$ = η τιμή του λογαρίθμου του P_{OW} της επιμέρους πειραματικής μονάδας i·

$\log P_{OW,Av}$ = η σταθμισμένη μέση τιμή των επιμέρους προσδιορισμών του λογαρίθμου του P_{OW}·

w_i = το στατιστικό βάρος που αποδίδεται στην τιμή του λογαρίθμου του P_{OW} της πειραματικής μονάδας i.

Ως w_i χρησιμοποιείται το αντίστροφο της διασποράς του λογαρίθμου του $P_{OW,i}$ ($w_i = \text{var}(\log P_{OW,i})^{-1}$)

53. Το σφάλμα του μέσου όρου του λογαρίθμου του P_{OW} εκτιμάται ως η επαναληψιμότητα του log C_o/C_w που έχει προσδιοριστεί κατά τη φάση ισορροπίας στις επιμέρους πειραματικές μονάδες. Εκφράζεται ως η σταθμισμένη τυπική απόκλιση του λογαρίθμου του $P_{OW,Av}$ ($\sigma_{\log Pow,Av}$), η οποία αποτελεί, με τη σειρά της, μέτρο του σφάλματος που συνδέεται με τον λογάριθμο του $P_{OW,Av}$. Η σταθμισμένη τυπική απόκλιση μπορεί να υπολογιστεί από τη σταθμισμένη διασπορά ($var_{\log Pow,Av}$) ως εξής:

$$var_{\log Pow,Av} = (\Sigma w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\Sigma w_i \times (n-1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log Pow,Av} = (var_{\log Pow,Av})^{0,5}$$

Το σύμβολο n παριστά τον αριθμό των πειραματικών μονάδων.

▼M4

Έκθεση δοκιμής

54. Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Ελεγχόμενη ουσία:

— κοινή ονομασία, χημική ονομασία, αριθμός CAS, συντακτικός τύπος (συμπεριλαμβανομένης της θέσης του ιχνηθέτη όταν χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένη ουσία) και σημαντικές φυσικοχημικές ιδιότητες (βλέπε παράγραφο 17),

— καθαρότητα (ξένες προσμείξεις) της ελεγχόμενης ουσίας,

— καθαρότητα του ιχνηθέτη των σημασμένων χημικών ουσιών και γραμμομοριακή δραστικότητα (κατά περίπτωση),

— προκαταρκτική εκτίμηση του λογαρίθμου του P_{ow}, καθώς και μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της τιμής.

Συνθήκες δοκιμής:

— ημερομηνίες διεξαγωγής των μελετών,

— θερμοκρασία κατά τη διάρκεια του πειράματος,

— όγκοι οκτανόλης-1 και νερού στην αρχή της δοκιμής,

— όγκοι ληφθέντων δειγμάτων οκτανόλης-1 και νερού,

— όγκοι οκτανόλης-1 και νερού που απέμειναν στα δοχεία της δοκιμής·

— περιγραφή των δοχείων της δοκιμής και των συνθηκών ανάδευσης (σχήμα της ράβδου ανάδευσης και του δοχείου της δοκιμής, ύψος του στροβίλου, σε mm, και ταχύτητα ανάδευσης, εάν είναι γνωστή),

— αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της ελεγχόμενης ουσίας και το μεθοδολογικό όριο ποσοτικού προσδιορισμού,

— χρόνοι δειγματοληψιών,

— pH της υδατικής φάσης και χρησιμοποιηθέντα ρυθμιστικά διαλύματα, σε περίπτωση ρύθμισης του pH προκειμένου για μόρια που μπορούν να ιοντιστούν,

— πλήθος προσδιορισμών (replicates).

Αποτελέσματα:

— επαναληψιμότητα και ευαισθησία των αναλυτικών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν,

— προσδιορισθείσες συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας σε οκτανόλη-1 και νερό, σε συνάρτηση με τον χρόνο,

— κατάδειξη του ισοζυγίου μάζας,

— θερμοκρασία και τυπική απόκλιση ή εύρος θερμοκρασιών κατά τη διεξαγωγή του πειράματος,

— παλινδρόμηση του λόγου συγκεντρώσεων σε συνάρτηση με τον χρόνο,

— μέση τιμή του λογαρίθμου του $P_{ow,Av}$ και τυπικό σφάλμα της τιμής αυτής,

— συζήτηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων,

▼**M4**

— παραδείγματα ανεπεξέργαστων αριθμητικών δεδομένων αντιπροσωπευτικών αναλύσεων (όλα τα ανεπεξέργαστα δεδομένα πρέπει να αποθηκεύονται σύμφωνα με τα πρότυπα ορθής εργαστηριακής πρακτικής), συμπεριλαμβανομένων των ανακτήσεων των υποκατάστατων και του πλήθους επιπέδων που χρησιμοποιήθηκαν στη βαθμονόμηση (με τα κριτήρια για τον συντελεστή συσχέτισης της καμπύλης βαθμονόμησης), και αποτελέσματα της διασφάλισης ποιότητας/του ποιοτικού ελέγχου (QA/QC),

— όταν είναι διαθέσιμη: έκθεση επικύρωσης της διαδικασίας δοκιμασιών (πρέπει να αναφέρεται στη βιβλιογραφία).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) De Bruijn J.H.M., Busser F., Seinen W., Hermens J. (1989), Determination of octanol/water partition coefficients with the «slow-stirring» method. Environ. Toxicol. Chem. 8: 499-512.

(2) Κεφάλαιο Α.8 του παρόντος παραρτήματος: Συντελεστής κατανομής.

(3) Κεφάλαιο Α.8 του παρόντος παραρτήματος: Συντελεστής κατανομής.

(4) OECD (2000), OECD Draft Guideline for the Testing of Chemicals: 122 Partition Coefficient (n-Octanol/Water): pH-Metric Method for Ionisable Substances, Paris.

(5) Tolls J. (2002), Partition Coefficient 1-Octanol/Water (Pow) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report, RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.

(6) Boethling R.S., Mackay D. (eds.) (2000), Handbook of property estimation methods for chemicals, Lewis Publishers Boca Raton, FL, USA.

(7) Schwarzenbach R.P., Gschwend P.M., Imboden D.M. (1993), Environmental Organic Chemistry, Wiley, New York, NY.

(8) Arnold C.G., Widenhaupt A., David M.M., Müller S.R., Haderlein S.B., Schwarzenbach R.P. (1997), Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition, *Environ. Sci. Technol.* 31: 2596-2602.

(9) OECD (1981) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 112 Dissociation Constants in Water, Paris.

(10) Κεφάλαιο Α.6 του παρόντος παραρτήματος: Υδατοδιαλυτότητα.

(11) Κεφάλαιο Γ.7 του παρόντος παραρτήματος: Αποικοδόμηση — Αβιοτική αποικοδόμηση: υδρόλυση ως συνάρτηση του pH.

(12) Κεφάλαιο Γ.4 — Μέρη II-VII (μέθοδοι Α έως Ζ) του παρόντος παραρτήματος: Προσδιορισμός «άμεσης» βιοαποικοδομησιμότητας.

(13) Κεφάλαιο Α.4 του παρόντος παραρτήματος: Τάση ατμών.

(14) Pinsuwan S., Li A. και Yalkowsky S.H. (1995), «Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients», *J. Chem. Eng. Data.* 40: 623-626.

(15) Lyman W.J. (1990), Solubility in water, στο: Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds, Lyman W.J., Reehl W.F., Rosenblatt D.H., Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2-1 έως 2-52.

(16) Leo A., Weininger D. (1989), Medchem Software Manual, Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.

(17) Meylan W. (1993), SRC-LOGKOW for Windows, SRC, Syracuse, N.Y.

(18) Compudrug L. (1992), ProLogP, Compudrug, Ltd, Budapest.

(19) ACD. ACD logP, Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Canada, 2001.

▼**M4**

(20) Lyman W.J. (1990), Octanol/water partition coefficient, στο Lyman W.J., Reehl W.F., Rosenblatt D.H., (eds), *Handbook of chemical property estimation*, American Chemical Society, Washington, D.C.

(21) Rekker R.F., de Kort H.M. (1979), «The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set», *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 14: 479-488.

(22) Jübermann O., (1958). Houben-Weyl, ed., *Methoden der Organischen Chemie*: 386-390.

▼M4

Προσάρτημα 1

Υπολογιστικό φύλλο για τον υπολογισμό των ελάχιστων όγκων νερού που απαιτούνται για την ανίχνευση ελεγχόμενων ουσιών με διαφορετικό λογάριθμο του P_{OW} στην υδατική φάση

Παραδοχές:

— Μέγιστος όγκος επιμέρους γνωστών κλασμάτων = 10 % του συνολικού όγκου· 5 γνωστά κλάσματα = 50 % του συνολικού όγκου.

— Συγκέντρωση των ελεγχόμενων ουσιών = 0,7 × διαλυτότητα και στις δύο φάσεις. Σε περίπτωση χαμηλότερων συγκεντρώσεων, απαιτούνται μεγαλύτεροι όγκοι.

— Όγκος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης (LOD) = 100 ml.

— Οι σχέσεις λογάριθμος του P_{ow} προς λογάριθμο του S_w και λογάριθμος του P_{ow} προς SR (S_{oct}/S_w) παριστούν εύλογα τις σχέσεις στην περίπτωση των ελεγχόμενων ουσιών.

Εκτίμηση του S_w

log P_{ow}	Εξίσωση	log S_w	S_w (mg/l)
4	(–)0,922 × log P_{ow} + 4,184	0,496	3 133E+00
4,5	(–)0,922 × log P_{ow} + 4,184	0,035	1 084E+00
5	(–)0,922 × log P_{ow} + 4,184	– 0,426	3 750E-01
5,5	(–)0,922 × log P_{ow} + 4,184	– 0,887	1 297E-01
6	(–)0,922 × log P_{ow} + 4,184	– 1,348	4 487E-02
6,5	(–)0,922 × log P_{ow} + 4,184	– 1,809	1 552E-02
7	(–)0,922 × log P_{ow} + 4,184	– 2,270	5 370E-03
7,5	(–)0,922 × log P_{ow} + 4,184	– 2,731	1 858E-03
8	(–)0,922 × log P_{ow} + 4,184	– 3,192	6 427E-04

Εκτίμηση του S_{oct}

log P_{ow}	εξίσωση	S_{oct} (mg/l)
4	log P_{ow} = 0,88log SR + 0,41	3 763E+04
4,5	log P_{ow} = 0,88log SR + 0,42	4 816E+04
5	log P_{ow} = 0,88log SR + 0,43	6 165E+04
5,5	log P_{ow} = 0,88log SR + 0,44	7 890E+04
6	log P_{ow} = 0,88log SR + 0,45	1 010E+05
6,5	log P_{ow} = 0,88log SR + 0,46	1 293E+05
7	log P_{ow} = 0,88log SR + 0,47	1 654E+05
7,5	log P_{ow} = 0,88log SR + 0,48	2 117E+05
8	log P_{ow} = 0,88log SR + 0,49	2 710E+05

▼**M4**

Συνολική μάζα ελεγχόμενης ουσίας (mg)	$Mass_{oct}/Mass_{water}$	$Mass_{H2O}$ (mg)	$Conc_{H2O}$ (mg/l)	$Mass_{oct}$ (mg)	$Conc_{oct}$ (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333
1 686	1 664	1,0127	1,0660	1 685	33 709
2 158	5 263	0,4099	0,4315	2 157	43 149
2 762	16 644	0,1659	0,1747	2 762	55 230
3 535	52 632	0,0672	0,0707	3 535	70 691
4 524	166 436	0,0272	0,0286	4 524	90 480
5 790	526 316	0,0110	0,0116	5 790	115 807
7 411	1 664 357	0,0045	0,0047	7 411	148 223
9 486	5 263 158	0,0018	0,0019	9 486	189 713

Υπολογισμός όγκων

Ελάχιστος απαιτούμενος όγκος για τη φάση H_2O σε κάθε συγκέντρωση LOD

log K_{ow}	LOD (micrograms/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4		0,04	0,38	3,80	38	380
4,5		0,09	0,94	9,38	94	938
5		0,23	2,32	23,18	232	2 318
5,5		0,57	5,73	57,26	573	5 726
6		1,41	14,15	141	1 415	14 146
6,5		3,50	34,95	350	3 495	34 950
7		8,64	86,35	864	8 635	86 351
7,5		21,33	213	2 133	21 335	213 346
8		52,71	527	5 271	52 711	527 111
Χρησιμοποιούμενος όγκος για το LOD (l)	0,1					

Κλείδα των υπολογισμών

Αντιπροσωπεύει < 10 % του συνολικού όγκου της υδατικής φάσης, δοχείο εξισορρόπησης 1 λίτρου.

Αντιπροσωπεύει < 10 % του συνολικού όγκου της υδατικής φάσης, δοχείο εξισορρόπησης 2 λίτρων.

Αντιπροσωπεύει < 10 % του συνολικού όγκου της υδατικής φάσης, δοχείο εξισορρόπησης 5 λίτρων.

Αντιπροσωπεύει < 10 % του συνολικού όγκου της υδατικής φάσης, δοχείο εξισορρόπησης 10 λίτρου.

Υπερβαίνει το 10 % ακόμη και του δοχείου εξισορρόπησης 10 λίτρων.

▼**M4**

Ανασκόπηση των απαιτούμενων όγκων ως συνάρτηση της υδατοδιαλυτότητας και του λογαρίθμου του P_{ow}

Ελάχιστος απαιτούμενος όγκος για τη φάση H_2O σε κάθε συγκέντρωση LOD (ml)

log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (micrograms/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	0,5		0,20	2,03	20,34	203,37	2 033,67
5	1		0,09	0,87	8,69	86,90	869,01
	0,5		0,17	1,74	17,38	173,80	1 738,02
	0,375		0,23	2,32	23,18	231,75	2 317,53
	0,2		0,43	4,35	43,45	434,51	4 345,05
5,5	0,4		0,19	1,86	18,57	185,68	1 856,79
	0,2		0,37	3,71	37,14	371,36	3 713,59
	0,1		0,74	7,43	74,27	742,72	7 427,17
	0,05		1,49	14,85	148,54	1 485,43	14 854,35
6	0,1		0,63	6,35	63,48	634,80	6 347,95
	0,05		1,27	12,70	126,96	1 269,59	12 695,91
	0,025		2,54	25,39	253,92	2 539,18	25 391,82
	0,0125		5,08	50,78	507,84	5 078,36	50 783,64
6,5	0,025		2,17	21,70	217,02	2 170,25	21 702,46
	0,0125		4,34	43,40	434,05	4 340,49	43 404,93
	0,006		9,04	90,43	904,27	9 042,69	90 426,93
	0,003		18,09	180,85	1 808,54	18 085,39	180 853,86
7	0,006		7,73	77,29	772,89	7 728,85	77 288,50
	0,003		15,46	154,58	1 545,77	15 457,70	154 577,01
	0,0015		23,19	231,87	2 318,66	23 186,55	231 865,51
	0,001		46,37	463,73	4 637,31	46 373,10	463 731,03
7,5	0,002		19,82	198,18	1 981,77	19 817,73	198 177,33
	0,001		39,64	396,35	3 963,55	39 635,47	396 354,66
	0,0005		79,27	792,71	7 927,09	79 270,93	792 709,32

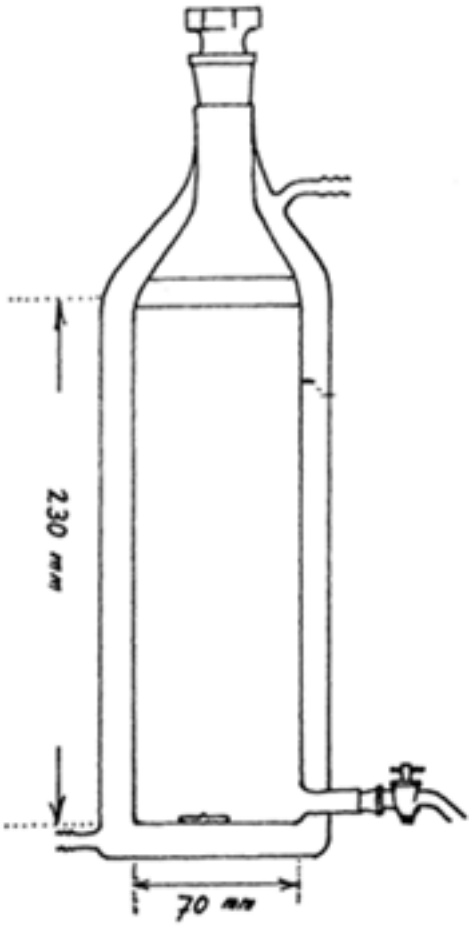
▼**M4**

log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (micrograms/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
	0,00025		158,54	1 585,42	15 854,19	158 541,86	1 585 418,63
8	0,001		33,88	338,77	3 387,68	33 876,77	338 767,72
	0,0005		67,75	677,54	6 775,35	67 753,54	677 535,44
	0,00025		135,51	1 355,07	13 550,71	135 507,09	1 355 070,89
	0,000125		271,01	2 710,14	27 101,42	271 014,18	2 710 141,77
Χρησιμοποιούμενος όγκος για το LOD (l)		0,1					

▼**M4**

Προσάρτημα 2

Παράδειγμα δοκιμαστικού δοχείου με γυάλινο χιτώνιο για τον προσδιορισμό του P_{OW} με πείραμα αργής ανάδευσης



▼M6

Α.24. ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ (Ν-ΟΚΤΑΝΟΛΗ/ΝΕΡΟ), ΜΕΘΟΔΟΣ HPLC (ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 117 του ΟΟΣΑ (2004).

1. Ως συντελεστής κατανομής (P) ορίζεται ο λόγος των συγκεντρώσεων ισορροπίας μιας διαλυμένης ουσίας σε διφασικό σύστημα που αποτελείται από δύο σε μεγάλο βαθμό μη αναμείξιμους διαλύτες. Στην περίπτωση n-οκτανόλης και νερού,

$$P_{ow} = \frac{C_n - \text{οκτανόλη}}{C_{\text{νερό}}}$$

Επειδή ο συντελεστής κατανομής είναι το πηλίκο δύο συγκεντρώσεων, είναι αδιάστατο μέγεθος και δίνεται συνήθως με τη μορφή του δεκαδικού λογαρίθμου του.

2. Ο P_{ow} συνιστά βασική παράμετρο στις μελέτες σχετικά με τη συμπεριφορά των χημικών ουσιών στο περιβάλλον. Έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει εξαιρετικά σημαντική σχέση μεταξύ του P_{ow} ουσιών σε μη ιοντισμένη μορφή και της βιοσυσσώρευσής τους στα ψάρια. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι ο P_{ow} συνιστά χρήσιμη παράμετρο για την πρόβλεψη της προσρόφησης στο έδαφος και τα ιζήματα, καθώς και για τον προσδιορισμό ποσοτικών σχέσεων δομής-δράσης για μεγάλο φάσμα βιολογικών επιδράσεων.

3. Η αρχική πρόταση για τη συγκεκριμένη μέθοδο δοκιμών βασιζόταν σε άρθρο των C.V. Eadsforth και P. Moser (1). Η ανάπτυξη της μεθόδου δοκιμών και η διεργαστηριακή συγκριτική δοκιμή σε επίπεδο ΟΟΣΑ συντονίστηκαν από την Υπηρεσία Περιβάλλοντος (Umweltbundesamt) της Ομοσπονδιακής Δημοκρατίας της Γερμανίας κατά τη διάρκεια του 1986 (2).

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

4. Οι τιμές του log P_{ow} στην κλίμακα – 2 έως 4 (περιστασιακά έως 5 και άνω) ([1]) μπορούν να προσδιορίζονται πειραματικά με τη μέθοδο της ανακινούμενης φιάλης (κεφάλαιο Α.8 του παρόντος παραρτήματος, κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 107 του ΟΟΣΑ). Η μέθοδος HPLC καλύπτει τις τιμές του log P_{ow} στην κλίμακα από 0 έως 6 (1)(2)(3)(4)(5). Η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να απαιτήσει εκτίμηση του P_{ow}, ώστε να κατανεμηθούν οι κατάλληλες ουσίες αναφοράς και να υποστηριχθούν οποιαδήποτε συμπεράσματα αντλούνται από τα δεδομένα που προκύπτουν από τη δοκιμή. Οι μέθοδοι υπολογισμού εξετάζονται εν συντομία στο προσάρτημα της παρούσας μεθόδου δοκιμών. Ο τρόπος λειτουργίας της HPLC είναι ισοκρατικός.

5. Οι τιμές του P_{ow} εξαρτώνται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως τη θερμοκρασία, το pH, την ιοντική ισχύ κ.λπ., οι οποίες θα πρέπει να προσδιορίζονται στο πείραμα με σκοπό την ορθή ερμηνεία των δεδομένων P_{ow}. Για τις ιοντιζόμενες ουσίες, μια άλλη μέθοδος [π.χ. σχέδιο κατευθυντήριας γραμμής του ΟΟΣΑ σχετικά με τη μέθοδο μέτρησης του pH για τις ιοντιζόμενες ουσίες (6)] θα μπορούσε να καταστεί διαθέσιμη και να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά. Αν και το εν λόγω σχέδιο κατευθυντήριας γραμμής του ΟΟΣΑ μπορεί να ενδείκνυται για τον προσδιορισμό του P_{ow} για τις συγκεκριμένες ιοντιζόμενες ουσίες, σε ορισμένες περιπτώσεις είναι καταλληλότερο να χρησιμοποιείται η μέθοδος HPLC σε περιβαλλοντικά σημαντικό pH (βλ. σημείο 9).

([1]) Δίνεται ένα ανώτατο όριο επειδή είναι αναγκαίο να επιτευχθεί φάση πλήρους διαχωρισμού μετά τις προσαρμογές της ισορροπίας κατανομής και πριν από τη λήψη δειγμάτων για αναλυτικούς προσδιορισμούς. Με τη δέουσα μέριμνα, το ανώτατο όριο μπορεί να επεκταθεί σε υψηλότερες τιμές του P_{ow}.

▼**M6**

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

6. Η HPLC αντίστροφης φάσης διεξάγεται σε αναλυτικές στήλες που φέρουν μια εμπορικά διαθέσιμη στερεά φάση με μακριές αλυσίδες υδρογονανθράκων (π.χ. C8, Cl8) χημικώς ενωμένες με διοξείδιο του πυριτίου.

7. Η χημική ουσία που εγχέεται σε τέτοια στήλη διαχωρίζεται μεταξύ της κινητής φάσης του διαλύτη και της υδρογονανθρακικής στατικής φάσης, καθώς μετακινείται κατά μήκος της στήλης με τη βοήθεια της κινητής φάσης. Οι ουσίες συγκρατούνται ανάλογα με τον συντελεστή κατανομής τους σε υδρογονάνθρακα-νερό· οι υδρόφιλες ουσίες εκλούονται πρώτες και οι λιπόφιλες ουσίες τελευταίες. Ο χρόνος κατακράτησης βρίσκεται από τον παράγοντα χωρητικότητας k, που δίνεται από τον τύπο:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

όπου t_R είναι ο χρόνος κατακράτησης της υπό δοκιμή ουσίας, και t_0 είναι ο νεκρός χρόνος, δηλ. ο μέσος χρόνος που χρειάζεται το μόριο ενός διαλύτη για να περάσει από τη στήλη. Δεν απαιτούνται ποσοτικές αναλυτικές μέθοδοι· μόνο ο προσδιορισμός των χρόνων κατακράτησης είναι αναγκαίος.

8. Ο συντελεστής κατανομής της υπό δοκιμή ουσίας σε οκτανόλη/νερό μπορεί να υπολογιστεί εάν ο παράγοντας χωρητικότητάς της k προσδιοριστεί πειραματικά και, στη συνέχεια, προστεθεί στην ακόλουθη εξίσωση:

$$\log P_{ow} = a + b \times \log k$$

όπου

a, b = συντελεστές γραμμικής παλινδρόμησης.

Η ανωτέρω εξίσωση μπορεί να επιλυθεί με τη γραμμική παλινδρόμηση μεταξύ του λογαρίθμου των συντελεστών κατανομής των ουσιών αναφοράς σε οκτανόλη/νερό και του λογαρίθμου των παραγόντων χωρητικότητας των ουσιών αναφοράς.

9. Η μέθοδος HPLC αντίστροφης φάσης καθιστά εφικτή την εκτίμηση των συντελεστών κατανομής των οποίων η τιμή του log P_{ow} είναι στην περιοχή μεταξύ 0 και 6, αλλά, σε εξαιρετικές περιπτώσεις, μπορεί να επεκταθεί για να καλύπτει την τιμή του log P_{ow} στην περιοχή μεταξύ 6 και 10. Αυτό μπορεί να απαιτήσει την τροποποίηση της κινητής φάσης (3). Η μέθοδος δεν έχει εφαρμογή σε ισχυρά οξέα και βάσεις, σε σύμπλοκα μετάλλων, σε ουσίες που αντιδρούν με το μέσο έκλουσης ή σε επιφανειοδραστικές ουσίες. Οι μετρήσεις μπορούν να διενεργούνται σε ιοντιζόμενες ουσίες στη μη ιοντισμένη μορφή τους (ελεύθερο οξύ ή ελεύθερη βάση) μόνο με τη χρησιμοποίηση κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος με pH μικρότερο του pK_a, για το ελεύθερο οξύ, ή μεγαλύτερο του pK_a, για την ελεύθερη βάση. Εναλλακτικά, η πεχαμετρική μέθοδος για τη δοκιμή ιοντιζόμενων ουσιών (6) θα μπορούσε να καταστεί διαθέσιμη και να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική μέθοδος (6). Εάν η τιμή του log P_{ow} προσδιορίζεται με σκοπό τη χρήση στην ταξινόμηση ως προς την περιβαλλοντική επικινδυνότητα ή στην εκτίμηση των κινδύνων για το περιβάλλον, η δοκιμή θα πρέπει να διεξάγεται στην περιοχή pH που είναι σημαντική για το φυσικό περιβάλλον, δηλ. στην περιοχή pH 5,0 - 9.

10. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι προσμείξεις μπορεί να δυσχεράνουν την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, λόγω αβεβαιότητας ως προς την απόδοση των κορυφών. Στην περίπτωση μειγμάτων που έχουν ως αποτέλεσμα ανεπαρκώς διαχωρισμένες ζώνες, θα πρέπει να δηλώνονται το ανώτατο και το κατώτατο όριο του log P_{ow}, καθώς και το επί τοις εκατό εμβαδόν κάθε κορυφής που αντιστοιχεί σε log P_{ow}. Στην περίπτωση μειγμάτων που αποτελούνται από ομάδα ομόλογων ενώσεων, θα πρέπει επίσης να δηλώνεται η μεσοσταθμική τιμή του log P_{ow} (7), η οποία πρέπει να υπολογίζεται με βάση τις μεμονωμένες τιμές P_{ow} και τις τιμές του αντίστοιχου επί τοις εκατό εμβαδού (8). Όλες οι κορυφές που συμβάλλουν κατά 5 % ή περισσότερο στο ολικό εμβαδόν κορυφής θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά τον υπολογισμό (9):

▼**M6**

$$\textit{μεσοσταθμική τιμή } \log\ P_{ow} = \frac{\sum_i (\log\ P_{owi})(\textit{εμβαδού \%})}{\textit{ολικό εμβαδόν κορυφής \%}} = \frac{\sum (\textit{log}\ P_{owi})(\textit{εμβαδού \%}_i)}{\sum_i \textit{εμβαδού \%}}$$

Η μεσοσταθμική τιμή του log P_{ow} είναι έγκυρη μόνο για ουσίες ή μείγματα (π.χ. ταλλέλαια) που αποτελούνται από ομόλογες ενώσεις (π.χ. σειρά αλκανίων). Είναι δυνατόν να πραγματοποιούνται μετρήσεις μειγμάτων με χρήσιμα αποτελέσματα, υπό την προϋπόθεση ότι ο αναλυτικός ανιχνευτής που θα χρησιμοποιείται θα έχει την ίδια ευαισθησία προς όλες τις ουσίες του μείγματος και θα μπορεί να τις διαχωρίζει επαρκώς.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΟΥΣΙΑ

11. Η σταθερά διάστασης, ο συντακτικός τύπος και η διαλυτότητα στην κινητή φάση θα πρέπει να είναι γνωστά προτού χρησιμοποιηθεί η μέθοδος. Πληροφορίες σχετικά με την υδρόλυση θα ήταν επίσης χρήσιμες.

ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

12. Για να αυξηθεί η αξιοπιστία της μέτρησης, πρέπει να εκτελούνται επαναληπτικοί προσδιορισμοί.

— Επαναληψιμότητα: Οι τιμές του log P_{ow} που προκύπτουν από επαναλαμβανόμενες μετρήσεις οι οποίες διενεργήθηκαν υπό πανομοιότυπες συνθήκες και κατά τις οποίες χρησιμοποιήθηκε το ίδιο σύνολο ουσιών αναφοράς θα πρέπει να μη διαφέρουν περισσότερο από ± 0,1 λογαριθμικές μονάδες.

— Αναπαραγωγιμότητα: Εάν οι μετρήσεις επαναλαμβάνονται με διαφορετικό σύνολο ουσιών αναφοράς, τα αποτελέσματα μπορεί να είναι διαφορετικά. Κατά κανόνα, ο συντελεστής συσχέτισης R όσον αφορά τη σχέση μεταξύ του log k και του log P_{ow} για μια ομάδα εξεταζόμενων ουσιών είναι περίπου 0,9, τιμή που αντιστοιχεί σε συντελεστή κατανομής σε οκτανόλη/νερό του log P_{ow} ± 0,5 λογαριθμικές μονάδες.

13. Η διεργαστηριακή συγκριτική δοκιμή απέδειξε ότι, με τη μέθοδο HPLC, οι τιμές του log P_{ow} μπορούν να ληφθούν με απόκλιση ± 0,5 μονάδων από τις τιμές της μεθόδου της ανακινούμενης φιάλης (2). Στη βιβλιογραφία βρίσκονται και άλλες συγκρίσεις (4)(5)(10)(11)(12). Τα γραφήματα συσχέτισης που βασίζονται σε δομικά συγγενείς ουσίες αναφοράς παρέχουν τα ακριβέστερα αποτελέσματα (13).

ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

14. Για να υπάρξει συσχέτιση του μετρούμενου παράγοντα χωρητικότητας k μιας ουσίας με τον P_{ow} της εν λόγω ουσίας, πρέπει να καταρτιστεί καμπύλη βαθμονόμησης που να χρησιμοποιεί τουλάχιστον 6 σημεία (βλ. σημείο 24). Η επιλογή των κατάλληλων ουσιών αναφοράς εναπόκειται στον χρήστη. Κανονικά, οι ουσίες αναφοράς θα πρέπει να έχουν τιμές log P_{ow} οι οποίες να περικλείουν τον log P_{ow} της υπό δοκιμή ουσίας, δηλ. τουλάχιστον μία ουσία αναφοράς θα πρέπει να έχει P_{ow} υψηλότερο από τον αντίστοιχο της υπό δοκιμή ουσίας, και μία άλλη ουσία θα πρέπει να έχει P_{ow} χαμηλότερο από τον αντίστοιχο της υπό δοκιμή ουσίας. Η προεκβολή θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο σε εξαιρετικές περιπτώσεις. Είναι προτιμότερο αυτές οι ουσίες αναφοράς να είναι δομικά συγγενείς με την υπό δοκιμή ουσία. Οι τιμές του log P_{ow} των ουσιών αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν για τη βαθμονόμηση θα πρέπει να βασίζονται σε αξιόπιστα πειραματικά δεδομένα. Ωστόσο, για ουσίες με υψηλό log P_{ow} (κατά κανόνα, πάνω από 4) μπορούν να χρησιμοποιούνται οι υπολογισθείσες τιμές, εκτός εάν υπάρχουν διαθέσιμα αξιόπιστα πειραματικά δεδομένα. Εάν χρησιμοποιούνται τιμές προεκβολής, θα πρέπει να καθορίζεται οριακή τιμή.

15. Για πολλές ομάδες χημικών ουσιών υπάρχουν εκτεταμένοι πίνακες τιμών του log P_{ow} (14)(15). Εάν δεν υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία για τους συντελεστές κατανομής δομικά συγγενικών ουσιών, μπορεί να χρησιμοποιηθεί γενικότερη βαθμονόμηση, η οποία να καθορίζεται με βάση άλλες ουσίες αναφοράς. Οι συνιστώμενες ουσίες αναφοράς και οι τιμές P_{ow} τους παρατίθενται στον πίνακα 1. Για τις ιοντιζόμενες ουσίες, οι παρεχόμενες τιμές ισχύουν για τη μη ιοντισμένη μορφή. Η εφικτότητα και η ποιότητα των τιμών ελέγχθηκαν κατά τη διεργαστηριακή συγκριτική δοκιμή.

▼**M6**

Πίνακας 1

Συνιστώμενες ουσίες αναφοράς

	Αριθμός CAS	Ουσία αναφοράς	log P_{ow}	pKa
1	78-93-3	2-βουτανόνη (Μεθυλαιθυλκετόνη)	0,3	
2	1122-54-9	4-ακετυλοπυριδίνη	0,5	
3	62-53-3	Ανιλίνη	0,9	
4	103-84-4	Ακετανιλίδιο	1,0	
5	100-51-6	Βενζυλική αλκοόλη	1,1	
6	150-76-5	4-μεθοξυφαινόλη	1,3	pKa = 10,26
7	122-59-8	Φαινοξυοξικό οξύ	1,4	pKa = 3,12
8	108-95-2	Φαινόλη	1,5	pKa = 9,92
9	51-28-5	2,4-δινιτροφαινόλη	1,5	pKa = 3,96
10	100-47-0	Βενζονιτρίλιο	1,6	
11	140-29-4	Φαινυλακετονιτρίλιο	1,6	
12	589-18-4	4-μεθυλοβενζυλική αλκοόλη	1,6	
13	98-86-2	Ακετοφαινόνη	1,7	
14	88-75-5	2-νιτροφαινόλη	1,8	pKa = 7,17
15	121-92-6	3-νιτροβενζοϊκό οξύ	1,8	pKa = 3,47
16	106-47-8	4-χλωρανιλίνη	1,8	pKa = 4,15
17	98-95-3	Νιτροβενζόλιο	1,9	
18	104-54-1	Κινναμυλαλκοόλη (Κινναμωμική αλκοόλη)	1,9	
19	65-85-0	Βενζοϊκό οξύ	1,9	pKa = 4,19
20	106-44-5	π-κρεσόλη	1,9	pKa = 10,17
21	140-10-3 (trans)	Κινναμωμικό οξύ	2,1	pKa = 3,89 (cis) 4,44 (trans)
22	100-66-3	Ανισόλη	2,1	
23	93-58-3	Βενζοϊκό μεθύλιο	2,1	
24	71-43-2	Βενζόλιο	2,1	
25	99-04-7	3-μεθυλοβενζοϊκό οξύ	2,4	pKa = 4,27
26	106-48-9	4-χλωροφαινόλη	2,4	pKa = 9,1
27	79-01-6	Τριχλωροαιθυλένιο	2,4	
28	1912-24-9	Ατραζίνη	2,6	
29	93-89-0	Βενζοϊκό αιθύλιο	2,6	

▼**M6**

	Αριθμός CAS	Ουσία αναφοράς	log P_{ow}	pKa
30	1194-65-6	2,6-διχλωροβενζονιτρίλιο	2,6	
31	535-80-8	3-χλωροβενζοϊκό οξύ	2,7	pKa = 3,82
32	108-88-3	Τολουόλιο	2,7	
33	90-15-3	1-ναφθόλη	2,7	pKa = 9,34
34	608-27-5	2,3-διχλωροανιλίνη	2,8	
35	108-90-7	Χλωροβενζόλιο	2,8	
36	1746-13-0	Αλλυλοφαινυλαιθέρας	2,9	
37	108-86-1	Βρωμοβενζόλιο	3,0	
38	100-41-4	Αιθυλοβενζόλιο	3,2	
39	119-61-9	Βενζοφαινόνη	3,2	
40	92-69-3	4-φαινυλοφαινόλη	3,2	pKa = 9,54
41	89-83-8	Θυμόλη	3,3	
42	106-46-7	1,4-διχλωροβενζόλιο	3,4	
43	122-39-4	Διφαινυλαμίνη	3,4	pKa = 0,79
44	91-20-3	Ναφθαλίνη	3,6	
45	93-99-2	Βενζοϊκό φαινύλιο	3,6	
46	98-82-8	Ισοπροπυλοβενζόλιο	3,7	
47	88-06-2	2,4-6-τριχλωροφαινόλη	3,7	pKa = 6
48	92-52-4	Διφαινύλιο	4,0	
49	120-51-4	Βενζοϊκό βενζύλιο	4,0	
50	88-85-7	2,4-δινιτρο-6-sec-βουτυλοφαινόλη	4,1	
51	120-82-1	1,2,4-τριχλωροβενζόλιο	4,2	
52	143-07-7	Δωδεκανοϊκό οξύ	4,2	pKa = 5,3
53	101-84-8	Διφαινυλαιθέρας	4,2	
54	85-01-8	Φαινανθρένιο	4,5	
55	104-51-8	n-βουτυλοβενζόλιο	4,6	
56	103-29-7	Διβενζύλιο	4,8	
57	3558-69-8	2,6-διφαινυλοπυριδίνη	4,9	
58	206-44-0	Φλουορανθένιο	5,1	
59	603-34-9	Τριφαινυλαμίνη	5,7	
60	50-29-3	DDT	6,5	

▼M6

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Προκαταρκτική εκτίμηση του συντελεστή κατανομής

16. Εάν κρίνεται αναγκαίο, η εκτίμηση του συντελεστή κατανομής μπορεί να επιτυγχάνεται, κατά προτίμηση, με τη χρήση μεθόδου υπολογισμού (βλ. προσάρτημα) ή, όπου ενδείκνυται, με την εφαρμογή του λόγου της διαλυτότητας της υπό δοκιμή ουσίας στους καθαρούς διαλύτες.

Εργαστηριακός εξοπλισμός

17. Απαιτείται υγροχρωματογράφος, ο οποίος να διαθέτει αντλία χαμηλών παλμών και κατάλληλο σύστημα ανίχνευσης. Σε ευρύ φάσμα χημικών ομάδων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ανιχνευτής UV, με μήκος κύματος 210 nm, ή ανιχνευτής RI. Η παρουσία πολικών ομάδων στη στατική φάση μπορεί να επηρεάσει σοβαρά την απόδοση της στήλης HPLC. Κατά συνέπεια, οι στατικές φάσεις θα πρέπει να έχουν το ελάχιστο δυνατό ποσοστό πολικών ομάδων (16). Μπορούν να χρησιμοποιούνται εμπορικά διαθέσιμα μικροσωματιδιακά υλικά πλήρωσης στηλών χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης ή έτοιμες γεμισμένες στήλες. Μεταξύ του συστήματος έγχυσης και της αναλυτικής στήλης μπορεί να τοποθετείται προστήλη.

Κινητή φάση

18. Για την παρασκευή του διαλύτη έκλουσης ο οποίος απαεριώνεται πριν από τη χρήση, χρησιμοποιούνται μεθανόλη και απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό ποιότητας HPLC. Θα πρέπει να γίνεται χρήση ισοκρατικής έκλουσης. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται αναλογίες μεθανόλης/νερού με ελάχιστη περιεκτικότητα σε νερό 25 %. Κατά κανόνα, μείγμα 3:1 (v/v) μεθανόλης-νερού είναι ικανοποιητικό για την έκλουση ουσιών με log P 6 εντός μίας ώρας, με ταχύτητα ροής 1 ml/λεπτό. Για ουσίες με log P άνω του 6 μπορεί να είναι αναγκαίο να μειωθεί ο χρόνος έκλουσής τους (όπως και των ουσιών αναφοράς) με μείωση της πολικότητας της κινητής φάσης ή του μήκους της στήλης.

19. Η υπό δοκιμή ουσία και οι ουσίες αναφοράς πρέπει να είναι διαλυτές στην κινητή φάση, σε συγκέντρωση επαρκή ώστε να είναι εφικτή η ανίχνευσή τους. Με το μείγμα μεθανόλης-νερού μπορούν να χρησιμοποιηθούν πρόσθετα μόνο σε εξαιρετικές περιπτώσεις, αφού αυτά μεταβάλλουν τις ιδιότητες της στήλης. Σε αυτές τις περιπτώσεις πρέπει να επιβεβαιώνεται ότι ο χρόνος κατακράτησης της υπό δοκιμή ουσίας και των ουσιών αναφοράς δεν επηρεάζεται. Εάν το μείγμα μεθανόλης-νερού δεν είναι το ενδεδειγμένο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλα μείγματα οργανικών διαλυτών-νερού, π.χ. αιθανόλης-νερού, ακετονιτριλίου-νερού ή ισοπροπυλικής αλκοόλης (2-προπανόλης)-νερού.

20. Το pH του μέσου έκλουσης είναι κρίσιμος παράγοντας για τις ιοντιζόμενες ουσίες. Θα πρέπει να είναι μέσα στην περιοχή του pH λειτουργίας της στήλης, συνήθως μεταξύ 2 και 8. Συνιστάται η χρήση ρυθμιστικού διαλύματος. Πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγεται η καθίζηση αλάτων και η φθορά της στήλης, κάτι που συμβαίνει με ορισμένα μείγματα οργανικής φάσης-ρυθμιστικού διαλύματος. Κατά κανόνα, δεν συνιστώνται οι μετρήσεις HPLC με στατικές φάσεις που έχουν ως βάση το οξείδιο του πυριτίου για pH πάνω από 8, δεδομένου ότι η χρήση αλκαλικής κινητής φάσης μπορεί να προκαλέσει ταχεία ελάττωση της απόδοσης της στήλης.

Διαλυμένες ουσίες

21. Η υπό δοκιμή ουσία και οι ουσίες αναφοράς πρέπει να είναι επαρκώς καθαρές, ώστε να αποδίδονται οι κορυφές των χρωματογραφημάτων στις αντίστοιχες ουσίες. Εάν είναι δυνατόν, οι ουσίες που χρησιμοποιούνται για τους σκοπούς της δοκιμής ή της βαθμονόμησης διαλύονται στην κινητή φάση. Εάν για τη διάλυση της υπό δοκιμή ουσίας και της ουσίας αναφοράς χρησιμοποιείται διαλύτης άλλος από την κινητή φάση, η κινητή φάση θα πρέπει να χρησιμοποιείται για την τελική αραίωση πριν από την έγχυση.

Συνθήκες της δοκιμής

22. Η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια των μετρήσεων δεν θα πρέπει να διαφέρει περισσότερο από ± 1 °C.

▼M6

Προσδιορισμός του νεκρού χρόνου t_o

23. Ο νεκρός χρόνος t_0 μπορεί να μετρηθεί με τη χρήση μη κατακρατούμενων οργανικών ουσιών (π.χ. θειουρίας ή φορμαμιδίου). Ακριβέστερος νεκρός χρόνος μπορεί να προσδιοριστεί από τους χρόνους κατακράτησης που μετρήθηκαν ή από ομάδα περίπου επτά μελών ομόλογης σειράς (π.χ. n-αλκυλο μεθυλο κετόνες) (17). Οι χρόνοι κατακράτησης t_R $(n_C + 1)$ παριστώνται γραφικά σε συνάρτηση με τον t_R (n_C), όπου n_C είναι ο αριθμός των ατόμων άνθρακα. Λαμβάνεται ευθεία γραμμή, t_R $(n_C + 1) = A\ t_R\ (n_C) + (1 – A)t_0$, όπου το A, που αντιπροσωπεύει τον λόγο $k(n_C + 1)/k(n_C)$, είναι σταθερό. Ο νεκρός χρόνος t_0 λαμβάνεται από το σημείο τομής $(1 – A)t_0$ και την κλίση A.

Εξίσωση παλινδρόμησης

24. Το επόμενο βήμα είναι να αποτυπωθεί η συσχέτιση του log k σε συνάρτηση με τον log P για τις κατάλληλες ουσίες αναφοράς, όπου οι τιμές του log P προσεγγίζουν την τιμή που αναμένεται για την υπό δοκιμή ουσία. Στην πράξη, εγχέονται ταυτόχρονα 6 έως 10 ουσίες αναφοράς. Οι χρόνοι κατακράτησης προσδιορίζονται, κατά προτίμηση σε ολοκληρωτή καταγραφής συνδεδεμένο με το σύστημα ανίχνευσης. Οι αντίστοιχοι λογάριθμοι των παραγόντων χωρητικότητας, log k, σχεδιάζονται ως συνάρτηση του log P. Η εξίσωση παλινδρόμησης εκτελείται σε τακτά χρονικά διαστήματα, τουλάχιστον μία φορά την ημέρα, ώστε να λαμβάνονται υπόψη οι πιθανές μεταβολές στην απόδοση της στήλης.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ P_{OW} ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΗΣ ΟΥΣΙΑΣ

25. Η υπό δοκιμή ουσία εγχέεται στις μικρότερες ανιχνεύσιμες ποσότητες. Ο χρόνος κατακράτησης προσδιορίζεται δύο φορές. Ο συντελεστής κατανομής της υπό δοκιμή ουσίας λαμβάνεται με παρεμβολή του υπολογιζόμενου παράγοντα χωρητικότητας στην καμπύλη βαθμονόμησης. Για πολύ χαμηλούς και πολύ υψηλούς συντελεστές κατανομής είναι αναγκαία η προεκβολή. Ειδικά σε αυτές τις περιπτώσεις, πρέπει να δίνεται προσοχή στα όρια εμπιστοσύνης της γραμμής παλινδρόμησης. Εάν ο χρόνος κατακράτησης του δείγματος βρίσκεται έξω από την περιοχή των χρόνων κατακράτησης που λαμβάνονται για τα πρότυπα, θα πρέπει να δηλώνεται οριακή τιμή.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Έκθεση δοκιμής

26. Στην έκθεση πρέπει να περιλαμβάνονται τα ακόλουθα στοιχεία:

— εάν καθορίζονται, η προκαταρκτική εκτίμηση του συντελεστή κατανομής, οι εκτιμώμενες τιμές και η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε· και εάν εφαρμόστηκε μέθοδος υπολογισμού, η πλήρης περιγραφή της, όπως αναγνώριση της βάσης δεδομένων και λεπτομερή στοιχεία σχετικά με την επιλογή τμημάτων·

— υπό δοκιμή ουσίες και ουσίες αναφοράς: καθαρότητα, συντακτικός τύπος και αριθμός CAS·

— περιγραφή του εξοπλισμού και των συνθηκών λειτουργίας: αναλυτική στήλη, προστήλη·

— κινητή φάση, μέσα ανίχνευσης, περιοχή θερμοκρασιών, pH·

— προφίλ έκλουσης (χρωματογραφήματα)·

— νεκρός χρόνος και τρόπος μέτρησής του·

— στοιχεία κατακράτησης και βιβλιογραφικές τιμές log P_{ow} για τις ουσίες αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν στη βαθμονόμηση·

— λεπτομερή στοιχεία για τη προσαρμοσμένη γραμμή παλινδρόμησης (log k σε συνάρτηση με τον log P_{ow}) και τον συντελεστή συσχέτισης της γραμμής συμπεριλαμβανομένων των διαστημάτων εμπιστοσύνης·

▼**M6**

— δεδομένα μέσης κατακράτησης και παρεμβλημένη τιμή log P_{ow} για την εξεταζόμενη ουσία·

— στην περίπτωση μείγματος: χρωματογράφημα του προφίλ έκλουσης με επισήμανση των τιμών αποκοπής·

— τιμές log P_{ow} σχετικές με το επί τοις εκατό εμβαδόν της κορυφής του log P_{ow}·

— υπολογισμός με τη βοήθεια γραμμής παλινδρόμησης·

— υπολογισθείσες μεσοσταθμικές τιμές log P_{ow}, κατά περίπτωση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) C.V. Eadsforth and P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. Chemosphere. 12, 1459.

(2) W. Klein, W. Körde1, M. Weiss and H.J. Poremski. (1988). Updating of the OECD Test Guideline 107 Partition Coefficient n-Octanol-Water, OECD Laboratory Intercomparison Test on the HPLC Method. Chemosphere. 17, 361.

(3) C.V. Eadsforth. (1986). Application of Reverse H.P.L.C. for the Determination of Partition Coefficient. Pesticide Science. 17, 311.

(4) H. Ellgehausen, C. D'Hondt and R. Fuerer (1981). Reversed-phase chromatography as a general method for determining octan-1-ol/water partition coefficients. Pesticide. Science. 12, 219.

(5) B. McDuffie (1981). Estimation of Octanol Water Partition Coefficients for Organic Pollutants Using Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography. Chemosphere. 10, 73.

(6) OECD (2000). Guideline for Testing of Chemicals — Partition Coefficient (n-octanol/water): pH-metric Method for Ionisable Substances. Draft Guideline, Νοέμβριος 2000.

(7) OSPAR (1995). «Harmonised Offshore Chemicals Notification Format (HOCFN) 1995», Oslo and Paris Conventions for the Prevention of Marine Pollution Programmes and Measures Committee (PRAM), Παράρτημα 10, Oviedo, 20–24 Φεβρουαρίου 1995.

(8) M. Thatcher, M. Robinson, L. R. Henriquez and C. C. Karman. (1999). An User Guide for the Evaluation of Chemicals Used and Discharged Offshore, A CIN Revised CHARM III Report 1999. Version 1.0, 3 Αυγούστου.

(9) E. A. Vik, S. Bakke and K. Bansal. (1998). Partitioning of Chemicals. Important Factors in Exposure Assessment of Offshore Discharges. Environmental Modelling & Software Vol. 13, σ. 529-537.

(10) L.O. Renberg, S.G. Sundstroem and K. Sundh-Nygård. (1980). Partition coefficients of organic chemicals derived from reversed-phase thin-layer chromatography. Evaluation of methods and application on phosphate esters, polychlorinated paraffins and some PCB-substitutes. Chemosphere. 9, 683.

(11) W.E. Hammers, G.J.Meurs and C.L. De-Ligny. (1982). (1982). Correlations between liquid chromatographic capacity ratio data on Lichrosorb RP-18 and partition coefficients in the octanol-water system. J. Chromatography 247, 1.

(12) J.E. Haky and A.M. Young. (1984). Evaluation of a simple HPLC correlation method for the estimation of the octanol-water partition coefficients of organic compounds. J. Liq. Chromatography. 7, 675.

(13) S. Fujisawa and E. Masuhara. (1981). Determination of Partition Coefficients of Acrylates Methacrylates and Vinyl Monomers Using High Performance Liquid Chromatography. Journal of Biomedical Materials Research. 15, 787.

▼**M6**

(14) C. Hansch and A. J. Leo. (1979). Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. John Willey, Νέα Υόρκη.

(15) C. Hansch, chairman; A.J. Leo, dir. (1982). Log P and Parameter Database: A tool for the quantitative prediction of bioactivity — Available from Pomona College Medical Chemistry Project, Pomona College, Claremont, California 91711.

(16) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. Eur. J. Med. Chem. — Chim. Ther. 14, 479.

(17) G.E. Berendsen, P.J. Schoenmakers, L. de Galan, G. Vigh, Z. Varga-Puchony, and J. Inczédy. (1980). On determination of hold-up time in reversed-phase liquid chromatography. J. Liq. Chromato. 3, 1669.

▼M6

Προσάρτημα

Μέθοδοι υπολογισμού του P_{OW}

Εισαγωγή

1. Το παρόν προσάρτημα παρέχει σύντομη εισαγωγή στον υπολογισμό του P_{ow}. Για περισσότερες πληροφορίες, συμβουλευθείτε τα εγχειρίδια (1)(2).

2. Οι υπολογισθείσες τιμές του P_{ow} χρησιμοποιούνται με σκοπό:

— να αποφασιστεί η πειραματική μέθοδος που θα χρησιμοποιηθεί: η μέθοδος της ανακινούμενης φιάλης, για log P_{ow} μεταξύ – 2 και 4, και η μέθοδος HPLC, για log P_{ow} μεταξύ 0 και 6·

— να επιλεγούν οι συνθήκες που θα εφαρμοστούν στη μέθοδο HPLC (ουσίες αναφοράς, αναλογία μεθανόλης-νερού)·

— να ελεγχθεί η αξιοπιστία των τιμών που λαμβάνονται με τις πειραματικές μεθόδους·

— να δοθεί εκτιμώμενη τιμή σε περίπτωση που δεν μπορούν να εφαρμοστούν πειραματικές μέθοδοι.

Αρχή των μεθόδων υπολογισμού

3. Οι μέθοδοι υπολογισμού που προτείνονται στην παρούσα ενότητα βασίζονται στη θεωρητική κατάτμηση του μορίου σε κατάλληλα τμήματα για τα οποία υπάρχουν γνωστές αξιόπιστες αυξήσεις του log P_{ow} · Ο log P_{ow} προκύπτει από την άθροιση των τμηματικών τιμών και των διορθωτικών όρων για ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις. Υπάρχουν πίνακες σταθερών και διορθωτικών όρων για τα τμήματα (1)(2)(3)(4)(5)(6). Ορισμένοι ενημερώνονται τακτικά (3).

Αξιοπιστία των υπολογισθεισών τιμών

4. Κατά κανόνα, η αξιοπιστία των μεθόδων υπολογισμού μειώνεται όσο αυξάνει η πολυπλοκότητα της υπό μελέτη ουσίας. Στην περίπτωση απλών μορίων με μικρό μοριακό βάρος και με μία ή δύο λειτουργικές ομάδες, μπορεί να αναμένεται απόκλιση 0,1 έως 0,3 μονάδων του log P_{ow} μεταξύ των αποτελεσμάτων των διαφόρων μεθόδων κατάτμησης και των μετρούμενων τιμών. Το περιθώριο σφάλματος θα εξαρτηθεί από την αξιοπιστία των σταθερών των τμημάτων που χρησιμοποιούνται, την ικανότητα αναγνώρισης των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων (π..χ. των δεσμών υδρογόνου) και την ορθή χρήση των διορθωτικών όρων. Στην περίπτωση ιοντιζόμενων ουσιών, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη το φορτίο και ο βαθμός ιοντισμού (10).

Η μέθοδος π των Fujita και Hansch

5. Η σταθερά υδρόφοβου υποκαταστάτη, π, η οποία εισήχθη αρχικά από τους Fujita et al. (7), ορίζεται ως εξής:

$$^{\pi}X = \log P_{ow}\,(PhX) - \log P_{ow}\,(PhH)$$

όπου PhX είναι αρωματικό παράγωγο και PhH η μητρική ουσία.

$$\begin{aligned} \text{π.χ.} \quad ^{\pi}Cl &= \log Pow\,(C_6H_5Cl) - \log P_{ow}\,(C_6H_6) \\ &= 2{,}84 - 2{,}13 \\ &= 0{,}71 \end{aligned}$$

Η μέθοδος π είναι πρωτίστως σημαντική για τις αρωματικές ουσίες. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν οι τιμές π για μεγάλο αριθμό υποκαταστατών (4)(5).

Μέθοδος Rekker

6. Με τη μέθοδο Rekker (8), η τιμή log P_{ow} υπολογίζεται ως εξής:

$$Log\ \ P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{όροι αλληλεπίδρασης})$$

▼M6

όπου το a_i δηλώνει πόσες φορές ένα συγκεκριμένο τμήμα εμφανίζεται στο μόριο, και το f_i δηλώνει την αύξηση του log P_{ow} του τμήματος. Οι όροι αλληλεπίδρασης μπορούν να εκφραστούν ως ακέραιο πολλαπλάσιο μίας και μόνης σταθεράς C_m (που καλείται «μαγική σταθερά»). Οι σταθερές f_i και C_m του τμήματος έχουν προσδιοριστεί από κατάλογο 1 054 πειραματικών τιμών P_{ow} 825 ουσιών μέσω ανάλυσης πολλαπλής παλινδρόμησης (6)(8). Ο προσδιορισμός των όρων αλληλεπίδρασης διενεργείται σύμφωνα με ένα σύνολο κανόνων (6)(8)(9).

Μέθοδος Hansch και Leo

7. Με τη μέθοδο Hansch και Leo (4), η τιμή log P_{ow} υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{Log } P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j b_j F_j$$

όπου f_i είναι μια σταθερά τμήματος, F_j ένας διορθωτικός όρος (παράγοντας), a_i και b_j η αντίστοιχη συχνότητα εμφάνισης. Με βάση πειραματικές τιμές P_{ow} προσδιορίστηκαν εμπειρικά ένας κατάλογος ατομικών και ομαδικών τιμών τμημάτων και ένας κατάλογος διορθωτικών όρων F_j. Οι διορθωτικοί όροι χωρίστηκαν σε πολλές διαφορετικές κατηγορίες (1)(4). Αναπτύχθηκαν πακέτα λογισμικού, ώστε να ληφθούν υπόψη όλοι οι κανόνες και οι διορθωτικοί όροι (3).

ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΜΕΘΟΔΟΣ

8. Ο υπολογισμός του log P_{ow} πολύπλοκων μορίων μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά, εάν το μόριο χωριστεί σε μεγαλύτερα τμήματα για τα οποία υπάρχουν αξιόπιστες τιμές log P_{ow}, είτε από πίνακες (3)(4) είτε από υφιστάμενες μετρήσεις. Τα τμήματα αυτά (π.χ. ετεροκυκλικοί δακτύλιοι, ανθρακινόνη, αζωβενζόλιο) μπορούν να συνδυαστούν στη συνέχεια με τις τιμές π της μεθόδου Hansch ή με τις σταθερές τμημάτων της μεθόδου Rekker ή της μεθόδου Leo.

Παρατηρήσεις

i) Οι μέθοδοι υπολογισμού εφαρμόζονται μόνο σε μερικώς ή πλήρως ιοντιζόμενες ουσίες, όταν λαμβάνονται υπόψη οι αναγκαίοι διορθωτικοί παράγοντες.

ii) Εάν μπορεί να υποτεθεί η ύπαρξη ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου, πρέπει να προστεθούν οι αντίστοιχοι διορθωτικοί όροι (περίπου +0,6 έως +1,0 μονάδες του log P_{ow}). Ενδείξεις για την παρουσία τέτοιων δεσμών μπορούν να ληφθούν από στερεοχημικά μοντέλα ή φασματοσκοπικά δεδομένα.

iii) Εάν υπάρχει πιθανότητα περισσότερων από μίας ταυτομερών μορφών, ως βάση του υπολογισμού θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί η πιο πιθανή μορφή.

iv) Οι αναθεωρήσεις των καταλόγων με τις σταθερές τμημάτων θα πρέπει να ακολουθούνται προσεκτικά.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ

(1) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, Νέα Υόρκη (1982).

(2) W.J. Dunn, J.H. Block and R.S. Pearlman (ed.). Partition Coefficient, Determination and Estimation, Pergamon Press, Elmsford (Νέα Υόρκη) και Οξφόρδη (1986).

(3) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).

(4) C. Hansch and A.J. Leo. Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, Νέα Υόρκη (1979).

▼**M6**

(5) Leo, C. Hansch and D. Elkins. (1971) Partition coefficients and their uses. *Chemical. Reviews*. 71, 525.

(6) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem*. — *Chim. Ther.* 14, 479.

(7) Toshio Fujita, Junkichi Iwasa & Corwin Hansch (1964). A New Substituent Constant, π, Derived from Partition Coefficients. *J. Amer. Chem. Soc*. 86, 5175.

(8) R.F. Rekker. The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, Vol. 1, Elsevier, Νέα Υόρκη (1977).

(9) C.V. Eadsforth and P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. *Chemosphere.* 12, 1459.

(10) R.A. Scherrer. ACS — Symposium Series 255, p. 225, American Chemical Society, Washington, D.C. (1984).

▼M7

Α.25. ΣΤΑΘΕΡΕΣ ΔΙΑΣΤΑΣΗΣ ΣΤΟ ΝΕΡΟ (ΤΙΤΛΟΔΟΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ — ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ — ΑΓΩΓΙΜΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 112 του ΟΟΣΑ (1981).

Προϋποθέσεις

— Κατάλληλη αναλυτική μέθοδος

— Υδατοδιαλυτότητα

Πληροφορίες καθοδήγησης

— Συντακτικός τύπος

— Ηλεκτρική αγωγιμότητα για αγωγιμομετρική μέθοδο

Διευκρινίσεις

— Όλες οι μέθοδοι δοκιμών μπορούν να εφαρμόζονται σε καθαρές ουσίες ή σε ουσίες εμπορικής ποιότητας. Θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η πιθανή επίδραση των προσμείξεων στα αποτελέσματα.

— Η τιτλοδοτική μέθοδος δεν είναι κατάλληλη για ουσίες με χαμηλή υδατοδιαλυτότητα (βλ. ενότητα «Διαλύματα δοκιμής» κατωτέρω).

— Η φασματοφωτομετρική μέθοδος εφαρμόζεται μόνο σε ουσίες των οποίων οι διασταθείσες και μη διασταθείσες μορφές έχουν σημαντικά διαφορετικά φάσματα απορρόφησης στο υπεριώδες και το ορατό τμήμα. Η μέθοδος αυτή μπορεί επίσης να είναι κατάλληλη για ουσίες χαμηλής διαλυτότητας και για άλλες διαστάσεις εκτός των οξέων/βάσεων, π.χ. σχηματισμός συμπλόκων.

— Στις περιπτώσεις που ισχύει η εξίσωση Onsager, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η αγωγιμομετρική μέθοδος ακόμη και σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις, και μάλιστα και σε περιπτώσεις άλλων ισορροπιών εκτός των οξέων/βάσεων.

Έγγραφα αναφοράς

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών βασίζεται σε μεθόδους που αναφέρονται στις παραπομπές που περιλαμβάνονται στο τμήμα «Βιβλιογραφία» και στο προσχέδιο καθοδήγησης για τις κοινοποιήσεις πριν από τη βιομηχανική παραγωγή της Υπηρεσίας Προστασίας του Περιβάλλοντος των ΗΠΑ (Preliminary Draft Guidance for Premanufacture Notification EPA), της 18ης Αυγούστου 1978.

Η ΜΕΘΟΔΟΣ — ΕΙΣΑΓΩΓΗ, ΣΚΟΠΟΣ, ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ, ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΗΤΑ, ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΚΑΙ ΟΡΙΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η διάσταση μιας ουσίας στο νερό είναι σημαντική για την εκτίμηση των επιπτώσεών της στο περιβάλλον. Ελέγχει τη μορφή της ουσίας, η οποία με τη σειρά της καθορίζει τη συμπεριφορά και τη μεταφορά της. Μπορεί να επηρεάσει την απορρόφηση της χημικής ουσίας, αφενός από τα εδάφη και τα ιζήματα και, αφετέρου, από τα βιολογικά κύτταρα.

Ορισμοί και μονάδες

Διάσταση είναι ο αναστρέψιμος διαχωρισμός σε δύο ή περισσότερα χημικά είδη που μπορεί να είναι ιονικά. Η διεργασία αυτή δηλώνεται συνήθως με τη χημική εξίσωση

$$RX \rightleftharpoons R^{+} + X^{-}$$

και η σταθερά ισορροπίας της συγκέντρωσης, που ρυθμίζει την αντίδραση, είναι

$$K = \frac{[R^{+}][X^{-}]}{[RX]}$$

Για παράδειγμα, στη συγκεκριμένη περίπτωση όπου R είναι το υδρογόνο (η ουσία είναι οξύ), η σταθερά είναι

▼M7

$$K_\alpha = [H^+] \cdot \frac{[X^-]}{[HX]}$$

ή

$$pK_\alpha = pH - \log\frac{[X^-]}{[HX]}$$

Ουσίες αναφοράς

Οι κατωτέρω ουσίες αναφοράς δεν είναι απαραίτητο να χρησιμοποιούνται σε όλες τις περιπτώσεις που εξετάζεται μια νέα ουσία. Παρέχονται, κυρίως, για να μπορεί να γίνεται διακρίβωση της μεθόδου κατά περιόδους και για να υπάρχει δυνατότητα σύγκρισης με τα αποτελέσματα από την εφαρμογή άλλης μεθόδου.

	pK_a ([1])	Θερμοκρασία σε °C
p-νιτροφαινόλη	7,15	25 ([1])
Βενζοϊκό οξύ	4,12	20
p-χλωροανιλίνη	3,93	20

([1]) Δεν υπάρχει διαθέσιμη τιμή για τους 20 °C, τεκμαίρεται, ωστόσο, ότι η μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων των μετρήσεων είναι υψηλότερη από την αναμενόμενη θερμοκρασιακή εξάρτηση

Μπορούν να φανούν χρήσιμες οι ουσίες με περισσότερες από μία pK, όπως αναφέρεται στο τμήμα «Αρχή της μεθόδου» κατωτέρω. Μια τέτοια ουσία θα μπορούσε να είναι το:

Κιτρικό οξύ	pK_a (8)	Θερμοκρασία σε °C
	1) 3,14	20
	2) 4,77	20
	3) 6,39	20

Αρχή της μεθόδου δοκιμών

Κατά κανόνα, η περιγραφόμενη χημική διεργασία εξαρτάται ελάχιστα από τη θερμοκρασία στο θερμοκρασιακό εύρος που συναντάται στο περιβάλλον. Ο προσδιορισμός της σταθεράς διάστασης απαιτεί μέτρηση των συγκεντρώσεων της διασταθείσας και της μη διασταθείσας μορφής της χημικής ουσίας. Από τη γνώση της στοιχειομετρίας της αντίδρασης διάστασης, που αναφέρεται στην ενότητα «Ορισμοί και μονάδες» ανωτέρω, μπορεί να προσδιοριστεί η κατάλληλη σταθερά. Στην ειδική περίπτωση που περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, η ουσία συμπεριφέρεται ως οξύ ή βάση και ο ευχερέστερος τρόπος προσδιορισμού είναι ο προσδιορισμός των σχετικών συγκεντρώσεων των ιονισμένων και μη ιονισμένων μορφών της ουσίας, καθώς και του pH του διαλύματος. Η σχέση μεταξύ των όρων αυτών παρέχεται στην εξίσωση για την pK_a στην ενότητα «Ορισμοί και μονάδες» ανωτέρω. Ορισμένες ουσίες παρουσιάζουν περισσότερες από μία σταθερές διάστασης και μπορούν να αναπτυχθούν παρόμοιες εξισώσεις. Ορισμένες από τις μεθόδους που περιγράφονται στο παρόν κεφάλαιο είναι επίσης κατάλληλες για άλλες διαστάσεις εκτός των οξέων/βάσεων.

Ποιοτικά κριτήρια

Επαναληψιμότητα

Η σταθερά διάστασης θα πρέπει να αναπαράγεται (σε τουλάχιστον τρεις προσδιορισμούς) με ακρίβεια ± 0,1 λογαριθμικές μονάδες.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ ΔΟΚΙΜΗΣ

Υπάρχουν δύο βασικές προσεγγίσεις για τον προσδιορισμό της pK_a. Η μία συνίσταται στην τιτλοδότηση γνωστής ποσότητας της ουσίας με πρότυπο οξύ ή βάση, κατά περίπτωση. Η άλλη συνίσταται στον προσδιορισμό των σχετικών συγκεντρώσεων των ιονισμένων και μη ιονισμένων μορφών της ουσίας και της εξάρτησής τους από το pH.

▼M7

Προετοιμασίες

Οι μέθοδοι που βασίζονται στις αρχές αυτές μπορούν να χαρακτηρισθούν ως τιτλοδοτική, φασματοφωτομετρική και αγωγιμομετρική διαδικασία.

Διαλύματα δοκιμής

Για την τιτλοδοτική και την αγωγιμομετρική μέθοδο, η χημική ουσία θα πρέπει να διαλύεται σε απεσταγμένο νερό. Για τη φασματοφωτομετρική και τις άλλες μεθόδους χρησιμοποιούνται ρυθμιστικά διαλύματα. Η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τη μικρότερη από τις τιμές 0,01 M ή 1/2 της συγκέντρωσης κορεσμού και για την παρασκευή των διαλυμάτων θα πρέπει να χρησιμοποιείται η καθαρότερη διαθέσιμη μορφή της ουσίας. Εάν η ουσία είναι μετρίως διαλυτή στο νερό, μπορεί να διαλυθεί σε μικρή ποσότητα αναμείξιμου με το νερό διαλύτη, πριν προστεθεί στις προαναφερόμενες συγκεντρώσεις.

Τα διαλύματα θα πρέπει να ελέγχονται για την παρουσία γαλακτωμάτων με τη χρήση δέσμης Tyndall, ιδίως εάν έχει χρησιμοποιηθεί συνδιαλύτης για την ενίσχυση της διαλυτότητας. Όταν χρησιμοποιούνται ρυθμιστικά διαλύματα, η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 0,05 M.

Συνθήκες δοκιμής

Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία θα πρέπει να ρυθμίζεται με ακρίβεια τουλάχιστον ± 1°C. Ο προσδιορισμός θα πρέπει να εκτελείται κατά προτίμηση στους 20°C.

Εάν υπάρχουν υπόνοιες σημαντικής θερμοκρασιακής εξάρτησης, θα πρέπει να εκτελείται προσδιορισμός σε τουλάχιστον δύο ακόμη θερμοκρασίες. Τα διαστήματα θερμοκρασίας θα πρέπει να είναι 10°C σε αυτή την περίπτωση και η ακρίβεια ρύθμισης της θερμοκρασίας ± 0,1°C.

Αναλύσεις

Η μέθοδος καθορίζεται από τη φύση της υπό δοκιμή ουσίας. Θα πρέπει να έχει επαρκή ευαισθησία ώστε να επιτρέπει τον προσδιορισμό των διαφόρων χημικών ειδών σε κάθε συγκέντρωση του διαλύματος δοκιμής.

Εκτέλεση της δοκιμής

Τιτλοδοτική μέθοδος

Το διάλυμα δοκιμής προσδιορίζεται με τιτλοδότηση με πρότυπο διάλυμα βάσης ή οξέος, κατά περίπτωση, και μέτρηση του pH μετά από κάθε προσθήκη τιτλοδότη. Θα πρέπει να γίνονται τουλάχιστον 10 διαδοχικές προσθήκες πριν από το σημείο ισοδυναμίας. Εάν επιτυγχάνεται ισορροπία αρκετά γρήγορα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί καταγραφικό ποτενσιόμετρο. Για την παρούσα μέθοδο, πρέπει να είναι επακριβώς γνωστά τόσο η συνολική ποσότητα της ουσίας όσο και η συγκέντρωσή της. Πρέπει να λαμβάνονται προφυλάξεις για τον αποκλεισμό του διοξειδίου του άνθρακα. Λεπτομέρειες για τη διαδικασία, τις προφυλάξεις και τους υπολογισμούς παρέχονται σε πρότυπες δοκιμές, π.χ. στις βιβλιογραφικές παραπομπές (1), (2), (3), (4).

Φασματοφωτομετρική μέθοδος

Εντοπίζεται το μήκος κύματος στο οποίο οι ιονισμένες και μη ιονισμένες μορφές της ουσίας έχουν αισθητά διαφορετικούς συντελεστές απόσβεσης. Λαμβάνεται το φάσμα απορρόφησης στο υπεριώδες/ορατό τμήμα από διαλύματα σταθερής συγκέντρωσης σε συνθήκες pH στις οποίες η ουσία είναι ουσιαστικά μη ιονισμένη και πλήρως ιονισμένη, καθώς και σε διάφορα ενδιάμεσα pH. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί είτε με τη διαδοχική προσθήκη πυκνού οξέος (πυκνής βάσης) σε σχετικά μεγάλο όγκο διαλύματος της ουσίας σε πολυσυστατικό ρυθμιστικό διάλυμα, αρχικά σε υψηλό (χαμηλό) pH (βιβλιογραφική παραπομπή αριθ. 5), είτε με την προσθήκη ίσων όγκων διαλύματος παρακαταθήκης της ουσίας, π.χ. σε νερό ή μεθανόλη, σε σταθερούς όγκους διαφόρων ρυθμιστικών διαλυμάτων που καλύπτουν το επιθυμητό εύρος τιμών pH. Από τις τιμές pH και απορρόφησης στο επιλεγμένο μήκος κύματος υπολογίζεται επαρκής αριθμός τιμών pK_a με τη χρήση δεδομένων από τουλάχιστον 5 pH, όπου η ουσία είναι ιονισμένη σε ποσοστό από τουλάχιστον 10 % έως λιγότερο από 90 %. Πρόσθετες λεπτομέρειες για το πείραμα και η μέθοδος υπολογισμού παρατίθενται στη βιβλιογραφική παραπομπή (1).

▼M7

Αγωγιμομετρική μέθοδος

Με τη χρήση κυψελίδας μικρής και γνωστής σταθεράς, μετράται η αγωγιμότητα διαλύματος της ουσίας περίπου 0,1 M σε νερό χαμηλής αγωγιμότητας. Μετράται επίσης η αγωγιμότητα ορισμένων αραιώσεων του διαλύματος αυτού που παρασκευάζονται με ακρίβεια. Η συγκέντρωση υποδιπλασιάζεται σε κάθε αραίωση και η σειρά θα πρέπει να καλύπτει τουλάχιστον μία τάξη μεγέθους της συγκέντρωσης. Η περιοριστική αγωγιμότητα σε άπειρη αραίωση υπολογίζεται με την εκτέλεση παρόμοιου πειράματος με το άλας νατρίου και προεκβολή. Από την αγωγιμότητα κάθε διαλύματος μπορεί στη συνέχεια να υπολογιστεί ο βαθμός διάστασης με τη χρήση της εξίσωσης Onsager και, κατ' επέκταση, η σταθερά διάστασης με εφαρμογή του νόμου αραίωσης του Ostwald ως $K = \alpha^2C/(1 - \alpha)$όπου C είναι η συγκέντρωση, σε γραμμομόρια ανά λίτρο και α το διασταθέν κλάσμα. Πρέπει να λαμβάνονται προφυλάξεις για τον αποκλεισμό του CO_2. Πρόσθετες λεπτομέρειες σχετικά με το πείραμα και η μέθοδος υπολογισμού παρατίθενται στα έγγραφα αναφοράς και στις βιβλιογραφικές παραπομπές (1), (6) και (7).

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Τιτλοδοτική μέθοδος

Η pK_a υπολογίζεται για 10 σημεία που έχουν μετρηθεί στην καμπύλη τιτλοδότησης. Υπολογίζονται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση αυτών των τιμών pK_a. Θα πρέπει να περιλαμβάνεται διάγραμμα του pH σε συνάρτηση με τον όγκο της πρότυπης βάσης ή του πρότυπου οξέος, συνοδευόμενο από παρουσίαση σε πίνακα.

Φασματοφωτομετρική μέθοδος

Για κάθε φάσμα παρουσιάζονται σε πίνακα η απορρόφηση και το pH. Υπολογίζονται τουλάχιστον πέντε τιμές pK_a από τα σημεία ενδιάμεσων φασματικών δεδομένων, καθώς επίσης η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων αυτών.

Αγωγιμομετρική μέθοδος

Υπολογίζεται η ισοδύναμη αγωγιμότητα Λ για κάθε συγκέντρωση οξέος και για κάθε συγκέντρωση μείγματος ενός ισοδυνάμου οξέος συν 0,98 ισοδύναμα υδροξειδίου του νατρίου χωρίς ανθρακικό άλας. Το οξύ βρίσκεται σε περίσσεια ώστε να αποτρέπεται η περίσσεια OH^- λόγω υδρόλυσης. Σχεδιάζεται διάγραμμα του λόγου $1/\Lambda$ σε συνάρτηση με την $\sqrt{C}$ ενώ η τιμή του Λ_o του άλατος μπορεί να υπολογιστεί με προεκβολή στη μηδενική συγκέντρωση.

Η τιμή Λ_o του οξέος μπορεί να υπολογιστεί από τις τιμές της βιβλιογραφίας για τα ιόντα για H^+ και Na^+. Η τιμή pK_a μπορεί να υπολογιστεί από τις εξισώσεις $\alpha = \Lambda_i / \Lambda_o$ και $K_a = \alpha^2C/(1 - \alpha)$για κάθε συγκέντρωση. Καλύτερες τιμές K_a μπορούν να ληφθούν με διορθώσεις για να ληφθούν υπόψη η κινητικότητα και η ενεργότητα. Θα πρέπει να υπολογίζονται η μέση τιμή και οι τυπικές αποκλίσεις των τιμών pK_a.

Έκθεση δοκιμής

Θα πρέπει να υποβάλλονται όλα τα ανεπεξέργαστα δεδομένα και οι υπολογισμένες τιμές pK_a συνοδευόμενα από τη μέθοδο υπολογισμού (κατά προτίμηση σε πίνακα, όπως προτείνεται στη βιβλιογραφική παραπομπή αριθ. 1), καθώς και οι στατιστικές παράμετροι που περιγράφονται ανωτέρω. Για την τιτλοδοτική μέθοδο, θα πρέπει να παρέχονται λεπτομέρειες σχετικά με την τυποποίηση των τιτλοδοτών.

Για τη φασματοφωτομετρική μέθοδο, θα πρέπει να υποβάλλονται όλα τα φάσματα. Για την αγωγιμομετρική μέθοδο, θα πρέπει να αναφέρονται λεπτομέρειες για τον προσδιορισμό της σταθεράς της κυψελίδας. Θα πρέπει να υποβάλλονται στοιχεία σχετικά με τη χρησιμοποιούμενη τεχνική, τις αναλυτικές μεθόδους και το είδος των τυχόν χρησιμοποιούμενων ρυθμιστικών διαλυμάτων.

Θα πρέπει να αναφέρονται οι θερμοκρασίες της δοκιμής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Albert, A. & Sergeant, E.P.: *Ionization Constants of Acids and Bases,* Wiley, Inc., New York, 1962.

▼**M7**

(2) Nelson, N.H. & Faust, S.D.: Acidic dissociation constants of selected aquatic herbicides, Env. Sci. Tech. 3, II, pp. 1186-1188 (1969).

(3) ASTM D 1293 — Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.

(4) Standard Method 242. APHA/AWWA/WPCF, *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*, 14th Edition, American Public Health Association, Washington, D.C., 1976.

(5) Clark, J. & Cunliffe, A.E.: Rapid spectrophotometric measurement of ionisation constants in aqueous solution. Chem. Ind. (London) 281, (March 1973).

(6) ASTM D 1125 — Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.

(7) Standard Method 205 — APHA/AWWA/NPCF (βλ. 4 ανωτέρω).

(8) *Handbook of Chemistry and Physics,* 60th ed. CRC-Press, Boca Raton, Florida, 33431 (1980).

▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΜΕΡΟΣ Β: ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Β.1α. ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ — ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΟΚΑΘΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΔΟΣΕΩΝ

Β.1β. ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ — ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΩΝ ΚΛΑΣΕΩΝ ΟΞΕΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

Β.2. ΟΞΕΙΑ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

Β.3. ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ (ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ)

Β.4. ΟΞΕΙΑΣ ΜΟΡΦΗΣ ΕΡΕΘΙΣΜΟΣ/ΔΙΑΒΡΩΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

Β.5. ΟΞΕΙΑΣ ΜΟΡΦΗΣ ΕΡΕΘΙΣΜΟΣ/ΔΙΑΒΡΩΣΗ ΤΩΝ ΟΦΘΑΛΜΩΝ

Β.6. ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ: ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

Β.7. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ, 28 ΗΜΕΡΩΝ, ΜΕ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΔΟΣΗ ΣΕ ΤΡΩΚΤΙΚΑ

Β.8. ΥΠΟΞΕΙΑ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ: ΜΕΛΕΤΗ 28 ΗΜΕΡΩΝ

Β.9. ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗΣ (28 ΗΜΕΡΕΣ) ΔΟΣΗΣ (ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ)

Β.10. ΔΟΚΙΜΉ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΩΝ ΕΚΤΡΟΠΩΝ IN VITRO ΣΕ ΘΗΛΑΣΤΙΚΆ

Β.11. ΔΟΚΙΜΉ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΩΝ ΕΚΤΡΟΠΩΝ ΣΕ ΜΥΕΛΌ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

Β.12. ΔΟΚΙΜΉ ΜΙΚΡΟΠΥΡΉΝΩΝ ΣΕ ΕΡΥΘΡΟΚΎΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

Β.13/14. ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ — ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΑΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Β.17. *IN VITRO* ΔΟΚΙΜΕΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ HPRT ΚΑΙ XPRT

Β.21. ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ *IN VITRO*

Β.22. ΔΟΚΙΜΗ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΥ ΕΠΙΚΡΑΤΟΥΝΤΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΑ ΣΕ ΤΡΩΚΤΙΚΑ

▼B

Β.23.	ΔΟΚΙΜΗ ΣΠΕΡΜΟΓΟΝΙΑΚΗΣ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗΣ ΕΚΤΡΟΠΗΣ ΣΕ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ
Β.25.	ΚΛΗΡΟΝΟΜΗΣΙΜΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΠΟΝΤΙΚΟΥΣ
Β.26.	ΔΟΚΙΜΗ ΥΠΟΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ —ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ 90 ΗΜΕΡΩΝ ΜΕ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΔΟΣΗ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ
Β.27.	ΔΟΚΙΜΗ ΥΠΟΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ — ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ 90 ΗΜΕΡΩΝ ΜΕ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΔΟΣΗ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ ΣΕ ΜΗ ΤΡΩΚΤΙΚΑ
Β.28.	ΜΕΛΕΤΗ ΥΠΟΧΡΟΝΙΑΣ ΔΕΡΜΑΤΙΚΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΥΣΙΩΝ — ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΔΟΣΗ 90 ΗΜΕΡΩΝ ΣΤΟ ΔΕΡΜΑ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΡΩΚΤΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ
Β.29.	ΥΠΟΧΡΟΝΙΑ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ: ΜΕΛΕΤΗ 90 ΗΜΕΡΩΝ
Β.30.	ΜΕΛΕΤΕΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ
Β.31.	ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ
Β.32.	ΜΕΛΕΤΕΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΤΙΚΟΤΗΤΑΣ
Β.33.	ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ/ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΤΙΚΟΤΗΤΑΣ
Β.34.	ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΜΙΑΣ ΓΕΝΕΑΣ
Β.35.	ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΔΥΟ ΓΕΝΕΩΝ
Β.36.	ΤΟΞΙΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ
Β.37.	ΕΚ ΤΩΝ ΥΣΤΕΡΩΝ ΕΜΦΑΝΙΖΟΜΕΝΗ ΝΕΥΡΟΤΟΞΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΟΞΕΙΑ ΕΚΘΕΣΗ
Β.38.	ΕΚ ΤΩΝ ΥΣΤΕΡΩΝ ΕΜΦΑΝΙΖΟΜΕΝΗ ΝΕΥΡΟΤΟΞΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ — ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗΣ ΔΟΣΗΣ 28 ΗΜΕΡΩΝ
Β.39.	ΔΟΚΙΜΗ ΜΗ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΕΝΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ DNA (UDS) ΜΕ ΗΠΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ *IN VIVO*
Β.40.	ΔΙΑΒΡΩΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ *IN VITRO*: ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ΔΙΑΔΕΡΜΙΚΗΣ ΗΛΕΚΤΡΙΚΗΣ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ (TER)
Β.40α.	ΔΙΑΒΡΩΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ *IN VITRO*: ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ΣΕ ΑΝΑΣΥΣΤΑΘΕΙΣΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΕΠΙΔΕΡΜΙΔΑ (RhE)
Β.41.	ΔΟΚΙΜΗ ΦΩΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ 3T3 NRU *IN VITRO*
Β.42.	ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ: ΤΟΠΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΛΕΜΦΑΔΕΝΩΝ

▼B

B.43. ΜΕΛΕΤΗ ΝΕΥΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΤΡΩΚΤΙΚΑ

B.44. ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ: ΜΕΘΟΔΟΣ *IN VIVO*

B.45. ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ: ΜΕΘΟΔΟΣ *IN VITRO*

B.46. ΔΕΡΜΑΤΙΚΟΣ ΕΡΕΘΙΣΜΟΣ *IN VITRO*: ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ΣΕ ΑΝΑΣΥΣΤΑΘΕΙΣΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΕΠΙΔΕΡΜΙΔΑ

B.47. ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ΑΔΙΑΦΑΝΕΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΟΥΣ ΒΟΟΕΙΔΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΙΑΒΡΩΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΙΣΧΥΡΩΝ ΕΡΕΘΙΣΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΟΦΘΑΛΜΩΝ

B.48. ΜΈΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ΑΔΙΑΦΆΝΕΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΒΟΕΙΟΥ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΟΎΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΌ Ι) ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΏΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΎΝ ΣΟΒΑΡΉ ΟΦΘΑΛΜΙΚΉ ΒΛΆΒΗ ΚΑΙ ΙΙ) ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΏΝ ΠΟΥ ΔΕΝ ΕΠΙΒΆΛΛΕΤΑΙ ΝΑ ΤΑΞΙΝΟΜΗΘΟΎΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΟΦΘΑΛΜΙΚΌ ΕΡΕΘΙΣΜΌ Ή ΤΗ ΣΟΒΑΡΉ ΟΦΘΑΛΜΙΚΉ ΒΛΆΒΗ

B.49. ΜΈΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ΣΕ ΑΠΟΜΟΝΩΜΈΝΟΥΣ ΟΦΘΑΛΜΟΎΣ ΟΡΝΙΘΊΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΌ Ι) ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΏΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΎΝ ΣΟΒΑΡΉ ΟΦΘΑΛΜΙΚΉ ΒΛΆΒΗ ΚΑΙ ΙΙ) ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΏΝ ΠΟΥ ΔΕΝ ΕΠΙΒΆΛΛΕΤΑΙ ΝΑ ΤΑΞΙΝΟΜΗΘΟΎΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΟΦΘΑΛΜΙΚΌ ΕΡΕΘΙΣΜΌ Ή ΤΗ ΣΟΒΑΡΉ ΟΦΘΑΛΜΙΚΉ ΒΛΆΒΗ

B.50. ΔΟΚΙΜΉ ΜΙΚΡΟΠΥΡΉΝΩΝ IN VITRO ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

B.51. ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΡΜΑΤΟΣ: ΤΟΠΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΛΕΜΦΑΔΕΝΩΝ: BRDU-ELISA

B.52. ΟΞΕΙΑ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ — ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΩΝ ΚΛΑΣΕΩΝ ΟΞΕΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

B.53. ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΗΣ ΝΕΥΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

B.54. ΜΗΤΡΟΤΡΟΦΙΚΟΣ ΒΙΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΕ ΤΡΩΚΤΙΚΑ: ΒΡΑΧΥΠΡΟΘΕΣΜΗ ΔΟΚΙΜΗ ΔΙΑΛΟΓΗΣ ΓΙΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

B.55. ΒΙΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ HERSHBERGER ΣΕ ΕΠΙΜΥΕΣ: ΒΡΑΧΥΠΡΟΘΕΣΜΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ ΓΙΑ (ΑΝΤΙ)ΑΝΔΡΟΓΟΝΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

B.56. ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΙΑΣ ΓΕΝΕΑΣ

B.57. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΕΡΟΕΙΔΟΓΕΝΕΣΗΣ H295R

B.58. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΓΕΝΝΗΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΤΡΩΚΤΙΚΑ

B.59. ΔΕΡΜΑΤΙΚΉ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΊΗΣΗ IN CHEMICO: ΆΜΕΣΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΌΣ ΠΕΠΤΙΔΙΚΉΣ ΔΡΑΣΤΙΚΌΤΗΤΑΣ (DPRA)

B.60. ΔΕΡΜΑΤΙΚΉ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΊΗΣΗ IN VITRO: ΜΈΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ARE-NRF2/ΛΟΥΣΙΦΕΡΆΣΗΣ

B.61. ΜΈΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ΔΙΑΡΡΟΉΣ ΦΛΟΥΟΡΕΣΚΕΪΝΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΌ ΔΙΑΒΡΩΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΙΣΧΥΡΩΝ ΕΡΕΘΙΣΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΟΦΘΑΛΜΩΝ

B.62. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΌΣ COMET IN VIVO ΣΕ ΑΛΚΑΛΙΚΈΣ ΣΥΝΘΉΚΕΣ ΣΕ ΘΗΛΑΣΤΙΚΆ

▼**B**

B.63.	ΔΟΚΙΜΗ ΔΙΑΛΟΓΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ/ΑΝΑΠΤΥΞΗ
B.64.	ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗΣ ΔΟΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΔΟΚΙΜΗ ΔΙΑΛΟΓΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ/ΑΝΑΠΤΥΞΗ
B.65.	*IN VITRO* ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ΦΡΑΓΜΟΥ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΓΙΑ ΔΙΑΒΡΩΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ
B.66.	*IN VITRO* ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΔΙΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΑΘΕΡΩΣ ΔΙΑΜΟΛΥΝΘΕΝΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΓΩΝΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΩΝ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ
B.67.	*IN VITRO* ΔΟΚΙΜΕΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΘΥΜΙΔΙΝΟΚΙΝΑΣΗΣ
B.68.	IN VITRO ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ΒΡΑΧΥΧΡΟΝΙΑΣ ΕΚΘΕΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ i) ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ ΣΟΒΑΡΗ ΟΦΘΑΛΜΙΚΗ ΒΛΑΒΗ ΚΑΙ ii) ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΔΕΝ ΕΠΙΒΑΛΛΕΤΑΙ ΝΑ ΤΑΞΙΝΟΜΗΘΟΥΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΟΦΘΑΛΜΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΟ Η ΤΗ ΣΟΒΑΡΗ ΟΦΘΑΛΜΙΚΗ ΒΛΑΒΗ
B.69.	ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ΣΕ ΑΝΑΣΥΣΤΑΘΕΝ ΕΠΙΘΗΛΙΟ ΟΜΟΙΟ ΜΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΗ (RhCE) ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΔΕΝ ΕΠΙΒΑΛΛΕΤΑΙ ΝΑ ΤΑΞΙΝΟΜΗΘΟΥΝ ΚΑΙ ΝΑ ΕΠΙΣΗΜΑΝΘΟΥΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΟΦΘΑΛΜΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΟ Η ΤΗ ΣΟΒΑΡΗ ΟΦΘΑΛΜΙΚΗ ΒΛΑΒΗ
B.70.	*IN VITRO* ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ER
B.71.	*IN VITRO* ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΠΟΥ ΑΦΟΡΟΥΝ ΤΟ ΒΑΣΙΚΟ ΣΥΜΒΑΝ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΔΕΝΔΡΙΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΠΟΡΕΙΑ ΔΥΣΜΕΝΟΥΣ ΕΚΒΑΣΗΣ (AOP) ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

▼B

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A. **ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗΣ ΟΥΣΙΑΣ**

Η σύνθεση της ελεγχόμενης ουσίας, συμπεριλαμβανομένων των κυριότερων προσμείξεων και οι σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητές της, συμπεριλαμβανομένης της σταθερότητας, πρέπει να είναι γνωστές πριν από την έναρξη οποιασδήποτε μελέτης τοξικότητας.

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης ουσίας, παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για την επιλογή της οδού χορήγησης, τη σχεδίαση κάθε ιδιαίτερης μελέτης, το χειρισμό και τη φύλαξη της ελεγχόμενης ουσίας.

Η ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου γιο τον ποιοτικό Και ποσοτικό προσδιορισμό της ελεγχόμενης ουσίας (συμπεριλαμβανομένων των κυριότερων προσμείξεων, εάν είναι δυνατόν) στο μέσο χορήγησης των δόσεων, καθώς επίσης και στο βιολογικό υλικό. θα πρέπει να προηγείται από την έναρξη της μελέτης.

Όλα τα στοιχεία σχετικά με την ταυτότητα, τις φυσικοχημικές ιδιότητες, την καθαρότητα και την συμπεριφορά της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να περιλαμβάνονται στην έκθεση της δοκιμής.

B. **ΦΡΟΝΤΙΔΑ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ**

Για τις δοκιμές τοξικότητας ουσιαστικός είναι ο αυστηρός έλεγχος των περιβαλλοντικών συνθηκών και οι κατάλληλες τεχνικές φροντίδας των πειραματόζωων.

i) *Συνθήκες στέγασης*

Οι περιβαλλοντικές συνθήκες στους θαλάμους ή στα περιφράγματα θα πρέπει να είναι κατάλληλες για το κάθε είδος πειραματόζωου. Για τους επίμυες, τους ποντικούς και τα ινδικά χοιρίδια, κατάλληλες συνθήκες είναι η θερμοκρασία δωματίου 22 ± 3 ^{o}C με σχετική υγρασία 30 % έως 70 % 7 για τα κουνέλια η θερμοκρασία πρέπει να είναι 20 ± 3 ^{o}C με σχετική υγρασία 30 % έως 70 %.

Μερικές πειραματικές τελικές είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στην επίδραση της θερμοκρασίας και, σ' αυτές τις περιπτώσεις, η περιγραφή της πειραματικής μεθόδου πρέπει να περιλαμβάνει και λεπτομέρειες για τις κατάλληλες συνθήκες. Σε όλες τις έρευνες για τις τοξικές επιδράσεις η θερμοκρασία και η υγρασία πρέπει να παρακολουθούνται, να καταγράφονται και να περιλαμβάνονται στην τελική έκθεση της μελέτης.

Ο φωτισμός πρέπει να είναι τεχνητός και η φωτοπερίοδος να αποτελείται από δώδεκα ώρες φωτός και δώδεκα ώρες σκότους. Λεπτομέρειες για τον προγραμματισμό της φωτοπεριόδου πρέπει να καταγράφονται και να περιλαμβάνονται στην τελική έκθεση της μελέτης.

Εάν η μέθοδος δεν καθορίζει διαφορετικές συνθήκες, τα ζώα μπορούν να στεγάζονται ατομικά ή σε μικρές ομάδες ζώων του ιδίου φύλου. Σε περίπτωση ομαδικής στέγασης, τα κλουβιά δεν πρέπει να περιέχουν περισσότερα από πέντε ζώα.

Στις εκθέσεις πειραμάτων με ζώα, είναι σημαντικό να αναφέρεται ο τύπος των χρησιμοποιουμένων κλουβιών και ο αριθμός των ζώων ανά κλουβί, τόσο κατά την περίοδο έκθεσης στη χημική ουσία όσο και κατά την μετέπειτα περίοδο των παρατηρήσεων.

▼B

ii) *Συνθήκες διατροφής*

Τα σιτηρέσια πρέπει να ανταποκρίνονται σε όλες τις διατροφικές απαιτήσεις του χρησιμοποιουμένου πειραματόζωου. Όταν οι ουσίες χορηγούνται στα ζώα μαζί με την τροφή τους. Η θρεπτική αξία του σιτηρεσίου μπορεί να ελαττωθεί λόγω αλληλεπιδράσεων μεταξύ της ουσίας και των συστατικών της τροφής. Η δυνατότητα μιας τέτοιας αντίδρασης πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων του πειράματος. Επιτρέπεται η χορήγηση συμβατικών εργαστηριακών σιτηρεσίων με χορήγηση απεριόριστης ποσότητας πόσιμου νερού. Η επιλογή του σιτηρεσίου μπορεί να εξαρτηθεί από την ανάγκη εξασφάλισης κατάλληλου δείγματος ελεγχόμενης ουσίας εφόσον αυτή χορηγείται με την εν λόγω μέθοδο.

Τροφικές προσμείξεις που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν την τοξικότητα δεν πρέπει να περιέχονται στο σιτηρέσιο σε συγκεντρώσεις που θα επιτρέψουν παρεμβολή.

Γ. **ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ**

Η Ευρωπαϊκή Ένωση δεσμεύεται για την ανάπτυξη και την αξιολόγηση της εγκυρότητας εναλλακτικών τεχνικών που μπορούν να παρέχουν πληροφορίες του ιδίου επιπέδου με εκείνες που λαμβάνονται από τις τρέχουσες δοκιμές ου ζώου. χρησιμοποιώντας όπως μικρότερο αριθμό πειραματόζωων και προκαλώντας λιγότερη ταλαιπωρία ή αποφεύγοντας τη χρήση πειραματόζωων.

Τέτοιες μέθοδοι, εφόσον διατίθενται, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όταν είναι δυνατόν για τον χαρακτηρισμό του κινδύνου και την επακόλουθη ταξινόμηση και επισήμανση σε σχέση με τους εγγενείς κινδύνους.

Δ. **ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ**

Κατά την αξιολόγηση και ερμηνεία των δοκιμών, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι περιορισμοί στο βαθμό απ' ευθείας προέκτασης στον άνθρωπο των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τις δοκιμές *in vitro* σε ζώα και, εφόσον διατίθενται στοιχεία για δυσμενείς επιπτώσεις στον άνθρωπο, μπορεί να χρησιμοποιούνται για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων των δοκιμών.

Ε. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Οι περισσότερες από *τις* μεθόδους αυτές έχουν αναπτυχθεί στο πλαίσιο του προγράμματος του ΟΟΣΑ για τις κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών και πρέπει να εφαρμόζονται σύμφωνα με τις αρχές ορθής εργαστηριακής πρακτικής ώστε να εξασφαλίζεται η ευρύτερη δυνατή «αμοιβαία αποδοχή των δεδομένων».

Περαιτέρω πληροφορίες μπορούν να αναζητηθούν στις παραπομπές των κατευθυντήριων γραμμών του ΟΟΣΑ καθώς και στην αλλού δημοσιευμένη σχετική βιβλιογραφία.

▼B

Β.1α. ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ — ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΟΚΑΘΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΔΟΣΕΩΝ

1. Η ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντηρία γραμμή δοκιμών TG 420 (2001) του ΟΟΣΑ.

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στις κλασικές μεθόδους εκτίμησης της οξείας τοξικότητας, χρησιμοποιείται ως τελικό ο θάνατος των ζώων. Το 1984, η Βρετανική Τοξικολογική Εταιρεία πρότεινε μια νέα προσέγγιση των δοκιμών οξείας τοξικότητας, βασισμένη στη χορήγηση σειράς προκαθορισμένων δόσεων (1). Η προσέγγιση αυτή αποτρέπει τη χρήση του θανάτου των ζώων ως τελικού σημείου και αντί αυτού, στηρίζεται στην παρατήρηση σαφών συμπτωμάτων τοξικότητας σε ένα από μια σειρά προκαθορισμένων επιπέδων δόσης. Μετά τη διεξαγωγή μελετών ελέγχου της αξιοπιστίας, *in vivo,* συγκεκριμένα μίας στο Ηνωμένο Βασίλειο (2) και μίας δεύτερης σε διεθνή κλίμακα(3), η διαδικασία εγκρίθηκε ως μέθοδος δοκιμών το 1992. Στη συνέχεια, αξιολογήθηκαν σε σειρά μελετών, με χρήση μαθηματικών μοντέλων, οι στατιστικές ιδιότητες της διαδικασίας σταθερής δόσης (4)(5)(6). Οι μελέτες *in vivo* σε συνδυασμό με τις μελέτες εκπόνησης μοντέλων έδειξαν ότι η διαδικασία διαθέτει επαναληπτικότητα, απαιτεί μικρότερο αριθμό ζώων και τους προκαλεί λιγότερες ταλαιπωρίες σε σύγκριση με τις κλασικές μεθόδους, Επίσης, παρέχει ανάλογες δυνατότητες ταξινόμησης των ουσιών με τις άλλες μεθόδους δοκιμών οξείας τοξικότητας.

Οδηγίες για την επιλογή της καταλληλότερης μεθόδου δοκιμών σε κάθε δεδομένη περίπτωση παρέχονται από το καθοδηγητικό έγγραφο «Guidance document on Acute Oral Toxicity Testing» (7), το οποίο περιέχει επίσης συμπληρωματικές πληροφορίες σχετικά με την εφαρμογή και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών Β.1δις.

Αποτελεί αρχή της μεθόδου η χρήση στην κυρίως μελέτη μόνο μετρίως τοξικών και η αποφυγή της χορήγησης δόσεων που προβλέπεται να είναι θανατηφόρες. Επίσης, δεν χρειάζεται να χορηγούνται δόσεις που είναι γνωστό ότι προκαλούν ισχυρούς πόνους και έντονη δυσφορία, εξαιτίας της διαβρωτικής ή πολύ ερεθιστικής δράσης των ουσιών. Τα ετοιμοθάνατα ζώα, καθώς και εκείνα που εμφανίζουν σαφή σημεία πόνου ή έντονης και διαρκούς δυσφορίας, θανατώνονται με ευθανασία και λαμβάνονται υπόψη της απόφασης να θανατωθούν ετοιμοθάνατα ή βαρέως πάσχοντα ζώα, καθώς και οι οδηγίες για την αναγνώριση των ενδείξεων προβλέψιμου ή επικείμενου θανάτου αποτελούν το αντικείμενο χωριστού καθοδηγητικού εγγράφου (8).

Η μέθοδος παρέχει στοιχεία για τις επικίνδυνες ιδιότητες των ουσιών και επιτρέπει την ιεράρχηση και την ταξινόμησή τους σύμφωνα με το Παγκόσμιο Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης των χημικών ουσιών που προκαλούν οξεία τοξικότητα (GHS από τα αρχικά τον αγγλικού Globally Harmonised System) (9).

Πριν από τη διεξαγωγή της μελέτης, το εργαστήριο δοκιμών θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη όλα τα διαθέσιμα στοιχεία σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία, μεταξύ των οποίων την ταυτότητα και τη χημική δομή της, τις φυσικές και χημικές ιδιότητές της, τα αποτελέσματα τυχόν άλλων δοκιμών τοξικότητας της ουσίας in vivo, τα τοξικολογικά δεδομένα του αφορούν ουσίες ανάλογης χημικής δομής, καθώς και την ή τις προβλεπόμενες χρήσεις της ουσίας. Οι πληροφορίες αυτές είναι απαραίτητες για να διασφαλίζεται ότι η διεξαγωγή της δοκιμής έχει ουσιαστική σημασία για την προστασία της υγείας του ανθρώπου και βοηθούν στην εκλογή της κατάλληλης αρχικής δόσης.

▼B

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

Οξεία τοξικότητα από το στόμα: οι δυσμενείς δράσεις που παρατηρούνται μετά τη χορήγηση από το στόμα μίας δόσης της ουσίας εφάπαξ ή πολλών δόσεων εντός 24ώρου.

Όψιμος θάνατος: η περίπτωση όπου ένα ζώο δεν πεθαίνει ούτε φαίνεται ετοιμοθάνατο εντός 48 ωρών, αλλά πεθαίνει αργότερα στη διάρκεια της περιόδου παρατήρησης που διαρκεί 14 ημέρες.

Δόση: η χορηγούμενη ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας εκφράζεται σε βάρος ελεγχόμενης ουσίας ανά μονάδα βάρους του πειραματόζωου (π.χ. mg/kg).

Έκδηλη τοξικότητα: γενικός όρος που δηλώνει την εμφάνιση σαφών συμπτωμάτων τοξικότητας μετά τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας [βλέπε παραδείγματα στη δημοσίευση (3)], ώστε να αναμένεται ότι η αμέσως υψηλότερη προκαθορισμένη δόση θα προκαλέσει είτε ισχυρό πόνο και διαρκή σημεία έντονης δυσφορίας ή κατάσταση ετοιμοθάνατου [τα σχετικά κριτήρια παρατίθενται στο καθοδηγητικό έγγραφο για τα τελικά σημεία ευθανασίας (8)] ή πιθανή θνησιμότητα στα περισσότερα ζώα.

GHS: παγκόσμιο εναρμονισμένο σύστημα ταξινόμησης για τις χημικές ουσίες και τα μίγματά τους. Πρόκειται για κοινή πρωτοβουλία του ΟΟΣΑ (υγεία του ανθρώπου και περιβάλλον), της Επιτροπής Εμπειρογνωμόνων για τις Μεταφορές Επικίνδυνων Εμπορευμάτων του ΟΗΕ (φυσικές και χημικές ιδιότητες) και της Διεθνούς Οργάνωσης Εργασίας (ανακοίνωση κινδύνων), με συντονιστή το Πρόγραμμα Διεθνών Οργανισμών για την ορθή Διαχείριση των Χημικών Προϊόντων (IOMC).

Επικείμενος θάνατος: η περίπτωση όπου αναμένεται κατάσταση ετοιμοθάνατου ή θάνατος πριν από τον επόμενο προγραμματισμένο χρόνο παρατήρησης. Μεταξύ των ενδείξεων επικείμενου θανάτου στα τρωκτικά περιλαμβάνονται οι σπασμοί, η πλάγια θέση, η κατάκλιση και ο τρόμος [για περισσότερες λεπτομέρειες, βλέπε καθοδηγητικό έγγραφο για τα τελικά σημεία ευθανασίας (8)].

LD_{50} **(διάμεσος θανατηφόρου δόσης):** η στατιστικά λαμβανόμενη τιμή εφάπαξ δόσης μιας ουσίας που αναμένεται να προκαλέσει το θάνατο του 50 % των πειραματόζωων, όταν χορηγηθεί από το στόμα. Η τιμή LD_{50} εκφράζεται σε βάρος ελεγχόμενης ουσίας ανά μονάδα βάρους του πειραματόζωου (mg/kg).

Οριακή δόση: μια δόση που αποτελεί το ανώτατο όριο για τη δοκιμή (2 000 ή 5 000 mg/kg).

Κατάσταση ετοιμοθάνατου: η κατάσταση πολύ κοντά στο θάνατο ή η αδυναμία επιβίωσης ακόμη και μετά από θεραπευτική αγωγή [για περισσότερες λεπτομέρειες, βλέπε καθοδηγητικό έγγραφο για τα τελικά σημεία ευθανασίας (8)].

Προβλέψιμος θάνατος: η εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων που αποτελούν ένδειξη μελλοντικού θανάτου σε γνωστό χρόνο πριν από τον προγραμματισμένο τερματισμό του πειράματος, λόγου χάριν η αδυναμία του πειραματόζωου να φθάσει την τροφή ή το νερό [για περισσότερες λεπτομέρειες, βλέπε καθοδηγητικό έγγραφο για τα τελικά σημεία ευθανασίας (8)].

▼B

1.3 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Σε ομάδες ζώων του ίδιου φύλου χορηγούνται με βαθμιδωτή διαδικασία οι προκαθορισμένες δόσεις 5, 50, 300 και 2 000 mg/kg (κατ' εξαίρεση, μπορεί να προστεθεί η προκαθορισμένη δόση 5 000 mg/kg, βλέπε σημείο 1.6.2). Η αρχική δόση επιλέγεται με βάση τα αποτελέσματα αναγνωριστικής μελέτης ως η δόση εκείνη που αναμένεται να προκαλέσει κάποια συμπτώματα τοξικότητας, όχι όμως σοβαρές τοξικές επιδράσεις ή θνησιμότητα. Τα κλινικά συμπτώματα και οι παθολογικές καταστάσεις που συνοδεύονται από πόνο, ταλαιπωρίες και επικείμενο θάνατο περιγράφονται λεπτομερώς σε χωριστό καθοδηγητικό έγγραφο του ΟΟΣΑ (8). Ανάλογα με την εκδήλωση ή την απουσία συμπτωμάτων τοξικότητας ή θνησιμότητας, είναι δυνατόν να χορηγηθούν σε πρόσθετες ομάδες ζώων υψηλότερες ή χαμηλότερες προκαθορισμένες δόσεις. Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται μέχρι να προσδιοριστεί η δόση που προκαλεί έκδηλη τοξικότητα ή το θάνατο όχι περισσότερων του ενός ζώων ή διακόπτεται όταν δεν παρατηρούνται επιδράσεις στο ανώτατο επίπεδο δόσης ή η κατώτατη δόση προκαλεί θανάτους.

1.4 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

1.4.1 **Επιλογή είδους ζώων**

Το προτιμώμενο είδος τρωκτικού είναι ο επίμυς, αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη τρωκτικών. Κατά κανόνα χρησιμοποιούνται θηλυκά ζώα (7), επειδή από τη βιβλιογραφική έρευνα για τις συμβατικές δοκιμές LD_{50} προκύπτει ότι, αν και οι διαφορές ευπάθειας μεταξύ των δύο φύλων είναι συνήθως ελάχιστες, όταν παρατηρούνται διαφορές, τα θηλυκά ζώα είναι κατά κανόνα ελαφρώς πιο ευπαθή (10). Εάν ωστόσο οι γνώσεις σχετικά με τις τοξικολογικές ή τοξικοκινητικές ιδιότητες χημικών ουσιών με ανάλογη χημική δομή συνηγορούν υπέρ του ότι τα αρσενικά ζώα είναι πιθανώς πιο ευπαθή, τότε θα πρέπει να προτιμάται αυτό το φύλο. Όταν η δοκιμή διεξάγεται σε αρσενικά ζώα, η επιλογή αυτή θα πρέπει να αιτιολογείται επαρκώς.

Πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή νεαρά ενήλικα ζώα που ανήκουν σε φυλές κοινής εργαστηριακής χρήσης. Τα θηλυκά ζώα πρέπει να μην έχουν ποτέ γεννήσει ούτε να εγκυμονούν. Κατά την έναρξη της χορήγησης των δόσεων, η ηλικία κάθε ζώου πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 8 και 12 εβδομάδων και το βάρος του να μην αποκλίνει περισσότερο από ± 20 % από το μέσο βάρος των ζώων στα οποία έχει ενδεχομένως χορηγηθεί η ουσία σε προηγούμενο στάδιο.

1.4.2 **Συνθήκες στέγασης και διατροφής**

Η θερμοκρασία του θαλάμου πειραματόζωων πρέπει να είναι 22 °C (± 3 °C). Αν και η σχετική υγρασία πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου, εν τούτοις ο στόχος θα πρέπει να είναι μια τιμή 50-60 %. Ο φωτισμός πρέπει να είναι τεχνητός, με εναλλαγή φωτός-σκότους ανά 12ωρο. Για τη διατροφή των ζώων μπορούν να χρησιμοποιούνται τα συνήθη εργαστηριακά σιτηρέσια, με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού. Τα ζώα μπορούν να τοποθετούνται ομαδικά σε κλουβιά κατά δόση, αλλά ο αριθμός ζώων σε κάθε κλουβί δεν πρέπει να παρεμποδίζει την ακριβή παρατήρηση του καθενός ζώου.

1.4.3 **Προετοιμασία των ζώων**

Τα ζώα επιλέγονται τυχαία, σημαίνονται με τρόπο που επιτρέπει την αναγνώριση του καθενός και παραμένουν στα κλουβιά τους τουλάχιστον για πέντε ημέρες πριν από την έναρξη της χορήγησης των δόσεων, ώστε να εγκλιματιστούν στις εργαστηριακές συνθήκες.

▼B

1.4.4 **Παρασκευή των δόσεων**

Ο χορηγούμενος όγκος της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει κατά κανόνα να διατηρείται σταθερός σε όλη τη σειρά των δόσεων της δοκιμής με αλλαγή της συγκέντρωσης του χορηγούμενου παρασκευάσματος Όταν ωστόσο πρόκειται να ελεγχθεί ένα υγρό τελικό προϊόν ή μίγμα, η χρήση της ελεγχόμενης ουσίας χωρίς αραίωση, δηλαδή σε σταθερή συγκέντρωση, μπορεί να είναι πιο ενδεδειγμένη για τη μετέπειτα εκτίμηση των κινδύνων, ενώ αποτελεί και απαίτηση ορισμένων αρμόδιων για τις νομοθετικές ρυθμίσεις Αρχών. Σε κάθε περίπτωση, δεν επιτρέπεται υπέρβαση του μέγιστου όγκου χορηγούμενης δόσης. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Στα τρωκτικά, ο όγκος δεν πρέπει κατά κανόνα να υπερβαίνει το 1 ml/100 g βάρους σώματος, αλλά στην περίπτωση των υδατικών διαλυμάτων μπορεί να εξετασθεί το ενδεχόμενο χορήγησης 2 ml/100 g βάρους σώματος. Όσον αφορά τη μορφή του χορηγούμενου παρασκευάσματος, συνιστάται να χρησιμοποιούνται, κατά το δυνατόν, υδατικά διαλύματα/εναιωρήματα/γαλακτώματα, με δεύτερα κατά σειρά προτίμησης τα διαλύματα/εναιωρήματα/γαλακτώματα σε έλαιο (π.χ. αραβοσιτέλαιο) και τελευταία τα διαλύματα σε άλλους φορείς. Σε περίπτωση χρήσης άλλου φορέα πλην του νερού, πρέπει να είναι γνωστές οι τοξικολογικές ιδιότητές του. Οι δόσεις πρέπει να παρασκευάζονται λίγο πριν από τη χορήγηση, εκτός εάν η σταθερότητα του παρασκευάσματος στο χρονικό διάστημα εντός του οποίου πρόκειται να χρησιμοποιηθεί είναι γνωστή και έχει κριθεί αποδεκτή.

1.5 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.5.1 **Χορήγηση των δόσεων**

Η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται εφάπαξ με τη βοήθεια ρινογαστρικού καθετήρα σίτισης ή κατάλληλου σωλήνα διασωλήνωσης. Στη σπάνια περίπτωση όπου η εφάπαξ χορήγηση δεν είναι εφικτή, η δόση μπορεί να χορηγηθεί τμηματικά εντός περιόδου που δεν υπερβαίνει τις 24 ώρες.

Πριν από τη χορήγηση των δόσεων, τα ζώα υποβάλλονται σε νηστεία (π.χ. διακοπή της σίτισης, αλλά όχι της παροχής νερού για όλη την προηγούμενη νύκτα, όταν χρησιμοποιούνται επίμυες, ή για 3-4 ώρες, όταν χρησιμοποιούνται ποντικοί). Μετά την περίοδο νηστείας, τα ζώα ζυγίζονται και τους χορηγείται η ελεγχόμενη ουσία. Η διακοπή της σίτισης μπορεί να συνεχιστεί και μετά τη χορήγηση της ουσίας για 3-4 ώρες, προκειμένου για επίμυες, ή 1-2 ώρες, προκειμένου για ποντικούς. Σε περίπτωση τμηματικής χορήγησης της δόσης εντός ορισμένου χρόνου, μπορεί να χρειαστεί να δοθεί στα ζώα τροφή και νερό, ανάλογα με τη διάρκεια του συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος.

1.5.2 **Αναγνωριστική μελέτη**

Σκοπός της αναγνωριστικής μελέτης είναι να επιτρέψει την επιλογή της ενδεδειγμένης αρχικής δόσης για την κυρίως μελέτη. Η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται σε μεμονωμένα ζώα σε διαδοχικά στάδια σύμφωνα με τα διαγράμματα ροής του παρατήματος 1. Η αναγνωριστική μελέτη τερματίζεται όταν μπορεί να ληφθεί απόφαση σχετικά με την αρχική δόση της κυρίως μελέτης (ή εάν η κατώτατη προκαθορισμένη δόση προκαλέσει θάνατο).

Η αρχική δόση της αναγνωριστικής μελέτης επιλέγεται μεταξύ των προκαθορισμένων επιπέδων 5, 50, 300 και 2 000 mg/kg ως η δόση που αναμένεται να προκαλέσει έκδηλη τοξικότητα, κατά το δυνατόν με βάση δεδομένα από μελέτες *in vivo* και *in vitro* με την ίδια ουσία ή με ουσίες ανάλογης χημικής δομής. Εάν δεν υπάρχουν τέτοια στοιχεία, η αρχική δόση είναι 300 mg/kg.

Τα διαδοχικά στάδια χορήγησης των δόσεων στο εκάστοτε ζώο πρέπει να απέχουν τουλάχιστον 24 ώρες. Όλα τα ζώα πρέπει να παρατηρούνται για 14 ημέρες τουλάχιστον.

▼B

Κατ' εξαίρεση, και μόνον εφόσον το επιβάλλουν συγκεκριμένες ανάγκες νομοθετικής ρύθμισης, μπορεί να εξεταστεί η χρήση ενός επιπλέον ανώτατου προκαθορισμένου επιπέδου δόσης 5 000 mg/kg (βλέπε παράρτημα 3). Για λόγους προστασίας των ζώων, η διεξαγωγή δοκιμών σε ζώα με δόσεις της κλίμακας που ορίζει την κατηγορία 5 του GHS (2 000-5 000 mg/kg) δεν συνιστάται και θα πρέπει να εξετάζεται μόνον εφόσον υπάρχουν μεγάλες πιθανότητες τα αποτελέσματα των δοκιμών αυτών να έχουν άμεση, ουσιαστική σημασία για την προστασία της υγείας των ζώων ή του ανθρώπου ή για την προστασία του περιβάλλοντος.

Σε περίπτωση θανάτου ενός ζώου στο οποίο έχει χορηγηθεί η κατώτατη προκαθορισμένη δόση για την αναγνωριστική μελέτη (5 mg/kg), ο κανόνας είναι να τερματίζεται η μελέτη και η ουσία να κατατάσσεται στην κατηγορία 1 του GHS (όπως φαίνεται στο παράρτημα 1). Εάν ωστόσο απαιτείται επιβεβαίωση της ταξινόμησης, μπορεί να εφαρμοστεί η προαιρετική συμπληρωματική διαδικασία που ακολουθεί. Χορηγούνται 5 mg/kg σε ένα δεύτερο ζώο. Εάν αυτό πεθάνει, τότε επιβεβαιώνεται η κατάταξη στην κατηγορία 1 του GHS και η μελέτη τερματίζεται αμέσως. Εάν το δεύτερο ζώο επιζήσει, χορηγούνται 5 mg/kg σε τρία επιπλέον ζώα κατ' ανώτατο όριο. Επειδή υπάρχει πλέον μεγάλος κίνδυνος θνησιμότητας, η δόση θα πρέπει να χορηγείται διαδοχικά για να προστατεύονται τα ζώα. Το χρονικό διάστημα μεταξύ των διαδοχικών σταδίων χορήγησης της δόσης πρέπει να είναι επαρκές, ώστε να τεκμαίρεται ότι το προηγούμενο ζώο θα επιζήσει. Σε περίπτωση δεύτερου θανάτου, η ακολουθία χορήγησης της δόσης διακόπτεται αμέσως και δεν υποβάλλονται σε δοκιμή άλλα ζώα. Δεδομένου ότι ο δεύτερος θάνατος (ανεξαρτήτως του αριθμού των ζώων που είχαν υποβληθεί στη δοκιμή κατά το χρόνο τερματισμού) εμπίπτει στην έκβαση Α (2 ή περισσότεροι θάνατοι), εφαρμόζεται ο κανόνας ταξινόμησης του παραρτήματος 2 για την προκαθορισμένη δόση 5 mg/kg (κατάταξη στην κατηγορία 1, όταν διαπιστώνονται 2 ή περισσότεροι θάνατοι, ή στην κατηγορία 2, όταν διαπιστώνεται μόνον 1 θάνατος). Επιπλέον, το παράρτημα 4 παρέχει καθοδήγηση για την ταξινόμηση κατά το σύστημα της ΕΕ μέχρι να εφαρμοστεί το νέο GHS.

1.5.3 **Κυρίως μελέτη**

1.5.3.1 *Αριθμοί ζώων και επίπεδα δόσεων*

Το επόμενο βήμα μετά τη δοκιμή με την αρχική δόση υποδεικνύεται στα διαγράμματα ροής του παραρτήματος 2. Υπάρχουν οι εξής τρεις πιθανότητες: διακοπή της δοκιμής και κατάταξη στην ενδεδειγμένη κλάση κινδύνου ή δοκιμή με υψηλότερη προκαθορισμένη δόση ή δοκιμή με χαμηλότερη προκαθορισμένη δόση. Παρόλα αυτά, για λόγους προστασίας των ζώων, οι δόσεις που προκαλούν θανάτους κατά την αναγνωριστική μελέτη δεν χορηγούνται εκ νέου κατά την κυρίως μελέτη (βλέπε παράρτημα 2). Η πείρα δείχνει ότι το πιθανότερο αποτέλεσμα της δοκιμής με την αρχική δόση είναι η δυνατότητα ταξινόμησης της ουσίας, χωρίς να χρειάζονται άλλες δοκιμές.

Για κάθε επίπεδο δόσης που ελέγχεται, χρησιμοποιούνται κατά κανόνα πέντε ζώα του ίδιου φύλου. Η ομάδα των πέντε ζώων σχηματίζεται από το ζώο στο οποίο χορηγήθηκε το συγκεκριμένο επίπεδο δόσης κατά την αναγνωριστική μελέτη συν τέσσερα άλλα ζώα (εκτός εάν —σπάνια περίπτωση— ένα επίπεδο δόσης της κυρίως μελέτης δεν χορηγήθηκε στο πλαίσιο της αναγνωριστικής).

Το χρονικό διάστημα μεταξύ των δόσεων καθορίζεται ανάλογα με το χρόνο εκδήλωσης, τη διάρκεια και τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων τοξικότητας. Η χορήγηση της επόμενης δόσης θα πρέπει να καθυστερεί μέχρις ότου είναι βέβαιο ότι τα ζώα που έλαβαν την προηγούμενη θα επιζήσουν. Συνιστάται να μεσολαβούν μεταξύ των δόσεων 3 ή 4 ημέρες, εάν χρειάζεται, ώστε να είναι δυνατόν να διαπιστωθούν οι όψιμες τοξικές επιδράσεις. Το χρονικό διάστημα μεταξύ των δόσεων μπορεί να αναπροσαρμόζεται ανάλογα με τις ανάγκες, λόγου χάριν στις περιπτώσεις αβέβαιης απόκρισης.

▼B

Όταν εξετάζεται η χρήση των 5 000 mg/kg ως ανώτατης προκαθορισμένης δόσης, πρέπει να εφαρμόζεται η διαδικασία που περιγράφεται στο παράρτημα 3 (βλέπε επίσης σημείο 1.6.2).

1.5.3.2 *Οριακή δοκιμή*

Η οριακή δοκιμή χρησιμοποιείται κυρίως στις περιπτώσεις όπου ο ερευνητής έχει στη διάθεσή του στοιχεία, από τα οποία προκύπτει ότι η ελεγχόμενη ουσία μάλλον δεν είναι τοξική, δηλαδή ότι έχει τοξικές επιδράσεις μόνον εάν ληφθεί σε δόσεις μεγαλύτερες από τις οριακές τιμές που προβλέπονται στις νομοθετικές ρυθμίσεις. Στοιχεία σχετικά με την τοξικότητα της ελεγχόμενης ουσίας είναι δυνατόν να συναχθούν από τα αποτελέσματα δοκιμών που έχουν διεξαχθεί με ενώσεις, μίγματα ή προϊόντα ανάλογης χημικής δομής, λαμβάνοντας υπόψη την ταυτότητα και την εκατοστιαία αναλογία των σημαντικών από τοξικολογική άποψη συστατικών. Στις περιπτώσεις όπου δεν υπάρχουν καθόλου ή υπάρχουν ελάχιστα στοιχεία για την τοξικότητα της ελεγχόμενης ουσίας ή εάν η τελευταία αναμένεται να είναι τοξική, πρέπει να διεξάγεται η κυρίως δοκιμή.

Μία αναγνωριστική μελέτη με αρχική δόση 2 000 mg/kg (ή κατ' εξαίρεση 5 000 mg/kg), ακολουθούμενη από τη χορήγηση της ίδιας δόσης σε τέσσερα επιπλέον ζώα, με εφαρμογή της συνήθους διαδικασίας, συνιστά οριακή δοκιμή για τους σκοπούς της παρούσας κατευθυντήριας γραμμής.

1.6 ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Τα ζώα εξετάζονται το καθένα χωριστά τουλάχιστον μία φορά εντός των πρώτων 30 λεπτών από τη χορήγηση της ουσίας και τακτικά στη διάρκεια του πρώτου 24ώρου, με ιδιαίτερη προσοχή στις πρώτες 4 ώρες. Στη συνέχεια, εξετάζονται καθημερινά για 14 ημέρες συνολικά, εκτός εάν χρειαστεί να αποσυρθούν από τη μελέτη και να θανατωθούν με ευθανασία για να μην υποφέρουν ή εάν βρεθούν νεκρά. Η διάρκεια της περιόδου παρατήρησης δεν πρέπει πάντως να είναι αυστηρά καθορισμένη, αλλά να συναρτάται με τις τοξικές αντιδράσεις, το χρόνο εκδήλωσής τους και το χρόνο ανάρρωσης· συνεπώς, μπορεί να παρατείνεται, εφόσον κρίνεται απαραίτητο. Ο χρόνος εμφάνισης και εξαφάνισης των συμπτωμάτων τοξικότητας έχει μεγάλη σημασία, ιδίως στις περιπτώσεις όπου αυτά τείνουν να εκδηλώνονται με καθυστέρηση (11). Όλες οι παρατηρήσεις καταγράφονται συστηματικά σε χωριστό αρχείο για κάθε ζώο.

Εάν τα ζώα εξακολουθούν να παρουσιάζουν συμπτώματα τοξικότητας, απαιτούνται συμπληρωματικές παρατηρήσεις, μεταξύ των οποίων αλλαγές στο δέρμα και στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους, επίσης στη λειτουργία του αναπνευστικού και του κυκλοφοριακού συστήματος, του Κ.Ν.Σ και του αυτόνομου, καθώς και στη σωματική κινητικότητα και τη συμπεριφορά. Η προσοχή πρέπει να εστιάζεται στην παρατήρηση των σημείων τρόμου, σπασμών, σιελόρροιας, διάρροιας, υπνηλίας, λήθαργου και κώματος. Πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι γενικές αρχές και τα κριτήρια που συνοψίζονται στο καθοδηγητικό έγγραφο για τα τελικά σημεία ευθανασίας (8). Τα ετοιμοθάνατα ζώα και όσα εμφανίζουν ισχυρούς πόνους ή διαρκή σημεία έντονης δυσφορίας θα πρέπει να θανατώνονται με ευθανασία Ο χρόνος θανάτου των ζώων που θανατώνονται για να μην υποφέρουν ή βρίσκονται νεκρά θα πρέπει να σημειώνεται με τη μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια.

1.6.1 **Βάρος σώματος**

Το βάρος κάθε ζώου πρέπει να μετριέται λίγο πριν από τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας και, μετά, τουλάχιστον ανά εβδομάδα. Πρέπει να υπολογίζονται οι αλλαγές βάρους και να καταγράφονται. Στο τέλος της δοκιμής, τα ζώα που έχουν επιζήσει ζυγίζονται και έπειτα θανατώνονται με ευθανασία·.

▼B

1.6.2 **Παθολογία**

Σε όλα τα ζώα της δοκιμής (συμπεριλαμβανομένων εκείνων που πεθαίνουν στη διάρκεια της μελέτης ή αποσύρονται από τη μελέτη για να μην υποφέρουν τα ζώα) πρέπει να διενεργείται νεκροψία-νεκροτομία. Για κάθε ζώο, πρέπει να καταγράφονται όλες οι μακροσκοπικές παθολογικές αλλοιώσεις. Στα ζώα που επιζούν 24 ή περισσότερες ώρες μετά τη χορήγηση της πρώτης δόσης, μπορεί επιπλέον να πραγματοποιείται μικροσκοπική εξέταση των οργάνων που εμφανίζουν μακροσκοπικώς παθολογικές αλλοιώσεις, καθώς από την εξέταση αυτή ενδέχεται να προκύψουν χρήσιμα στοιχεία.

2 **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Πρέπει να παρέχονται τα δεδομένα για κάθε ζώο χωριστά. Επιπλέον, το σύνολο των δεδομένων πρέπει να συνοψίζεται σε πίνακα, όπου θα εμφαίνονται, για κάθε ομάδα της δοκιμής, ο αριθμός ζώων που χρησιμοποιήθηκαν, ο αριθμός ζώων που παρουσίασαν συμπτώματα τοξικότητας, ο αριθμός ζώων που βρέθηκαν νεκρά στη διάρκεια της δοκιμής ή θανατώθηκαν για να μην υποφέρουν, ο χρόνος θανάτου κάθε ζώου, περιγραφή και εξέλιξη των τοξικών επιδράσεων και κατά πόσον ήταν ανατάξιμες, καθώς και τα ευρήματα από τη νεκροψία.

3 **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ**

3.1 ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία, κατά περίπτωση:

Ελεγχόμενη ουσία:

— φυσική κατάσταση, καθαρότητα και, εφόσον έχει σημασία, φυσικές και χημικές ιδιότητες (συμπεριλαμβανομένης της ισομερείωσης)·

— στοιχεία ταυτότητας, μεταξύ των οποίων τον αριθμό CAS.

Φορέας (κατά περίπτωση):

— αιτιολόγηση της επιλογής άλλου φορέα εκτός από νερό.

Πειραματόζωα:

— είδος/φυλή που χρησιμοποιήθηκε·

— μικροβιολογική κατάσταση των ζώων, εφόσον είναι γνωστή·

— αριθμό, ηλικία και φύλο των ζώων (όπου συμπεριλαμβάνεται, κατά περίπτωση, αιτιολόγηση της χρήσης αρσενικών αντί θηλυκών ζώων)·

— προέλευση των ζώων, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσιο κλπ..

Συνθήκες δοκιμής:

— λεπτομέρειες για το παρασκεύασμα της ελεγχόμενης ουσίας, συμπεριλαμβανομένης της φυσικής κατάστασης στην οποία χορηγήθηκε·

— λεπτομέρειες για τη χορήγηση των δόσεων, συμπεριλαμβανομένων των όγκων τους και του χρόνου χορήγησης·

— λεπτομέρειες για την ποιότητα της τροφής και του νερού (μεταξύ άλλων, τύπος/προέλευση του σιτηρεσίου, προέλευση του νερού)·

— αιτιολόγηση της επιλογής της αρχικής δόσης.

▼B

Αποτελέσματα:

— πίνακα με τα δεδομένα απόκρισης και τα επίπεδα δόσης για κάθε ζώο (δηλ. ζώα που παρουσίασαν συμπτώματα τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένης της θνησιμότητας, φύση, σοβαρότητα και διάρκεια των επιδράσεων)·

— πίνακα με τα βάρη των ζώων και τις μεταβολές τους·

— για κάθε ζώο, βάρος την ημέρα χορήγησης της δόσης, κατόπιν ανά εβδομάδα και, τέλος, κατά το χρόνο θανάτου ή θανάτωσης·

— ημερομηνία και ώρα θανάτου, εάν επήλθε νωρίτερα από την προγραμματισμένη θανάτωση·

— για κάθε ζώο, το χρόνο εκδήλωσης και την εξέλιξη των συμπτωμάτων τοξικότητας, καθώς και το κατά πόσον αυτά ήταν ανατάξιμα·

— για κάθε ζώο, ευρήματα από τη νεκροψία και την ιστολογική εξέταση, εφόσον υπάρχουν.

Συζήτηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Συμπεράσματα.

4 **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. Human Toxicol., 3, 85-92.

(2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. Human Toxicol., 6, 279-291.

(3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P.-(1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD_{50} test. Fd. Chem. Toxicol. 28, 469-482.

(4) Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. Fd. Chem. Toxicol., 30, 313-324.

(5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. Human Exptl. Toxicol. 14, 315-323. Human Exptl. Toxicol.

(6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure.-Hum. . Exp. Toxicol., 21,183-196.

(7) ΟΟΣΑ (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris

(8) ΟΟΣΑ (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assesment N. 19.

▼B

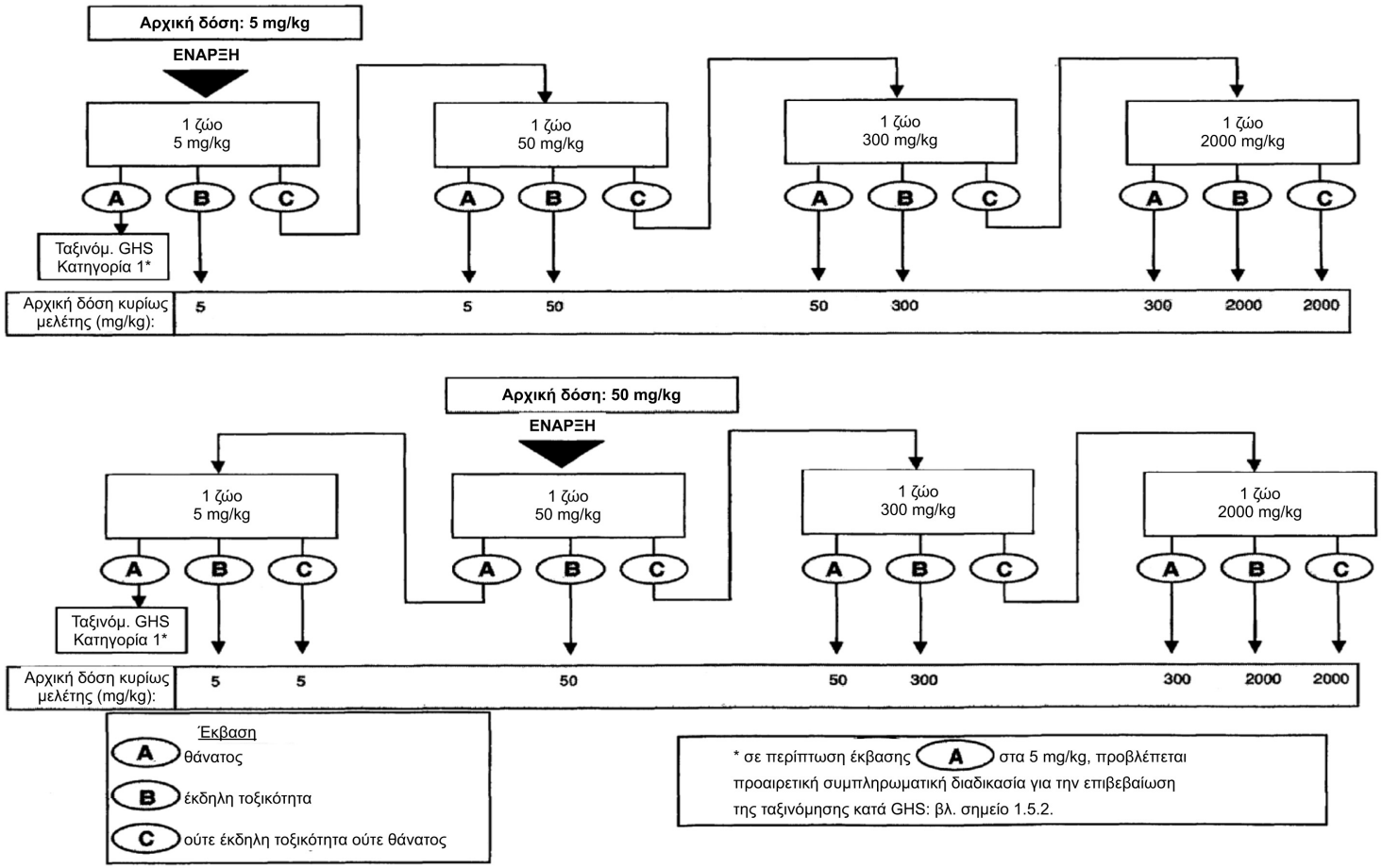
(9) ΟΟΣΑ (1998) Εναρμονισμένο Ολοκληρωμένο Σύστημα Ταξινόμησης Κινδύνων για τις Επιδράσεις των Χημικών Ουσιών στην Υγεία του ανθρώπου και στο Περιβάλλον, το οποίο εγκρίθηκε από την 28η κοινή συνεδρίαση της επιτροπής χημικών προϊόντων και της ομάδας εργασίας για τα χημικά προϊόντα, το Νοέμβριο του 1998, Μέρος 2, σ. 11 [http://webnetl.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

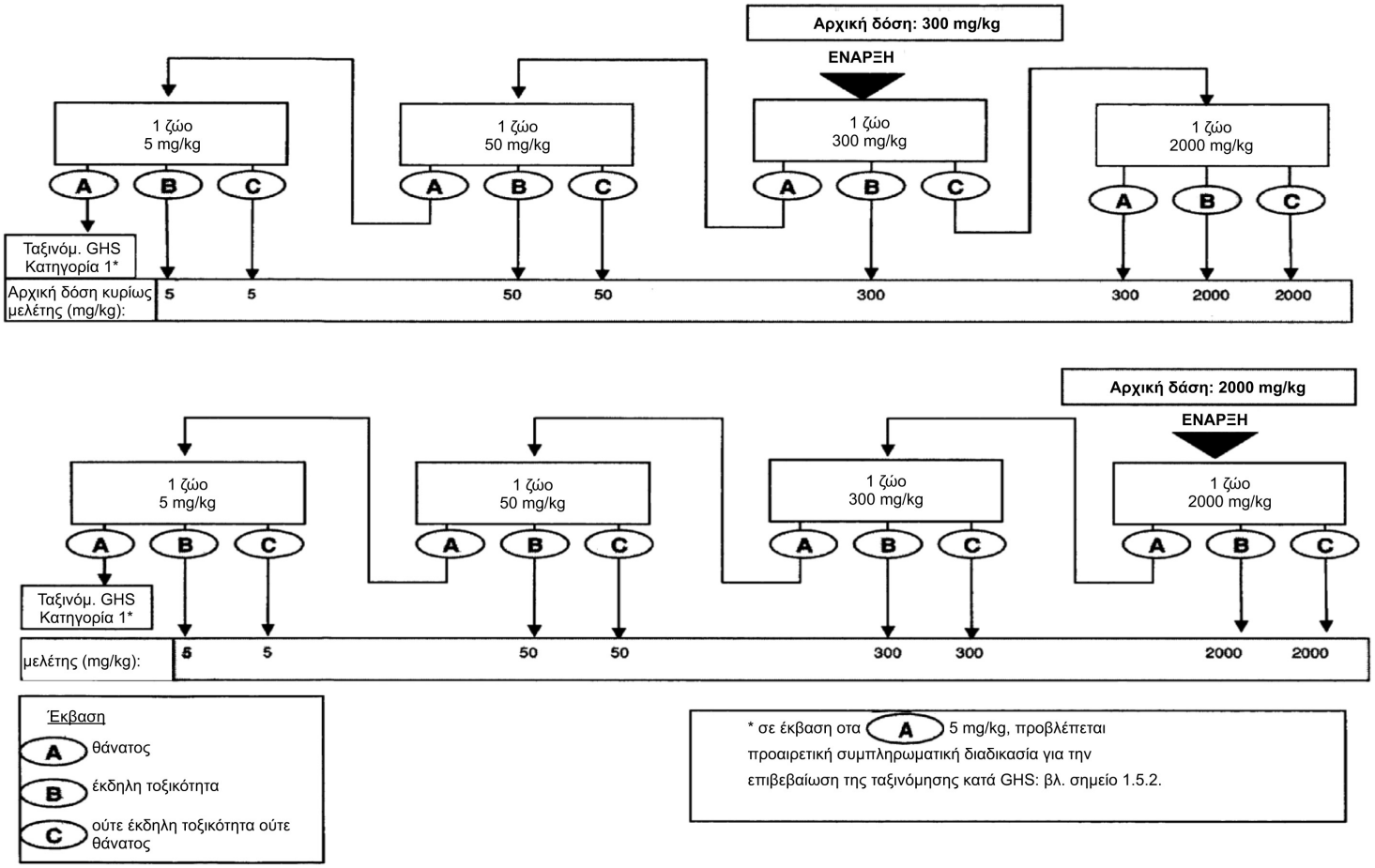
(10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD_{50}, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol. 33, 223-231.

(11) Chan P.K and A.W. Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation. In: Principles and Methods of Toxicology. 3rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1:

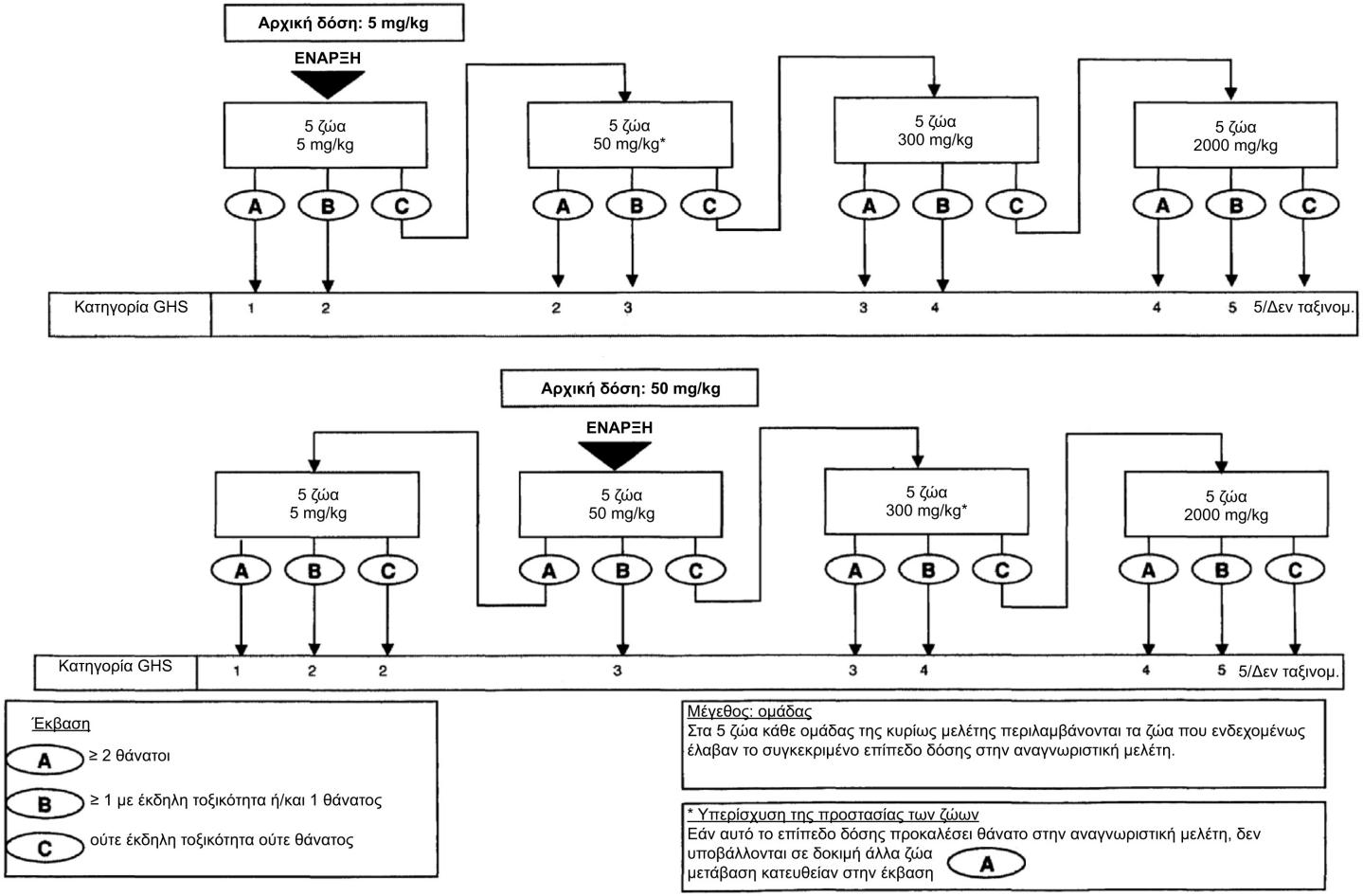
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΡΟΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

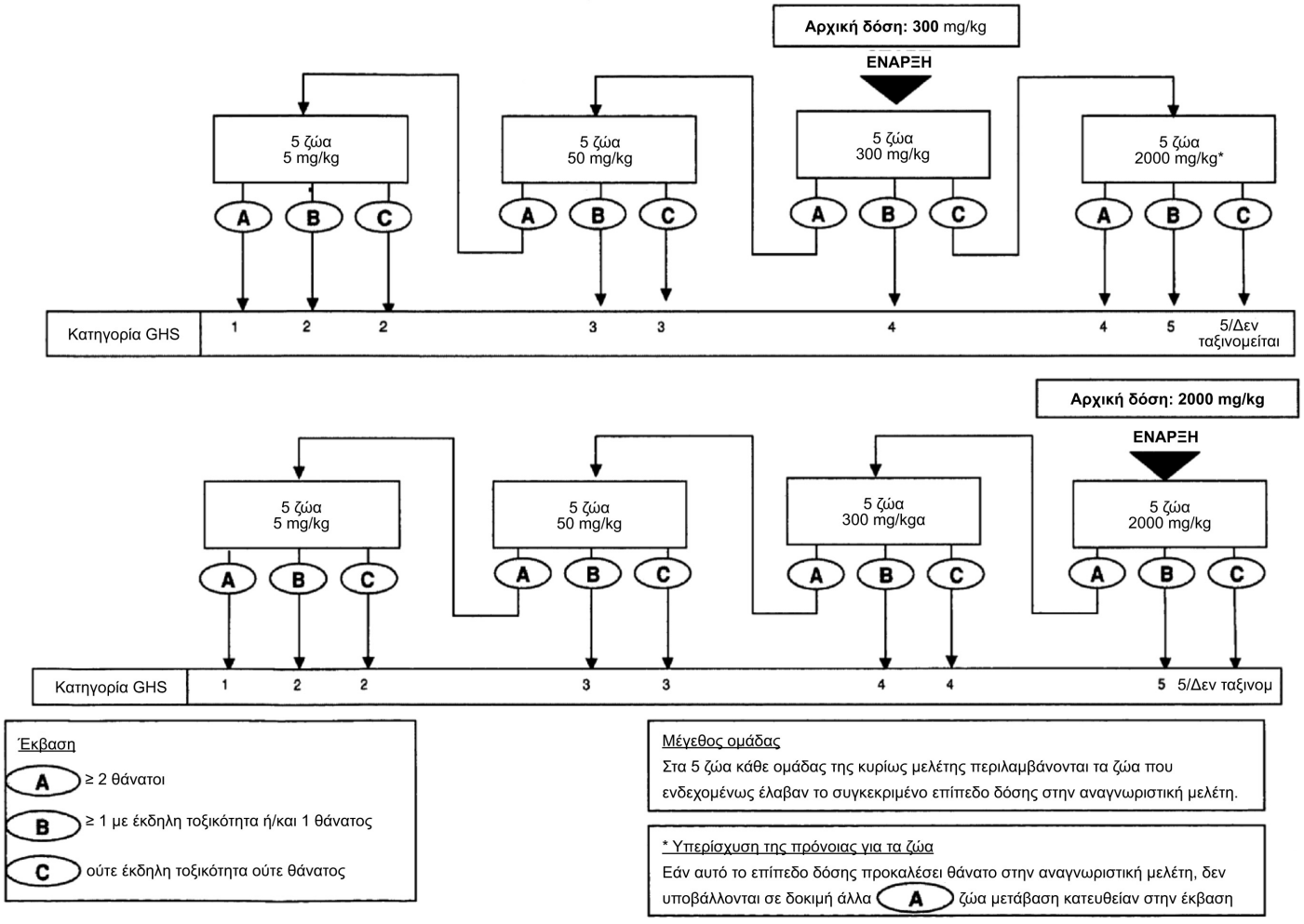



Αρχική δόση: 300 mg/kg
ΕΝΑΡΞΗ
1 ζώο 5 mg/kg
1 ζώο 50 mg/kg
1 ζώο 300 mg/kg
1 ζώο 2000 mg/kg
A
B
C
Ταξινόμ. GHS Κατηγορία 1*
Αρχική δόση κυρίως μελέτης (mg/kg):
5 5 50 50 300 300 2000 2000
Αρχική δάση: 2000 mg/kg
ΕΝΑΡΞΗ
1 ζώο 5 mg/kg
1 ζώο 50 mg/kg
1 ζώο 300 mg/kg
1 ζώο 2000 mg/kg
Ταξινόμ. GHS Κατηγορία 1*
μελέτης (mg/kg):
5 5 50 50 300 300 2000 2000
Έκβαση
A θάνατος
B έκδηλη τοξικότητα
C ούτε έκδηλη τοξικότητα ούτε θάνατος
* σε έκβαση οτα A 5 mg/kg, προβλέπεται προαιρετική συμπληρωματική διαδικασία για την επιβεβαίωση της ταξινόμησης κατά GHS: βλ. σημείο 1.5.2.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΡΟΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΥΡΙΩΣ ΜΕΛΕΤΗ




Αρχική δόση: 300 mg/kg
ΕΝΑΡΞΗ
5 ζώα
5 mg/kg
5 ζώα
50 mg/kg
5 ζώα
300 mg/kg
5 ζώα
2000 mg/kg*
A
B
C
Κατηγορία GHS
1
2
2
3
3
4
4
5
5/Δεν ταξινομείται
Αρχική δόση: 2000 mg/kg
ΕΝΑΡΞΗ
5 ζώα
5 mg/kg
5 ζώα
50 mg/kg
5 ζώα
300 mg/kga
5 ζώα
2000 mg/kg
Κατηγορία GHS
1
2
2
3
3
4
4
5
5/Δεν ταξινομ
Έκβαση
A ≥ 2 θάνατοι
B ≥ 1 με έκδηλη τοξικότητα ή/και 1 θάνατος
C ούτε έκδηλη τοξικότητα ούτε θάνατος
Μέγεθος ομάδας
Στα 5 ζώα κάθε ομάδας της κυρίως μελέτης περιλαμβάνονται τα ζώα που ενδεχομένως έλαβαν το συγκεκριμένο επίπεδο δόσης στην αναγνωριστική μελέτη.
* Υπερίσχυση της πρόνοιας για τα ζώα
Εάν αυτό το επίπεδο δόσης προκαλέσει θάνατο στην αναγνωριστική μελέτη, δεν υποβάλλονται σε δοκιμή άλλα A ζώα μετάβαση κατευθείαν στην έκβαση

▼B

Παραρτημα 3

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΤΩΝ ΟΠΟΙΩΝ ΟΙ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ LD_{50} ΥΠΕΡΒΑΙΝΟΥΝ ΤΑ 2 000 mg/kg, ΧΩΡΙΣ ΝΑ ΧΡΕΙΑΖΕΤΑΙ ΝΑ ΔΙΕΞΑΧΘΟΥΝ ΔΟΚΙΜΕΣ

Σκοπός των κριτηρίων ταξινόμησης στην κατηγορία κινδύνου 5 είναι να επιτρέψουν την ταυτοποίηση ελεγχόμενων ουσιών που ενέχουν σχετικά χαμηλό κίνδυνο οξείας τοξικότητας, αλλά σε ορισμένες περιστάσεις ενδέχεται να είναι επικίνδυνες για ευπαθείς ομάδες του πληθυσμού. Η τιμή LD_{50} από το στόμα ή το δέρμα για τις ουσίες αυτές αναμένεται να περιλαμβάνεται στη περιοχή τιμών 2 000-5 000 mg/kg ή ισοδύναμων δόσεων, προκειμένου για άλλες οδούς έκθεσης. Μια ελεγχόμενη ουσία θα μπορούσε να ταξινομηθεί στην κατηγορία κινδύνου που ορίζεται από: το εύρος 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (κατηγορία 5 κατά GHS) στις ακόλουθες περιπτώσεις:

α) εάν κάποιο από τα σχήματα δοκιμών του παραρτήματος 2 κατευθύνει προς την κατηγορία αυτή με βάση τη συχνότητα θανάτων·

β) εάν υπάρχουν ήδη αξιόπιστα στοιχεία που δείχνουν ότι η τιμή LD_{50} περιλαμβάνεται στη περιοχή τιμών της κατηγορίας 5 ή εάν τα αποτελέσματα άλλων μελετών σε ζώα ή παρατηρήσεις τοξικών επιδράσεων στον άνθρωπο δημιουργούν ανησυχίες για οξείες βλάβες στην υγεία του ανθρώπου.

γ) εάν μετά από παρέκταση δεδομένων, υπολογισμούς κατά προσέγγιση ή μετρήσεις δεν δικαιολογείται η ταξινόμηση σε ανώτερη κατηγορία κινδύνου και

— υπάρχουν αξιόπιστα στοιχεία που δείχνουν σοβαρές τοξικές επιδράσεις στον άνθρωπο ή

— έχει παρατηρηθεί θνησιμότητα σε δοκιμές από το στόμα με επίπεδα δόσεων έως και της κατηγορίας 4 ή

— οι απόψεις των ειδικών επιβεβαιώνουν σοβαρά κλινικά συμπτώματα τοξικότητας —εκτός από διάρροια, ανόρθωση του τριχώματος και ταλαιπωρημένη εμφάνιση— που έχουν παρατηρηθεί σε δοκιμές με επίπεδα δόσεων έως και της κατηγορίας 4 ή

— οι απόψεις των ειδικών επιβεβαιώνουν αξιόπιστες ενδείξεις πιθανής σοβαρής, οξείας τοξικής επίδρασης, οι οποίες έχουν προκύψει από άλλες μελέτες σε ζώα.

ΔΙΕΞΑΓΩΓΗ ΔΟΚΙΜΩΝ ΜΕ ΔΟΣΕΙΣ ΑΝΩ ΤΩΝ 2 000 mg/kg

Κατ' εξαίρεση και μόνον εφόσον το επιβάλλουν συγκεκριμένες ανάγκες κανονιστικής ρύθμισης, μπορεί να εξεταστεί η χρήση ενός επιπλέον ανώτατου προκαθορισμένου επιπέδου δόσης 5 000 mg/kg. Για λόγους προστασίας των ζώων, η διεξαγωγή δοκιμών με δόση 5 000 mg/kg δεν συνιστάται και θα πρέπει να εξετάζεται μόνον εφόσον υπάρχουν μεγάλες πιθανότητες τα αποτελέσματα των δοκιμών αυτών να έχουν άμεση, ουσιαστική σημασία για την προστασία της υγείας των ζώων ή του ανθρώπου (9).

Αναγνωριστική μελέτη

Οι κανόνες που διέπουν τη λήψη απόφασης στη διαδοχική διαδικασία του παραρτήματος 1 διευρύνονται, ώστε να συμπεριλάβουν το επίπεδο δόσης 5 000 mg/kg. Συνεπώς, η έκβαση Α (θάνατος) σε αναγνωριστική μελέτη με αρχική δόση 5 000 mg/kg απαιτεί την υποβολή δεύτερου ζώου σε δοκιμή με 2 000 mg/kg, ενώ η έκβαση Β ή Γ (έκδηλη τοξικότητα ή απουσία τοξικότητας) επιτρέπει την επιλογή των 5 000 mg/kg ως αρχικής δόσης για την κυρίως μελέτη. Ομοίως, εάν χρησιμοποιηθεί άλλη αρχική δόση πλην των 5 000 mg/kg, τότε διεξάγεται δοκιμή με 5 000 mg/kg, εφόσον η έκβαση στο επίπεδο 2 000 mg/kg είναι Β ή Γ. Στη συνέχεια, η έκβαση Α στο επίπεδο 5 000 mg/kg υπαγορεύει τη διεξαγωγή κυρίως μελέτης με αρχική δόση 2 000 mg/kg, ενώ η έκβαση Β ή Γ τη χρήση αρχικής δόσης 5 000 mg/kg στη μελέτη αυτή.

▼B

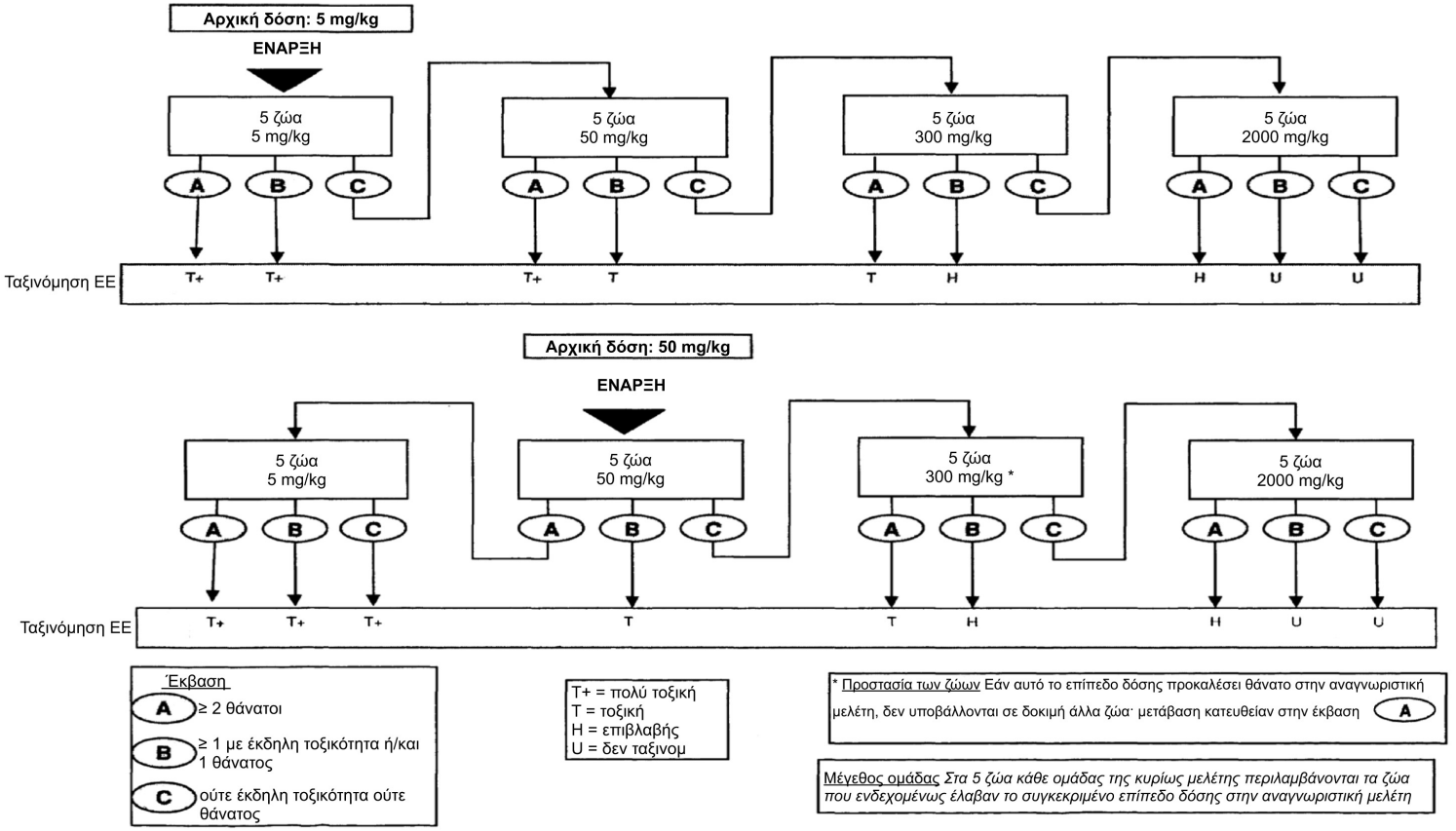
Κυρίως μελέτη

Οι κανόνες που διέπουν τη λήψη απόφασης στη διαδοχική διαδικασία του παραρτήματος 2 διευρύνονται, ώστε να συμπεριλάβουν το επίπεδο δόσης 5 000 mg/kg. Συνεπώς, η έκβαση Α (> 2 θάνατοι) σε κυρίως μελέτη με αρχική δόση 5 000 mg/kg απαιτεί την υποβολή δεύτερης ομάδας σε δοκιμή με 2 000 mg/kg, ενώ η έκβαση Β (έκδηλη τοξικότητα ή/και < 1 θάνατος) ή Γ (απουσία τοξικότητας) συνεπάγεται ότι η ουσία δεν ταξινομείται κατά GHS. Ομοίως, εάν χρησιμοποιηθεί άλλη αρχική δόση πλην των 5 000 mg/kg, τότε διεξάγεται δοκιμή με 5 000 mg/kg εφόσον η έκβαση στο επίπεδο 2 000 mg/kg είναι Γ. Στη συνέχεια, η έκβαση Α στο επίπεδο 5 000 mg/kg συνεπάγεται ότι η ουσία ταξινομείται στην κατηγορία 5 του GHS, ενώ η έκβαση Β ή Γ ότι η ουσία δεν ταξινομείται σύμφωνα με το σύστημα αυτό.

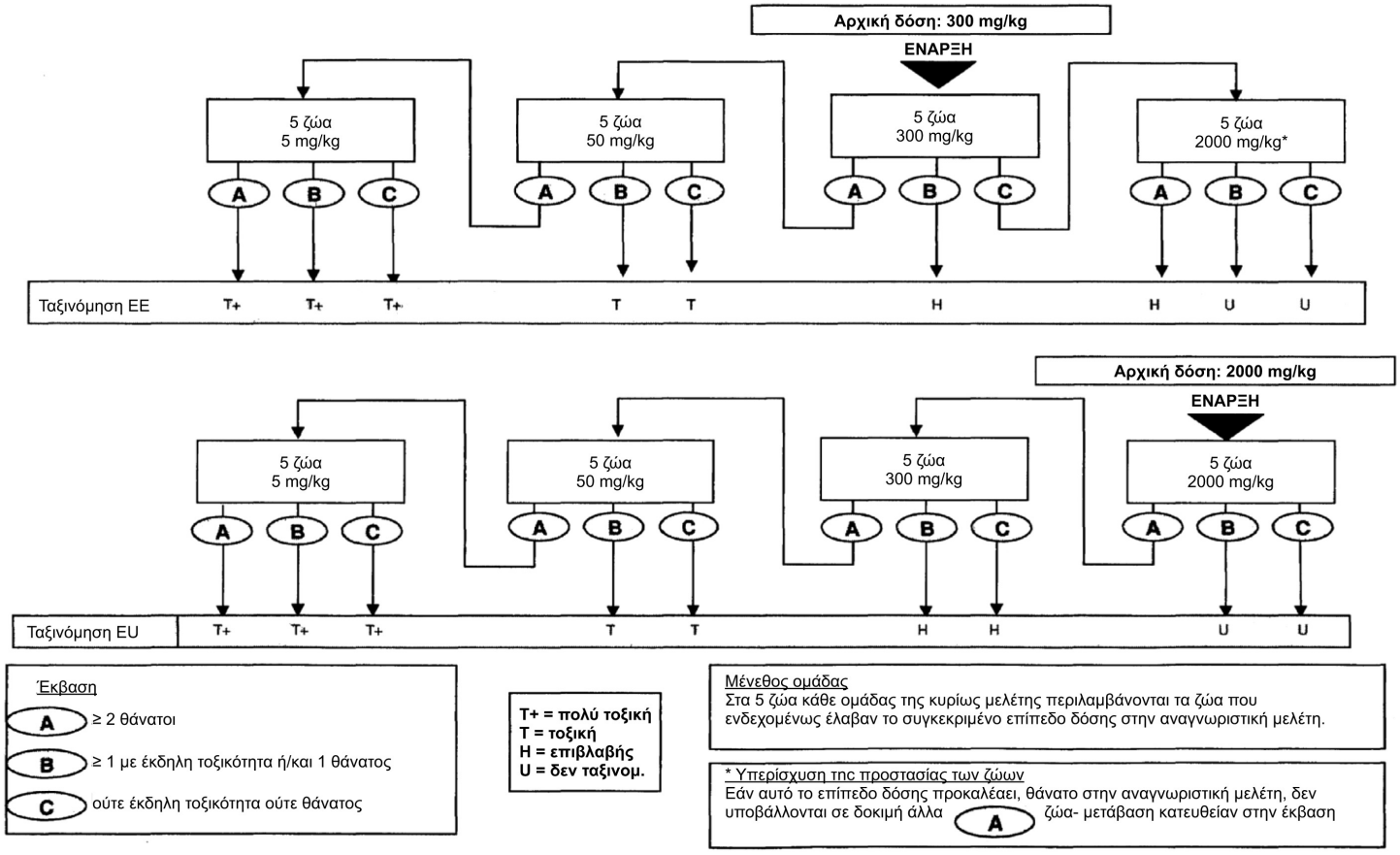
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ Β.1.α

Οδηγίες για την ταξινόμηση σύμφωνα με το σύστημα της ΕΕ κατά τη μεταβατική περίοδο μέχρι να εφαρμοστεί πλήρως το παγκόσμιο εναρμονισμένο σύστημα ταξινόμησης (GHS) [έχουν ληφθεί από τη δημοσίευση (8)]



▼B


Αρχική δόση: 300 mg/kg
ΕΝΑΡΞΗ
5 ζώα 5 mg/kg
5 ζώα 50 mg/kg
5 ζώα 300 mg/kg
5 ζώα 2000 mg/kg*
A B C
Ταξινόμηση ΕΕ
T+ T+ T+ T T H H U U
Αρχική δόση: 2000 mg/kg
ΕΝΑΡΞΗ
5 ζώα 5 mg/kg
5 ζώα 50 mg/kg
5 ζώα 300 mg/kg
5 ζώα 2000 mg/kg
A B C
Ταξινόμηση EU
T+ T+ T+ T T H H U U
Έκβαση
A ≥ 2 θάνατοι
B ≥ 1 με έκδηλη τοξικότητα ή/και 1 θάνατος
C ούτε έκδηλη τοξικότητα ούτε θάνατος
T+ = πολύ τοξική
T = τοξική
H = επιβλαβής
U = δεν ταξινομ.
Μένεθος ομάδας
Στα 5 ζώα κάθε ομάδας της κυρίως μελέτης περιλαμβάνονται τα ζώα που ενδεχομένως έλαβαν το συγκεκριμένο επίπεδο δόσης στην αναγνωριστική μελέτη.
* Υπερίσχυση της προστασίας των ζώων
Εάν αυτό το επίπεδο δόσης προκαλέσει, θάνατο στην αναγνωριστική μελέτη, δεν υποβάλλονται σε δοκιμή άλλα A ζώα- μετάβαση κατευθείαν στην έκβαση

▼B

Β.1β. ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ — ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΩΝ ΚΛΑΣΕΩΝ ΟΞΕΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

1. Η ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη την κατευθυντήρια γραμμή TG 423 (2001) του ΟΟΣΑ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μέθοδος των οξείας τοξικότητας (1) που περιγράφεται στην παρούσα κατευθυντήρια γραμμή συνίσταται σε μια βαθμιδωτή διαδικασία, σε κάθε στάδιο της οποίας χρησιμοποιούνται 3 ζώα του ίδιου φύλου. Για να είναι δυνατόν να κριθεί η οξεία τοξικότητα της ελεγχόμενης ουσίας, χρειάζονται κατά μέσον όρο 2.4 βαθμίδες, ανάλογα με τη θνησιμότητα ή/και την κατάσταση ετοιμοθάνατων των ζώων. Η διαδικασία διαθέτει επαναληπτικότητα, απαιτεί πολύ μικρό αριθμό ζώων και παρέχει ανάλογες δυνατότητες ταξινόμησης των ουσιών με τις άλλος μεθόδους δοκιμών οξείας τοξικότητας. Η μέθοδος των κλάσεων οξείας τοξικότητας βασίζεται σε βιομετρικές αξιολογήσεις (2) (3) (4) (5) με χρήση καθορισμένων δόσεων, οι οποίες διαφέρουν επαρκώς μεταξύ τους, ώστε να επιτρέπουν την ιεράρχηση των ελεγχόμενων ουσιών για τους σκοπούς της ταξινόμησης και της εκτίμησης κινδύνου. Η μέθοδος, του υιοθετήθηκε το 1996, αποτέλεσε αντικείμενο διεξοδικών μελετών ελέγχων της αξιοπιστίας *in vivo,* τόσο σε εθνική (6) όσο και σε διεθνή κλίμακα (7), έναντι δεδομένων σχετικών με την LD_{50} που ελήφθησαν από τη βιβλιογραφία.

Οδηγίες για την επιλογή της καταλληλότερης μεθόδου δοκιμών σε κάθε δεδομένη περίπτωση παρέχονται από το καθοδηγητικό έγγραφο «Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing» (8), το οποίο περιέχει επίσης συμπληρωματικές πληροφορίες σχετικά με την εφαρμογή και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών Β.1β.

Δεν απαιτείται να χορηγούνται οι ελεγχόμενες ουσίες σε δόσεις που είναι γνωστό ότι προκαλούν ισχυρούς πόνους και έντονη δυσφορία, εξαιτίας της διαβρωτικής ή πολύ ερεθιστικής δράσης των ουσιών. Τα ετοιμοθάνατα ζώα, καθώς και εκείνα που παρουσιάζουν σαφή σημεία πόνου ή έντονης και διαρκούς δυσφορίας, θανατώνονται με ευθανασία και λαμβάνονται υπόψη στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων με τον ίδιο τρόπο όπως τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη δοκιμή. Τα κριτήρια για τη λήψη της απόφασης να θανατωθούν ετοιμοθάνατα ή βαρέως πάσχοντα ζώα, καθώς και οι οδηγίες για την αναγνώριση των ενδείξεων προβλέψιμου ή επικειμένου θανάτου, αποτελούν το αντικείμενο χωριστού καθοδηγητικού εγγράφου (9).

Στη μέθοδο χρησιμοποιούνται προκαθορισμένες δόσεις, ενώ τα αποτελέσματα της επιτρέπουν την ιεράρχηση και την ταξινόμηση των ουσιών σύμφωνα με το Παγκόσμιο Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης των χημικών ουσιών που προκαλούν οξεία τοξικότητα (10).

Η μέθοδος αυτή δεν έχει μελετηθεί, καταρχήν, για να επιτρέπει του ακριβή υπολογισμό της LD_{50} μόνον στις περιπτώσεις όπου δύο τουλάχιστον δόσεις έχουν ως αποτέλεσμα θνησιμότητα μεγαλύτερη από 0 % και μικρότερη από 100 %. Η χρήση επιλεγμένων προκαθορισμένων δόσεων, ανεξαρτήτως της ελεγχόμενης ουσίας, σε συνδυασμό με τη ρητή σύνδεση της ταξινόμησης με τον αριθμό των ζώων του διαπιστώνεται ότι βρίσκονται σε μια σειρά διαφορετικών καταστάσεων, βελτιώνει τη συνέπεια των εκθέσεων δοκιμής την επαναληπτικότητα της μεθόδου μεταξύ των εργαστηρίων.

▼B

Πριν από τη διεξαγωγή της μελέτης, το εργαστήριο δοκιμών θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη όλα τα διαθέσιμα στοιχεία σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία, μεταξύ των οποίων την ταυτότητα και τη χημική δομή της, τις φυσικές και χημικές ιδιότητές της, τα αποτελέσματα τυχόν άλλων δοκιμών της ουσίας *in vitro* ή *in vivo,* τα τοξικολογικά δεδομένα του αφορούν ουσίες ανάλογης χημικής δομής, καθώς και την ή τις προβλεπόμενες χρήσεις, της ουσίας. Οι πληροφορίες αυτές είναι απαραίτητες για να διασφαλίζεται ότι η διεξαγωγή της δοκιμής έχει ουσιαστική σημασία για την προστασία της υγείας του ανθρώπου και βοηθούν στην επιλογή της καταλληλότερης αρχικής δόσης.

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

Οξεία τοξικότητα από το στόμα: οι δυσμενείς επιδράσεις που παρατηρούνται μετά τη χορήγηση από το στόμα μίας δόσης της ουσίας εφάπαξ ή πολλών δόσεων εντός 24ώρου.

Όψιμος θάνατος: η περίπτωση όπου ένα ζώο δεν πεθαίνει ούτε είναι ετοιμοθάνατο εντός 48 ωρών, αλλά πεθαίνει αργότερα στη διάρκεια της περιόδου παρατήρησης, που διαρκεί 14 ημέρες.

Δόση: η χορηγούμενη ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας· εκφράζεται σε βάρος ελεγχόμενης ουσίας ανά μονάδα βάρους του πειραματόζωου (π.χ. mg/kg).

GHS: παγκόσμιο εναρμονισμένο σύστημα ταξινόμησης για τις χημικές ουσίες και τα μίγματά τους. Πρόκειται για κοινή πρωτοβουλία του ΟΟΣΑ (υγεία του ανθρώπου και περιβάλλον), της Επιτροπής Εμπειρογνωμόνων για τις Μεταφορές Επικίνδυνων Εμπορευμάτων του ΟΗΕ (φυσικές και χημικές ιδιότητες) και της Διεθνούς Οργάνωσης Εργασίας (ανακοίνωση κινδύνων), με συντονιστή το Πρόγραμμα Διεθνών Οργανισμών για την ορθή Διαχείριση των Χημικών Προϊόντων (ΙΟΜC).

Επικείμενος θάνατος: η περίπτωση όπου αναμένεται κατάσταση ετοιμοθάνατου ή θάνατος πριν από τον επόμενο προγραμματισμένο χρόνο παρατήρησης. Μεταξύ των ενδείξεων επικείμενου θανάτου στα τρωκτικά περιλαμβάνονται οι σπασμοί, η πλάγια θέση, η κατάκλιση και ο τρόμος [για περισσότερες λεπτομέρειες, βλέπε καθοδηγητικό έγγραφο για τα τελικά σημεία ευθανασίας (8)].

LD_{50} (διάμεσος θανατηφόρου δόσης): η στατιστικά λαμβανόμενη τιμή εφάπαξ δόσης μιας ουσίας που αναμένεται να προκαλέσει το θάνατο του 50 % των πειραματόζωων, όταν χορηγηθεί από το στόμα. Η τιμή LD_{50} εκφράζεται σε βάρος ελεγχόμενης ουσίας ανά μονάδα βάρους του πειραματόζωου (mg/kg).

Οριακή δόση: μια δόση που αποτελεί το ανώτατο όριο για τη δοκιμή (2 000 ή 5 000 mg/kg).

Κατάσταση ετοιμοθάνατου: η κατάσταση πολύ κοντά στο θάνατο ή η αδυναμία επιβίωσης ακόμη και μετά από θεραπευτική αγωγή [για περισσότερες λεπτομέρειες, βλέπε καθοδηγητικό έγγραφο για τα τελικά σημεία ευθανασίας (8)].

Προβλέψιμος θάνατος: η εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων που αποτελούν ένδειξη μελλοντικού θανάτου σε γνωστό χρόνο πριν από τον προγραμματισμένο τερματισμό του πειράματος, λόγου χάριν η αδυναμία του πειραματόζωου να φθάσει την τροφή ή το νερό [για περισσότερες λεπτομέρειες, βλέπε καθοδηγητικό έγγραφο για τα τελικά σημεία ευθανασίας (8)].

▼B

1.3 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Η αρχή της μεθόδου συνίσταται στη συγκέντρωση επαρκών στοιχείων για την οξεία τοξικότητα της ελεγχόμενης ουσίας, ώστε να είναι δυνατή η ταξινόμηση της, με βαθμιδωτή διαδικασία, σε κάθε στάδιο της οποίας χρησιμοποιείται ο ελάχιστος δυνατός αριθμός ζώων. Μία από τις προκαθορισμένες δόσεις ουσίας χορηγείται από το στόμα σε ομάδα πειραματόζωων. Η διαδικασία δοκιμής είναι βαθμιδωτή και σε κάθε στάδιό της χρησιμοποιούνται τρία ζώα του ίδιου φύλου (συνήθως θηλυκά). Η απουσία ή παρουσία θνησιμότητας των ζώων συνδεόμενης με την ουσία σε μια δεδομένη βαθμίδα, καθορίζει ποια θα είναι η επόμενη, δηλαδή:

— δεν χρειάζονται άλλες δοκιμές,

— χορήγηση της ίδιας δόσης σε τρία επιπλέον ζώα,

— χορήγηση της αμέσως υψηλότερης ή χαμηλότερης δόσης σε τρία επιπλέον ζώα.

Οι λεπτομέρειες της διαδικασίας δοκιμών παρατίθενται στο παράρτημα 1. Η μέθοδος επιτρέπει τη λήψη απόφασης σχετικά με την κατάταξη της ελεγχόμενης ουσίας σε μία από μια σειρά κλάσεων τοξικότητας, οι οποίες ορίζονται από καθορισμένες κρίσιμες τιμές LD_{50}.

1.4 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

1.4.1 **Επιλογή είδους ζώων**

Το προτιμώμενο είδος τρωκτικού είναι ο επίμυς, αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη τρωκτικών. Κατά κανόνα χρησιμοποιούνται θηλυκά ζώα (7), επειδή από τη βιβλιογραφική έρευνα για τις συμβατικές δοκιμές LD_{50} προκύπτει ότι, αν και οι διαφορές ευπάθειας μεταξύ των δύο φύλων είναι συνήθως ελάχιστες, όταν παρατηρούνται διαφορές, τα θηλυκά ζώα είναι κατά κανόνα ελαφρώς πιο ευπαθή (10). Εάν ωστόσο οι γνώσεις σχετικά με τις τοξικολογικές ή τοξικοκινητικές ιδιότητες χημικών ουσιών με ανάλογη χημική δομή συνηγορούν υπέρ του ότι τα αρσενικά ζώα είναι πιθανώς πιο ευπαθή, τότε θα πρέπει να προτιμάται αυτό το φύλο. Όταν η δοκιμή διεξάγεται σε αρσενικά ζώα, η επιλογή αυτή θα πρέπει να αιτιολογείται επαρκώς.

Πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή νεαρά ενήλικα ζώα που ανήκουν σε φυλές κοινής εργαστηριακής χρήσης. Τα θηλυκά ζώα πρέπει να μην έχουν ποτέ γεννήσει ούτε να εγκυμονούν. Κατά την έναρξη της χορήγησης των δόσεων, η ηλικία κάθε ζώου πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 8 και 12 εβδομάδων και το βάρος του να μην αποκλίνει περισσότερο από ± 20 % από το μέσο βάρος των ζώων στα οποία έχει ενδεχομένως χορηγηθεί η ουσία σε προηγούμενο στάδιο.

1.4.2 **Συνθήκες στέγασης και διατροφής**

Η θερμοκρασία του θαλάμου πειραματόζωων πρέπει να είναι 22 °C (± 3 °C). Αν και η σχετική υγρασία πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου, εν τούτοις ο στόχος θα πρέπει να είναι μια τιμή 50-60 %. Ο φωτισμός πρέπει να είναι τεχνητός, με εναλλαγή φωτός-σκότους ανά 12ωρο. Για τη διατροφή των ζώων μπορούν να χρησιμοποιούνται τα συνήθη εργαστηριακά σιτηρέσια, με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού. Τα ζώα μπορούν να τοποθετούνται ομαδικά σε κλουβιά κατά δόση, αλλά ο αριθμός ζώων σε κάθε κλουβί δεν πρέπει να παρεμποδίζει την ακριβή παρατήρηση του καθενός ζώου.

▼B

1.4.3 **Προετοιμασία των ζώων**

Τα ζώα επιλέγονται τυχαία, σημαίνονται με τρόπο που επιτρέπει την αναγνώριση του καθενός και παραμένουν στα κλουβιά τους τουλάχιστον για πέντε ημέρες πριν από την έναρξη της χορήγησης των δόσεων, ώστε να εγκλιματιστούν στις εργαστηριακές συνθήκες.

1.4.4 **Παρασκευή των δόσεων**

Ο χορηγούμενος όγκος της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει κατά κανόνα να διατηρείται σταθερός σε όλη τη σειρά των δόσεων της δοκιμής με αλλαγή της συγκέντρωσης του χορηγούμενου παρασκευάσματος Όταν ωστόσο πρόκειται να ελεγχθεί ένα υγρό τελικό προϊόν ή μίγμα, η χρήση της ελεγχόμενης ουσίας χωρίς αραίωση, δηλαδή σε σταθερή συγκέντρωση, μπορεί να είναι πιο ενδεδειγμένη για τη μετέπειτα εκτίμηση των κινδύνων, ενώ αποτελεί και απαίτηση ορισμένων αρμόδιων για τις νομοθετικές ρυθμίσεις Αρχών. Σε κάθε περίπτωση, δεν επιτρέπεται υπέρβαση του μέγιστου όγκου χορηγούμενης δόσης. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Στα τρωκτικά, ο όγκος δεν πρέπει κατά κανόνα να υπερβαίνει το 1 ml/100g βάρους σώματος, αλλά στην περίπτωση των υδατικών διαλυμάτων μπορεί να εξετασθεί το ενδεχόμενο χορήγησης 2 ml/100g βάρους σώματος. Όσον αφορά τη μορφή του χορηγούμενου παρασκευάσματος, συνιστάται να χρησιμοποιούνται, κατά το δυνατόν, υδατικά διαλύματα/εναιωρήματα/γαλακτώματα, με δεύτερα κατά σειρά προτίμησης τα διαλύματα/εναιωρήματα/γαλακτώματα σε έλαιο (π.χ. αραβοσιτέλαιο) και τελευταία τα διαλύματα σε άλλους φορείς. Σε περίπτωση χρήσης άλλου φορέα πλην του νερού, πρέπει να είναι γνωστές οι τοξικολογικές ιδιότητές του. Οι δόσεις πρέπει να παρασκευάζονται λίγο πριν από τη χορήγηση, εκτός εάν η σταθερότητα του παρασκευάσματος στο χρονικό διάστημα εντός του οποίου πρόκειται να χρησιμοποιηθεί είναι γνωστή και έχει κριθεί αποδεκτή.

1.5 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.5.1 **Χορήγηση των δόσεων**

Η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται εφάπαξ με τη βοήθεια ρινογαστρικού καθετήρα σίτισης ή κατάλληλου σωλήνα διασωλήνωσης. Στη σπάνια περίπτωση όπου η εφάπαξ χορήγηση δεν είναι εφικτή, η δόση μπορεί να χορηγηθεί τμηματικά εντός περιόδου που δεν υπερβαίνει τις 24 ώρες.

Πριν από τη χορήγηση των δόσεων, τα ζώα υποβάλλονται σε νηστεία (π.χ. διακοπή της σίτισης, αλλά όχι της παροχής νερού για όλη την προηγούμενη νύκτα, όταν χρησιμοποιούνται επίμυες, ή για 34 ώρες, όταν χρησιμοποιούνται ποντικοί). Μετά την περίοδο νηστείας, τα ζώα ζυγίζονται και τους χορηγείται η ελεγχόμενη ουσία. Η διακοπή της σίτισης μπορεί να συνεχιστεί και μετά τη χορήγηση της ουσίας για 3-4 ώρες, προκειμένου για επίμυες, ή 1-2 ώρες, προκειμένου για ποντικούς. Σε περίπτωση τμηματικής χορήγησης της δόσης εντός ορισμένου χρόνου, μπορεί να χρειαστεί να δοθεί στα ζώα τροφή και νερό, ανάλογα με τη διάρκεια του συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος.

1.5.2 **Αριθμός ζώων και επίπεδα δόσεων**

Σε κάθε βαθμίδα χρησιμοποιούνται τρία ζώα. Η αρχική δόση επιλέγεται μεταξύ τεσσάρων προκαθορισμένων επιπέδων, που είναι τα 5, 50, 300 και 2 000 mg/kg βάρους σώματος. Η αρχική δόση θα πρέπει να είναι το επίπεδο με τις μεγαλύτερες πιθανότητες να προκαλέσει το θάνατο ορισμένων από τα ζώα στα οποία θα χορηγηθεί. Η διαδικασία που θα πρέπει να εφαρμόζεται για κάθε επίπεδο αρχικής δόσης εμφαίνεται στα διαγράμματα ροής του παραρτήματος 1. Επιπλέον, το παράρτημα 4 παρέχει καθοδήγηση για την ταξινόμηση κατά το σύστημα της ΕΕ μέχρι να εφαρμοστεί το νέο GHS.

▼B

Όταν από τα διαθέσιμα στοιχεία συνάγεται μικρή πιθανότητα θνησιμότητας στο υψηλότερο επίπεδο αρχικής δόσης (2 000 mg/kg βάρους σώματος), θα πρέπει να διεξάγεται οριακή δοκιμή. Εάν δεν υπάρχουν στοιχεία για την ουσία που πρόκειται να ελεγχθεί, συνιστάται να χρησιμοποιείται αρχική δόση 300 mg/kg βάρους σώματος για λόγους προστασίας των ζώων.

Το χρονικό διάστημα μεταξύ των δόσεων καθορίζεται με την έναρξη, τη διάρκεια και τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων τοξικότητας. Η χορήγηση της επόμενης δόσης θα πρέπει να καθυστερεί μέχρις ότου είναι βέβαιο ότι τα ζώα που έλαβαν την προηγούμενη θα επιζήσουν.

Κατ' εξαίρεση, και μόνον εφόσον το επιβάλλουν συγκεκριμένες ανάγκες νομοθετικής ρύθμισης, μπορεί να εξεταστεί η χρήση ενός επιπλέον ανώτατου επιπέδου δόσης 5 000 mg/kg (βλέπε παράρτημα 2). Για λόγους προστασίας των ζώων, η διεξαγωγή δοκιμών σε ζώα με δόσεις της κλίμακας που ορίζει την κατηγορία 5 του GHS (2 000-5 000 mg/kg) δεν συνιστάται και θα πρέπει να εξετάζεται μόνον εφόσον υπάρχουν μεγάλες πιθανότητες τα αποτελέσματα των δοκιμών αυτών να έχουν άμεση, ουσιαστική σημασία για την προστασία της υγείας του ανθρώπου ή των ζώων ή για την προστασία του περιβάλλοντος.

1.5.3 **Οριακή δοκιμή**

Η οριακή δοκιμή χρησιμοποιείται κυρίως στις περιπτώσεις όπου ο ερευνητής έχει στη διάθεσή του στοιχεία, από τα οποία προκύπτει ότι η ελεγχόμενη ουσία μάλλον δεν είναι τοξική, δηλαδή ότι έχει τοξικές επιδράσεις μόνον εάν ληφθεί σε δόσεις μεγαλύτερες από τις οριακές τιμές που προβλέπονται στις νομοθετικές ρυθμίσεις. Στοιχεία σχετικά με την τοξικότητα της ελεγχόμενης ουσίας είναι δυνατόν να συναχθούν από τα αποτελέσματα δοκιμών που έχουν διεξαχθεί με ενώσεις, μίγματα ή προϊόντα ανάλογης χημικής δομής, λαμβάνοντας υπόψη την ταυτότητα και την εκατοστιαία αναλογία των σημαντικών από τοξικολογική άποψη συστατικών. Στις περιπτώσεις όπου δεν υπάρχουν καθόλου ή υπάρχουν ελάχιστα στοιχεία για την τοξικότητα της ελεγχόμενης ουσίας ή εάν η τελευταία αναμένεται να είναι τοξική, πρέπει να διεξάγεται η κυρίως δοκιμή.

Μπορεί να διεξαχθεί οριακή δοκιμή με δόση 2 000 mg/kg βάρους σώματος σε έξι ζώα (τρία ανά βαθμίδα). Κατ' εξαίρεση, μπορεί να διεξαχθεί οριακή δοκιμή με δόση 5 000 mg/kg σε τρία ζώα (βλ. παράρτημα 2). Εάν διαπιστωθεί θνησιμότητα συνδεόμενη με την ελεγχόμενη ουσία, μπορεί να χρειαστεί να διεξαχθεί δοκιμή με το αμέσως χαμηλότερο επίπεδο δόσης.

1.6 ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Τα ζώα εξετάζονται το καθένα χωριστά τουλάχιστον μία φορά εντός των πρώτων 30 λεπτών από τη χορήγηση της ουσίας και τακτικά στη διάρκεια του πρώτου 24ώρου, με ιδιαίτερη προσοχή στις πρώτες 4 ώρες. Στη συνέχεια, εξετάζονται καθημερινά για 14 ημέρες συνολικά, εκτός εάν χρειαστεί να αποσυρθούν από τη μελέτη και να θανατωθούν με ευθανασία για να μην υποφέρουν ή εάν βρεθούν νεκρά. Η διάρκεια της περιόδου παρατήρησης δεν πρέπει πάντως να είναι αυστηρά καθορισμένη, αλλά να συναρτάται με τις τοξικές αντιδράσεις, το χρόνο έναρξής τους και το χρόνο ανάρρωσης· συνεπώς, μπορεί να παρατείνεται, εφόσον κρίνεται απαραίτητο. Ο χρόνος εμφάνισης και εξαφάνισης των συμπτωμάτων τοξικότητας έχει μεγάλη σημασία, ιδίως στις περιπτώσεις όπου αυτά τείνουν να εκδηλώνονται με καθυστέρηση (11). Όλες οι παρατηρήσεις καταγράφονται συστηματικά σε χωριστό αρχείο για κάθε ζώο.

▼B

Εάν τα ζώα εξακολουθούν να παρουσιάζουν συμπτώματα τοξικότητας, απαιτούνται συμπληρωματικές παρατηρήσεις, μεταξύ των οποίων αλλαγές στο δέρμα και στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους, επίσης στη λειτουργία του αναπνευστικού και του κυκλοφοριακού συστήματος, του Κ.Ν.Σ και του (αυτόνομου), καθώς και στη σωματική κινητικότητα και τη συμπεριφορά. Η προσοχή πρέπει να εστιάζεται σε παρατηρήσεις των σημείων τρόμου, σπασμών, σιελόρροιας, διάρροιας, υπνηλίας, λήθαργου και κώματος. Πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι γενικές αρχές και τα κριτήρια που συνοψίζονται στο καθοδηγητικό έγγραφο για τα τελικά σημεία ευθανασίας (9). Τα ετοιμοθάνατα ζώα και όσα παρουσιάζουν ισχυρούς πόνους ή διαρκή σημεία έντονης δυσφορίας θα πρέπει να θανατώνονται με ευθανασία. Ο χρόνος θανάτου των ζώων που θανατώνονται για να μην υποφέρουν ή βρίσκονται νεκρά θα πρέπει να σημειώνεται με τη μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια.

1.6.1 **Βάρος σώματος**

Το βάρος κάθε ζώου πρέπει να μετριέται λίγο πριν από τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας και, κατόπιν, τουλάχιστον ανά εβδομάδα. Πρέπει να υπολογίζονται οι αλλαγές βάρους και να καταγράφονται. Στο τέλος της δοκιμής, τα ζώα που έχουν επιζήσει ζυγίζονται και έπειτα θανατώνονται με ευθανασία.

1.6.2 **Παθολογία**

Σε όλα τα ζώα της δοκιμής (συμπεριλαμβανομένων εκείνων που πεθαίνουν στη διάρκεια της δοκιμής ή αποσύρονται από τη μελέτη για να μην υποφέρουν) πρέπει να διενεργείται μη λεπτομερειακή νεκροψία-νεκροτομία. Για κάθε ζώο, πρέπει να καταγράφονται όλες οι μακροσκοπικές παθολογικές αλλοιώσεις. Στα ζώα που επιζούν 24 ή περισσότερες ώρες μετά τη χορήγηση της πρώτης δόσης, μπορεί επιπλέον να πραγματοποιείται μικροσκοπική εξέταση των οργάνων που εμφανίζουν μακροσκοπικώς παθολογικές αλλοιώσεις, καθώς από την εξέταση αυτή ενδέχεται να προκύψουν χρήσιμα στοιχεία.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Πρέπει να παρέχονται τα δεδομένα για κάθε ζώο χωριστά. Επιπλέον, το σύνολο των δεδομένων πρέπει να συνοψίζεται σε πίνακα, όπου θα εμφαίνονται, για κάθε ομάδα της δοκιμής, ο αριθμός ζώων που χρησιμοποιήθηκαν, ο αριθμός ζώων που παρουσίασαν συμπτώματα τοξικότητας, ο αριθμός ζώων που βρέθηκαν νεκρά στη διάρκεια της δοκιμής ή θανατώθηκαν για να μην υποφέρουν, ο χρόνος θανάτου κάθε ζώου, περιγραφή και εξέλιξη των τοξικών επιδράσεων και κατά πόσον ήταν ανατάξιμες, καθώς και τα ευρήματα από τη νεκροψία.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ**

3.1 **Έκθεση δοκιμής**

Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία, κατά περίπτωση:

Ελεγχόμενη ουσία:

— φυσική κατάσταση, καθαρότητα και, εφόσον έχει σημασία, φυσικές και χημικές ιδιότητες (συμπεριλαμβανομένης της ισομερείωσης)·

— στοιχεία ταυτότητας, μεταξύ των οποίων τον αριθμό CAS.

Φορέας (κατά περίπτωση):

— αιτιολόγηση της επιλογής άλλου φορέα εκτός από νερό.

Πειραματόζωα:

— είδος/φυλή που χρησιμοποιήθηκε·

▼B

— μικροβιολογική κατάσταση των ζώων, εφόσον είναι γνωστή·

— αριθμό, ηλικία και φύλο των ζώων (όπου συμπεριλαμβάνεται, κατά περίπτωση, αιτιολόγηση της χρήσης αρσενικών αντί θηλυκών ζώων)·

— προέλευση των ζώων, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσιο κλπ..

Συνθήκες δοκιμής:

— λεπτομέρειες για τον τύπο της ελεγχόμενης ουσίας, συμπεριλαμβανομένης της φυσικής κατάστασης στην οποία χορηγήθηκε·

— λεπτομέρειες για τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας, συμπεριλαμβανομένων των όγκων και του χρόνου χορήγησης των δόσεων·

— λεπτομέρειες για την ποιότητα της τροφής και του νερού (μεταξύ άλλων, τύπος/προέλευση του σιτηρεσίου, προέλευση του νερού)·

— αιτιολόγηση της επιλογής της αρχικής δόσης.

Αποτελέσματα:

— πίνακα με τα δεδομένα απόκρισης και τα επίπεδα δόσης για κάθε ζώο (δηλ. ζώα που παρουσίασαν συμπτώματα τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένης της θνησιμότητας, φύση, σοβαρότητα και διάρκεια των επιδράσεων)·

— πίνακα με τα βάρη των ζώων και τις μεταβολές τους·

— για κάθε ζώο, βάρος την ημέρα χορήγησης της δόσης, κατόπιν ανά εβδομάδα και, τέλος, κατά το χρόνο θανάτου ή θανάτωσης·

— ημερομηνία και ώρα θανάτου, εάν επήλθε νωρίτερα από την προγραμματισμένη θανάτωση·

— για κάθε ζώο, το χρόνο εκδήλωσης και την εξέλιξη των συμπτωμάτων τοξικότητας, καθώς και το κατά πόσον αυτά ήταν ανατάξιμα·

— για κάθε ζώο, ευρήματα από τη νεκροψία και και τα ιστοπαθολογικά ευρήματα, εφόσον υπάρχουν.

Συζήτηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα.

4 **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) Roll R., Höfer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86

(2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, 336-341.

(3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, 559-610

(4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 729-734.

(5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC_{50} Tests. ALTEX 16, 129-134

(6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic- Class Method — An Alternative to the LD_{50} Test. Arch. Toxicol. 66, 455-470.

▼B

(7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 659-670.

(8) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

(9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N 19.

(10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnetl.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

(11) Lipnick R L, Cotruvo, J A, Hill R N, Bruce R D, Stitzel K A, Walker A P, Chu I; Goddard M, Segal L, Springer J A and Myers R C (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD_{50}, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol 33, 223-231.

(12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology.* Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

▼B

Παραρτημα 1

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΟΥ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΕΦΑΡΜΟΖΕΤΑΙ ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΑΡΧΙΚΗ ΔΟΣΗ

ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Η διαδικασία που πρέπει να εφαρμόζεται για κάθε αρχική δόση περιγράφεται σχηματικά στα αντίστοιχα διαγράμματα δοκιμών του παρόντος παραρτήματος.

— Παράρτημα 1 Α: αρχική δόση 5 mg/kg βάρους σώματος

— Παράρτημα 1 Β: αρχική δόση 50 mg/kg βάρους σώματος

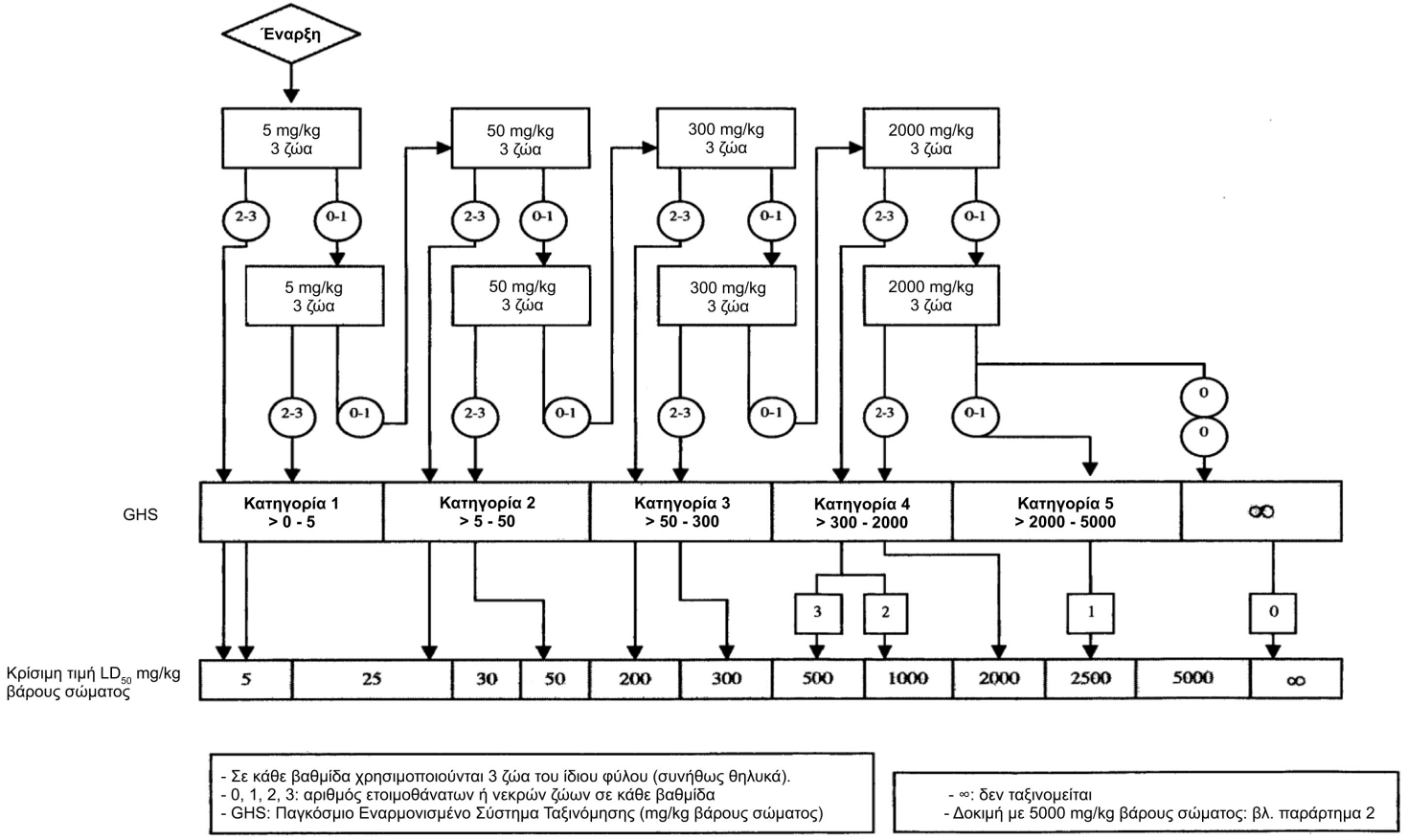
— Παράρτημα 1 Γ: αρχική δόση 300 mg/kg βάρους σώματος

— Παράρτημα 1 Δ: αρχική δόση 2 000 mg/kg βάρους σώματος.

Ανάλογα με τον αριθμό των ζώων που θανατώνονται με ευθανασία ή βρίσκονται νεκρά, η διαδικασία δοκιμών ακολουθεί την πορεία που υποδεικνύεται με βέλη.

Παραρτημα 1 A

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΩΝ ΜΕ ΑΡΧΙΚΗ ΔΟΣΗ 5 MG/KG ΒΑΡΟΥΣ ΣΩΜΑΤΟΣ

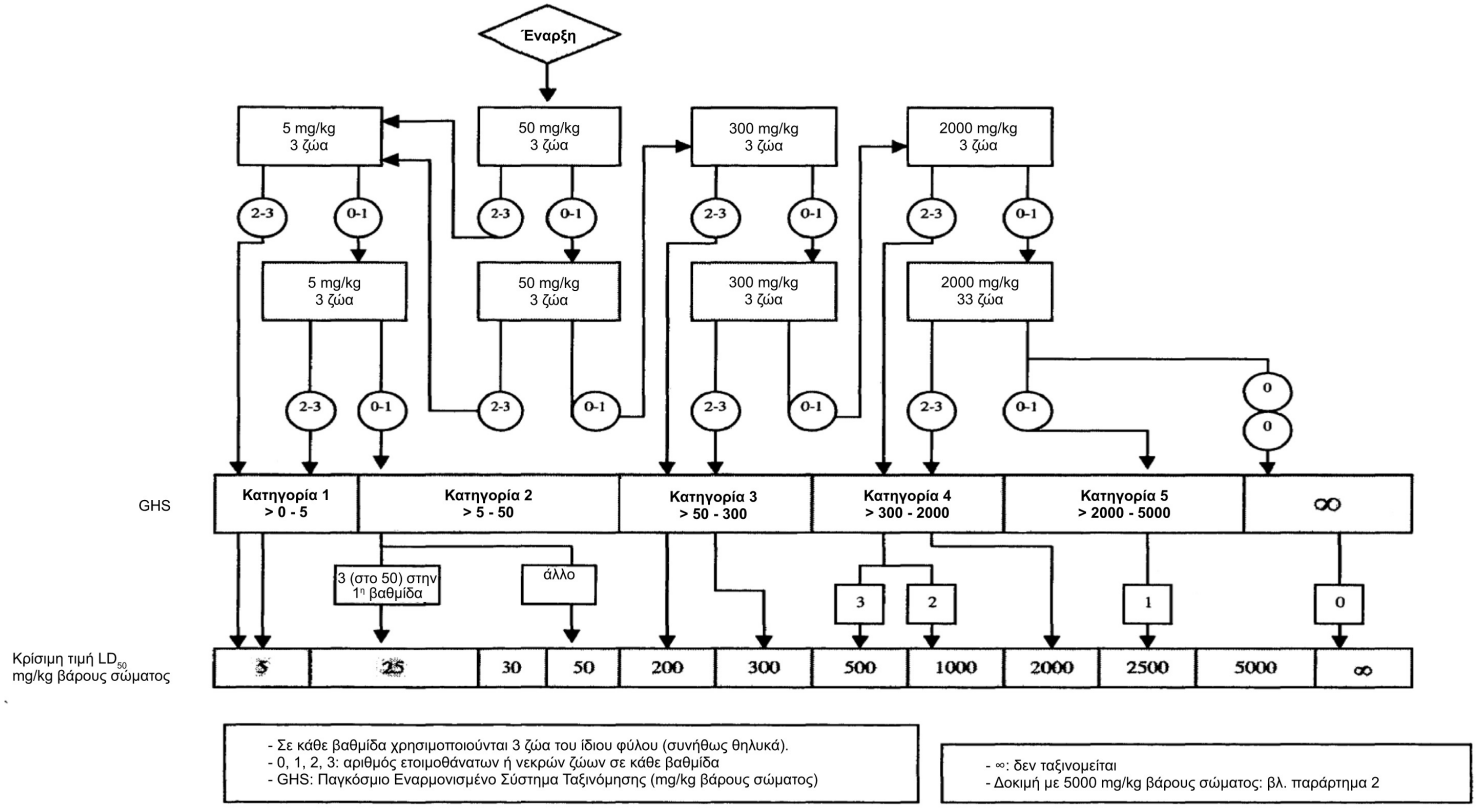


- Σε κάθε βαθμίδα χρησιμοποιούνται 3 ζώα του ίδιου φύλου (συνήθως θηλυκά).
- 0, 1, 2, 3: αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων σε κάθε βαθμίδα
- GHS: Παγκόσμιο Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης (mg/kg βάρους σώματος)

- ∞: δεν ταξινομείται
- Δοκιμή με 5000 mg/kg βάρους σώματος: βλ. παράρτημα 2

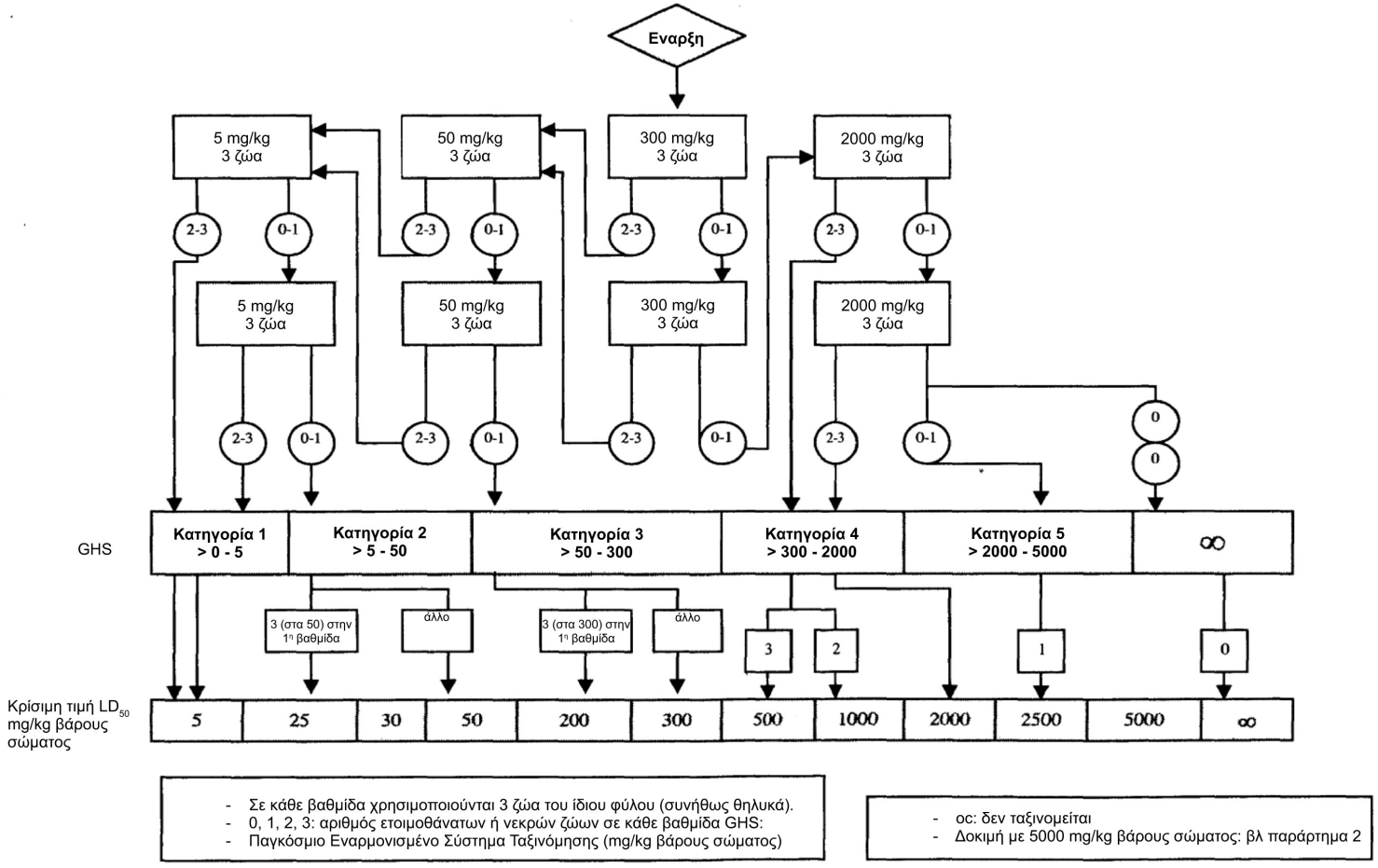
Παραρτημα 1 Β

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΩΝ ΜΕ ΑΡΧΙΚΗ ΔΟΣΗ 50 MG/KG ΒΑΡΟΥΣ ΣΩΜΑΤΟΣ



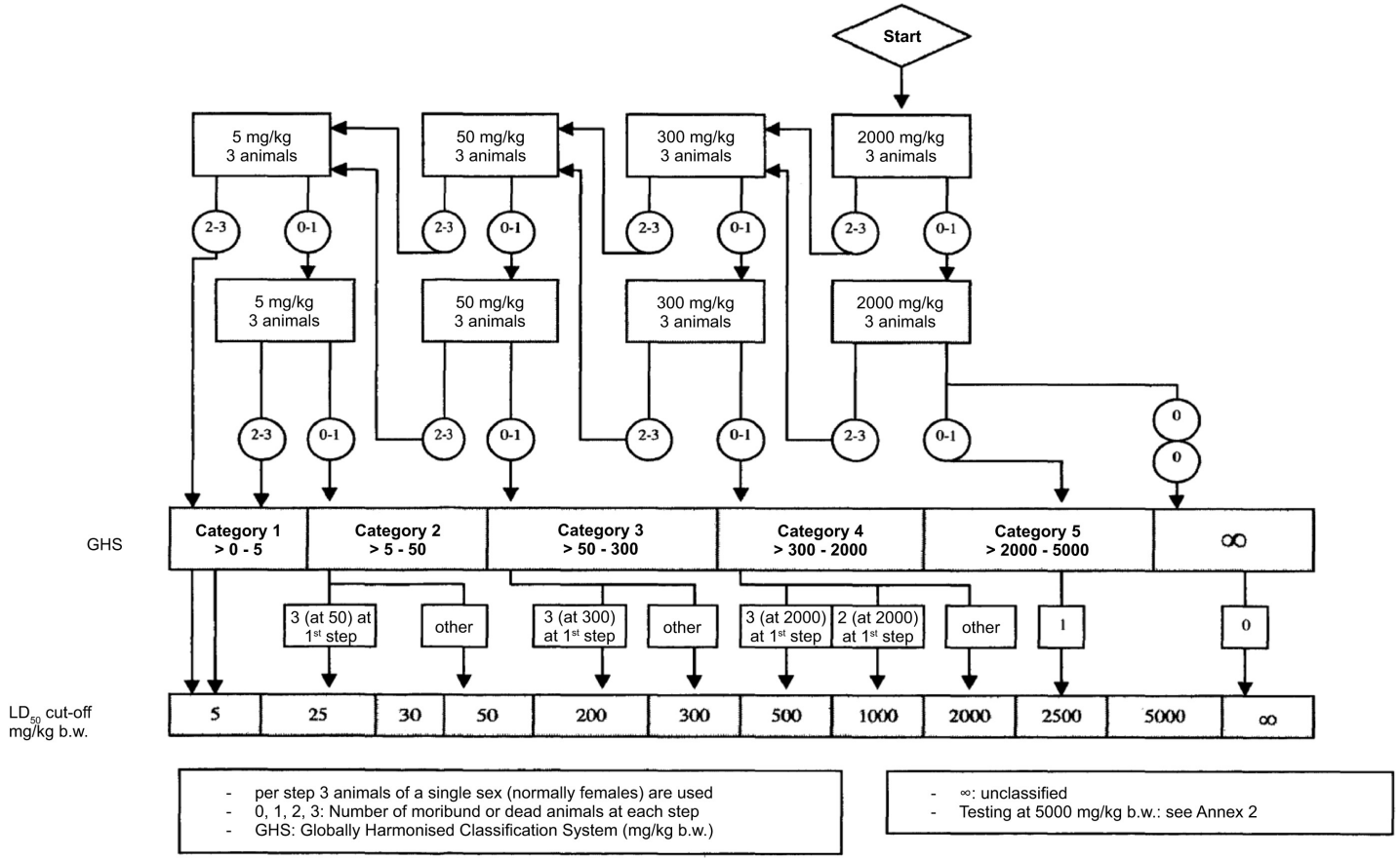
Παραρτημα 1 Γ

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΩΝ ΜΕ ΑΡΧΙΚΗ ΔΟΣΗ 300 MG/KG ΒΑΡΟΥΣ ΣΩΜΑΤΟΣ



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1 Δ

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΩΝ ΜΕ ΑΡΧΙΚΗ ΔΟΣΗ 2 000 MG/KG ΒΑΡΟΥΣ ΣΩΜΑΤΟΣ



▼B

Παραρτημα 2

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΤΩΝ ΟΠΟΙΩΝ ΟΙ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ LD_{50} ΥΠΕΡΒΑΙΝΟΥΝ ΤΑ 2 000 MG/KG, ΧΩΡΙΣ ΝΑ ΧΡΕΙΑΖΕΤΑΙ ΝΑ ΔΙΕΞΑΧΘΟΥΝ ΔΟΚΙΜΕΣ

Σκοπός των κριτηρίων ταξινόμησης στην κατηγορία κινδύνου 5 είναι να επιτρέψουν την ταυτοποίηση ελεγχόμενων ουσιών που ενέχουν σχετικά χαμηλό κίνδυνο οξείας τοξικότητας, αλλά σε ορισμένες περιστάσεις ενδέχεται να είναι επικίνδυνες για ευπαθείς ομάδες του πληθυσμού. Η τιμή LD_{50} από το στόμα ή το δέρμα για τις ουσίες αυτές αναμένεται να περιλαμβάνεται στη περιοχή τιμών 2 000-5 000 mg/kg ή ισοδύναμων δόσεων, προκειμένου για άλλες οδούς έκθεσης. Μια ελεγχόμενη ουσία θα μπορούσε να ταξινομηθεί στην κατηγορία κινδύνου που ορίζεται από την κλίμακα: 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (κατηγορία 5 κατά GHS) στις ακόλουθες περιπτώσεις:

α) εάν κάποιο από τα σχήματα δοκιμών του παραρτήματος 1 Α-Δ κατευθύνει προς την κατηγορία αυτή με βάση τη συχνότητα θανάτων·

β) εάν υπάρχουν ήδη αξιόπιστα στοιχεία που δείχνουν ότι η τιμή LD_{50} περιλαμβάνεται στη περιοχή τιμών της κατηγορίας 5 ή εάν τα αποτελέσματα άλλων μελετών σε ζώα ή παρατηρήσεις τοξικών επιδράσεων στον άνθρωπο δημιουργούν ανησυχίες για οξείες βλάβες στην υγεία του ανθρώπου·

γ) εάν μετά από παρέκταση δεδομένων, υπολογισμούς κατά προσέγγιση ή μετρήσεις δεν δικαιολογείται η κατάταξη σε ανώτερη κατηγορία κινδύνου και

— υπάρχουν αξιόπιστα στοιχεία που δείχνουν σοβαρές τοξικές επιδράσεις στον άνθρωπο ή

— έχει παρατηρηθεί θνησιμότητα σε δοκιμές από το στόμα με τιμές δόσεων έως και της κατηγορίας 4 ή

— οι απόψεις των ειδικών επιβεβαιώνουν σοβαρά κλινικά συμπτώματα τοξικότητας —εκτός από διάρροια, ανόρθωση του τριχώματος και ταλαιπωρημένη εμφάνιση— που έχουν παρατηρηθεί σε δοκιμές με τιμές δόσεων έως και της κατηγορίας 4 ή

— οι απόψεις των ειδικών επιβεβαιώνουν αξιόπιστες ενδείξεις πιθανής σοβαρής, οξείας τοξικής επίδρασης, οι οποίες έχουν προκύψει από άλλες μελέτες σε ζώα.

ΔΙΕΞΑΓΩΓΗ ΔΟΚΙΜΩΝ ΜΕ ΔΟΣΕΙΣ ΑΝΩ ΤΩΝ 2 000 mg/kg

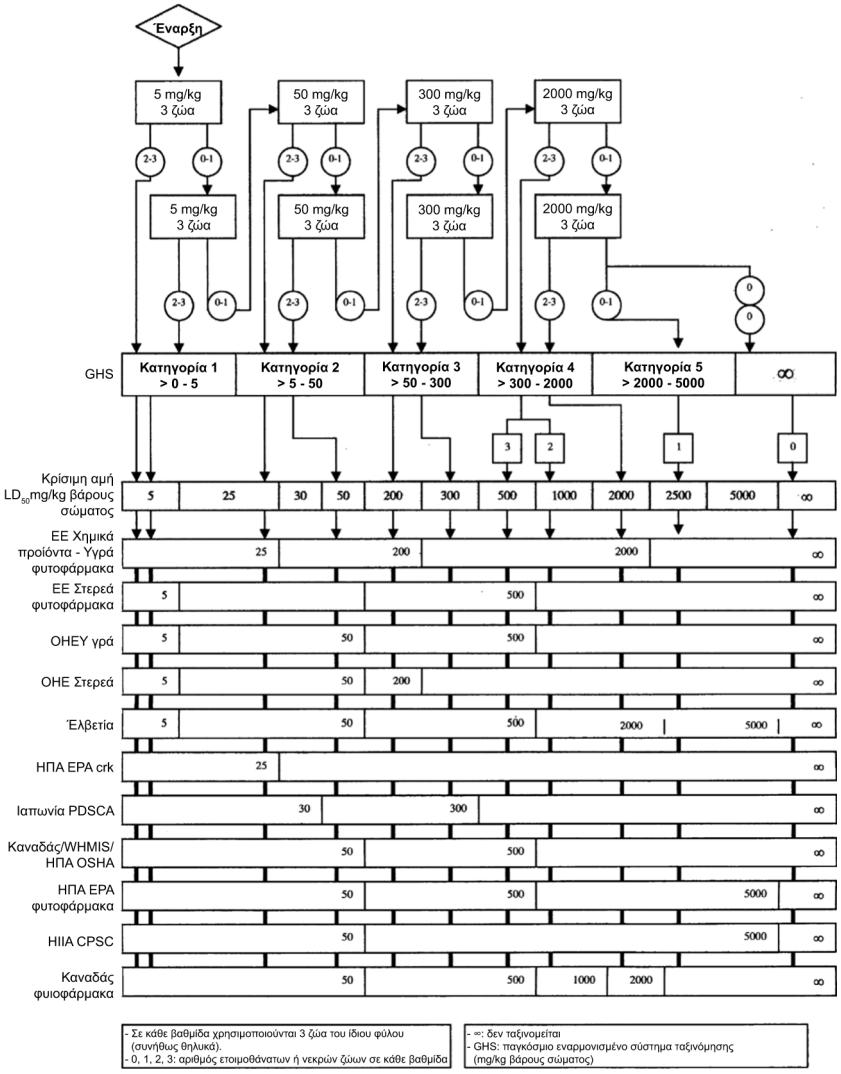
Για λόγους προστασίας των ζώων, η διεξαγωγή δοκιμών με δόσεις του εύρους τιμών που ορίζει την κατηγορία 5 (2 000-5 000 mg/kg) δεν συνιστάται και θα πρέπει να εξετάζεται μόνον εφόσον υπάρχουν μεγάλες πιθανότητες τα αποτελέσματα των δοκιμών αυτών να έχουν άμεση, σημασία για την προστασία της υγείας του ανθρώπου ή των ζώων (10). Δεν θα πρέπει να διεξάγονται άλλες δοκιμές με υψηλότερες δόσεις.

Εφόσον απαιτείται δοκιμή με δόση 5 000 mg/kg, αυτή διεξάγεται σε μία μόνο βαθμίδα (δηλαδή, σε τρία ζώα). Εάν το πρώτο ζώο πεθάνει, το επόμενο βήμα είναι η χορήγηση 2 000 mg/kg σύμφωνα με τα διαγράμματα ροής του παραρτήματος 1. Εάν το πρώτο ζώο' επιζήσει, η δόση χορηγείται σε δύο ακόμη ζώα. Εάν πεθάνει μόνον ένα από τα δύο ζώα, τότε η τιμή LD_{50} αναμένεται να υπερβαίνει τα 5 000 mg/kg. Εάν πεθάνουν και τα δύο, το επόμενο βήμα είναι η χορήγηση 2 000 mg/kg.

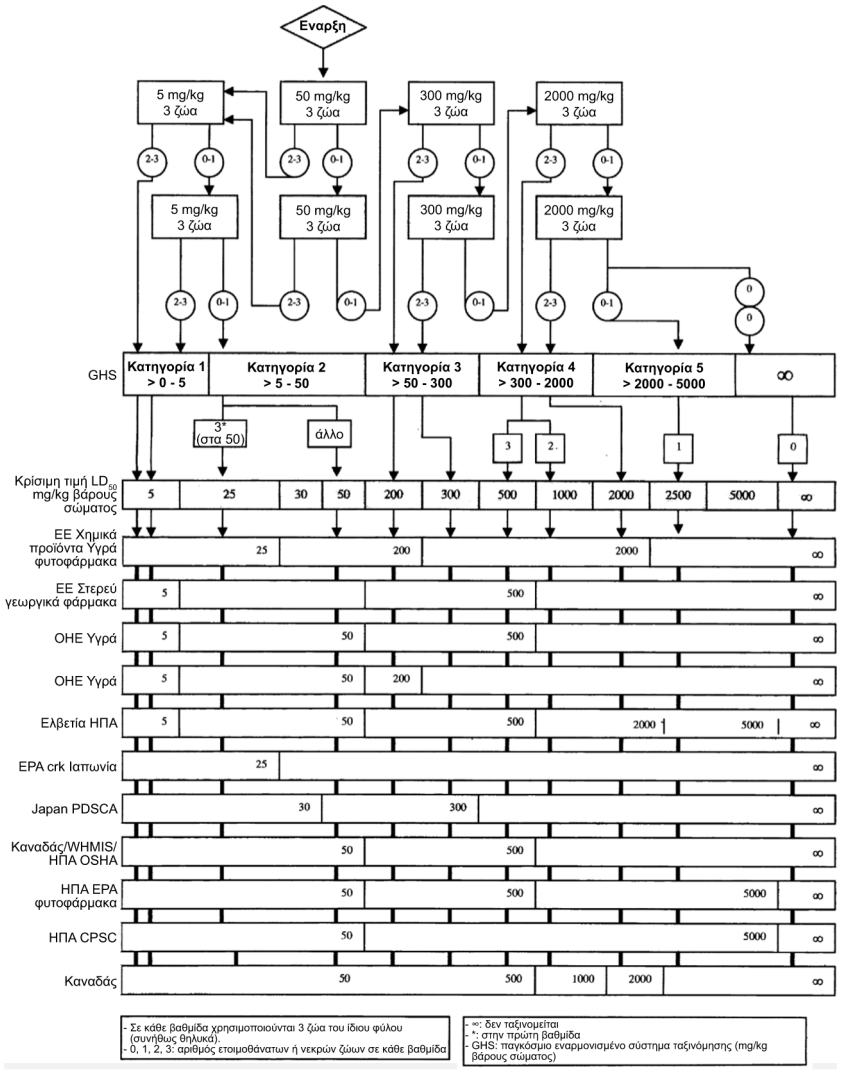
▼B

Παραρτημα 3

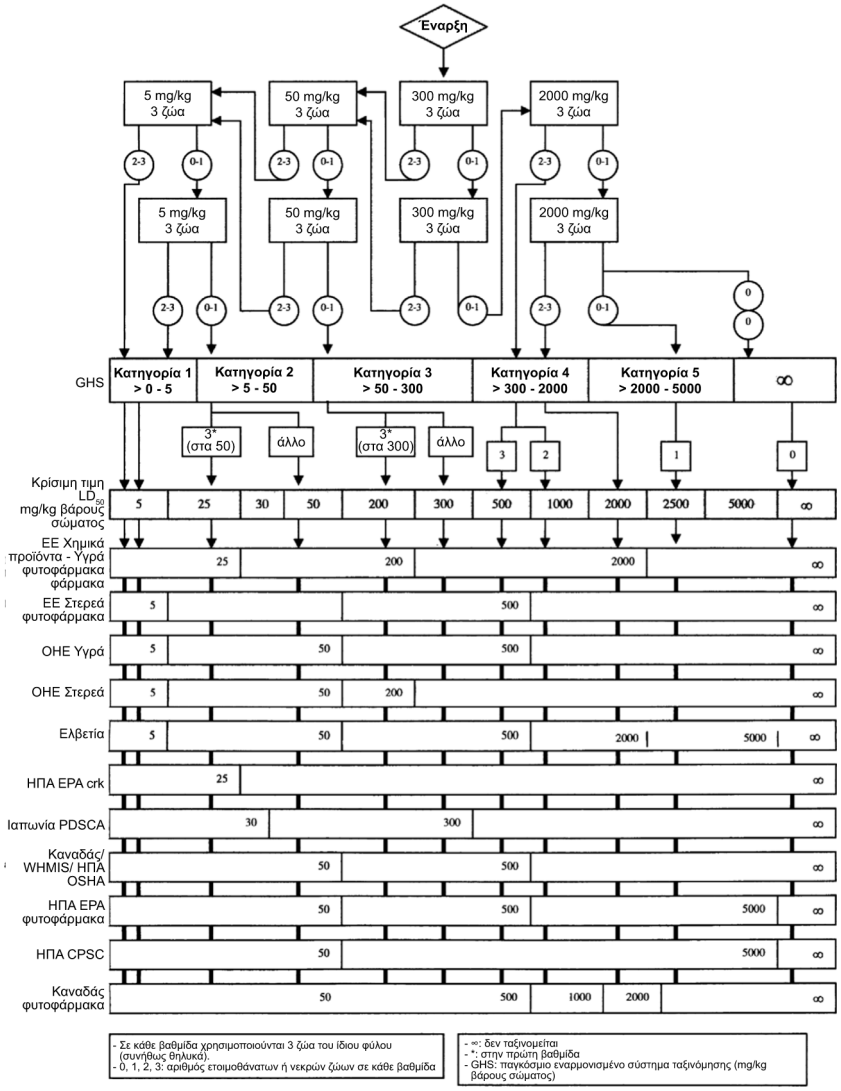
ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ Β.1.β: Οδηγίες για την ταξινόμηση σύμφωνα με το σύστημα της ΕΕ κατά τη μεταβατική περίοδο μέχρι να εφαρμοστεί πλήρως το Παγκόσμιο Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης (GHS) [έχουν ληφθεί από τη δημοσίευση (8)]



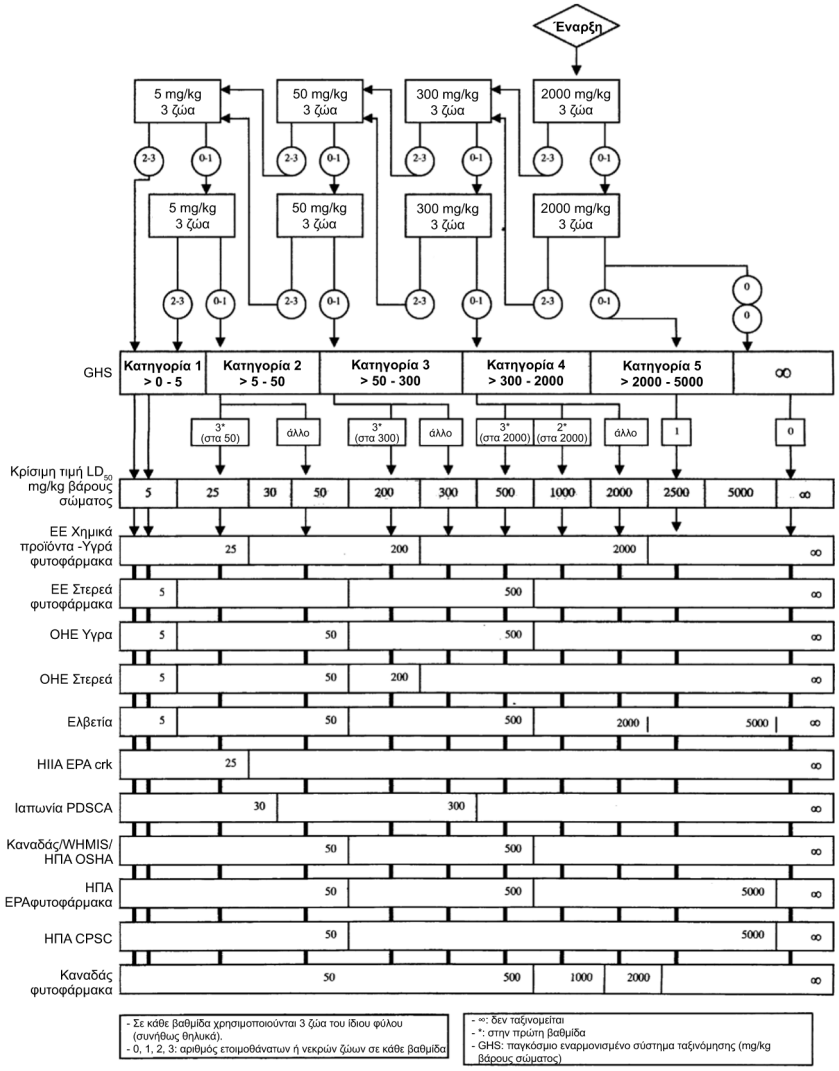
▼B


Έναρξη
5 mg/kg 3 ζώα
50 mg/kg 3 ζώα
300 mg/kg 3 ζώα
2000 mg/kg 3 ζώα
2-3
0-1
0
GHS
Κατηγορία 1 > 0 - 5
Κατηγορία 2 > 5 - 50
Κατηγορία 3 > 50 - 300
Κατηγορία 4 > 300 - 2000
Κατηγορία 5 > 2000 - 5000
∞
3* (στα 50)
άλλο
Κρίσιμη τιμή LD50 mg/kg βάρους σώματος
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
ΕΕ Χημικά προϊόντα Υγρά φυτοφάρμακα
ΕΕ Στερεύ γεωργικά φάρμακα
ΟΗΕ Υγρά
ΟΗΕ Υγρά
Ελβετία ΗΠΑ
EPA crk Ιαπωνία
Japan PDSCA
Καναδάς/WHMIS/ ΗΠΑ OSHA
ΗΠΑ EPA φυτοφάρμακα
ΗΠΑ CPSC
Καναδάς
- Σε κάθε βαθμίδα χρησιμοποιούνται 3 ζώα του ίδιου φύλου (συνήθως θηλυκά).
- 0, 1, 2, 3: αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων σε κάθε βαθμίδα
- ∞: δεν ταξινομείται
- *: στην πρώτη βαθμίδα
- GHS: παγκόσμιο εναρμονισμένο σύστημα ταξινόμησης (mg/kg βάρους σώματος)

▼B


Έναρξη
5 mg/kg 3 ζώα
50 mg/kg 3 ζώα
300 mg/kg 3 ζώα
2000 mg/kg 3 ζώα
2-3
0-1
0
GHS
Κατηγορία 1 > 0 - 5
Κατηγορία 2 > 5 - 50
Κατηγορία 3 > 50 - 300
Κατηγορία 4 > 300 - 2000
Κατηγορία 5 > 2000 - 5000
∞
3* (στα 50)
άλλο
3* (στα 300)
άλλο
3
2
1
0
Κρίσιμη τιμη LD50 mg/kg βάρους σώματος
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
ΕΕ Χημικά προϊόντα - Υγρά φυτοφάρμακα φάρμακα
25 200 2000 ∞
ΕΕ Στερεά φυτοφάρμακα
5 500 ∞
ΟΗΕ Υγρά
5 50 500 ∞
ΟΗΕ Στερεά
5 50 200 ∞
Ελβετία
5 50 500 2000 5000 ∞
ΗΠΑ EPA crk
25 ∞
Ιαπωνία PDSCA
30 300 ∞
Καναδάς/ WHMIS/ ΗΠΑ OSHA
50 500 ∞
ΗΠΑ EPA φυτοφάρμακα
50 500 5000 ∞
ΗΠΑ CPSC
50 5000 ∞
Καναδάς φυτοφάρμακα
50 500 1000 2000 ∞
- Σε κάθε βαθμίδα χρησιμοποιούνται 3 ζώα του ίδιου φύλου (συνήθως θηλυκά).
- 0, 1, 2, 3: αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων σε κάθε βαθμίδα
- ∞: δεν ταξινομείται
- *: στην πρώτη βαθμίδα
- GHS: παγκόσμιο εναρμονισμένο σύστημα ταξινόμησης (mg/kg βάρους σώματος)

▼**B**


Έναρξη
5 mg/kg 3 ζώα
50 mg/kg 3 ζώα
300 mg/kg 3 ζώα
2000 mg/kg 3 ζώα
2-3
0-1
0
GHS
Κατηγορία 1 > 0 - 5
Κατηγορία 2 > 5 - 50
Κατηγορία 3 > 50 - 300
Κατηγορία 4 > 300 - 2000
Κατηγορία 5 > 2000 - 5000
∞
3* (στα 50)
άλλο
3* (στα 300)
3* (στα 2000)
2* (στα 2000)
1
Κρίσιμη τιμή LD50 mg/kg βάρους σώματος
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
ΕΕ Χημικά προϊόντα -Υγρά φυτοφάρμακα
ΕΕ Στερεά φυτοφάρμακα
ΟΗΕ Υγρα
ΟΗΕ Στερεά
Ελβετία
HIIA EPA crk
Ιαπωνία PDSCA
Καναδάς/WHMIS/ ΗΠΑ OSHA
ΗΠΑ EPAφυτοφάρμακα
ΗΠΑ CPSC
Καναδάς φυτοφάρμακα
- Σε κάθε βαθμίδα χρησιμοποιούνται 3 ζώα του ίδιου φύλου (συνήθως θηλυκά).
- 0, 1, 2, 3: αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων σε κάθε βαθμίδα
- ∞: δεν ταξινομείται
- *: στην πρώτη βαθμίδα
- GHS: παγκόσμιο εναρμονισμένο σύστημα ταξινόμησης (mg/kg βάρους σώματος)

▼M4

Β.2. ΟΞΕΙΑ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 403 του ΟΟΣΑ (2009) (1). Η αρχική κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 403 (TG 403) για την οξεία αναπνευστική τοξικότητα εκδόθηκε το 1981. Η παρούσα αναθεωρημένη μέθοδος δοκιμών Β.2 (όντας ισοδύναμη της αναθεωρημένης TG 403) έχει σχεδιαστεί ώστε να είναι πιο ευέλικτη, να περιορίζει τη χρήση ζώων και να καλύπτει κανονιστικές ανάγκες. Η αναθεωρημένη μέθοδος δοκιμών περιλαμβάνει δύο τύπους μελετών: ένα παραδοσιακό πρωτόκολλο LC_{50} και ένα πρωτόκολλο «συγκέντρωση × χρόνος» (C × t). Κύρια χαρακτηριστικά της παρούσας μεθόδου δοκιμών είναι η ικανότητά της να παρέχει σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης που κυμαίνεται από θανατηφόρα έως μη θανατηφόρα αποτελέσματα, ώστε να προσδιορίζονται η διάμεσος θανατηφόρας συγκέντρωσης (LC_{50}), η μη θανατηφόρα οριακή συγκέντρωση (π.χ. LC_{01}) και η κλίση, καθώς και να εντοπίζει την πιθανή ευαισθησία ανάλογα με το φύλο. Το πρωτόκολλο C × t θα πρέπει να χρησιμοποιείται όταν υπάρχει συγκεκριμένη κανονιστική ή επιστημονική ανάγκη που υπαγορεύει τη διεξαγωγή δοκιμών σε ζώα για πολλαπλά χρονικά διαστήματα, όπως για τον σχεδιασμό αντίδρασης σε περίπτωση έκτακτης ανάγκης [π.χ. συναγωγή κατευθυντήριων επιπέδων οξείας έκθεσης (AEGL), κατευθυντήριων γραμμών σχεδιασμού αντίδρασης σε περίπτωση έκτακτης ανάγκης (ERPG) ή οριακών επιπέδων οξείας έκθεσης (AETL)] ή για χωροταξικό σχεδιασμό.

2. Καθοδήγηση σχετικά με την εκπόνηση και την ερμηνεία των μελετών με την παρούσα μέθοδο δοκιμών παρέχει το έγγραφο καθοδήγησης για τη διεξαγωγή δοκιμών οξείας αναπνευστικής τοξικότητας (GD 39) (2).

3. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών παρατίθενται στο τέλος του παρόντος κεφαλαίου και στο έγγραφο GD 39 (2).

4. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών επιτρέπει τον χαρακτηρισμό ελεγχόμενων χημικών ουσιών και την ποσοτική εκτίμηση των κινδύνων, καθώς και την κατάταξη και ταξινόμηση των ελεγχόμενων χημικών ουσιών σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 (3). Το έγγραφο GD 39 (2) παρέχει καθοδήγηση σχετικά με την επιλογή της κατάλληλης μεθόδου δοκιμών για τη διεξαγωγή δοκιμών οξείας τοξικότητας. Όταν απαιτούνται μόνο πληροφορίες για την ταξινόμηση και την επισήμανση, συνιστάται γενικά το κεφάλαιο Β.52 του παρόντος παραρτήματος (4) [βλέπε GD 39 (2)]. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών Β.2 δεν προορίζεται ειδικά για τον έλεγχο εξειδικευμένων υλικών, όπως δυσδιάλυτων ισομετρικών ή ινωδών υλικών ή βιομηχανικών νανοϋλικών.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

5. Πριν από τη διεξαγωγή δοκιμών σύμφωνα με την παρούσα μέθοδο δοκιμών, το εργαστήριο θα πρέπει να εξετάζει όλες τις διαθέσιμες πληροφορίες για την ελεγχόμενη χημική ουσία, συμπεριλαμβανομένων υφιστάμενων μελετών [π.χ. κεφάλαιο Β.52 του παρόντος παραρτήματος (4)], τα δεδομένα των οποίων θα υποστήριζαν τη μη διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών, ώστε να ελαχιστοποιείται η χρήση ζώων. Πληροφορίες που μπορούν να βοηθήσουν στην επιλογή των καταλληλότερων ειδών, φυλών, φύλων, τρόπων έκθεσης και των κατάλληλων συγκεντρώσεων δοκιμής είναι, μεταξύ άλλων, η ταυτότητα, η χημική δομή και οι φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τα αποτελέσματα δοκιμών τοξικότητας in vitro ή in vivo, οι προβλεπόμενες χρήσεις και η δυνητική έκθεση του ανθρώπου, τα διαθέσιμα δεδομένα (Q)SAR και τοξικολογικά δεδομένα για δομικά συγγενείς ουσίες [βλέπε GD 39 (2)].

▼M4

6. Η διεξαγωγή δοκιμών με διαβρωτικές και/ή ερεθιστικές ελεγχόμενες χημικές ουσίες σε συγκεντρώσεις που αναμένεται να προκαλέσουν σοβαρό πόνο και/ή δυσφορία θα πρέπει να αποφεύγεται στο μέτρο του δυνατού. Η διαβρωτική/ερεθιστική δράση θα πρέπει να αξιολογείται κατά την κρίση των ειδικών, με τη χρήση αποδεικτικών στοιχείων όπως η προηγούμενη εμπειρία σε σχέση με ανθρώπους και ζώα (π.χ. από μελέτες επαναλαμβανόμενης δόσης με μη διαβρωτικές/ερεθιστικές συγκεντρώσεις), υφιστάμενα δεδομένα in vitro [π.χ. από τα κεφάλαια Β.40 (5) και Β.40α (6) του παρόντος παραρτήματος ή από την TG 435 (7) του ΟΟΣΑ], τιμές pH, πληροφορίες για παρόμοιες ουσίες ή οποιαδήποτε άλλα συναφή δεδομένα, ώστε να διερευνάται αν είναι δυνατόν να μη διεξαχθούν περαιτέρω δοκιμές. Για συγκεκριμένες κανονιστικές ανάγκες (π.χ. κατάρτιση σχεδίων έκτακτης ανάγκης), η παρούσα μέθοδος δοκιμών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την έκθεση ζώων, καθώς επιτρέπει στον διευθυντή της μελέτης ή στον κύριο ερευνητή να ελέγχει την επιλογή των συγκεντρώσεων στόχου. Ωστόσο, οι συγκεντρώσεις στόχου, χωρίς να έχουν ισχυρή διαβρωτική και ερεθιστική δράση, θα πρέπει να επαρκούν για την επέκταση της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης σε επίπεδα που επιτυγχάνουν τους κανονιστικούς και επιστημονικούς στόχους της δοκιμής. Οι συγκεντρώσεις αυτές θα πρέπει να επιλέγονται κατά περίπτωση και η επιλογή τους θα πρέπει να αιτιολογείται [βλέπε GD 39 (2)].

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

7. Η παρούσα αναθεωρημένη μέθοδος δοκιμών Β.2 έχει σχεδιαστεί με σκοπό να λαμβάνονται επαρκείς πληροφορίες για την οξεία τοξικότητα μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας, ώστε να είναι δυνατή η ταξινόμησή της και να προκύπτουν, για ένα ή και για τα δύο φύλα, τα δεδομένα θνησιμότητας (π.χ. LC_{50}, LC_{01} και κλίση) που απαιτούνται για ποσοτικές εκτιμήσεις κινδύνου. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών περιλαμβάνει δύο μεθόδους. Η πρώτη είναι ένα παραδοσιακό πρωτόκολλο στο οποίο ομάδες ζώων εκτίθενται σε μια οριακή συγκέντρωση (οριακή δοκιμή) ή σε σειρά συγκεντρώσεων, με μια κλιμακωτή διαδικασία, για προκαθορισμένο χρονικό διάστημα, συνήθως 4 ωρών. Επιτρέπεται να εφαρμόζονται άλλοι χρόνοι έκθεσης για την εξυπηρέτηση ειδικών κανονιστικών σκοπών. Η δεύτερη μέθοδος είναι ένα πρωτόκολλο C × t, στο οποίο ομάδες ζώων εκτίθενται σε μια συγκέντρωση (οριακή συγκέντρωση) ή σε σειρά πολλαπλών συγκεντρώσεων για διάφορα χρονικά διαστήματα.

8. Τα ετοιμοθάνατα ζώα, καθώς και εκείνα που παρουσιάζουν σαφή σημεία πόνου ή έντονης και διαρκούς δυσφορίας, θα πρέπει να θανατώνονται με ευθανασία και λαμβάνονται υπόψη στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων με τον ίδιο τρόπο όπως τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη δοκιμή. Τα κριτήρια για τη λήψη της απόφασης να θανατωθούν ετοιμοθάνατα ή βαρέως πάσχοντα ζώα, καθώς και κατευθύνσεις για την αναγνώριση των ενδείξεων προβλέψιμου ή επικείμενου θανάτου, αποτελούν το αντικείμενο του εγγράφου καθοδήγησης αριθ. 19 του ΟΟΣΑ για τα λιγότερο βάναυσα καταληκτικά σημεία (8).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Επιλογή των ειδών ζώων

9. Πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή νεαρά ενήλικα ζώα των συνήθων εργαστηριακών φυλών. Το προτιμώμενο είδος είναι ο επίμυς και, εάν χρησιμοποιούνται άλλα είδη, πρέπει να παρέχεται σχετική αιτιολόγηση.

Προετοιμασία των ζώων

10. Τα θηλυκά ζώα πρέπει να είναι άτοκα και να μη βρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης. Κατά την ημέρα της έκθεσης, τα ζώα θα πρέπει να είναι νεαρά ενήλικα, ηλικίας 8 έως 12 εβδομάδων, ενώ η διακύμανση των βαρών των ζώων δεν πρέπει να υπερβαίνει το ± 20 % του μέσου βάρους, για κάθε φύλο, των ζώων της ίδιας ηλικίας που έχουν ενδεχομένως εκτεθεί στο παρελθόν. Τα ζώα επιλέγονται τυχαία και σημαίνονται με τρόπο που επιτρέπει την αναγνώριση του καθενός. Παραμένουν στους κλωβούς τους επί 5 τουλάχιστον ημέρες πριν από την έναρξη της δοκιμής προκειμένου να εγκλιματιστούν στις συνθήκες του εργαστηρίου. Τα ζώα πρέπει επίσης να εγκλιματίζονται στην πειραματική συσκευή για σύντομο χρονικό διάστημα πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμής, καθώς αυτό θα μειώσει το άγχος που προκαλείται από την εισαγωγή στο νέο περιβάλλον.

▼M4

Ζωοτεχνία

11. Η θερμοκρασία στην αίθουσα πειραματόζωων θα πρέπει να είναι 22 ± 3 °C. Η σχετική υγρασία θα πρέπει να διατηρείται, σε ιδανικές συνθήκες, εντός ενός εύρους 30 έως 70 %, αν και αυτό ενδέχεται να μην είναι δυνατόν όταν χρησιμοποιείται το νερό ως φορέας. Πριν και μετά την έκθεση, τα ζώα πρέπει γενικά να στεγάζονται σε κλωβούς σε ομάδες ανά φύλο και συγκέντρωση, αλλά ο αριθμός των ζώων ανά κλωβό πρέπει να μην εμποδίζει την παρατήρηση κάθε ζώου και να ελαχιστοποιεί τυχόν απώλειες λόγω κανιβαλισμού ή μαχών. Όταν τα ζώα πρόκειται να εκτεθούν μόνο ρινικά, ενδέχεται να είναι απαραίτητο να εγκλιματιστούν στους σωλήνες συγκράτησης. Οι σωλήνες συγκράτησης δεν θα πρέπει να προκαλούν στα ζώα περιττή σωματική ή θερμική δυσφορία ή δυσφορία λόγω ακινητοποίησης. Η συγκράτηση ενδέχεται να επηρεάζει τα φυσικά καταληκτικά σημεία, όπως τη θερμοκρασία του σώματος (υπερθερμία) και/ή τον όγκο του αναπνεόμενου αέρα ανά λεπτό. Εάν υπάρχουν γενικά δεδομένα που δείχνουν ότι δεν προκαλούνται τέτοιες αλλαγές σε σημαντικό βαθμό, δεν είναι απαραίτητη η προκαταρκτική προσαρμογή στους σωλήνες συγκράτησης. Τα ζώα που εκτίθενται ολόσωμα σε αερόλυμα θα πρέπει να στεγάζονται ατομικά κατά τη διάρκεια της έκθεσης, ώστε να αποφεύγεται η διήθηση του ελεγχόμενου αερολύματος μέσω του τριχώματος των ζώων που στεγάζονται στον ίδιο κλωβό. Μπορούν να χρησιμοποιούνται συμβατικά και πιστοποιημένα εργαστηριακά σιτηρέσια, εκτός από το διάστημα της έκθεσης, συνοδευόμενα από απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού από το δίκτυο ύδρευσης. Ο φωτισμός θα πρέπει να είναι τεχνητός, με φωτοπερίοδο 12 ωρών.

Θάλαμοι εισπνοής

12. Κατά την επιλογή θαλάμου εισπνοής θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη η φύση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και ο στόχος της δοκιμής. Προτιμώμενος τρόπος έκθεσης είναι η ρινική έκθεση (ο όρος περιλαμβάνει την κεφαλική, τη ρινική και τη ρυγχική έκθεση). Η ρινική έκθεση προτιμάται γενικά για μελέτες με υγρά ή στερεά αερολύματα και για ατμούς που μπορεί να συμπυκνωθούν σχηματίζοντας αερολύματα. Ειδικοί στόχοι της μελέτης ενδέχεται να επιτυγχάνονται καλύτερα με ολόσωμη έκθεση, αλλά αυτό θα πρέπει να αιτιολογείται στην έκθεση της μελέτης. Για να εξασφαλίζεται η σταθερότητα της ατμόσφαιρας κατά τη χρήση θαλάμου ολόσωμης έκθεσης, ο συνολικός όγκος των πειραματόζωων δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 5 % του όγκου του θαλάμου. Οι αρχές των τεχνικών ρινικής και ολόσωμης έκθεσης, καθώς και τα ιδιαίτερα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά τους, περιγράφονται στο έγγραφο GD 39 (2).

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΚΘΕΣΗΣ

Χορήγηση των συγκεντρώσεων

13. Οι ρινικές εκθέσεις επιμύων μπορούν να έχουν οποιαδήποτε διάρκεια, με ανώτατο όριο τις 6 ώρες. Σε περίπτωση ρινικής έκθεσης ποντικών, η διάρκειά της δεν θα πρέπει γενικά να υπερβαίνει τις 4 ώρες. Εάν απαιτούνται μελέτες μεγαλύτερης διάρκειας, πρέπει να παρέχεται αιτιολόγηση [βλέπε GD 39 (2)]. Τα ζώα που εκτίθενται σε αερολύματα σε θαλάμους ολόσωμης έκθεσης θα πρέπει να στεγάζονται ατομικά, ώστε να αποφεύγεται η κατάποση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας κατά την περιποίηση από τα άλλα ζώα που στεγάζονται στον ίδιο κλωβό. Κατά την περίοδο έκθεσης τα ζώα θα πρέπει να στερούνται τροφής. Νερό μπορεί να παρέχεται καθ' όλη τη διάρκεια της ολόσωμης έκθεσης.

14. Τα ζώα εκτίθενται στην ελεγχόμενη ουσία σε μορφή αερίου, ατμών, αερολύματος ή μείγματος αυτών. Η φυσική κατάσταση που ελέγχεται εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, την επιλεχθείσα συγκέντρωση και/ή τη φυσική μορφή που είναι η πιθανότερη κατά τον χειρισμό και τη χρήση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Υγροσκοπικές και χημικά δραστικές ελεγχόμενες χημικές ουσίες θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή υπό συνθήκες ξηρού αέρα. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μην παράγονται εκρηκτικές συγκεντρώσεις.

▼M4

Κατανομή μεγέθους σωματιδίων

15. Θα πρέπει να προσδιορίζεται η κατανομή μεγέθους σωματιδίων για όλα τα αερολύματα, καθώς και για ατμούς που ενδέχεται να συμπυκνωθούν σχηματίζοντας αερολύματα. Για να είναι δυνατή η έκθεση όλων των σχετικών περιοχών της αναπνευστικής οδού, συνιστώνται αερολύματα με διάμεσο αεροδυναμικής διαμέτρου κατά μάζα (MMAD) 1 έως 4 μm, με γεωμετρική τυπική απόκλιση (σ_g) 1,5 έως 3,0 (2) (9) (10). Παρόλο που θα πρέπει να καταβάλλονται εύλογες προσπάθειες για τη συμμόρφωση με το πρότυπο αυτό, εάν αυτό δεν είναι δυνατό θα πρέπει να αναφέρεται η γνώμη των ειδικών. Παραδείγματος χάριν, καπνοί μετάλλων ενδέχεται να υπολείπονται του προτύπου αυτού, ενώ φορτισμένα σωματίδια, ίνες και υγροσκοπικά υλικά (των οποίων το μέγεθος αυξάνεται στο υγρό περιβάλλον της αναπνευστικής οδού) ενδέχεται να το υπερβαίνουν.

Παρασκεύασμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε φορέα

16. Επιτρέπεται να χρησιμοποιείται φορέας για την επίτευξη κατάλληλης συγκέντρωσης και κατάλληλου μεγέθους σωματιδίων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην ατμόσφαιρα. Κατά κανόνα, θα πρέπει να προτιμάται το νερό. Τα σωματιδιακά υλικά μπορούν να υποβάλλονται σε μηχανικές διεργασίες ώστε να επιτυγχάνεται η απαιτούμενη κατανομή μεγέθους σωματιδίων, αλλά θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μην αποσυντίθεται ούτε να αλλοιώνεται η ελεγχόμενη χημική ουσία. Στις περιπτώσεις που θεωρείται ότι μηχανικές διεργασίες έχουν αλλοιώσει τη χημική σύσταση της ουσίας (π.χ. ακραίες θερμοκρασίες από υπερβολική άλεση λόγω τριβής), η σύσταση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας θα πρέπει να εξακριβώνεται με ανάλυση. Θα πρέπει να λαμβάνεται κατάλληλη μέριμνα, ώστε να μην μολύνεται η ελεγχόμενη χημική ουσία. Δεν είναι απαραίτητο να υποβάλλονται σε δοκιμή μη εύθρυπτα κοκκώδη υλικά που έχουν σκοπίμως μορφοποιηθεί κατά τρόπο ώστε να μην είναι εισπνεύσιμα. Θα πρέπει να διεξάγεται δοκιμή αντοχής στη φθορά λόγω τριβής ώστε να αποδεικνύεται ότι δεν παράγονται εισπνεύσιμα σωματίδια κατά τον χειρισμό κοκκώδους υλικού. Εάν παράγονται εισπνεύσιμες ουσίες κατά τη δοκιμή αντοχής στη φθορά λόγω τριβής, θα πρέπει να εκτελείται δοκιμή αναπνευστικής τοξικότητας.

Ζώα-μάρτυρες

17. Δεν είναι απαραίτητη μια παράλληλη ομάδα ως αρνητικός (αέρας) μάρτυρας. Όταν χρησιμοποιείται άλλος φορέας εκτός από το νερό για τη δημιουργία της πειραματικής ατμόσφαιρας, θα πρέπει να χρησιμοποιείται ομάδα-μάρτυρας για τον εν λόγω φορέα μόνο όταν δεν υπάρχουν ιστορικά δεδομένα αναπνευστικής τοξικότητας. Εάν η μελέτη τοξικότητας μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας που έχει μορφοποιηθεί σε φορέα δεν αποκαλύψει τοξικότητα, συνάγεται ότι ο φορέας δεν είναι τοξικός στην ελεγχόμενη συγκέντρωση. Συνεπώς δεν χρειάζεται μάρτυρας για τον φορέα.

ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΕΚΘΕΣΗΣ

Ροή αέρα στον θάλαμο

18. Η ροή του αέρα μέσω του θαλάμου πρέπει να ελέγχεται προσεκτικά, να παρακολουθείται συνεχώς και να καταγράφεται τουλάχιστον σε ωριαία βάση κατά τη διάρκεια κάθε έκθεσης. Η παρακολούθηση της συγκέντρωσης στην πειραματική ατμόσφαιρα (ή της σταθερότητας) αποτελεί ολοκληρωτική μέτρηση όλων των δυναμικών παραμέτρων και έμμεσο τρόπο ελέγχου όλων των σχετικών δυναμικών παραμέτρων δημιουργίας της ατμόσφαιρας. Θα πρέπει να δίδεται προσοχή ώστε να αποφεύγεται η εκ νέου αναπνοή στους θαλάμους ρινικής έκθεσης, στις περιπτώσεις που η ροή του αέρα μέσω του συστήματος έκθεσης είναι ανεπαρκής για την εξασφάλιση δυναμικής ροής της ατμόσφαιρας με την ελεγχόμενη χημική ουσία. Έχουν καθοριστεί μεθοδολογίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αποδειχθεί η απουσία εκ νέου αναπνοής υπό τις επιλεγμένες συνθήκες λειτουργίας (2) (11). Η συγκέντρωση οξυγόνου πρέπει να είναι τουλάχιστον 19 % και η συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα να μην υπερβαίνει το 1 %. Εάν υπάρχει λόγος να θεωρείται ότι δεν μπορούν να τηρηθούν τα πρότυπα αυτά, πρέπει να μετρώνται οι συγκεντρώσεις οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα.

▼M4

Θερμοκρασία και σχετική υγρασία του θαλάμου

19. Η θερμοκρασία του θαλάμου πρέπει να διατηρείται στους 22 ± 3 °C. Η σχετική υγρασία στη ζώνη αναπνοής των ζώων, τόσο για ρινική όσο και για ολόσωμη έκθεση, θα πρέπει να παρακολουθείται και να καταγράφεται τουλάχιστον τρεις φορές, σε περίπτωση έκθεσης διάρκειας έως 4 ωρών, και ανά ώρα, σε περίπτωση έκθεσης μικρότερης διάρκειας. Η σχετική υγρασία θα πρέπει, σε ιδανικές συνθήκες, να διατηρείται σε επίπεδα 30 έως 70 %, αλλά αυτό μπορεί να είναι είτε ανέφικτο (π.χ. κατά τη δοκιμή μειγμάτων που έχουν ως βάση το νερό) ή μη μετρήσιμο λόγω αλληλεπίδρασης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας με τη μέθοδο δοκιμών.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: ονομαστική συγκέντρωση

20. Εάν είναι εφικτό, θα πρέπει να υπολογίζεται και να καταγράφεται η ονομαστική συγκέντρωση στον θάλαμο έκθεσης. Η ονομαστική συγκέντρωση ορίζεται ως η μάζα της παραγόμενης ελεγχόμενης χημικής ουσίας διά του συνολικού όγκου αέρα που διαβιβάζεται μέσω του συστήματος έκθεσης. Η ονομαστική συγκέντρωση δεν χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό της έκθεσης των ζώων, αλλά η σύγκρισή της με την πραγματική συγκέντρωση παρέχει ένδειξη της απόδοσης παραγωγής του συστήματος δοκιμών και, συνεπώς, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό προβλημάτων παραγωγής.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: πραγματική συγκέντρωση

21. Η πραγματική συγκέντρωση ορίζεται ως η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας στη ζώνη αναπνοής των ζώων σε θάλαμο εισπνοής. Οι πραγματικές συγκεντρώσεις μπορούν να επιτευχθούν με ειδικές μεθόδους (π.χ. άμεση δειγματοληψία, μέθοδοι προσρόφησης ή χημικής αντίδρασης και επακόλουθος αναλυτικός χαρακτηρισμός) είτε με μη ειδικές μεθόδους, όπως η σταθμική ανάλυση με ηθμό. Η χρήση σταθμικής ανάλυσης είναι αποδεκτή μόνο για αερολύματα σκόνης με ένα μόνο μέρος ή για αερολύματα υγρών χαμηλής πτητικότητας και θα πρέπει να υποστηρίζεται από κατάλληλους, ειδικούς για την ελεγχόμενη ουσία χαρακτηρισμούς, πριν από τη μελέτη. Η συγκέντρωση αερολυμάτων σκόνης με πολλά μέρη μπορεί επίσης να προσδιοριστεί με σταθμική ανάλυση. Ωστόσο, απαιτούνται για τον σκοπό αυτό αναλυτικά δεδομένα που να αποδεικνύουν ότι η σύνθεση του αερομεταφερόμενου υλικού είναι παρόμοια με εκείνη του αρχικού υλικού. Εάν οι πληροφορίες αυτές δεν είναι διαθέσιμες, ενδέχεται να απαιτείται εκ νέου ανάλυση της ελεγχόμενης ουσίας (ιδανικά, στην αερομεταφερόμενη κατάσταση) ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της μελέτης. Προκειμένου για ουσίες σε μορφή αερολύματος που ενδέχεται να εξατμιστούν ή να εξαχνωθούν, θα πρέπει να αποδεικνύεται ότι συλλέγονται όλες οι φάσεις με την επιλεχθείσα μέθοδο. Στην έκθεση της μελέτης θα πρέπει να αναφέρονται οι στοχευόμενες, οι ονομαστικές και οι πραγματικές συγκεντρώσεις, αλλά μόνο οι πραγματικές συγκεντρώσεις χρησιμοποιούνται σε στατιστικές αναλύσεις για τον υπολογισμό τιμών θανατηφόρας συγκέντρωσης.

22. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται, εάν είναι δυνατόν, μία παρτίδα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και το δοκίμιο θα πρέπει να αποθηκεύεται υπό συνθήκες που διατηρούν την καθαρότητα, την ομοιογένεια και τη σταθερότητά του. Πριν από την έναρξη της μελέτης, η ελεγχόμενη ουσία θα πρέπει να χαρακτηρίζεται ως προς την καθαρότητά της και, εάν είναι τεχνικά εφικτό, ως προς την ταυτότητα και τις ποσότητες τυχόν εντοπισθέντων ρύπων και προσμείξεων. Αυτό μπορεί να αποδειχθεί, μεταξύ άλλων, από τα ακόλουθα δεδομένα: χρόνος κατακράτησης και σχετικό εμβαδόν κορυφής, μοριακό βάρος μέσω αναλύσεων φασματομετρίας μάζας ή αεριοχρωματογραφίας ή άλλες εκτιμήσεις. Παρόλο που η ταυτότητα του δοκιμίου δεν αποτελεί ευθύνη του εργαστηρίου, θα ήταν σκόπιμο να επιβεβαιώνει το εργαστήριο, έστω και σε περιορισμένη έκταση, τον χαρακτηρισμό από τον χορηγό (π.χ. χρώμα, φυσική κατάσταση κ.λπ.).

23. Η ατμόσφαιρα έκθεσης διατηρείται σταθερή στο μέτρο του εφικτού και παρακολουθείται συνεχώς και/ή κατά διαστήματα, ανάλογα με τη μέθοδο ανάλυσης. Όταν εφαρμόζεται δειγματοληψία κατά διαστήματα, θα πρέπει να λαμβάνονται δείγματα της ατμόσφαιρας του θαλάμου τουλάχιστον δύο φορές κατά τη μελέτη διάρκειας τεσσάρων ωρών. Εάν αυτό δεν είναι εφικτό, λόγω περιορισμένης ταχύτητας ροής αέρα ή χαμηλών συγκεντρώσεων, επιτρέπεται να λαμβάνεται ένα δείγμα καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης. Εάν εμφανίζονται αισθητές διακυμάνσεις μεταξύ των δειγμάτων,

▼M4

για τις επόμενες συγκεντρώσεις που θα υποβληθούν σε δοκιμή θα πρέπει να λαμβάνονται τέσσερα δείγματα ανά έκθεση. Τα επιμέρους δείγματα συγκέντρωσης στον θάλαμο δεν θα πρέπει να αποκλίνουν από τη μέση συγκέντρωση περισσότερο από ± 10 %, προκειμένου για αέρια και ατμούς, και ± 20 % για τα υγρά ή στερεά αερολύματα. Πρέπει να υπολογίζεται και να καταγράφεται ο χρόνος εξισορρόπησης του θαλάμου (t_{95}). Η διάρκεια της έκθεσης καλύπτει τον χρόνο παραγωγής της ελεγχόμενης ουσίας, στον οποίο λαμβάνονται υπόψη οι χρόνοι που απαιτούνται για την επίτευξη του t_{95}. Καθοδήγηση για την εκτίμηση του t_{95} παρέχεται στο έγγραφο GD 39 (2).

24. Στην περίπτωση πολύ σύνθετων μειγμάτων που αποτελούνται από αέρια/ατμούς και αερολύματα (π.χ. ατμόσφαιρες καύσης και ελεγχόμενες χημικές ουσίες εξωθούμενες από στοχοστρεφή προϊόντα/συσκευές τελικής χρήσης), κάθε φάση ενδέχεται να συμπεριφέρεται διαφορετικά στον θάλαμο εισπνοής. Συνεπώς, θα πρέπει να επιλέγεται τουλάχιστον μία ουσία-δείκτης (αναλύτης), συνήθως η κύρια δραστική ουσία του μείγματος, σε κάθε φάση (αέριο/ατμός και αερόλυμα). Όταν η ελεγχόμενη ουσία είναι μείγμα, η αναλυτική συγκέντρωση θα πρέπει να αναφέρεται για το μείγμα και όχι μόνο για τη δραστική ουσία ή το μέρος (αναλύτης). Πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με τις πραγματικές συγκεντρώσεις παρέχονται στο έγγραφο GD 39 (2).

Ελεγχόμενη χημική ουσία: κατανομή μεγέθους σωματιδίων

25. Η κατανομή μεγέθους σωματιδίων των αερολυμάτων θα πρέπει να προσδιορίζεται τουλάχιστον δύο φορές κατά τη διάρκεια κάθε τετράωρης έκθεσης, με τη χρήση κρουστικού διαχωριστήρα ή εναλλακτικού οργάνου, όπως ο αεροδυναμικός κατανεμητής σωματιδίων. Εάν μπορεί να αποδειχθεί ισοδυναμία των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται μέσω κρουστικού διαχωριστήρα και του εναλλακτικού οργάνου, το εναλλακτικό όργανο επιτρέπεται να χρησιμοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης. Παράλληλα με το κύριο όργανο θα πρέπει να χρησιμοποιείται μια δεύτερη συσκευή, όπως ένα σταθμικό φίλτρο ή πλυντρίδα αερίου/φυσαλιδοδείκτης, για να επιβεβαιώνει την απόδοση συλλογής του κύριου οργάνου. Η κατά μάζα συγκέντρωση που προκύπτει από την ανάλυση μεγέθους σωματιδίων θα πρέπει να προσεγγίζει, εντός εύλογων ορίων, την κατά μάζα συγκέντρωση που λαμβάνεται με σταθμική ανάλυση [βλέπε GD 39 (2)]. Εάν μπορεί να αποδειχθεί ισοδυναμία σε πρώιμο στάδιο της μελέτης, επιτρέπεται να παραλείπονται οι περαιτέρω επιβεβαιωτικές μετρήσεις. Για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων, θα πρέπει να λαμβάνονται μέτρα ώστε να ελαχιστοποιούνται τα ασαφή δεδομένα που ενδέχεται να δημιουργούν ανάγκη επανάληψης μιας έκθεσης. Στην περίπτωση των ατμών, η κατανομή μεγέθους σωματιδίων θα πρέπει να προσδιορίζεται, εάν υπάρχει πιθανότητα η συμπύκνωση των ατμών να οδηγήσει στον σχηματισμό αερολύματος ή εάν ανιχνευθούν σε ατμόσφαιρα ατμών σωματίδια με δυναμικό σχηματισμού μεικτών φάσεων (βλέπε παράγραφο 15).

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

26. Περιγράφονται κατωτέρω δύο τύποι μελέτης: το παραδοσιακό πρωτόκολλο και το πρωτόκολλο C × t. Τα δύο πρωτόκολλα μπορούν να περιλαμβάνουν αναγνωριστική μελέτη, κυρίως μελέτη και/ή οριακή δοκιμή (παραδοσιακό πρωτόκολλο) ή δοκιμή σε οριακή συγκέντρωση (C × t). Εάν είναι γνωστό ότι ένα φύλο είναι περισσότερο ευαίσθητο, ο διευθυντής της μελέτης μπορεί να επιλέξει να εκπονήσει τις μελέτες αυτές χρησιμοποιώντας μόνο το ευαίσθητο φύλο. Σε περίπτωση ρινικής έκθεσης άλλων ειδών τρωκτικών εκτός των επιμύων, οι μέγιστες περίοδοι έκθεσης μπορούν να προσαρμόζονται ώστε να ελαχιστοποιείται η δυσφορία που νιώθει το κάθε είδος. Πριν αρχίσει η δοκιμή, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όλα τα διαθέσιμα δεδομένα ώστε να ελαχιστοποιείται η χρήση ζώων. Παραδείγματος χάριν, τα δεδομένα που παράγονται με την εφαρμογή του κεφαλαίου B.52 του παρόντος παραρτήματος (4) ενδέχεται να εξαλείφουν την ανάγκη αναγνωριστικής μελέτης και μπορούν επίσης να καταδείξουν αν ένα φύλο είναι περισσότερο ευαίσθητο [βλέπε GD 39 (2)].

▼M4

ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

Γενικές εκτιμήσεις: παραδοσιακό πρωτόκολλο

27. Σε μια παραδοσιακή μελέτη, ομάδες ζώων εκτίθενται στην ελεγχόμενη χημική ουσία για καθορισμένη χρονική περίοδο (συνήθως 4 ώρες) σε θάλαμο είτε ρινικής είτε ολόσωμης έκθεσης. Τα ζώα εκτίθενται είτε σε οριακή συγκέντρωση (οριακή δοκιμή) είτε σε τρεις τουλάχιστον συγκεντρώσεις στο πλαίσιο κλιμακωτής διαδικασίας (κυρίως μελέτη). Μπορεί να προηγείται της κυρίως μελέτης μια αναγνωριστική μελέτη, εκτός εάν υπάρχουν ήδη κάποιες πληροφορίες σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία, όπως μελέτες του κεφαλαίου B.52 που έχουν εκπονηθεί στο παρελθόν [βλέπε GD 39 (2)].

Αναγνωριστική μελέτη: παραδοσιακό πρωτόκολλο

28. Αναγνωριστική μελέτη χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της ισχύος της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τον εντοπισμό διαφορών ευαισθησίας μεταξύ των δύο φύλων και την υποβοήθηση της επιλογής επιπέδων συγκέντρωσης έκθεσης για την κυρίως μελέτη ή την οριακή δοκιμή. Κατά την επιλογή των επιπέδων συγκέντρωσης για την αναγνωριστική μελέτη, πρέπει να χρησιμοποιούνται όλες οι διαθέσιμες πληροφορίες, συμπεριλαμβανομένων των διαθέσιμων δεδομένων (Q)SAR και δεδομένων για παρόμοιες χημικές ουσίες. Δεν πρέπει να εκτίθενται περισσότερα από τρία αρσενικά και τρία θηλυκά ζώα σε κάθε συγκέντρωση (ενδέχεται να απαιτούνται 3 ζώα/φύλο για να διαπιστωθούν διαφορές μεταξύ των δύο φύλων). Η αναγνωριστική μελέτη μπορεί να περιλαμβάνει μια μόνο συγκέντρωση, αλλά, εάν είναι απαραίτητο, μπορούν να ελεγχθούν περισσότερες συγκεντρώσεις. Κατά την αναγνωριστική μελέτη δεν θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή τόσα ζώα και συγκεντρώσεις ώστε αυτή να προσομοιάζει με κυρίως μελέτη. Αντί αναγνωριστικής μελέτης μπορεί να χρησιμοποιηθεί μελέτη του κεφαλαίου B.52 (4) που έχει εκπονηθεί στο παρελθόν [βλέπε GD 39 (2)].

Οριακή δοκιμή: παραδοσιακό πρωτόκολλο

29. Οριακή δοκιμή χρησιμοποιείται όταν είναι γνωστό ή αναμένεται ότι η ελεγχόμενη ουσία είναι ουσιαστικά μη τοξική, ήτοι προκαλεί τοξική αντίδραση μόνο σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από τις οριακές τιμές που προβλέπονται στις νομοθετικές ρυθμίσεις. Σε μια οριακή δοκιμή, μία ομάδα τριών αρσενικών και τριών θηλυκών ζώων εκτίθεται στην ελεγχόμενη ουσία σε οριακή συγκέντρωση. Στοιχεία σχετικά με την τοξικότητα της ελεγχόμενης ουσίας είναι δυνατόν να συναχθούν από τα αποτελέσματα δοκιμών που έχουν διεξαχθεί με ανάλογες χημικές ουσίες, λαμβάνοντας υπόψη την ταυτότητα και την εκατοστιαία αναλογία των σημαντικών από τοξικολογική άποψη συστατικών. Στις περιπτώσεις που δεν υπάρχουν καθόλου ή υπάρχουν ελάχιστα στοιχεία για την τοξικότητα της ελεγχόμενης ουσίας ή εάν η τελευταία αναμένεται να είναι τοξική, πρέπει να διεξάγεται η κυρίως δοκιμή.

30. Η επιλογή οριακών συγκεντρώσεων εξαρτάται συνήθως από τις κανονιστικές απαιτήσεις. Όταν εφαρμόζεται ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008, οι οριακές συγκεντρώσεις για αέρια, ατμούς και αερολύματα είναι 20 000 ppm, 20 mg/l και 5 mg/l, αντιστοίχως (ή η μέγιστη εφικτή συγκέντρωση) (3). Ενδέχεται να είναι τεχνικά δύσκολο να παραχθούν οριακές συγκεντρώσεις ορισμένων ελεγχόμενων χημικών ουσιών, ιδίως ατμών και αερολυμάτων. Κατά τη διεξαγωγή δοκιμών με αερολύματα, πρωταρχικός στόχος θα πρέπει να είναι η επίτευξη εισπνεύσιμου μεγέθους σωματιδίων (MMAD 1-4 μm). Αυτό είναι εφικτό με τις περισσότερες ελεγχόμενες χημικές ουσίες σε συγκέντρωση 2 mg/l. Ο έλεγχος αερολυμάτων σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 2 mg/l θα πρέπει να επιχειρείται μόνο εάν είναι δυνατόν να επιτευχθεί εισπνεύσιμο μέγεθος σωματιδίων [βλέπε GD 39 (2)]. Ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 αποθαρρύνει τη διεξαγωγή δοκιμών πάνω από μια οριακή συγκέντρωση για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων (3). Η οριακή συγκέντρωση θα πρέπει να εξετάζεται μόνο στην περίπτωση που είναι πολύ πιθανόν τα αποτελέσματα μιας τέτοιας δοκιμής να έχουν άμεση συνάφεια με την προστασία της υγείας των ανθρώπων (3) και εφόσον παρέχεται αιτιολόγηση στην έκθεση μελέτης. Στην περίπτωση δυνητικώς εκρήξιμων ελεγχόμενων ουσιών, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγονται οι συνθήκες που ευνοούν εκρήξεις. Για να αποφεύγεται η περιττή χρήση ζώων, θα πρέπει να διεξάγεται δοκιμαστική διαδικασία χωρίς ζώα, πριν από την οριακή δοκιμή, ώστε να εξασφαλίζεται η δυνατότητα επίτευξης των απαραιτήτων συνθηκών θαλάμου για μια οριακή δοκιμή.

▼M4

31. Εάν παρατηρούνται θνησιμότητα ή ετοιμοθάνατα ζώα στην οριακή συγκέντρωση, τα αποτελέσματα της οριακής δοκιμής μπορούν να χρησιμεύσουν ως αναγνωριστική μελέτη για περαιτέρω δοκιμές σε άλλες συγκεντρώσεις (βλέπε κυρίως μελέτη). Εάν οι φυσικές ή χημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας καθιστούν αδύνατη την επίτευξη οριακής συγκέντρωσης, θα πρέπει να πραγματοποιείται δοκιμή με τη μέγιστη εφικτή συγκέντρωση. Εάν παρατηρείται θνησιμότητα κάτω του 50 % με τη μέγιστη εφικτή συγκέντρωση, δεν είναι απαραίτητη η διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών. Εάν δεν είναι δυνατόν να επιτευχθεί η οριακή συγκέντρωση, η έκθεση μελέτης της θα πρέπει να περιλαμβάνει εξηγήσεις και υποστηρικτικά δεδομένα. Εάν η μέγιστη εφικτή συγκέντρωση ενός ατμού δεν προκαλεί την εκδήλωση τοξικότητας, ενδέχεται να είναι απαραίτητο να παραχθεί η ελεγχόμενη ουσία ως υγρό αερόλυμα.

Κυρίως μελέτη: παραδοσιακό πρωτόκολλο

32. Η κυρίως μελέτη διεξάγεται συνήθως με τη χρήση πέντε αρσενικών και πέντε θηλυκών ζώων (ή 5 ζώων του φύλου που παρουσιάζει ευαισθησία, εάν είναι γνωστό) ανά επίπεδο συγκέντρωσης και με τουλάχιστον τρία επίπεδα συγκέντρωσης. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται επαρκή επίπεδα συγκέντρωσης ώστε να πραγματοποιείται ανθεκτική στατιστική ανάλυση. Το χρονικό διάστημα μεταξύ των εκθέσεων στις οποίες υποβάλλονται οι ομάδες καθορίζεται από τον χρόνο εμφάνισης, τη διάρκεια και τη σοβαρότητα των τοξικών εκδηλώσεων. Η έκθεση των ζώων στο επόμενο επίπεδο συγκέντρωσης θα πρέπει να καθυστερεί έως ότου υπάρχει εύλογη πεποίθηση ότι τα ζώα που υποβλήθηκαν στην προηγούμενη δοκιμή θα επιβιώσουν. Με τον τρόπο αυτόν, ο διευθυντής της μελέτης μπορεί να προσαρμόζει ανάλογα τη συγκέντρωση στόχου για την επόμενη ομάδα έκθεσης. Λόγω της εξάρτησης από περίπλοκες τεχνολογίες, αυτό ενδέχεται να μην είναι πάντα εφικτό στην πράξη στις μελέτες εισπνοής, οπότε η έκθεση των ζώων στο επόμενο επίπεδο συγκέντρωσης θα πρέπει να βασίζεται στην προηγούμενη πείρα και σε επιστημονική κρίση. Όταν διεξάγονται δοκιμές με μείγματα, θα πρέπει να μελετάται το έγγραφο GD 39 (2).

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ «ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ × ΧΡΟΝΟΣ» (C × t)

Γενικές εκτιμήσεις: πρωτόκολλο C × t

33. Η κλιμακωτή μελέτη C × t μπορεί να εξετάζεται ως εναλλακτική λύση αντί του παραδοσιακού πρωτοκόλλου κατά την εκτίμηση της αναπνευστικής τοξικότητας (12) (13) (14). Η προσέγγιση αυτή επιτρέπει την έκθεση ζώων σε μια ελεγχόμενη χημική ουσία σε διάφορα επίπεδα συγκέντρωσης και για πολλαπλά χρονικά διαστήματα. Όλες οι δοκιμές εκτελούνται σε θάλαμο ρινικής έκθεσης (οι θάλαμοι ολόσωμης έκθεσης δεν είναι εύχρηστοι για το συγκεκριμένο πρωτόκολλο). Ένα διάγραμμα ροής στο προσάρτημα 1 επεξηγεί το πρωτόκολλο αυτό. Έχει αποδειχθεί με ανάλυση προσομοίωσης ότι τόσο από το παραδοσιακό πρωτόκολλο, όσο και από πρωτόκολλο C × t μπορούν να προκύψουν ανθεκτικές τιμές LC_{50}, αλλά το πρωτόκολλο C × t γενικά υπερέχει στην παροχή ανθεκτικών τιμών LC_{01} και LC_{10} (15).

34. Έχει καταδειχθεί με ανάλυση προσομοίωσης ότι η χρήση δύο ζώων ανά διάστημα C × t (ένα ζώο ανά φύλο, εάν χρησιμοποιούνται και τα δύο φύλα, ή δύο ζώα του πλέον ευαίσθητου φύλου) γενικά επαρκεί κατά τον έλεγχο 4 συγκεντρώσεων και 5 περιόδων έκθεσης σε μια κυρίως μελέτη. Υπό ορισμένες συνθήκες, ο διευθυντής της μελέτης μπορεί να επιλέξει να χρησιμοποιήσει δύο επίμυες ανά φύλο ανά διάστημα C × t (15). Με τη χρήση 2 ζώων ανά φύλο ανά συγκέντρωση και χρονικό σημείο είναι δυνατόν να μειωθεί το συστηματικό σφάλμα και η μεταβλητότητα των εκτιμήσεων, να αυξηθεί το ποσοστό επιτυχίας της εκτίμησης και να βελτιωθεί η κάλυψη του διαστήματος εμπιστοσύνης. Ωστόσο, σε περίπτωση ανεπαρκούς προσαρμογής στα δεδομένα για την εκτίμηση (κατά τη χρήση ενός ζώου ανά φύλο ή δύο ζώων του πλέον ευαίσθητου φύλου), ενδέχεται να επαρκεί επίσης μια 5η συγκέντρωση έκθεσης. Περαιτέρω καθοδήγηση για τον αριθμό ζώων και συγκεντρώσεων που πρέπει να χρησιμοποιούνται στις μελέτες C × t παρέχεται στο έγγραφο GD 39 (2).

▼M4

Αναγνωριστική μελέτη: πρωτόκολλο C × t

35. Αναγνωριστική μελέτη χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της ισχύος της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και την υποβοήθηση της επιλογής επιπέδων συγκέντρωσης έκθεσης για την κυρίως μελέτη. Ενδέχεται να απαιτείται αναγνωριστική μελέτη με τη χρήση τριών το πολύ ζώων/φύλο/συγκέντρωση [για λεπτομέρειες, βλέπε προσάρτημα III του εγγράφου GD 39 (2)] για την επιλογή κατάλληλης αρχικής συγκέντρωσης της κυρίως μελέτης και την ελαχιστοποίηση του αριθμού των χρησιμοποιούμενων ζώων. Μπορεί να είναι απαραίτητη η χρήση τριών ζώων ανά φύλο για την τεκμηρίωση της ύπαρξης διαφοράς μεταξύ των φύλων. Τα ζώα αυτά θα πρέπει να εκτίθενται για ένα μόνο χρονικό διάστημα, συνήθως 240 λεπτών. Θα πρέπει να εκτιμάται η εφικτότητα της δημιουργίας κατάλληλων πειραματικών ατμοσφαιρών, με τεχνικές προκαταρκτικές δοκιμές χωρίς χρήση ζώων. Γενικά, δεν απαιτείται αναγνωριστική μελέτη, εάν υπάρχουν δεδομένα θνησιμότητας από μελέτη του κεφαλαίου B.52 (4). Κατά την επιλογή της αρχικής συγκέντρωσης στόχου σε μελέτη του κεφαλαίου B.2, ο διευθυντής της μελέτης θα πρέπει να εξετάζει τα πρότυπα θνησιμότητας που έχουν παρατηρηθεί σε τυχόν διαθέσιμες μελέτες του κεφαλαίου B.52 (4) και για τα δύο φύλα και για το σύνολο των συγκεντρώσεων [βλέπε GD 39 (2)].

Αρχική συγκέντρωση: πρωτόκολλο C × t

36. Η αρχική συγκέντρωση (συνεδρία έκθεσης I) (προσάρτημα 1) θα είναι είτε μια οριακή συγκέντρωση ή μια συγκέντρωση επιλεγμένη από τον διευθυντή της μελέτης βάσει της αναγνωριστικής μελέτης. Ομάδες 1 ζώου/φύλο εκτίθενται στη συγκέντρωση αυτή για διάφορα χρονικά διαστήματα (π.χ. 15, 30, 60, 120 ή 240 λεπτά), έως ότου υποβληθούν σε δοκιμή 10 ζώα συνολικά (συνεδρία έκθεσης I) (προσάρτημα 1).

37. Η επιλογή οριακών συγκεντρώσεων εξαρτάται συνήθως από τις κανονιστικές απαιτήσεις. Όταν εφαρμόζεται ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008, οι οριακές συγκεντρώσεις για αέρια, ατμούς και αερολύματα είναι 20 000 ppm, 20 mg/l και 5 mg/l, αντιστοίχως (ή η μέγιστη εφικτή συγκέντρωση) (3). Ενδέχεται να είναι τεχνικά δύσκολο να παραχθούν οριακές συγκεντρώσεις ορισμένων ελεγχόμενων χημικών ουσιών, ιδίως ατμών και αερολυμάτων. Κατά τη διεξαγωγή δοκιμών με αερολύματα, στόχος θα πρέπει να είναι η επίτευξη εισπνεύσιμου μεγέθους σωματιδίων (MMAD 1-4 μm) σε οριακή συγκέντρωση 2 mg/l. Αυτό είναι εφικτό με τις περισσότερες ελεγχόμενες χημικές ουσίες. Ο έλεγχος αερολυμάτων σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 2 mg/l θα πρέπει να επιχειρείται μόνο εάν μπορεί να επιτευχθεί εισπνεύσιμο μέγεθος σωματιδίων [βλέπε GD 39 (2)]. Ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 αποθαρρύνει τη διεξαγωγή δοκιμών πάνω από μια οριακή συγκέντρωση για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων (3). Το ενδεχόμενο διεξαγωγής δοκιμών σε συγκεντρώσεις άνω της οριακής συγκέντρωσης θα πρέπει να εξετάζεται μόνο εφόσον είναι πολύ πιθανόν τα αποτελέσματα μιας τέτοιας δοκιμής να έχουν άμεση συνάφεια με την προστασία της ανθρώπινης υγείας (3) και πρέπει να παρέχεται σχετική αιτιολόγηση στην έκθεση της μελέτης. Στην περίπτωση των δυνητικώς εκρήξιμων ελεγχόμενων ουσιών, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγονται οι συνθήκες που ευνοούν εκρήξεις. Για να αποφεύγεται η περιττή χρήση ζώων, θα πρέπει να διεξάγεται δοκιμαστική διαδικασία χωρίς ζώα, πριν από τη δοκιμή με την αρχική συγκέντρωση, ώστε να εξασφαλίζεται η δυνατότητα επίτευξης των απαραιτήτων συνθηκών θαλάμου για τη συγκέντρωση αυτή.

38. Εάν παρατηρούνται θνησιμότητα ή ετοιμοθάνατα ζώα στην αρχική συγκέντρωση, τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με τη συγκέντρωση αυτή μπορούν να χρησιμεύσουν ως αφετηρία για περαιτέρω δοκιμές με άλλες συγκεντρώσεις (βλέπε κυρίως μελέτη). Όταν οι φυσικές ή χημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας καθιστούν αδύνατη την επίτευξη οριακής συγκέντρωσης, θα πρέπει να πραγματοποιείται δοκιμή με τη μέγιστη εφικτή συγκέντρωση. Εάν παρατηρηθεί θνησιμότητα κάτω του 50 % με τη μέγιστη εφικτή συγκέντρωση, δεν είναι απαραίτητη η διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών. Εάν δεν είναι δυνατόν να επιτευχθεί η οριακή συγκέντρωση, η έκθεση της μελέτης θα πρέπει να περιλαμβάνει εξηγήσεις και υποστηρικτικά δεδομένα. Εάν η μέγιστη εφικτή συγκέντρωση ενός ατμού δεν προκαλεί την εκδήλωση τοξικότητας, ενδέχεται να είναι απαραίτητο να παραχθεί η ελεγχόμενη ουσία ως υγρό αερόλυμα.

▼M4

Κυρίως μελέτη: πρωτόκολλο C × t

39. Η αρχική συγκέντρωση (συνεδρία έκθεσης I) (προσάρτημα 1) που ελέγχεται στην κυρίως μελέτη θα είναι είτε οριακή συγκέντρωση είτε συγκέντρωση επιλεγμένη από το διευθυντή της μελέτης βάσει της αναγνωριστικής μελέτης. Εάν έχει παρατηρηθεί θνησιμότητα κατά τη διάρκεια της συνεδρίας έκθεσης I ή έπειτα από αυτήν, η ελάχιστη έκθεση C × t που οδηγεί σε θνησιμότητα θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως οδηγός για τον καθορισμό της συγκέντρωσης και των περιόδων έκθεσης για τη συνεδρία έκθεσης II. Κάθε επόμενη συνεδρία έκθεσης θα εξαρτάται από την προηγούμενη (βλέπε προσάρτημα 1).

40. Για πολλές ελεγχόμενες χημικές ουσίες, τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με την αρχική συγκέντρωση, σε συνδυασμό με τρεις πρόσθετες συνεδρίες έκθεσης με μικρότερη χρονική κάναβο (δηλαδή γεωμετρική απόσταση των περιόδων έκθεσης, όπως δηλώνεται από τον συντελεστή μεταξύ διαδοχικών περιόδων, συνήθως √2), επαρκούν για τον προσδιορισμό της σχέσης θνησιμότητας C × t (15), αλλά ενδέχεται να προκύπτουν πλεονεκτήματα από τη χρήση μιας 5ης συγκέντρωσης έκθεσης [βλέπε προσάρτημα 1 και GD 39 (2)]. Για τη μαθηματική επεξεργασία των αποτελεσμάτων στην περίπτωση του πρωτοκόλλου C × t, βλέπε προσάρτημα 1.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

41. Τα ζώα θα πρέπει να υποβάλλονται συχνά σε κλινική παρατήρηση κατά τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης. Έπειτα από την έκθεση, τα ζώα υποβάλλονται σε κλινική παρατήρηση τουλάχιστον δύο φορές την ημέρα της έκθεσης ή συχνότερα, εάν είναι αναγκαίο, ανάλογα με την αντίδραση των ζώων στην αγωγή, και στη συνέχεια, τουλάχιστον μια φορά ημερησίως για 14 ημέρες συνολικά. Η διάρκεια της περιόδου παρατήρησης δεν είναι σταθερή, αλλά θα πρέπει να καθορίζεται βάσει της φύσης και του χρόνου εμφάνισης κλινικών συμπτωμάτων, καθώς και της διάρκειας της περιόδου ανάρρωσης. Ο χρόνος εμφάνισης και εξαφάνισης των τοξικών εκδηλώσεων είναι σημαντικός, ιδίως εάν παρατηρείται τάση καθυστερημένης εμφάνισης τοξικών εκδηλώσεων. Όλες οι παρατηρήσεις καταγράφονται συστηματικά και χωριστά για κάθε ζώο. Ζώα ετοιμοθάνατα ή που παρουσιάζουν έντονο πόνο και/ή επίμονη σοβαρή δυσφορία πρέπει να θανατώνονται με ευθανασία για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων. Κατά την εξέταση για κλινικά σημεία τοξικότητας πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα, ώστε αρχική κακή όψη και οι παροδικές αλλαγές στην αναπνοή, που οφείλονται στη διαδικασία της έκθεσης, να μην εκλαμβάνονται εσφαλμένα ως τοξικότητα συνδεόμενη με την ελεγχόμενη χημική ουσία, η οποία θα επέβαλλε πρόωρη θανάτωση των ζώων. Θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι αρχές και τα κριτήρια που συνοψίζονται στο έγγραφο καθοδήγησης για τα λιγότερο βάναυσα καταληκτικά σημεία (GD 19) (7). Ο χρόνος θανάτου των ζώων που θανατώνονται προκειμένου να μην ταλαιπωρηθούν ή βρίσκονται νεκρά θα πρέπει να καταγράφεται με τη μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια.

42. Οι παρατηρήσεις στον κλωβό θα πρέπει να περιλαμβάνουν τις αλλαγές στο δέρμα και το τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους, καθώς και στο αναπνευστικό, το κυκλοφοριακό, το αυτόνομο και το κεντρικό νευρικό σύστημα, στη σωματοκινητική δραστηριότητα και στον τρόπο συμπεριφοράς. Όταν είναι δυνατό, θα πρέπει να σημειώνεται τυχόν διαφοροποίηση μεταξύ τοπικών και συστημικών επιδράσεων. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίδεται στην παρατήρηση τρόμου, σπασμών, σιελόρροιας, διάρροιας, λήθαργου, ύπνου και κώματος. Η μέτρηση της θερμοκρασίας του ορθού μπορεί να παρέχει υποστηρικτικά αποδεικτικά στοιχεία αντανακλαστικής βραδύπνοιας ή υποθερμίας/υπερθερμίας που σχετίζεται με την αγωγή ή τη στέρηση της ελευθερίας.

Βάρος σώματος

43. Το βάρος του κάθε ζώου θα πρέπει να καταγράφεται μία φορά κατά τη διάρκεια της περιόδου εγκλιματισμού, την ημέρα της έκθεσης πριν από την έκθεση (ημέρα 0) και τουλάχιστον την 1η, την 3η και την 7η ημέρα (και, στη συνέχεια, εβδομαδιαίως), καθώς και κατά τον χρόνο θανάτου ή ευθανασίας, εάν επέρχεται μετά την 1η ημέρα. Το σωματικό βάρος θεωρείται κρίσιμος δείκτης τοξικότητας και, συνεπώς, τα ζώα που εμφανίζουν σταθερή μείωσή του κατά ≥ 20 % σε σύγκριση με τις τιμές πριν από τη μελέτη θα πρέπει να παρακολουθούνται στενά. Τα επιζώντα ζώα ζυγίζονται και θανατώνονται με ευθανασία στο τέλος της περιόδου μετά την έκθεση.

▼M4

Παθολογική ανατομική

44. Όλα τα πειραματόζωα, συμπεριλαμβανομένων όσων πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμής ή θανατώνονται με ευθανασία και αποσύρονται από τη μελέτη για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων, υποβάλλονται σε νεκροψία. Εάν δεν μπορεί να διενεργηθεί νεκροψία αμέσως μετά την ανακάλυψη κάποιου νεκρού ζώου, το ζώο θα πρέπει να ψύχεται (όχι να καταψύχεται) σε θερμοκρασίες αρκετά χαμηλές ώστε να ελαχιστοποιείται η αυτόλυση. Η νεκροψία θα πρέπει να διενεργείται όσο το δυνατόν συντομότερα, κατά κανόνα εντός μιας ή δύο ημερών. Όλες οι μακροσκοπικές παθολογικές αλλοιώσεις θα πρέπει να καταγράφονται για κάθε ζώο, με ιδιαίτερη προσοχή σε τυχόν αλλοιώσεις της αναπνευστικής οδού.

45. Επιπλέον εξετάσεις, που πρέπει να συμπεριλαμβάνονται εκ των προτέρων στον σχεδιασμό, μπορούν να διευρύνουν την ερμηνευτική αξία της μελέτης, όπως μέτρηση του βάρους των πνευμόνων των επιζώντων επιμύων και/ή παροχή αποδεικτικών στοιχείων ερεθισμού μέσω μικροσκοπικής εξέτασης της αναπνευστικής οδού. Μεταξύ των εξεταζόμενων οργάνων μπορούν επίσης να περιλαμβάνονται αυτά που εμφανίζουν μακροσκοπικές παθολογικές αλλοιώσεις στα ζώα που επιζούν 24 ή περισσότερες ώρες και τα όργανα που είναι γνωστό ή αναμένεται ότι θα προσβληθούν. Ενδέχεται να προκύπτουν χρήσιμα στοιχεία από τη μικροσκοπική εξέταση ολόκληρης της αναπνευστικής οδού για τις ελεγχόμενες χημικές ουσίες που αντιδρούν με το νερό, όπως οξέα και υγροσκοπικές χημικές ουσίες.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Δεδομένα

46. Θα πρέπει να παρέχονται ατομικά στοιχεία για το βάρος των ζώων και τα ευρήματα της νεκροψίας. Τα δεδομένα κλινικής παρατήρησης πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα ο οποίος περιλαμβάνει, για κάθε ομάδα δοκιμής, τον αριθμό των χρησιμοποιηθέντων ζώων, τον αριθμό των ζώων που εμφάνισαν συγκεκριμένες τοξικές εκδηλώσεις, τον αριθμό των ζώων που βρέθηκαν νεκρά κατά τη διάρκεια της δοκιμής ή θανατώθηκαν για να μην ταλαιπωρηθούν, τον χρόνο θανάτου κάθε ζώου, περιγραφή και χρονική εξέλιξη των τοξικών επιδράσεων, αναστρεψιμότητα και ευρήματα της νεκροψίας.

Έκθεση δοκιμής

47. Η έκθεση της δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία, κατά περίπτωση:

Πειραματόζωα και ζωοτεχνία

— περιγραφή των συνθηκών στέγασης σε κλωβούς, συμπεριλαμβανομένων των εξής: αριθμός (ή μεταβολή στον αριθμό) ζώων ανά κλωβό, στρωμνή, θερμοκρασία και σχετική υγρασία του περιβάλλοντος, φωτοπερίοδος και προσδιορισμός του σιτηρεσίου,

— είδος/φυλή που χρησιμοποιήθηκε και αιτιολόγηση της χρήσης άλλου είδους πέραν του επίμυ,

— αριθμό, ηλικία και φύλο των ζώων,

— μέθοδο τυχαιοποίησης,

— λεπτομερή στοιχεία για την ποιότητα της τροφής και του νερού (συμπεριλαμβανομένων του είδους και της πηγής του σιτηρεσίου και της πηγής του νερού),

— περιγραφή τυχόν προετοιμασίας πριν από τη δοκιμή, συμπεριλαμβανομένων του σιτηρεσίου, της περιόδου υγειονομικής απομόνωσης και της αγωγής για ασθένειες.

▼**M4**

Ελεγχόμενη χημική ουσία

— φυσική κατάσταση, καθαρότητα και, κατά περίπτωση, φυσικές και χημικές ιδιότητες (συμπεριλαμβανομένης της ισομερείωσης),

— στοιχεία ταυτότητας και αριθμός μητρώου Chemical Abstract Services (CAS), εάν είναι γνωστός.

Φορέας

— αιτιολόγηση της χρήσης φορέα και της επιλογής του φορέα (εάν δεν είναι το νερό),

— προϋπάρχοντα ή παράλληλα δεδομένα που καταδεικνύουν ότι ο φορέας δεν επηρεάζει το αποτέλεσμα της μελέτης.

Θάλαμος εισπνοής

— περιγραφή του θαλάμου εισπνοής, συμπεριλαμβανομένων των διαστάσεων και του όγκου,

— πηγή και περιγραφή του εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκε για την έκθεση των ζώων, καθώς και για τη δημιουργία της ατμόσφαιρας,

— εξοπλισμός για τη μέτρηση της θερμοκρασίας, της υγρασίας, του μεγέθους σωματιδίων και της πραγματικής συγκέντρωσης,

— πηγή αέρα και επεξεργασία του παρεχόμενου/απαγόμενου αέρα και σύστημα κλιματισμού που χρησιμοποιήθηκε,

— μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τη βαθμονόμηση του εξοπλισμού ώστε να εξασφαλίζεται ομοιογενής πειραματική ατμόσφαιρα,

— διαφορά πίεσης (θετική ή αρνητική),

— θύρες έκθεσης ανά θάλαμο (ρινική έκθεση)· θέση των ζώων στο σύστημα (ολόσωμη έκθεση),

— χρονική ομοιογένεια/σταθερότητα της πειραματικής ατμόσφαιρας,

— θέση των αισθητήρων θερμοκρασίας και υγρασίας και δειγματοληψία της πειραματικής ατμόσφαιρας στον θάλαμο,

— ταχύτητες ροής αέρα, ταχύτητα ροής αέρα/θύρα έκθεσης (ρινική έκθεση) ή φορτίο ζώων/θάλαμο (ολόσωμη έκθεση),

— πληροφορίες για τον εξοπλισμό που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση του οξυγόνου και του διοξειδίου του άνθρακα, κατά περίπτωση,

— χρόνος που απαιτήθηκε για την επίτευξη ισορροπίας στον θάλαμο εισπνοής (t_{95}),

— αριθμός αλλαγών όγκου ανά ώρα,

— συσκευές μέτρησης (κατά περίπτωση).

Δεδομένα έκθεσης

— αιτιολόγηση της επιλογής της συγκέντρωσης στόχου στην κυρίως μελέτη,

— ονομαστικές συγκεντρώσεις (συνολική μάζα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που παράγεται μέσα στον θάλαμο εισπνοής διά του όγκου αέρα που διαβιβάζεται μέσω του θαλάμου),

— πραγματικές συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που ελήφθησαν από τη ζώνη αναπνοής των ζώων· για μείγματα που παράγουν ετερογενείς φυσικές μορφές (αέρια, ατμούς, αερολύματα), καθεμιά μπορεί να αναλύεται χωριστά,

▼**M4**

— όλες οι ατμοσφαιρικές συγκεντρώσεις θα πρέπει να αναφέρονται σε μονάδες μάζας (π.χ. mg/l, mg/m^3 κ.λπ.)· μπορούν επίσης να αναφέρονται παρενθετικά μονάδες όγκου (π.χ. ppm, ppb κ.λπ.),

— κατανομή μεγέθους σωματιδίων, διάμεσος αεροδυναμικής διαμέτρου κατά μάζα (MMAD) και γεωμετρική τυπική απόκλιση (σg), συμπεριλαμβανομένων των μεθόδων υπολογισμού τους. Θα πρέπει να αναφέρονται οι επιμέρους αναλύσεις μεγέθους σωματιδίων.

Συνθήκες δοκιμής

— λεπτομερή στοιχεία για το παρασκεύασμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, συμπεριλαμβανομένων λεπτομερειών σχετικά με τις διαδικασίες που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν για τη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων στερεών υλικών ή για την παρασκευή διαλυμάτων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Στις περιπτώσεις που μηχανικές διεργασίες ενδέχεται να έχουν αλλοιώσει τη σύνθεση μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας, πρέπει να περιλαμβάνονται τα αποτελέσματα των αναλύσεων για την επαλήθευση της σύνθεσης της ελεγχόμενης ουσίας,

— περιγραφή (κατά προτίμηση συνοδευόμενη από διάγραμμα) του εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία της πειραματικής ατμόσφαιρας και την έκθεση των ζώων σε αυτήν,

— λεπτομερή στοιχεία για τη χημική αναλυτική μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε και την επικύρωση της μεθόδου (συμπεριλαμβανομένης της απόδοσης ανάκτησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας από το μέσο δειγματοληψίας),

— αιτιολόγηση της επιλογής των συγκεντρώσεων δοκιμής.

Αποτελέσματα

— πίνακας με τη θερμοκρασία, την υγρασία και τη ροή αέρα στον θάλαμο,

— πίνακας με τα δεδομένα ονομαστικών και πραγματικών συγκεντρώσεων στον θάλαμο,

— πίνακας με τα δεδομένα μεγέθους σωματιδίων, συμπεριλαμβανομένων δεδομένων για τη συλλογή του δείγματος ανάλυσης, της κατανομής μεγέθους σωματιδίων και των υπολογισμών της MMAD και της σ_g,

— πίνακας με τα δεδομένα απόκρισης και το επίπεδο συγκέντρωσης για κάθε ζώο (δηλαδή ζώα που παρουσίασαν εκδηλώσεις τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένων της θνησιμότητας, καθώς και της φύσης, της σοβαρότητας, του χρόνου εμφάνισης και της διάρκειας των επιδράσεων),

— για κάθε ζώο, το βάρος που μετρήθηκε κατά τη μελέτη· ημερομηνία και χρόνος θανάτου, εάν επήλθε πριν από την προγραμματισμένη ευθανασία, χρόνος εμφάνισης και χρονική εξέλιξη των εκδηλώσεων τοξικότητας και το κατά πόσον αυτές ήταν αναστρέψιμες, για κάθε ζώο,

— ευρήματα νεκροψίας και ιστοπαθολογικά ευρήματα για καθένα από τα ζώα, εφόσον διατίθενται,

— εκτιμήσεις θνησιμότητας (π.χ. LC_{50}, LD_{01}), συμπεριλαμβανομένων των ορίων εμπιστοσύνης 95 % και της κλίσης (αν παρέχεται από τη μέθοδο αξιολόγησης),

— στατιστική σχέση, συμπεριλαμβανομένης εκτίμησης για τον εκθέτη n (πρωτόκολλο C × t). Θα πρέπει να αναφέρεται το όνομα του λογισμικού στατιστικής ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκε.

▼**M4**

Συζήτηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

— ιδιαίτερη έμφαση θα πρέπει να δίδεται στην περιγραφή των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπλήρωση των κριτηρίων της παρούσας μεθόδου δοκιμών, π.χ. της οριακής συγκέντρωσης ή του μεγέθους σωματιδίων,

— θα πρέπει να καλύπτεται το ζήτημα της εισπνευσιμότητας των σωματιδίων βάσει των συνολικών ευρημάτων, ιδίως εάν τα σχετικά με το μέγεθος των σωματιδίων κριτήρια δεν ήταν δυνατό να εκπληρωθούν,

— θα πρέπει να παρέχονται εξηγήσεις σε περίπτωση που χρειάστηκε να θανατωθούν με ευθανασία ζώα τα οποία εμφάνιζαν πόνο ή έντονη και διαρκή δυσφορία, βάσει των κριτηρίων του εγγράφου καθοδήγησης του ΟΟΣΑ για τα λιγότερο βάναυσα καταληκτικά σημεία (8),

— εάν διακόπηκε η διεξαγωγή δοκιμών βάσει του κεφαλαίου Β.52 του παρόντος παραρτήματος (4) και προτιμήθηκε η παρούσα μέθοδος δοκιμών Β.2, πρέπει να αναφέρεται σχετική αιτιολόγηση,

— η συνολική αξιολόγηση της μελέτης πρέπει να περιλαμβάνει τη συνέπεια των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των ονομαστικών και πραγματικών συγκεντρώσεων και τη σχέση της πραγματικής προς την ονομαστική συγκέντρωση,

— θα πρέπει να αναφέρεται η πιθανή αιτία θανάτου και ο επικρατέστερος τρόπος δράσης (συστημική δράση έναντι τοπικής).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) OECD (2009), Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403, OECD, Paris. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(2) OECD (2009), Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(3) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων, την τροποποίηση και την κατάργηση των οδηγιών 67/548/ΕΟΚ και 1999/45/ΕΚ και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 (ΕΕ L 353 της 31.12.2008, σ. 1).

(4) Κεφάλαιο Β.52 του παρόντος παραρτήματος: Οξεία αναπνευστική τοξικότητα — Μέθοδος των κλάσεων οξείας τοξικότητας (ΑΤC).

(5) Κεφάλαιο Β.40 του παρόντος παραρτήματος: Διάβρωση του δέρματος in vitro: δοκιμή διαδερμικής ηλεκτρικής αντίστασης (TER).

(6) Κεφάλαιο Β.40α του παρόντος παραρτήματος: Διάβρωση του δέρματος in vitro: δοκιμή σε μοντέλο ανθρώπινου δέρματος.

(7) OECD (2005), In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion, OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(8) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, OECD, Paris. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(9) SOT (1992), Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT), Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests, *Fund. Appl. Toxicol.* 18: 321-327.

(10) Phalen R.F. (2009), Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

▼**M4**

(11) Pauluhn J. και Thiel A. (2007), A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers, *J. Appl. Toxicol.* 27: 160-167.

(12) Zwart J.H.E., Arts J.M., ten Berge W.F., Appelman L.M. (1992), Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing, *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 15: 278-290.

(13) Zwart J.H.E., Arts J.M., Klokman-Houweling E.D., Schoen E.D. (1990), Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values, *Inhal. Toxicol.* 2: 105-117.

(14) Ten Berge W.F. και Zwart A. (1989), More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing, *J. Haz. Mat.* 21: 65-71.

(15) OECD (2009), Performance Assessment: Comparison of 403 and C × t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 104, OECD, Paris. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(16) Finney D.J. (1977), Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

ΟΡΙΣΜΟΣ

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

▼M4

Προσάρτημα 1

Πρωτόκολλο C × t

1. Η κλιμακωτή μελέτη «Συγκέντρωση × Χρόνος» (C × t) μπορεί να εξετάζεται ως εναλλακτική λύση του παραδοσιακού πρωτοκόλλου για την αξιολόγηση της αναπνευστικής τοξικότητας (12) (13) (14). Θα πρέπει, κατά προτίμηση, να διεξάγεται όταν υπάρχει συγκεκριμένη κανονιστική ή επιστημονική ανάγκη που υπαγορεύει την υποβολή ζώων σε δοκιμές για πολλαπλά χρονικά διαστήματα, όπως για τον σχεδιασμό της αντιμετώπισης έκτακτων καταστάσεων ή για χωροταξικό σχεδιασμό. Η προσέγγιση αυτή αρχίζει συνήθως με δοκιμή σε μια οριακή συγκέντρωση (συνεδρία έκθεσης I), κατά την οποία ζώα εκτίθενται στην ελεγχόμενη χημική ουσία για πέντε χρονικά διαστήματα (π.χ. 15, 30, 60, 120 και 240 λεπτά). Έτσι επιτυγχάνονται πολλαπλά χρονικά διαστήματα με μια συνεδρία έκθεσης (βλ Σχήμα 1). Όταν εφαρμόζεται ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008, οι οριακές συγκεντρώσεις για αέρια, ατμούς και αερολύματα είναι 20 000 ppm, 20 mg/l και 5 mg/l, αντιστοίχως. Υπέρβαση των επιπέδων αυτών επιτρέπεται μόνο εάν υπάρχει κανονιστική ή επιστημονική ανάγκη διεξαγωγής δοκιμών σε αυτά τα επίπεδα (βλέπε παράγραφο 37 του κυρίως κειμένου του κεφαλαίου B.2).

2. Στις περιπτώσεις που δεν υπάρχουν καθόλου ή υπάρχουν ελάχιστα στοιχεία για την τοξικότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, θα πρέπει να διεξάγεται αναγνωριστική μελέτη, κατά την οποία ομάδες που δεν υπερβαίνουν τα τρία ζώα ανά φύλο, εκτίθενται στις συγκεντρώσεις στόχου που έχουν επιλεγεί από τον διευθυντή της μελέτης, συνήθως για 240 λεπτά.

3. Εάν ελεγχθεί μια οριακή συγκέντρωση κατά τη συνεδρία έκθεσης I και παρατηρηθεί θνησιμότητα κατώτερη του 50 %, δεν απαιτείται επιπλέον δοκιμή. Εάν υπάρχει κανονιστική ή επιστημονική ανάγκη προσδιορισμού της σχέσης συγκέντρωσης-χρόνου-απόκρισης σε επίπεδα υψηλότερα της υποδεικνυόμενης οριακής συγκέντρωσης, η επόμενη έκθεση θα πρέπει να πραγματοποιείται σε υψηλότερο επίπεδο, π.χ. διπλάσιο της οριακής συγκέντρωσης (δηλαδή 2L στο σχήμα 1).

4. Εάν παρατηρηθεί τοξικότητα στην οριακή συγκέντρωση, είναι απαραίτητη η διεξαγωγή επιπλέον δοκιμής (κυρίως μελέτη). Αυτές οι επιπλέον εκθέσεις πραγματοποιούνται είτε σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις (στο σχήμα 1: συνεδρίες έκθεσης II, III ή IV) ή σε υψηλότερες συγκεντρώσεις με τη χρήση μικρότερων χρονικών περιόδων (στο σχήμα 1: συνεδρία έκθεσης IV), οι οποίες είναι προσαρμοσμένες και δεν απέχουν τόσο πολύ μεταξύ τους.

5. Η δοκιμή (αρχική συγκέντρωση και επιπρόσθετες συγκεντρώσεις) εκτελείται με 1 ζώο/φύλο ανά συγκέντρωση/χρονική στιγμή ή με 2 ζώα του πλέον ευαίσθητου φύλου ανά συγκέντρωση/χρονική στιγμή. Υπό ορισμένες συνθήκες, ο διευθυντής της μελέτης μπορεί να επιλέξει να χρησιμοποιήσει 2 επίμυες ανά φύλο ανά συγκέντρωση/χρονική στιγμή (ή 4 ζώα του ευαίσθητου φύλου ανά συγκέντρωση/χρονική στιγμή) (15). Με τη χρήση 2 ζώων ανά φύλο ανά συγκέντρωση/χρονική στιγμή μειώνονται, γενικά, το συστηματικό σφάλμα και η μεταβλητότητα των εκτιμήσεων, αυξάνεται το ποσοστό επιτυχίας της εκτίμησης και βελτιώνεται η κάλυψη του διαστήματος εμπιστοσύνης που αφορά το περιγραφόμενο πρωτόκολλο. Περισσότερες λεπτομέρειες παρέχονται στο έγγραφο GD 39 (2).

6. Σε ιδανικές συνθήκες, κάθε συνεδρία έκθεσης ολοκληρώνεται σε μία ημέρα. Με τον τρόπο αυτόν είναι δυνατή η καθυστέρηση της επόμενης έκθεσης έως ότου υπάρξει εύλογη πεποίθηση ότι τα ζώα θα επιβιώσουν, ενώ ο διευθυντής της μελέτης μπορεί να προσαρμόζει τη συγκέντρωση στόχου και τη χρονική διάρκεια για την επόμενη συνεδρία έκθεσης. Συνιστάται να αρχίζει κάθε συνεδρία έκθεσης με την ομάδα που θα εκτεθεί για το μεγαλύτερο διάστημα, π.χ. την ομάδα έκθεσης 240 λεπτών, ακολουθούμενη από την ομάδα έκθεσης 120 λεπτών κ.ο.κ. Εάν, παραδείγματος χάριν, τα ζώα της ομάδας των 240 λεπτών πεθάνουν μετά από 90 λεπτά ή παρουσιάσουν σοβαρές εκδηλώσεις τοξικότητας (π.χ. ακραίες αλλαγές στο αναπνευστικό πρότυπο, όπως η εργώδης αναπνοή), δεν έχει νόημα να εκτεθεί μια ομάδα για 120 λεπτά, διότι η θνησιμότητα θα είναι μάλλον 100 %. Συνεπώς, ο διευθυντής της μελέτης θα πρέπει να επιλέξει μικρότερες περιόδους έκθεσης για τη συγκέντρωση αυτή (π.χ. 90, 65, 45, 33 και 25 λεπτά).

▼**M4**

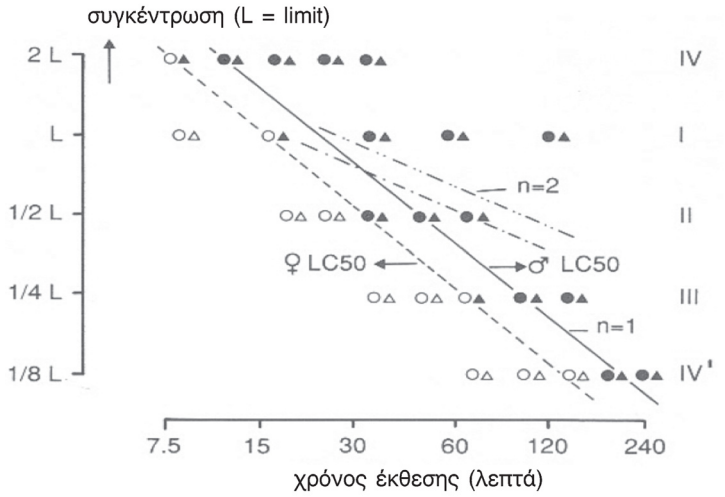
7. Η συγκέντρωση στον θάλαμο θα πρέπει να μετράται συχνά ώστε να προσδιορίζεται η σταθμισμένη ως προς τον χρόνο μέση συγκέντρωση για κάθε περίοδο έκθεσης. Όταν είναι δυνατό, θα πρέπει να χρησιμοποιείται στη στατιστική ανάλυση ο χρόνος θανάτου κάθε ζώου (αντί της περιόδου έκθεσης).

8. Θα πρέπει να εξετάζονται τα αποτελέσματα των πρώτων τεσσάρων συνεδριών έκθεσης, ώστε να προσδιορίζονται τυχόν κενά στα δεδομένα της καμπύλης συγκέντρωσης-χρόνου (βλέπε σχήμα 1). Σε περίπτωση ανεπαρκούς προσαρμογής της καμπύλης στα δεδομένα, μπορεί να πραγματοποιηθεί μια επιπρόσθετη έκθεση (5η συγκέντρωση). Η συγκέντρωση και τα χρονικά διαστήματα για την 5η έκθεση θα πρέπει να επιλέγονται κατά τρόπο ώστε να καλύπτουν τα κενά των δεδομένων.

9. Όλες οι συνεδρίες έκθεσης (συμπεριλαμβανομένης της πρώτης) χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της σχέσης συγκέντρωσης-χρόνου-απόκρισης μέσω στατιστικής ανάλυσης (16). Εάν είναι δυνατόν, για κάθε διάστημα C × t, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται η σταθμισμένη ως προς τον χρόνο μέση συγκέντρωση και η διάρκεια έκθεσης έως τον θάνατο (εάν επήλθε θάνατος κατά τη διάρκεια της έκθεσης).

Σχήμα 1

Υποθετική απεικόνιση μιας σχέσης συγκέντρωσης-χρόνου-θνησιμότητας σε επίμυες



Λευκά σύμβολα = επιζώντα ζώα· μαύρα σύμβολα = νεκρά ζώα

Τρίγωνα = θηλυκά· κύκλοι = αρσενικά

Συνεχής γραμμή = τιμές LC_{50} (εύρος 7,5-240 λεπτά) για αρσενικά ζώα με n = 1

Διακεκομμένη γραμμή = τιμές LC_{50} (εύρος 7,5-240 λεπτά) για θηλυκά ζώα με n = 1

Γραμμή με κουκίδες = υποθετικές τιμές LC_{50} για αρσενικά και θηλυκά ζώα, εάν n = 2 (12)

Γλωσσάριο

συγκέντρωση:

χρόνος έκθεσης:

▼M4

10. Ακολούθως παρατίθεται παράδειγμα της κλιμακωτής διαδικασίας:

Συνεδρία έκθεσης I— Δοκιμή στην οριακή συγκέντρωση (βλέπε σχήμα 1)

— 1 ζώο/φύλο ανά συγκέντρωση/χρονική στιγμή· 10 ζώα συνολικά ([α])

— Επιδιωκόμενη συγκέντρωση ([β]) = οριακή συγκέντρωση.

— Πέντε ομάδες ζώων εκτίθενται σε αυτή την επιδιωκόμενη συγκέντρωση για διαστήματα 15, 30, 60, 120 και 240 λεπτών, αντιστοίχως.

↓

Συνεδρία έκθεσης II ([γ])— Κυρίως μελέτη

— 1 ζώο/φύλο ανά συγκέντρωση/χρονική στιγμή· 10 ζώα συνολικά.

— Πέντε ομάδες ζώων εκτίθενται σε χαμηλότερη συγκέντρωση ([δ]) (1/2L) για ελαφρώς μεγαλύτερες περιόδους έκθεσης (που απέχουν μεταξύ τους κατά συντελεστή √2· βλέπε σχήμα 1).

↓

Συνεδρία έκθεσης III — Κυρίως μελέτη

— 1 ζώο/φύλο ανά συγκέντρωση/χρονική στιγμή· 10 ζώα συνολικά.

— Πέντε ομάδες ζώων εκτίθενται σε χαμηλότερη συγκέντρωση ([δ]) (1/4L) για ελαφρώς μεγαλύτερες περιόδους έκθεσης (που απέχουν μεταξύ τους κατά συντελεστή √2· βλέπε σχήμα 1).

↓

Συνεδρία έκθεσης IV' — Κυρίως μελέτη

— 1 ζώο/φύλο ανά συγκέντρωση/χρονική στιγμή· 10 ζώα συνολικά.

— Πέντε ομάδες ζώων εκτίθενται σε χαμηλότερη συγκέντρωση ([δ]) (1/8L) για ελαφρώς μεγαλύτερες περιόδους έκθεσης (που απέχουν μεταξύ τους κατά συντελεστή √2· βλέπε σχήμα 1).

↓ **ή**

([α]) Εάν δεν υπάρχουν πληροφορίες για ευαισθησία ανάλογα με το φύλο, χρησιμοποιούνται επίμυες και των δύο φύλων, ήτοι 1 ζώο/φύλο ανά συγκέντρωση. Βάσει των διαθέσιμων πληροφοριών ή εάν καταστεί προφανές κατά τη συγκεκριμένη συνεδρία έκθεσης ότι ένα φύλο παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία, χρησιμοποιούνται 10 ζώα του ευαίσθητου φύλου (2 ζώα ανά συγκέντρωση/χρονική στιγμή) σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης κατά τη διάρκεια των επόμενων δοκιμών.

([β]) Όταν εφαρμόζεται ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008, οι οριακές συγκεντρώσεις για αέρια, ατμούς και αερολύματα είναι 20 000 ppm, 20 mg/l και 5 mg/l, αντιστοίχως. Σε περίπτωση αναμενόμενης τοξικότητας ή βάσει των αποτελεσμάτων της αναγνωριστικής μελέτης, θα πρέπει να επιλέγονται χαμηλότερες αρχικές συγκεντρώσεις. Εάν υπάρχουν κανονιστικές ή επιστημονικές ανάγκες, μπορούν να χρησιμοποιούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις.

([γ]) Σε ιδανικές συνθήκες, η έκθεση των ζώων στο επόμενο επίπεδο συγκέντρωσης θα πρέπει να καθυστερεί έως ότου υπάρξει εύλογη πεποίθηση ότι τα ζώα που υποβλήθηκαν στην προηγούμενη δοκιμή θα επιβιώσουν. Με τον τρόπο αυτόν, ο διευθυντής της μελέτης μπορεί να προσαρμόζει ανάλογα τη συγκέντρωση στόχου και τις περιόδους έκθεσης για την επόμενη συνεδρία έκθεσης.

([δ]) Η ελάχιστη δόση (συγκέντρωση × χρόνος) που προκαλεί θνησιμότητα κατά τη διάρκεια της δοκιμής με την αρχική συγκέντρωση (πρώτη συνεδρία έκθεσης) χρησιμοποιείται ως οδηγός για τον προσδιορισμό του επόμενου συνδυασμού συγκέντρωσης και περιόδων έκθεσης. Κατά κανόνα, η συγκέντρωση θα υποδιπλασιάζεται (1/2L) και τα ζώα θα εκτίθενται σε ένα νέο εύρος χρόνου με λεπτότερη κάναβο, με γεωμετρική πρόοδο των περιόδων έκθεσης με λόγο 1,4 (√2· βλέπε παραπομπή 11) κοντά στο χρόνο που παρατηρήθηκε το ελάχιστο επίπεδο θανατηφόρας δόσης (χρόνος × συγκέντρωση) κατά την πρώτη έκθεση. Στο ανωτέρω σχήμα (σχήμα 1), παρατηρείται θνησιμότητα στη συνεδρία έκθεσης I για πρώτη φορά στα 15 λεπτά· επομένως, στη συνεδρία έκθεσης II οι περίοδοι ορίζονται με επίκεντρο τα 30 λεπτά και είναι 15, 21, 30, 42 και 60 λεπτά. Μετά τις δύο πρώτες εκθέσεις, συνιστάται ιδιαιτέρως να απεικονίζονται τα δεδομένα σε ένα σχήμα παρόμοιο με το ανωτέρω και να ελέγχεται αν η σχέση μεταξύ συγκέντρωσης και χρόνου σχηματίζει γωνία 45 μοιρών (n = 1) ή αν η σχέση συγκέντρωσης-χρόνου-απόκρισης παρουσιάζει μικρότερη (π.χ. n = 2) ή μεγαλύτερη (π.χ. n = 0,8) κλίση. Στις τελευταίες περιπτώσεις συνιστάται ιδιαιτέρως να προσαρμόζονται αναλόγως οι επόμενες συγκεντρώσεις και περίοδοι.

▼M4

Συνεδρία έκθεσης IV — Κυρίως μελέτη

— 1 ζώο/φύλο ανά συγκέντρωση/χρονική στιγμή· 10 ζώα συνολικά.

— Πέντε ομάδες ζώων εκτίθενται σε υψηλότερη συγκέντρωση ([ε]) (2L) για ελαφρώς μικρότερες περιόδους έκθεσης (που απέχουν μεταξύ τους κατά συντελεστή √2· βλέπε σχήμα 1).

Μαθηματική επεξεργασία των αποτελεσμάτων στην περίπτωση του πρωτοκόλλου C × t

11. Σε μια διαδικασία C × t με 4 ή 5 συγκεντρώσεις έκθεσης και πέντε περιόδους έκθεσης παράγονται 20 ή 25 σημεία δεδομένων, αντίστοιχα. Με αυτά τα σημεία δεδομένων μπορεί να υπολογιστεί η σχέση C × t μέσω στατιστικής ανάλυσης (16):

Εξίσωση 1:

$$Probit(P) = b_0 + b_1 ln\ C + b_2 ln\ t$$

όπου C = συγκέντρωση και t = διάρκεια έκθεσης ή

Εξίσωση 2:

$$Response = f(C^n t)$$

όπου $n = b_1/b_2$.

Από την 1η εξίσωση μπορεί να υπολογιστεί η τιμή LC_{50} για δεδομένη χρονική περίοδο (π.χ. 4 ώρες, 1 ώρα, 30 λεπτά ή οποιαδήποτε χρονική περίοδος εντός του εύρους των χρονικών περιόδων που χρησιμοποιήθηκαν στη δοκιμή) με τη χρήση P = 5 (απόκριση 50 %). Να σημειωθεί ότι ο κανόνας του Haber εφαρμόζεται μόνο όταν n = 1. Η τιμή LC_{01} μπορεί να υπολογιστεί με τη χρήση P = 2,67.

([ε]) Σε ορισμένες περιπτώσεις, ενδέχεται να είναι απαραίτητο να αυξηθεί η συγκέντρωση (2L) σε ένα νέο εύρος χρόνου, και πάλι με λεπτότερη κάναβο, με γεωμετρική πρόοδο των περιόδων έκθεσης με λόγο 1,4 (√2) κοντά στον χρόνο που παρατηρήθηκε το ελάχιστο επίπεδο θανατηφόρας δόσης κατά την πρώτη έκθεση. Η ελάχιστη διάρκεια έκθεσης θα πρέπει, κατά προτίμηση, να υπερβαίνει τα 5 λεπτά και η μέγιστη να μην υπερβαίνει τις 8 ώρες.

▼B

Β.3. ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ (ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ)

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Βλέπε Γενική Εισαγωγή Μέρος Β (Α).

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Βλέπε Γενική Εισαγωγή Μέρος Β (Β).

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Ουδεμία.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η εξεταζόμενη ουσία επιτίθεται στο δέρμα σε διαβαθμισμένες δόσεις σε διάφορες ομάδες πειραματόζωων, για κάθε δε ομάδα χρησιμοποιείται και μία δόση. Ακολούθως, γίνονται παρατηρήσεις των επιδράσεων και των θανάτων. Τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμής υποβάλλονται σε νεκροψία όπως επίσης υποβάλλονται σε νεκροψία και τα ζώα που επιζούν μετά το πέρας της δοκιμής.

Τα ζώα που εμφανίζουν έντονα και διαρκή συμπτώματα δυσφορίας και πόνου μπορεί αν χρειασθεί να θανατωθούν ανώδυνα. Δεν χρειάζεται να γίνεται χορήγηση της εξεταζόμενης ουσίας με τρόπο που είναι γνωστό ότι προκαλεί έντονο πόνο και αγωνία λόγω διαβρωτικών ή ερεθιστικών ιδιοτήτων.

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Ουδέν.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.6.1. **Προετοιμασίες**

Τα ζώα κρατούνται μέσα στους πειραματικούς κλωβούς τους, κάτω από τις πειραματικές συνθήκες εγκλωβισμού και διατροφής, για 5 τουλάχιστον ημέρες πριν από τη δοκιμασία. Πριν από τη δοκιμασία υγιή, νεαρά, ενήλικα ζώα ξεχωρίζονται τυχαία και κατανέμονται στις πειραματικές ομάδες. Περίπου 24 ώρες πριν από τη δοκιμασία, το τρίχωμα πρέπει να απομακρύνεται με τη βοήθεια ψαλιδιού ή ξυριστικής μηχανής, από την περιοχή της ράχης του κορμού των ζώων. Κατά το κούρεμα ή ξύρισμα του τριχώματος, προσοχή πρέπει να δίνεται ώστε να αποφεύγεται η απόξεση του δέρματος, πράγμα το οποίο μπορεί να μεταβάλει τη διαπερατότητά του. Η επιφάνεια της εφαρμογής δεν πρέπει να είναι μικρότερη από το 10 % της ολικής επιφάνειας του σώματος. Όταν δοκιμάζονται στερεά, τα οποία μπορούν να κονιοποιηθούν αν χρειάζεται, η ελεγχόμενη ουσία πρέπει να υγραίνεται αρκετά με νερό ή, όπου είναι ανάγκη, με έναν κατάλληλο φορέα για να εξασφαλίζεται καλή επαφή με το δέρμα. Όταν χρησιμοποιείται φορέας, η επίδρασή του στη δίοδο της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να λαμβάνεται υπόψη. Οι υγρές ουσίες χρησιμοποιούνται γενικά αδιάλυτες.

1.6.2. **Συνθήκες δοκιμής**

1.6.2.1. *Πειραματόζωα*

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο ενήλικας επίμυς ή το κουνέλι. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη, για τη χρησιμοποίησή τους όμως απαιτείται αιτιολόγηση. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οι συνήθεις εργαστηριακές φυλές. Για κάθε φύλο, το εύρος της διαφοράς βαρών των ζώων στην αρχή της δοκιμής δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το ±20 % της συνιστάμενης μέσης τιμής.

▼B

1.6.2.2. *Αριθμός και φύλο*

Για κάθε επίπεδο δόσεως χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 5 ζώα. Και τα πέντε πρέπει να είναι του ιδίου φύλου. Αν χρησιμοποιούνται θηλυκά, θα πρέπει να είναι άτοκα και να μην ευρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης. Όπου υπάρχουν πληροφορίες ότι ένα φύλο είναι πολύ περισσότερο ευαίσθητο, η χορήγηση της ουσίας θα πρέπει να γίνεται στα ζώα αυτού του φύλου.

Σημείωση: Σε δοκιμές οξείας τοξικότητας με ζώα υψηλότερης τάξης από την τάξη των τρωκτικών, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρησιμοποίησης μικρότερου αριθμού ζώων. Οι δόσεις θα πρέπει να επιλέγονται με προσοχή ενώ θα πρέπει να καταβάλλεται κάθε προσπάθεια ώστε να μη γίνεται υπέρβαση μετρίως τοξικών δόσεων. Στις δοκιμές αυτές, θα πρέπει να αποφεύγεται να χορηγούνται θανατηφόρες δόσεις της εξεταζόμενης ουσίας.

1.6.2.3. *Επίπεδα δόσεων*

Τα επίπεδα δόσεων θα πρέπει να είναι επαρκή ως προς τον αριθμό, τουλάχιστον τρία, και να απέχουν μεταξύ τους αρκετά ώστε να παρέχουν ομάδες πειραματισμού με εύρος τοξικών επιδράσεων και ποσοστών θνησιμότητας. Κατά τη λήψη αποφάσεων σχετικά με τα επίπεδα δόσεων, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κάθε ερεθιστική ή διαβρωτική επίδραση. Τα δεδομένα θα πρέπει να είναι αρκετά για τη χάραξη καμπύλης δόσεως/αποκρίσεως και, όπου είναι δυνατόν, να δίνουν τη δυνατότητα αποδεκτού προσδιορισμού της LD_{50}.

1.6.2.4. *Οριακή δοκιμή*

Σε ομάδα 5 αρσενικών και 5 θηλυκών ζώων, μπορεί να πραγματοποιηθεί οριακή δοκιμή σε επίπεδο μιας δόσης τουλάχιστον 2 000 mg/kg βάρους σώματος, χρησιμοποιώντας τις διαδικασίες που περιγράφονται ανωτέρω. Αν παρουσιασθεί θνησιμότητα σχετιζόμενη με την ουσία, μπορεί να χρειασθεί η πραγματοποίηση πλήρους μελέτης.

1.6.2.5. *Περίοδος παρατήρησης*

Η περίοδος παρατήρησης θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 14 ημέρες. Εντούτοις, η διάρκεια των παρατηρήσεων δεν πρέπει να είναι αυστηρά καθορισμένη. Μπορεί να καθορίζεται από τις τοξικές επιδράσεις, την τάξη εμφανίσεώς τους και τη διάρκεια της περιόδου αναρρώσεως μπορεί έτσι να επεκτείνεται όταν αυτό θεωρηθεί αναγκαίο. Ο χρόνος εμφανίσεως και εξαφανίσεως των τοξικών συμπτωμάτων, η διάρκειά τους και ο χρόνος θανάτου είναι σημαντικά, ιδιαίτερα αν υπάρχει τάση να αργοπορούν οι θάνατοι.

1.6.3. **Διαδικασία**

Τα ζώα θα πρέπει να εγκλωβίζονται κατ' άτομο. Η εξεταζόμενη ουσία θα πρέπει να επιτίθεται ομοιόμορφα σε μια περιοχή που να αντιστοιχεί στο 10 % περίπου του συνολικού εμβαδού της επιφάνειας του σώματος. Στην περίπτωση λίαν τοξικών ουσιών, το εμβαδόν της καλυπτόμενης επιφάνειας μπορεί να είναι μικρότερο, πάντως όμως θα πρέπει να καλύπτεται η μεγαλύτερη δυνατή επιφάνεια με ένα όσο το δυνατόν λεπτότερο και πιο ομοιόμορφο στρώμα.

Η ελεγχόμενη ουσία πρέπει να κρατείται σε επαφή με το δέρμα καθ' όλη τη διάρκεια της εκθέσεως των 24 ωρών, με τη βοήθεια ενός επιδέσμου από πορώδη γάζα και μια μη ερεθιστική ταινία. Η ελεγχόμενη περιοχή πρέπει, επιπλέον, να καλύπτεται με τον κατάλληλο τρόπο για να συγκρατείται ο επίδεσμος και η ελεγχόμενη ουσία και να εξασφαλίζεται έτσι η αδυναμία καταπόσεως της ουσίας από τα ζώα. Επιτρέπεται η χρήση συσκευών περιορισμού για να εμποδίζεται η κατάποση, αλλά δεν συνιστάται η μέθοδος της απόλυτης ακινησίας.

▼B

Στο τέλος της περιόδου εκθέσεως, πρέπει να απομακρύνεται το υπόλειμμα της ελεγχόμενης ουσίας, όταν αυτό είναι δυνατόν, με τη χρήση νερού ή με μια άλλη κατάλληλη μέθοδο καθαρισμού του δέρματος.

Οι παρατηρήσεις πρέπει να καταχωρούνται συστηματικά, όπως γίνονται. Πρέπει να διατηρούνται ατομικά αρχεία για κάθε ζώο. Οι παρατηρήσεις, κατά τη διάρκεια της πρώτης ημέρας, πρέπει να γίνονται συχνά. Τουλάχιστον μια φορά την ημέρα πρέπει να γίνεται μια προσεκτική κλινική εξέταση. Πρόσθετες παρατηρήσεις θα πρέπει να γίνονται καθημερινά και να λαμβάνονται τα απαραίτητα μέτρα ώστε να μειώνεται στο ελάχιστο η απώλεια των ζώων από τη μελέτη. Λ.χ. νεκροψία ή ψύξη εκείνων των ζώων που βρέθηκαν νεκρά και απομόνωση ή θανάτωση των αδύνατων και ετοιμοθάνατων ζώων.

Οι παρατηρήσεις θα πρέπει να περιλαμβάνουν αλλοιώσεις του τριχώματος, του εξεταζόμενου δέρματος, των οφθαλμών και των βλεννογόνων, όπως επίσης του αναπνευστικού, κυκλοφοριακού, αυτόνομου και κεντρικού νευρικού συστήματος, καθώς και αλλοιώσεις στη σωματοκινητική δραστηριότητα και του τρόπου συμπεριφοράς. Με ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να γίνονται οι παρατηρήσεις των τρόμων, σπασμών, σιελόρροιας, διάρροιας, λήθαργου, ύπνου και κώματος. Ο χρόνος θανάτου πρέπει να καταχωρείται όσο το δυνατόν ακριβέστερα. Τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, όπως και αυτά που επιζούν στη λήξη της, υπόκεινται σε νεκροψία. Όλες οι μακροσκοπικά παρατηρούμενες αλλοιώσεις πρέπει να καταχωρούνται. Όπου ενδείκνυται, οι ιστοί πρέπει να λαμβάνονται για ιστοπαθολογική εξέταση.

Εκτίμηση τοξικότητας στο άλλο φύλο

Αφού συμπληρωθεί η μελέτη σε ένα φύλο, η ουσία χορηγείται σε μία τουλάχιστον ομάδα 5 ζώων του άλλου φύλου για να επιβεβαιωθεί ότι τα ζώα αυτού του φύλου δεν είναι σε σημαντικό βαθμό πιο ευαίσθητα στην εξεταζόμενη ουσία. Σε συγκεκριμένες περιπτώσεις μπορεί να δικαιολογείται η χρήση λιγότερων ζώων. Όπου υπάρχουν σαφείς πληροφορίες ότι τα ζώα του εξεταζόμενου φύλου είναι σε σημαντικό βαθμό πιο ευαίσθητα, μπορεί να μη χρειασθεί η υποβολή σε δοκιμή ζώων του άλλου φύλου.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα, στον οποίο να φαίνεται, για κάθε πειραματική ομάδα, ο αριθμός των ζώων στην αρχή της δοκιμασίας, ο χρόνος θανάτου για κάθε ζώο, ο αριθμός των ζώων που εμφανίζουν άλλα συμπτώματα τοξικότητας, περιγραφή των τοξικών επιδράσεων και τα αποτελέσματα της νεκροψίας. Τα ατομικά βάρη των ζώων πρέπει να προσδιορίζονται και να καταχωρούνται, λίγο πριν την εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας ανά εβδομάδα μετά, και κατά το θάνατο. Αλλαγές στο βάρος θα πρέπει να υπολογίζονται και να καταγράφονται, εφόσον τα ζώα επιζούν περισσότερο από μία ημέρα. Τα ζώα που θανατώνονται ανώδυνα λόγω δυσφορίας και πόνου που οφείλεται στην ουσία, καταγράφονται ως θάνατοι που σχετίζονται με την ουσία. Η LD_{50} θα πρέπει να προσδιορίζεται με μια αναγνωρισμένη μέθοδο.

Η αξιολόγηση των δεδομένων πρέπει να περιλαμβάνει μια αξιολόγηση της σχέσης, αν αυτή υπάρχει, μεταξύ της έκθεσης των ζώων στην ελεγχόμενη ουσία και της συχνότητας και σοβαρότητας όλων των ανωμαλιών, όπου περιλαμβάνονται ανωμαλίες συμπεριφοράς, κλινικές ανωμαλίες, μακροσκοπικές αλλοιώσεις, αλλαγές του βάρους του σώματος, θνησιμότητα, και κάθε άλλη τοξικολογική επίδραση.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει, αν είναι δυνατόν, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

▼B

— είδος, φυλή, πηγή, περιβαλλοντικές συνθήκες, διατροφή, κλπ.

— συνθήκες δοκιμής (συμπεριλαμβανόμενης και της μεθόδου καθαρισμού του δέρματος και του τύπου της επίδεσης: προσροφητικής ή μη προσροφητικής)

— επίπεδα δόσεων (με φορέα, εφόσον χρησιμοποιήθηκε, και συγκεντρώσεις)

— φύλο των υποβληθέντων σε δοκιμή ζώων

— καταγραφή σε πίνακα των δεδομένων απόκρισης κατά φύλο και επίπεδο έκθεσης (δηλ., ο αριθμός ζώων που πέθαναν ή θανατώθηκαν κατά τη διάρκεια της δοκιμής, αριθμός ζώων που εμφάνισαν σημεία τοξικότητας, αριθμός εκτεθέντων ζώων)

— χρόνο θανάτου μετά από τη χορήγηση, λόγους και κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ανώδυνη θανάτωση ζώων

— όλες τις παρατηρήσεις

— τιμή LD_{50} για το φύλο που υποβλήθηκε σε πλήρη μελέτη, προσδιορισμένη μετά από 14 ημέρες με την καθορισμένη μέθοδο υπολογισμού

— όριο αξιοπιστίας 95 % για την LD_{50} (όπου είναι δυνατόν)

— καμπύλη δόσης/θνησιμότητας και κλίση (όπου το επιτρέπει η μέθοδος προσδιορισμού)

— ευρήματα νεκροψίας

— κάθε ιστοπαθολογικό εύρημα

— αποτελέσματα οποιασδήποτε δοκιμής στο άλλο φύλο

— συζήτηση των αποτελεσμάτων (ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δοθεί στην επίδραση που μπορεί να έχει στην υπολογιζόμενη τιμή LD_{50} η ανώδυνη θανάτωση των ζώων)

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ

Βλέπε Γενική Εισαγωγή Μέρος Β (Δ).

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Βλέπε Γενική Εισαγωγή Μέρος Β (Ε).

▼M8

Β.4. ΟΞΕΙΑΣ ΜΟΡΦΗΣ ΕΡΕΘΙΣΜΟΣ/ΔΙΑΒΡΩΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 404 του ΟΟΣΑ (2015). Οι κατευθυντήριες γραμμές του ΟΟΣΑ για τον έλεγχο των χημικών ουσιών επανεξετάζονται περιοδικά για να εξασφαλίζεται ότι αντανακλούν τις βέλτιστες διαθέσιμες επιστημονικές γνώσεις. Στο πλαίσιο της αναθεώρησης της TG 404 του ΟΟΣΑ, δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στις πιθανές βελτιώσεις σε σχέση με την καλή μεταχείριση των ζώων και την αξιολόγηση του συνόλου των υφιστάμενων πληροφοριών σχετικά με την υπό δοκιμή χημική ουσία προκειμένου να αποφεύγονται οι περιττές δοκιμές στα πειραματόζωα. Η επικαιροποιημένη έκδοση της TG 404 του ΟΟΣΑ (η οποία εγκρίθηκε το 1981 και αναθεωρήθηκε το 1992, το 2002 και το 2015) περιλαμβάνει αναφορά στο έγγραφο καθοδήγησης «Ολοκληρωμένες προσεγγίσεις για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση (IATA) για τον ερεθισμό/διάβρωση του δέρματος» (1), προτείνοντας μια προσέγγιση κατά ενότητες για τις δοκιμές ερεθισμού και διάβρωσης του δέρματος. Στην IATA περιγράφονται ορισμένες ενότητες για την ομαδοποίηση πηγών πληροφοριών και εργαλείων ανάλυσης, και i) παρέχεται καθοδήγηση σχετικά με τον τρόπο ενσωμάτωσης και χρήσης των υφιστάμενων δεδομένων δοκιμών και δεδομένων εκτός δοκιμών για την αξιολόγηση του δυναμικού των χημικών ουσιών για ερεθισμό και διάβρωση του δέρματος, και ii) προτείνεται μια προσέγγιση σε περίπτωση που απαιτείται η διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών (1). Επιπλέον, όπου απαιτείται, στη συγκεκριμένη κατευθυντήρια γραμμή συνιστάται η διαδοχική αντί της ταυτόχρονης εφαρμογής των τριών επιθεμάτων στο ζώο κατά την αρχική δοκιμή *in vivo*.

2. Στο προσάρτημα της παρούσας μεθόδου δοκιμών παρέχονται ορισμοί του ερεθισμού και της διάβρωσης του δέρματος.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

3. Για λόγους προαγωγής της αξιόπιστης επιστημονικής έρευνας και της καλής μεταχείρισης των ζώων, δεν θα πρέπει να διεξάγονται δοκιμές *in vivo* προτού αξιολογηθεί το σύνολο των διαθέσιμων δεδομένων που σχετίζονται με το δυναμικό δερματικής διαβρωτικότητας/ερεθισμού της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο πλαίσιο ανάλυσης βάρους της απόδειξης, όπως παρουσιάζεται στο έγγραφο καθοδήγησης «Ολοκληρωμένες προσεγγίσεις για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση για τη διάβρωση και τον ερεθισμό του δέρματος», δηλ. στα τρία μέρη της εν λόγω καθοδήγησης και στις αντίστοιχες ενότητες (1). Εν συντομία, στο μέρος 1 το θέμα των υπαρχόντων δεδομένων θίγεται σε επτά ενότητες που καλύπτουν τα δεδομένα για τον άνθρωπο, τα δεδομένα *in vivo*, τα δεδομένα *in vitro*, τα δεδομένα για τις φυσικοχημικές ιδιότητες (π.χ. το pH, ιδίως την ισχυρή οξύτητα ή αλκαλικότητα) και τις μεθόδους που δεν περιλαμβάνουν σε δοκιμές. Στο μέρος 2 διενεργείται ανάλυση βάρους της απόδειξης. Εάν η εν λόγω ανάλυση δεν καταλήξει σε οριστικά αποτελέσματα, πρέπει να εκτελείται το μέρος 3 με πρόσθετες δοκιμές, ξεκινώντας με τις μεθόδους *in vitro*, ενώ οι δοκιμές *in vivo* χρησιμοποιούνται ως έσχατη λύση. Ως εκ τούτου, η ανωτέρω ανάλυση αναμένεται να περιορίσει την ανάγκη διεξαγωγής δοκιμών *in vivo* για διαβρωτικότητα/ικανότητα ερεθισμού του δέρματος από υπό δοκιμή ουσίες για τις οποίες υπάρχουν ήδη επαρκή αποδεικτικά στοιχεία, προερχόμενα από άλλες μελέτες, όσον αφορά τις συγκεκριμένες δύο παραμέτρους.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ IN VIVO

4. Η υπό δοκιμή χημική ουσία εφαρμόζεται εφάπαξ στο δέρμα πειραματόζωου· μη εκτεθειμένες στη χημική ουσία περιοχές του δέρματος του πειραματόζωου χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες. Σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα, η έκταση του ερεθισμού / της διάβρωσης παρατηρείται, βαθμολογείται και περιγράφεται λεπτομερώς με σκοπό την πλήρη αξιολόγηση των επιδράσεων. Η διάρκεια της μελέτης θα πρέπει να είναι επαρκής για να εκτιμηθεί αν οι παρατηρούμενες επιδράσεις είναι αναστρέψιμες ή μη.

▼M8

5. Τα ζώα που εμφανίζουν διαρκή σημεία έντονης αγωνίας και/ή πόνου σε οποιοδήποτε στάδιο της δοκιμής θα πρέπει να θανατώνονται με ευθανασία, οπότε η υπό δοκιμή χημική ουσία αξιολογείται ανάλογα. Τα κριτήρια για τη λήψη απόφασης σχετικά με την ανώδυνη θανάτωση ετοιμοθάνατων ή βαρέως πασχόντων ζώων αποτελούν το αντικείμενο χωριστού εγγράφου καθοδήγησης (2).

ΠΡΟΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΓΙΑ ΤΗ ΔΟΚΙΜΗ IN VIVO

Επιλογή ζωικού είδους

6. Το προτιμώμενο πειραματόζωο είναι το αλφικό κουνέλι και χρησιμοποιούνται υγιή νεαρά ενήλικα κουνέλια. Η χρήση άλλων ειδών ζώων θα πρέπει να αιτιολογείται.

Προετοιμασία των ζώων

7. Ένα 24ωρο περίπου πριν από τη δοκιμή, πρέπει να αφαιρείται με κουρά το τρίχωμα από τη ραχιαία επιφάνεια του κορμού των ζώων. Η κουρά πρέπει να εκτελείται με προσοχή για να αποφεύγεται η απόξεση του δέρματος. Πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο ζώα με υγιές, ανέπαφο δέρμα.

8. Μερικές φυλές κουνελιών έχουν νησίδες πυκνού τριχώματος, που είναι πιο ανεπτυγμένες ορισμένες εποχές του έτους. Οι υπό δοκιμή ουσίες δεν θα πρέπει να εφαρμόζονται σε αυτές τις επιφάνειες πυκνού τριχώματος.

Συνθήκες στέγασης και σίτισης

9. Τα ζώα θα πρέπει να στεγάζονται χωριστά. Για τα κουνέλια, η θερμοκρασία του θαλάμου πειραματόζωων πρέπει να είναι 20 °C (± 3 °C). Αν και η σχετική υγρασία θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου, εν τούτοις θα πρέπει να επιδιώκεται μια τιμή 50-60 %. Ο φωτισμός θα πρέπει να είναι τεχνητός, με φωτοπερίοδο 12 ωρών. Για τη διατροφή των ζώων μπορούν να χρησιμοποιούνται τα συνήθη εργαστηριακά σιτηρέσια, με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

Εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας

10. Η υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να εφαρμόζεται σε μια μικρή επιφάνεια του δέρματος (περίπου 6 cm^2) και να καλύπτεται με ένα επίθεμα γάζας, το οποίο συγκρατείται στη θέση του με μη ερεθιστική ταινία. Σε περίπτωση όπου η απευθείας εφαρμογή δεν είναι εφικτή (π.χ. υγρά ή ορισμένες αλοιφές), θα πρέπει να τοποθετείται πρώτα η υπό δοκιμή χημική ουσία στη γάζα και κατόπιν το σύνολο στο δέρμα. Το επίθεμα θα πρέπει να διατηρείται χαλαρά σε επαφή με το δέρμα με τη βοήθεια κατάλληλου ημιπερατού επιδέσμου σε όλη τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης. Όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία τοποθετείται στο επίθεμα, το επίθεμα θα πρέπει να στερεώνεται στο δέρμα κατά τρόπον ώστε να εξασφαλίζεται καλή επαφή και ομοιόμορφη κατανομή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο δέρμα. Το ζώο θα πρέπει να μην μπορεί να φθάσει το επίθεμα, ώστε να μην υπάρχει κίνδυνος να καταπιεί/εισπνεύσει την υπό δοκιμή χημική ουσία.

11. Οι υγρές υπό δοκιμή χημικές ουσίες χρησιμοποιούνται συνήθως χωρίς αραίωση. Όταν ελέγχονται στερεές χημικές ουσίες (που μπορούν να λειοτριβούνται, εάν κρίνεται αναγκαίο), θα πρέπει να υγραίνονται με την ελάχιστη ποσότητα νερού (ή, εάν είναι απαραίτητο, άλλου κατάλληλου φορέα) που εξασφαλίζει καλή επαφή με το δέρμα. Εάν χρησιμοποιείται άλλος φορέας εκτός του νερού, η τυχόν επίδρασή του στον ερεθισμό του δέρματος από την υπό δοκιμή χημική ουσία πρέπει να είναι αμελητέα ή μηδενική.

12. Στο τέλος της περιόδου έκθεσης, που συνήθως διαρκεί 4 ώρες, τα υπολείμματα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να απομακρύνονται, εφόσον αυτό είναι πρακτικά εφικτό, με νερό ή κατάλληλο διαλύτη, χωρίς να αλλοιώνεται η υφιστάμενη απόκριση ούτε η ακεραιότητα της επιδερμίδας.

▼M8

Επίπεδα δόσεων

13. Στο σημείο δοκιμής εφαρμόζονται εφάπαξ 0,5 ml υγρού ή 0,5 g στερεού ή αλοιφής.

Αρχική δοκιμή (δοκιμή ερεθισμού/διάβρωσης του δέρματος *in vivo* σε ένα ζώο)

14. Όταν μια υπό δοκιμή χημική ουσία έχει κριθεί ότι είναι διαβρωτική, ερεθιστική ή μη ταξινομημένη βάσει αναλύσεων βάρους της απόδειξης ή βάσει προηγούμενων δοκιμών *in vitro*, συνήθως δεν είναι απαραίτητη η διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών *in vivo*. Εντούτοις, σε περιπτώσεις που θεωρείται δικαιολογημένη η απόκτηση συμπληρωματικών δεδομένων, διεξάγεται αρχικά η δοκιμή *in vivo* με χρήση ενός ζώου και κατ' εφαρμογή της ακόλουθης προσέγγισης. Στο ζώο εφαρμόζονται διαδοχικά τρία επιθέματα κατ' ανώτατο όριο. Το πρώτο αφαιρείται μετά από τρία λεπτά. Σε περίπτωση που δεν παρατηρηθεί σοβαρή αντίδραση του δέρματος, εφαρμόζεται δεύτερο επίθεμα σε διαφορετικό σημείο, το οποίο αφαιρείται μετά από μία ώρα. Εάν οι παρατηρήσεις στο στάδιο αυτό υποδεικνύουν ότι η έκθεση του ζώου μπορεί να παραταθεί ανώδυνα μέχρι τις τέσσερις ώρες, εφαρμόζεται τρίτο επίθεμα, το οποίο αφαιρείται μετά από τέσσερις ώρες, και διαβαθμίζεται η απόκριση.

15. Εάν μετά οποιοδήποτε από τα τρία διαδοχικά στάδια έκθεσης παρατηρηθεί διαβρωτική επίδραση, η δοκιμή τερματίζεται αμέσως. Εάν δεν παρατηρηθεί διαβρωτική επίδραση μετά την αφαίρεση του τελευταίου επιθέματος, το ζώο παραμένει υπό παρατήρηση για 14 ημέρες, εκτός εάν εκδηλωθεί διάβρωση νωρίτερα.

16. Στις περιπτώσεις όπου η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν αναμένεται να προκαλέσει διάβρωση, αλλά ενδέχεται να είναι ερεθιστική, θα πρέπει να εφαρμόζεται ένα μόνο επίθεμα σε ένα ζώο για τέσσερις ώρες,

Επιβεβαιωτική δοκιμή (δοκιμή ερεθισμού του δέρματος *in vivo* σε επιπλέον ζώα)

17. Εάν δεν έχει παρατηρηθεί διαβρωτική επίδραση κατά την αρχική δοκιμή, η ερεθιστική ή αρνητική απόκριση θα πρέπει να επιβεβαιώνεται με χρήση έως δύο επιπλέον ζώων, στο καθένα από τα οποία εφαρμόζεται ένα επίθεμα για περίοδο έκθεσης 4 ωρών. Εάν κατά την αρχική δοκιμή έχει παρατηρηθεί ερεθιστική επίδραση, η επιβεβαιωτική δοκιμή μπορεί να διεξαχθεί με διαδοχική ή ταυτόχρονη έκθεση των δύο επιπλέον ζώων. Στην εξαιρετική περίπτωση όπου δεν έχει διεξαχθεί η αρχική δοκιμή, είναι δυνατόν να υποβληθούν σε αγωγή δύο ή τρία ζώα με ένα μόνον επίθεμα, το οποίο αφαιρείται μετά 4 ώρες. Όταν χρησιμοποιούνται δύο ζώα και εμφανίζουν και τα δύο την ίδια απόκριση, δεν χρειάζονται άλλες δοκιμές. Στην αντίθετη περίπτωση, υποβάλλεται στη δοκιμή και το τρίτο ζώο. Για την αξιολόγηση αμφίβολων αποκρίσεων ενδέχεται να απαιτηθούν περισσότερα ζώα.

Περίοδος παρατήρησης

18. Η διάρκεια της περιόδου παρατήρησης θα πρέπει να είναι επαρκής για να εκτιμηθεί πλήρως το κατά πόσον οι παρατηρούμενες επιδράσεις είναι αναστρέψιμες. Παρόλα αυτά, το πείραμα θα πρέπει να τερματίζεται αμέσως μόλις το ζώο εμφανίσει διαρκή σημεία ισχυρού πόνου ή αγωνίας. Για να κριθεί αν οι επιδράσεις είναι αναστρέψιμες, τα ζώα θα πρέπει να παρατηρούνται για χρονικό διάστημα έως 14 ημερών μετά την αφαίρεση των επιθεμάτων. Εάν διαπιστωθεί ότι είναι αναστρέψιμες πριν παρέλθουν 14 ημέρες, το πείραμα θα πρέπει να τερματίζεται εκείνη τη στιγμή.

Κλινικές παρατηρήσεις και διαβάθμιση των δερματικών αντιδράσεων

19. Όλα τα ζώα θα πρέπει να εξετάζονται για σημεία ερυθήματος και οιδήματος και οι αποκρίσεις να βαθμολογούνται στα 60 λεπτά και, κατόπιν, στις 24, τις 48 και τις 72 ώρες από την αφαίρεση του επιθέματος. Κατά την αρχική δοκιμή σε ένα ζώο, εξετάζεται επίσης το σημείο εφαρμογής του επιθέματος αμέσως μετά την αφαίρεσή του. Οι δερματικές αντιδράσεις διαβαθμίζονται και καταγράφονται σύμφωνα με το σύστημα του πίνακα παρακάτω. Εάν σε 72 ώρες παρατηρηθεί βλάβη του δέρματος που δεν είναι δυνατόν να χαρακτηριστεί ερεθισμός ή διάβρωση, μπορεί να χρειάζεται να συνεχιστεί η

▼M8

παρατήρηση μέχρι τη 14η ημέρα για να κριθεί αν οι επιδράσεις είναι αναστρέψιμες. Εκτός από την παρατήρηση του ερεθισμού, θα πρέπει να περιγράφονται πλήρως και να καταγράφονται όλες οι τοπικές τοξικές επιδράσεις, λόγου χάριν απολίπανση του δέρματος, και οι τυχόν συστηματικές δυσμενείς επιδράσεις (π.χ. στα κλινικά συμπτώματα τοξικότητας και στο βάρος του σώματος). Για τη διασαφήνιση αμφίβολων αποκρίσεων, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο ιστοπαθολογικής εξέτασης.

20. Η διαβάθμιση των δερματικών αποκρίσεων είναι κατ' ανάγκην υποκειμενική. Για να διευκολυνθεί η εναρμονισμένη διαβάθμιση των δερματικών αποκρίσεων και να βοηθηθούν, αφενός, τα εργαστήρια δοκιμών και, αφετέρου, το προσωπικό που εκτελεί και ερμηνεύει τις παρατηρήσεις, απαιτείται κατάλληλη εκπαίδευση του εν λόγω προσωπικού στο χρησιμοποιούμενο σύστημα βαθμολόγησης (βλ. πίνακα παρακάτω). Χρήσιμος είναι επίσης ένας εικονογραφημένος οδηγός διαβάθμισης του ερεθισμού και άλλων βλαβών του δέρματος (3).

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

21. Τα αποτελέσματα της μελέτης θα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα της τελικής έκθεσης δοκιμής και να καλύπτουν όλα τα στοιχεία που απαριθμούνται στην παράγραφο 24.

Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

22. Η βαθμολογία του δερματικού ερεθισμού θα πρέπει να αξιολογείται σε συνδυασμό με το είδος και τη σοβαρότητα των βλαβών, καθώς και με το κατά πόσον αυτές είναι αναστρέψιμες. Οι επιμέρους βαθμοί δεν αντιπροσωπεύουν ένα απόλυτο πρότυπο για τις ερεθιστικές ιδιότητες ενός υλικού, δεδομένου ότι αξιολογούνται και άλλες επιδράσεις των υπό δοκιμή ουσιών. Αντίθετα, θα πρέπει να θεωρούνται τιμές αναφοράς, οι οποίες πρέπει να συνεκτιμώνται με όλες τις υπόλοιπες παρατηρήσεις της μελέτης.

23. Κατά την αξιολόγηση των ερεθιστικών αποκρίσεων, θα πρέπει να εξετάζεται αν οι βλάβες του δέρματος είναι αναστρέψιμες. Εφόσον αποκρίσεις όπως αλωπεκία (περιορισμένη επιφάνεια), υπερκεράτωση, υπερπλασία και απολέπιση επιμένουν μέχρι το τέλος της 14ήμερης περιόδου παρατήρησης, η υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να θεωρείται ερεθιστική.

Έκθεση δοκιμής

24. Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Αιτιολόγηση της διεξαγωγής δοκιμής in vivo:

— ανάλυση βάρους της απόδειξης των δεδομένων δοκιμών που προϋπήρχαν, συμπεριλαμβανομένων των αποτελεσμάτων της στρατηγικής διαδοχικών δοκιμών,

— περιγραφή των σχετικών δεδομένων που έχουν προκύψει από προηγούμενες δοκιμές,

— δεδομένα που προέκυψαν σε κάθε στάδιο της στρατηγικής δοκιμών,

— περιγραφή των δοκιμών *in vitro* που πραγματοποιήθηκαν, με λεπτομέρειες για τις διαδικασίες και τα αποτελέσματα που ελήφθησαν με τις ουσίες ελέγχου/αναφοράς,

— ανάλυση βάρους της απόδειξης προκειμένου να διεξαχθεί μελέτη *in vivo*.

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

— Μονοσυστατική ουσία: ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμίξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

▼**M8**

— πολυσυστατική ουσία, μείγμα και ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, προϊόντα πολύπλοκων αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά (UVCB): περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες,

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

— προέλευση, αριθμός παρτίδας εάν είναι διαθέσιμος,

— κατεργασία της υπό δοκιμή ουσίας/μάρτυρα πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, κονιοποίηση),

— σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, καταληκτική ημερομηνία χρήσης ή ημερομηνία νέας ανάλυσης, εάν είναι γνωστή,

— συνθήκες φύλαξης.

Φορέας:

— ταυτοποίηση, συγκέντρωση (κατά περίπτωση), όγκος που χρησιμοποιήθηκε,

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα.

Πειραματόζωο/-α:

— είδος/φυλή που χρησιμοποιήθηκε, αιτιολόγηση της χρήσης άλλου ζώου/-ων αντί αλφικών κουνελιών,

— αριθμός ζώων κάθε φύλου,

— βάρος/-η κάθε ζώου στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής,

— ηλικία κατά την έναρξη της μελέτης,

— προέλευση του ζώου/-ων, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσιο κ.λπ.

Συνθήκες δοκιμής:

— τεχνική προπαρασκευής της περιοχής εφαρμογής της ουσίας,

— λεπτομέρειες σχετικά με το επιδεσμικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε και την τεχνική της εφαρμογής του,

— λεπτομέρειες για την παρασκευή, την εφαρμογή και την απομάκρυνση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Αποτελέσματα:

— καταχώριση σε πίνακα των βαθμών ερεθιστικής/διαβρωτικής απόκρισης για κάθε ζώο σε κάθε χρονική στιγμή μέτρησης,

— περιγραφή όλων των βλαβών που παρατηρήθηκαν,

— αναλυτική περιγραφή του είδους και της έκτασης του ερεθισμού ή της διάβρωσης που παρατηρήθηκε, καθώς και τυχόν ιστοπαθολογικών ευρημάτων,

— περιγραφή άλλων δυσμενών τοπικών (π.χ. απολίπανση του δέρματος) επιδράσεων εκτός από δερματικό ερεθισμό ή διάβρωση και τυχόν συστηματικών επιδράσεων.

▼**M8**

Εξέταση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998.

(3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 19), Organistion for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

Πινακασ

Διαβαθμιση των Δερματικων Αντιδρασεων

Ερύθημα και σχηματισμός εσχάρας

Κανένα ερύθημα	0
Πολύ ελαφρό ερύθημα (μόλις αντιληπτό)	1
Περιγεγραμμένο ερύθημα	2
Μέτριο έως σοβαρό ερύθημα	3
Σοβαρό ερύθημα (ερυθρότητα βοείου κρέατος) έως σχηματισμός εσχάρας που εμποδίζει τη διαβάθμιση του ερυθήματος	4

Μέγιστος δυνατός βαθμός 4

Οίδημα

Κανένα οίδημα	0
Πολύ ελαφρό οίδημα (μόλις αντιληπτό)	1
Ελαφρό οίδημα (περιγεγραμμένα χείλη με σαφή διόγκωση)	2
Μέτριο οίδημα (διόγκωση 1 mm περίπου)	3
Σοβαρό οίδημα (διόγκωση άνω του 1 mm εκτεινόμενη πέραν της επιφάνειας έκθεσης)	4

Μέγιστος δυνατός βαθμός 4

Για τη διασαφήνιση αμφίβολων αποκρίσεων είναι δυνατόν να γίνει ιστοπαθολογική εξέταση.

▼**M8**

Προσάρτημα

ΟΡΙΣΜΟΙ

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Δερματικός ερεθισμός: η πρόκληση αναστρέψιμων βλαβών του δέρματος μετά την εφαρμογή της υπό δοκιμή ουσίας για χρονικό διάστημα έως 4 ωρών.

Δερματική διάβρωση: η πρόκληση μη αναστρέψιμης βλάβης του δέρματος· συγκεκριμένα, εμφανούς νεκρώσεως που διαπερνά την επιδερμίδα φθάνοντας στο χόριο, μετά την εφαρμογή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας για χρονικό διάστημα έως 4 ωρών. Τυπικές διαβρωτικές αντιδράσεις είναι τα έλκη, η αιμορραγία, οι αιματηρές εσχάρες και, στο τέλος της παρατήρησης μετά παρέλευση 14 ημερών, ο αποχρωματισμός λόγω λευκοδερμίας, επιφάνειες με τέλεια αλωπεκία και ουλές. Για την αξιολόγηση αμφίβολων βλαβών, θα πρέπει να μελετάται το ενδεχόμενο ιστοπαθολογικής εξέτασης.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

▼M7

Β.5. ΟΞΕΙΑΣ ΜΟΡΦΗΣ ΕΡΕΘΙΣΜΟΣ/ΔΙΑΒΡΩΣΗ ΤΩΝ ΟΦΘΑΛΜΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 405 του ΟΟΣΑ (2012). Οι κατευθυντήριες γραμμές του ΟΟΣΑ για τον έλεγχο των χημικών ουσιών επανεξετάζονται περιοδικά για να εξασφαλίζεται ότι αντανακλούν τις βέλτιστες διαθέσιμες επιστημονικές γνώσεις. Στις προηγούμενες επανεξετάσεις της παρούσας κατευθυντήριας γραμμής δοκιμών, δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή στις δυνατότητες βελτίωσης μέσω της αξιολόγησης όλων των υφιστάμενων στοιχείων σχετικά με τις υπό δοκιμή ουσίες, ώστε να μη διεξάγονται περιττές δοκιμές σε πειραματόζωα και, κατ' επέκταση, να λαμβάνονται υπόψη οι ανησυχίες σχετικά με την καλή μεταχείριση των ζώων. Η TG 405 (που εγκρίθηκε το 1981 και επικαιροποιήθηκε το 1987, το 2002 και το 2012) περιλαμβάνει τη σύσταση να διενεργείται ανάλυση βάρους της απόδειξης (1) για τα υφιστάμενα σχετικά δεδομένα, πριν από τη διεξαγωγή της περιγραφόμενης δοκιμής in vivo για οξείας μορφής ερεθισμό/διάβρωση των οφθαλμών. Όταν τα διαθέσιμα δεδομένα είναι ανεπαρκή, συνιστάται να συμπληρώνονται με την εφαρμογή στρατηγικής διαδοχικών δοκιμών (2) (3). Η στρατηγική δοκιμών περιλαμβάνει τη διεξαγωγή επικυρωμένων και αποδεκτών δοκιμών in vitro και παρέχεται ως συμπλήρωμα της παρούσας μεθόδου. Για τους σκοπούς του κανονισμού (ΕΚ) αριθ., 1907/2006 για την καταχώριση, την αξιολόγηση, την αδειοδότηση και τους περιορισμούς των χημικών προϊόντων (REACH) ([1]), μια στρατηγική ολοκληρωμένων δοκιμών περιλαμβάνεται επίσης στο σχετικό έγγραφο καθοδήγησης του ECHA (21). Οι δοκιμές σε ζώα θα πρέπει να διεξάγονται μόνον αν αυτό κρίνεται απαραίτητο μετά από εξέταση των διαθέσιμων εναλλακτικών μεθόδων, και να χρησιμοποιούν εκείνες που κρίνονται κατάλληλες. Κατά τον χρόνο σύνταξης της παρούσας επικαιροποιημένης μεθόδου δοκιμών, υπάρχουν περιπτώσεις κατά τις οποίες αυτή εξακολουθεί να είναι αναγκαία ή να απαιτείται βάσει ορισμένων κανονιστικών πλαισίων.

Η πιο πρόσφατη επικαιροποίηση επικεντρώθηκε κυρίως στη χρήση αναλγητικών και αναισθητικών χωρίς να επηρεάζεται η βασική ιδέα και δομή της κατευθυντήριας γραμμής δοκιμών. Η ICCVAM ([2]) και μια διεθνής ανεξάρτητη επιστημονική επιτροπή αξιολόγησης από ομότιμους κριτές εξέτασαν τη χρησιμότητα και τους περιορισμούς της χρήσης τοπικών αναισθητικών, συστημικών αναλγητικών και τελικών σημείων ευθανασίας ως συνήθη πρακτική κατά τις δοκιμές ασφάλειας έναντι οφθαλμικού ερεθισμού in vivo (12). Η επανεξέταση κατέληξε στο συμπέρασμα ότι με τη χρήση τοπικών αναισθητικών και συστημικών αναλγητικών μπορούν να αποφευχθούν κατά μεγάλο βαθμό ή και τελείως ο πόνος και η δυσφορία, χωρίς να επηρεάζεται το αποτέλεσμα της δοκιμής, και στη διατύπωση της σύστασης να χρησιμοποιούνται πάντοτε οι εν λόγω ουσίες. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών έχει ληφθεί υπόψη αυτή η επανεξέταση. Κατά τη διάρκεια των δοκιμών in vivo για οξείας μορφής ερεθισμό και διάβρωση των οφθαλμών, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ως συνήθης πρακτική τοπικά αναισθητικά, συστημικά αναλγητικά και τελικά σημεία ευθανασίας. Οι εξαιρέσεις στη χρήση τους θα πρέπει να αιτιολογούνται. Οι βελτιώσεις που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο θα περιορίσουν σημαντικά ή ακόμη και θα αποτρέψουν τον πόνο και τη δυσφορία των ζώων στις περισσότερες περιπτώσεις όπου εξακολουθεί να είναι αναγκαία η διεξαγωγή δοκιμών in vivo για την οφθαλμική ασφάλεια.

Η ισόρροπη προληπτική διαχείριση του πόνου θα πρέπει να περιλαμβάνει i) ως συνήθη πρακτική, προκαταρτική αγωγή με τοπικό αναισθητικό (π.χ. προπαρακαΐνη ή τετρακαΐνη) και συστημικό αναλγητικό (π.χ. βουπρενορφίνη), ii) ως συνήθη πρακτική, πρόγραμμα χορήγησης συστημικών αναλγητικών μετά τη μεταχείριση (π.χ. βουπρενορφίνη και μελοξικάμη), iii) προγραμματισμένη παρατήρηση, παρακολούθηση και καταγραφή των ζώων για κλινικά σημεία πόνου και/ή δυσφορίας και iv) προγραμματισμένη παρατήρηση, παρακολούθηση και καταγραφή του είδους, της σοβαρότητας και της πορείας όλων των κακώσεων των οφθαλμών. Περισσότερες λεπτομέρειες περιέχονται στις επικαιροποιημένες

([1]) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 18ης Δεκεμβρίου 2006, για την καταχώριση, την αξιολόγηση, την αδειοδότηση και τους περιορισμούς των χημικών προϊόντων (REACH) και για την ίδρυση του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Χημικών Προϊόντων καθώς και για την τροποποίηση της οδηγίας 1999/45/ΕΚ και για την κατάργηση του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 793/93 του Συμβουλίου και του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1488/94 της Επιτροπής καθώς και της οδηγίας 76/769/ΕΟΚ του Συμβουλίου και των οδηγιών της Επιτροπής 91/155/ΕΟΚ, 93/67/ΕΟΚ, 93/105/ΕΚ και 2000/21/ΕΚ. ΕΕ L 304 της 22.11.2007, σ. 1.

([2]) Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (Διυπηρεσιακή Συντονιστική Επιτροπή για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων, των Ηνωμένων Πολιτειών)

▼M7

διαδικασίες που περιγράφονται κατωτέρω. Μετά τη χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, δεν θα πρέπει να εφαρμόζονται τοπικά αναισθητικά ή αναλγητικά ώστε να αποφεύγονται οι παρεμβολές στη μελέτη. Αναλγητικά με αντιφλεγμονώδη δράση (π.χ. μελοξικάμη) δεν θα πρέπει να εφαρμόζονται τοπικά και οι δόσεις που χρησιμοποιούνται συστημικά δεν θα πρέπει να επηρεάζουν τις επιδράσεις στους οφθαλμούς.

Οι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

ΑΡΧΙΚΑ ΘΕΜΑΤΑ ΠΡΟΣ ΕΞΕΤΑΣΗ

Προς όφελος τόσο της ορθότητας του επιστημονικού έργου, όσο και της καλής μεταχείρισης των ζώων, δεν θα πρέπει να διεξάγονται δοκιμές in vivo πριν αξιολογηθούν, με ανάλυση βάρους της απόδειξης, όλα τα διαθέσιμα δεδομένα σχετικά με την πιθανή διαβρωτική/ερεθιστική επίδραση των ουσιών στους οφθαλμούς. Τα εν λόγω δεδομένα περιλαμβάνουν στοιχεία από προηγούμενες μελέτες στον άνθρωπο και/ή σε πειραματόζωα, στοιχεία που αποδεικνύουν ότι μια ή περισσότερες ουσίες με ανάλογη χημική δομή ή μείγματα τέτοιων ουσιών προκαλούν διάβρωση/ερεθισμό στους οφθαλμούς, δεδομένα που αποδεικνύουν υψηλή οξύτητα ή αλκαλικότητα της χημικής ουσίας (4) (5) και αποτελέσματα έγκυρων και αποδεκτών δοκιμών in vitro ή ex vivo για διάβρωση του δέρματος και διάβρωση/ερεθισμό των οφθαλμών 6) (13) (14) (15) (16) (17). Οι μελέτες αυτές μπορεί να έχουν διεξαχθεί πριν από την ανάλυση βάρους της απόδειξης ή ως επακόλουθό της.

Από την ανωτέρω ανάλυση ενδέχεται να προκύπτει ανάγκη μελετών in vivo του διαβρωτικού/ερεθιστικού για τους οφθαλμούς δυναμικού ορισμένων χημικών ουσιών. Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις, πριν εξεταστεί το ενδεχόμενο εκτέλεσης της οφθαλμικής δοκιμής in vivo, θα πρέπει κατά προτίμηση να προηγείται μελέτη των διαβρωτικών επιδράσεων της χημικής ουσίας στο δέρμα in vitro και/ή in vivo και η μελέτη να αξιολογείται σύμφωνα με τη στρατηγική διαδοχικών δοκιμών που προβλέπεται στη μέθοδο δοκιμών B.4 (7) ή τη στρατηγική ολοκληρωμένων δοκιμών που περιγράφεται στο έγγραφο καθοδήγησης του ECHA (21).

Η στρατηγική διαδοχικών δοκιμών, που περιλαμβάνει τη διεξαγωγή επικυρωμένων δοκιμών διάβρωσης/ερεθισμού των οφθαλμών in vitro ή ex vivo, συμπεριλαμβάνεται ως συμπλήρωμα στην παρούσα μέθοδο δοκιμών και, για τους σκοπούς του κανονισμού REACH, στο έγγραφο καθοδήγησης του ECHA (21). Συνιστάται η εφαρμογή της εν λόγω στρατηγικής διαδοχικών δοκιμών πριν από τη διεξαγωγή δοκιμών in vivo. Για τις νέες χημικές ουσίες, συνιστάται κλιμακωτή προσέγγιση δοκιμών για τη συλλογή επιστημονικώς ορθών δεδομένων σχετικά με τη διαβρωτική/ερεθιστική δράση της χημικής ουσίας. Για τις υφιστάμενες χημικές ουσίες, για τις οποίες δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα όσον αφορά τη δερματική και οφθαλμική διάβρωση/ερεθισμό, η στρατηγική μπορεί να χρησιμοποιείται για να συμπληρωθούν τα κενά στα δεδομένα. Η εφαρμογή διαφορετικής στρατηγικής ή διαδικασίας δοκιμών ή τυχόν απόφαση να μην εφαρμοστεί κλιμακωτή προσέγγιση δοκιμών θα πρέπει να αιτιολογείται.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ IN VIVO

Μετά από προκαταρτική αγωγή με συστημικό αναλγητικό και επαγωγή της κατάλληλης τοπικής αναισθησίας, η προς δοκιμή χημική ουσία εφαρμόζεται εφάπαξ σε έναν από τους οφθαλμούς του πειραματόζωου. Ο οφθαλμός που δεν υποβάλλεται σε αγωγή χρησιμεύει ως μάρτυρας. Ο βαθμός ερεθισμού/διάβρωσης του οφθαλμού αξιολογείται με βαθμολόγηση των βλαβών του επιπεφυκότα, του κερατοειδούς και της ίριδας σε συγκεκριμένα διαστήματα. Περιγράφονται επίσης τυχόν άλλες επιδράσεις στους οφθαλμούς και συστημικές δυσμενείς επιδράσεις με σκοπό την πλήρη αξιολόγηση των επιδράσεων. Η διάρκεια της μελέτης θα πρέπει να είναι επαρκής για να εκτιμηθεί αν οι επιδράσεις είναι αναστρέψιμες ή μη.

Τα ζώα που εμφανίζουν σημεία έντονης δυσφορίας και/ή πόνου σε οποιοδήποτε στάδιο της δοκιμής ή βλάβες συμβατές με τα τελικά σημεία ευθανασίας που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών (βλ. παράγραφο 26) θα πρέπει να θανατώνονται ανώδυνα και η χημική ουσία να αξιολογείται ανάλογα. Τα κριτήρια για τη λήψη απόφασης σχετικά με την ανώδυνη θανάτωση ετοιμοθάνατων ή βαρέως πασχόντων ζώων αποτελούν το αντικείμενο εγγράφου καθοδήγησης του ΟΟΣΑ (8).

▼M7

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΟΚΙΜΗ IN VIVO

Επιλογή ζωικού είδους

Το προτιμώμενο πειραματόζωο είναι το αλφικό κουνέλι και χρησιμοποιούνται υγιή νεαρά ενήλικα ζώα. Η χρήση άλλων φυλών ή ειδών θα πρέπει να αιτιολογείται.

Προετοιμασία των ζώων

Κάθε πειραματόζωο που επιλέγεται αρχικά για τη δοκιμή θα πρέπει, εντός των 24 ωρών που προηγούνται της έναρξής της, να υποβάλλεται σε οφθαλμολογική εξέταση και των δύο οφθαλμών. Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ζώα που εμφανίζουν ερεθισμένους οφθαλμούς, οφθαλμικές ανωμαλίες ή προϋπάρχουσες κακώσεις του κερατοειδούς.

Συνθήκες στέγασης και σίτισης

Τα ζώα θα πρέπει να στεγάζονται χωριστά. Η θερμοκρασία στην αίθουσα πειραματόζωων θα πρέπει να είναι 20°C (± 3°C) για τα κουνέλια. Αν και η σχετική υγρασία θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού της αίθουσας, εν τούτοις θα πρέπει να επιδιώκεται μια τιμή 50-60 %. Ο φωτισμός θα πρέπει να είναι τεχνητός, με φωτοπερίοδο 12 ωρών. Θα πρέπει να αποφεύγεται η υπερβολική φωτεινή ένταση. Για τη διατροφή των ζώων μπορούν να χρησιμοποιούνται τα συνήθη εργαστηριακά σιτηρέσια, με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

Χρήση τοπικών αναισθητικών και συστημικών αναλγητικών

Συνιστώνται οι ακόλουθες διαδικασίες για την αποφυγή ή την ελαχιστοποίηση του πόνου και της δυσφορίας σε διαδικασίες δοκιμών οφθαλμικής ασφάλειας. Εναλλακτικά, επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται υποκατάστατες διαδικασίες που αποδεδειγμένα εξασφαλίζουν εξίσου αποτελεσματική ή και αποτελεσματικότερη πρόληψη ή ανακούφιση από τον πόνο και τη δυσφορία.

— Εξήντα λεπτά πριν από την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (ΕΔΧ), χορηγούνται 0,01 mg/kg βουπρενορφίνης με υποδόρια ένεση για την επίτευξη θεραπευτικών επιπέδων συστημικής αναλγησίας. Η βουπρενορφίνη και άλλα παρόμοια οπιοειδή αναλγητικά που χορηγούνται συστημικά δεν είναι γνωστό ότι διαφοροποιούν ούτε αναμένεται να μεταβάλουν τις οφθαλμικές αποκρίσεις (12).

— Πέντε λεπτά πριν από την ΕΔΧ, εφαρμόζονται σε κάθε οφθαλμό μία ή δύο σταγόνες τοπικού αναισθητικού των οφθαλμών (π.χ. 0,5 % υδροχλωρικής προπαρακαΐνης ή υδροχλωρικής τετρακαΐνης). Για να αποφευχθούν πιθανές παρεμβολές στη μελέτη, συνιστάται η εφαρμογή τοπικού αναισθητικού που δεν περιέχει συντηρητικά. Ο οφθαλμός κάθε ζώου που δεν υποβάλλεται σε μεταχείριση με την υπό δοκιμή χημική ουσία, αλλά στον οποίο εφαρμόζεται τοπικό αναισθητικό, χρησιμεύει ως μάρτυρας. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία προβλέπεται ότι θα προκαλέσει μεγάλο πόνο και δυσφορία, δεν θα πρέπει κανονικά να υποβάλλεται σε δοκιμή in vivo. Ωστόσο, σε περίπτωση αμφιβολίας ή εάν είναι αναγκαία η δοκιμή, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο πρόσθετων εφαρμογών του τοπικού αναισθητικού ανά 5 λεπτά πριν από την ΕΔΧ. Οι χρήστες θα πρέπει να γνωρίζουν ότι οι πολλαπλές εφαρμογές τοπικών αναισθητικών θα μπορούσαν να προκαλέσουν μικρή αύξηση της σοβαρότητας των χημικώς επαγόμενων βλαβών και/ή του χρόνου που απαιτείται για την απαλλαγή από αυτές.

— Οκτώ ώρες μετά την ΕΔΧ, χορηγούνται υποδορίως 0,01 mg/kg βουπρενορφίνης και 0,5 mg/kg μελοξικάμης για να εξασφαλιστεί συνεχές θεραπευτικό επίπεδο συστημικής αναλγησίας. Μολονότι δεν υπάρχουν στοιχεία που να δείχνουν ότι η μελοξικάμη έχει αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις στους οφθαλμούς όταν χορηγείται υποδορίως εφάπαξ ημερησίως, δεν θα πρέπει να χορηγείται πριν παρέλθουν 8 τουλάχιστον ώρες από την ΕΔΧ, προκειμένου να αποφεύγεται τυχόν παρεμβολή στη μελέτη (12).

— Μετά την παρέλευση του πρώτου οκταώρου από την ΕΔΧ, θα πρέπει να χορηγούνται υποδορίως 0,01 mg/kg βουπρενορφίνης ανά 12 ώρες, σε συνδυασμό με υποδόρια χορήγηση 0,5 mg/kg μελοξικάμης ανά 24 ώρες, μέχρι να υποχωρήσουν οι οφθαλμικές βλάβες και να μην εκδηλώνονται κλινικά

▼M7

σημεία πόνου και δυσφορίας. Θα μπορούσε να εξεταστεί η δυνατότητα χορήγησης διαθέσιμων σκευασμάτων αναλγητικών βραδείας αποδέσμευσης για να μειωθεί η συχνότητα δοσολογίας αναλγητικών.

— Εάν η προληπτική αναλγησία και η τοπική αναισθησία είναι ανεπαρκείς, θα πρέπει να χορηγείται αναλγησία «διάσωσης» αμέσως μετά την ΕΔΧ. Εάν ένα ζώο εμφανίζει σημεία πόνου και δυσφορίας κατά τη διάρκεια της μελέτης, χορηγείται αμέσως δόση «διάσωσης» 0,03 mg/kg βουπρενορφίνης υποδορίως και, εάν είναι απαραίτητο, επαναλαμβάνεται το νωρίτερο κάθε 8 ώρες, αντί των 0,01 mg/kg υποδορίως ανά 12ωρο. Σε συνδυασμό με τη δόση «διάσωσης» βουπρενορφίνης χορηγούνται 0,5 mg/kg μελοξικάμης υποδορίως ανά 24 ώρες, αλλά όχι πριν παρέλθουν 8 τουλάχιστον ώρες μετά την ΕΔΧ.

Εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας

Η υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να τοποθετείται στο θόλο του επιπεφυκότα του ενός οφθαλμού κάθε ζώου, αφού αποτραβηχτεί, με απαλές κινήσεις, το κάτω βλέφαρο από το βολβό. Στη συνέχεια, με απαλές κινήσεις, τα βλέφαρα διατηρούνται κλειστά για ένα περίπου δευτερόλεπτο, για να αποφευχθεί η απώλεια υλικού. Ο άλλος οφθαλμός, που δεν υποβάλλεται σε μεταχείριση, χρησιμεύει ως μάρτυρας.

Έκπλυση

Οι οφθαλμοί των πειραματόζωων δεν θα πρέπει να εκπλένονται για 24 ώρες τουλάχιστον μετά την ενστάλαξη της υπό δοκιμή ουσίας, εκτός εάν αυτή είναι στερεό (βλ. παράγραφο 18) ή εάν εκδηλωθούν αμέσως διαβρωτικές ή ερεθιστικές επιδράσεις. Σε 24 ώρες μπορεί να γίνει έκπλυση, εάν θεωρηθεί σκόπιμο.

Δεν συνιστάται η χρήση δορυφορικής ομάδας ζώων για τη διερεύνηση της επίδρασης της έκπλυσης, εκτός εάν το επιβάλλουν επιστημονικοί λόγοι. Στις περιπτώσεις όπου απαιτείται δορυφορική ομάδα, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται δύο κουνέλια. Πρέπει να τεκμηριώνονται επιμελώς οι συνθήκες έκπλυσης, π.χ. χρόνος έκπλυσης, σύνθεση και θερμοκρασία του διαλύματος, διάρκεια, όγκος και ταχύτητα εφαρμογής.

Επίπεδα δόσεων

(1) *Δοκιμή υγρών*

Για τη δοκιμή υγρών χρησιμοποιείται μία δόση 0,1 ml. Τα εκνεφώματα (σπρέι) δεν θα πρέπει να ενσταλάζονται απευθείας από τον ψεκαστήρα στον οφθαλμό. Το υγρό θα πρέπει να εκβάλλεται από τον περιέκτη, να συλλέγεται σε άλλο δοχείο και κατόπιν να λαμβάνονται 0,1 ml για ενστάλαξη στον οφθαλμό.

(2) *Δοκιμή στερεών*

Για τη δοκιμή στερεών, αλοιφών και κοκκωδών χημικών ουσιών, η χρησιμοποιούμενη ποσότητα θα πρέπει να έχει όγκο 0,1 ml ή βάρος που δεν υπερβαίνει τα 100 mg. Η υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να λειοτριβείται σε λεπτή σκόνη. Ο όγκος των στερεών υλικών θα πρέπει να μετριέται αφού αυτά συμπυκνωθούν ελαφρά, π.χ. με μικρά κτυπήματα στο δοχείο μέτρησης. Εάν η στερεά υπό δοκιμή χημική ουσία δεν έχει απομακρυνθεί από τον οφθαλμό του πειραματόζωου με τους φυσιολογικούς μηχανισμούς κατά τον πρώτο χρόνο παρατήρησης, που είναι μία ώρα μετά την εφαρμογή, ο οφθαλμός μπορεί να εκπλυθεί με φυσιολογικό ορό ή απεσταγμένο νερό.

(3) *Δοκιμή αερολυμάτων*

Συνιστάται όλα τα εκνεφώματα και αερολύματα να συλλέγονται σε άλλο δοχείο πριν από την ενστάλαξή τους στον οφθαλμό. με μόνη εξαίρεση τις χημικές ουσίες που περιέχονται σε δοχεία υπό πίεση, οι οποίες δεν είναι δυνατόν να συλλεχθούν επειδή εξατμίζονται. Στις περιπτώσεις αυτές, ο οφθαλμός θα πρέπει να κρατείται ανοικτός και η υπό δοκιμή χημική ουσία να χορηγείται με έναν μόνο ψεκασμό διάρκειας ενός δευτερολέπτου περίπου από απόσταση 10 cm, ακριβώς απέναντι από τον οφθαλμό. Αυτή η απόσταση μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την πίεση του εκνεφώματος και τα συστατικά του. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε ο οφθαλμός να μην υφίσταται βλάβη από την πίεση ψεκασμού. Σε ειδικές περιπτώσεις, ενδέχεται να είναι αναγκαία η εκτίμηση της πιθανότητας να προκληθεί «μηχανική» βλάβη στον οφθαλμό από τη δύναμη του αερολύματος.

▼M7

Η δόση του αερολύματος είναι δυνατόν να υπολογιστεί κατά προσέγγιση με την ακόλουθη προσομοίωση της δοκιμής: η χημική ουσία ψεκάζεται διαμέσου οπής μεγέθους ίσου με τον οφθαλμό του κουνελιού επάνω σε χαρτί ζύγισης τοποθετημένο ακριβώς πίσω από την οπή. Η αύξηση του βάρους του χαρτιού παρέχει μια εκτίμηση της ποσότητας που θα ψεκαστεί στον οφθαλμό. Στην περίπτωση των πτητικών χημικών ουσιών, η δόση μπορεί να υπολογιστεί κατά προσέγγιση με ζύγιση του δοχείου που περιέχει την υπό δοκιμή χημική ουσία πριν και μετά την αφαίρεσή της.

Αρχική δοκιμή (δοκιμή ερεθισμού/διάβρωσης των οφθαλμών in vivo σε ένα ζώο)

Συνιστάται θερμά να διεξάγεται η δοκιμή in vivo πρώτα σε ένα μόνο ζώο (βλ. συμπλήρωμα της παρούσας μεθόδου δοκιμών: Στρατηγική διαδοχικών δοκιμών ερεθισμού και διάβρωσης των οφθαλμών). Οι παρατηρήσεις θα πρέπει να επιτρέπουν τον προσδιορισμό της σοβαρότητας και της αναστρεψιμότητας πριν από τη διεξαγωγή επιβεβαιωτικής δοκιμής σε δεύτερο ζώο.

Εάν τα αποτελέσματα της δοκιμής αυτής υποδεικνύουν, σύμφωνα με την περιγραφόμενη διαδικασία, ότι η χημική ουσία είναι διαβρωτικό ή ισχυρό ερεθιστικό των οφθαλμών, δεν θα πρέπει να διεξάγονται άλλες δοκιμές ερεθισμού των οφθαλμών.

Επιβεβαιωτική δοκιμή (δοκιμή ερεθισμού των οφθαλμών in vivo σε επιπλέον ζώα)

Εάν δεν έχει παρατηρηθεί διαβρωτική ή σοβαρή ερεθιστική επίδραση κατά την αρχική δοκιμή, η ερεθιστική ή αρνητική απόκριση θα πρέπει να επιβεβαιώνεται με τη χρήση έως δύο επιπλέον ζώων. Εάν έχει παρατηρηθεί ερεθιστική επίδραση κατά την αρχική δοκιμή, συνιστάται η διεξαγωγή της επιβεβαιωτικής δοκιμής σε διαδοχικές φάσεις με χρήση ενός ζώου κάθε φορά αντί της ταυτόχρονης έκθεσης των δύο επιπλέον ζώων. Εάν το δεύτερο ζώο εμφανίσει διαβρωτικές ή ισχυρές ερεθιστικές επιδράσεις, η δοκιμή διακόπτεται. Εάν τα αποτελέσματα από το δεύτερο ζώο είναι επαρκή για την απόφαση σχετικά με την ταξινόμηση κινδύνων, δεν θα πρέπει να διεξάγονται άλλες δοκιμές.

Περίοδος παρατήρησης

Η διάρκεια της περιόδου παρατήρησης θα πρέπει να είναι επαρκής για να εκτιμηθούν πλήρως το μέγεθος και η αναστρεψιμότητα των παρατηρούμενων επιδράσεων. Παρόλα αυτά, το πείραμα θα πρέπει να τερματίζεται αμέσως μόλις το ζώο εμφανίσει σημεία ισχυρού πόνου ή έντονης δυσφορίας (8). Για να κριθεί αν οι επιδράσεις είναι αναστρέψιμες, τα ζώα θα πρέπει να παρατηρούνται κατά κανόνα για χρονικό διάστημα 21 ημερών μετά τη χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Εάν διαπιστωθεί ότι είναι αναστρέψιμες πριν παρέλθουν 21 ημέρες, το πείραμα θα πρέπει να τερματίζεται τη συγκεκριμένη στιγμή.

Κλινικές παρατηρήσεις και διαβάθμιση των οφθαλμικών αντιδράσεων

Οι οφθαλμοί θα πρέπει να αξιολογούνται πλήρως για την παρουσία ή την απουσία οφθαλμικών βλαβών μία ώρα μετά την ΕΔΧ και να ακολουθούν τουλάχιστον καθημερινές αξιολογήσεις. Τα ζώα θα πρέπει να αξιολογούνται αρκετές φορές την ημέρα κατά τις πρώτες 3 ημέρες για να εξασφαλίζεται η έγκαιρη λήψη αποφάσεων τερματισμού της δοκιμής. Τα υπό δοκιμή ζώα θα πρέπει να αξιολογούνται συστηματικά σε όλη τη διάρκεια της μελέτης για κλινικά σημεία πόνου και/ή δυσφορίας (π.χ. επανειλημμένο άγγιγμα ή τρίψιμο του οφθαλμού με τα οπίσθια ή πρόσθια άκρα, υπερβολικός βλεφαρισμός, υπερβολική δακρύρροια) (9) (10) (11), τουλάχιστον δύο φορές ημερησίως με ελάχιστα διαστήματα 6 ωρών μεταξύ των παρατηρήσεων, ή συχνότερα εάν χρειαστεί. Αυτό είναι αναγκαίο για i) την επαρκή αξιολόγηση των ενδείξεων πόνου και δυσφορίας στα ζώα, έτσι ώστε να λαμβάνονται τεκμηριωμένες αποφάσεις για το αν είναι αναγκαίο να αυξηθεί η δόση των αναλγητικών και ii) την αξιολόγηση της επίτευξης κάποιου από τα καθορισμένα τελικά σημεία ευθανασίας στα ζώα, έτσι ώστε να λαμβάνονται τεκμηριωμένες αποφάσεις για το κατά πόσον είναι σκόπιμη η θανάτωση των ζώων με ευθανασία και να διασφαλίζεται η έγκαιρη λήψη αυτών των αποφάσεων. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ως συνήθης πρακτική χρώση φλουορεσκεΐνης και βιομικροσκόπιο σχισμοειδούς λυχνίας, όταν αυτό κρίνεται σκόπιμο (π.χ. κατά την αξιολόγηση του βάθους της κάκωσης σε περίπτωση εξέλκωσης του κερατοειδούς), για να υποβοηθούν τον εντοπισμό και τη μέτρηση της οφθαλμικής βλάβης και για να εκτιμάται αν πληρούνται τα καθορισμένα κριτήρια τελικών σημείων για θανάτωση με ευθανασία. Μπορούν να συλλέγονται ψηφιακές

▼M7

φωτογραφίες των παρατηρούμενων βλαβών ως σημεία αναφοράς και για μια μόνιμη καταγραφή της έκτασης της οφθαλμικής βλάβης. Τα ζώα θα πρέπει να παραμένουν υπό δοκιμή μόνο για όσο χρόνο απαιτείται για να ληφθούν οριστικά στοιχεία. Τα ζώα που εμφανίζουν σημεία ισχυρού πόνου ή έντονης δυσφορίας θα πρέπει να θανατώνονται αμέσως με ευθανασία, οπότε η χημική ουσία αξιολογείται ανάλογα.

Τα ζώα που εμφανίζουν τις ακόλουθες βλάβες των οφθαλμών μετά την ενστάλαξη της χημικής ουσίας θα πρέπει να θανατώνονται με ευθανασία (βλ. πίνακα 1 για περιγραφή της διαβάθμισης των βλαβών): διάτρηση ή σοβαρή εξέλκωση του κερατοειδούς, συμπεριλαμβανομένου του σταφυλώματος· αιμορραγία στον πρόσθιο θάλαμο του οφθαλμού· αδιαφάνεια (θολερότητα) του κερατοειδούς 4ου βαθμού· απουσία φωτοκινητικού αντανακλαστικού (βαθμός απόκρισης ίριδας 2) για 72 ώρες· εξέλκωση του επιπεφυκότα· νέκρωση του επιπεφυκότα ή της σκαρδαμυκτικής μεμβράνης· ή απόπτωση εσχάρας, επειδή οι συγκεκριμένες βλάβες κατά κανόνα δεν είναι αναστρέψιμες. Επιπλέον, συνιστάται να χρησιμοποιούνται οι ακόλουθες βλάβες των οφθαλμών ως τελικά σημεία ευθανασίας για τον τερματισμό μελετών πριν από τη λήξη της προγραμματισμένης περιόδου παρατήρησης, διάρκειας 21 ημερών. Οι βλάβες αυτές θεωρούνται πρόδρομα σοβαρών ερεθιστικών ή διαβρωτικών κακώσεων και κακώσεων που δεν αναμένεται να αναστραφούν πλήρως μέχρι το τέλος της 21ήμερης περιόδου παρατήρησης: μεγάλο βάθος της κάκωσης (π.χ. επέκταση της εξέλκωσης του κερατοειδούς πέρα από τις επιφανειακές στιβάδες του στρώματος), καταστροφή του σκληροκερατοειδικού ορίου > 50 % (όπως αποδεικνύεται από τη λεύκανση του επιπεφυκότα) και σοβαρή λοίμωξη του οφθαλμού (πυόρροια). Ο συνδυασμός νεοαγγείωσης της επιφάνειας του κερατοειδούς (δηλ. σχηματισμός πάννου), μη συρρίκνωσης της επιφάνειας που χρωματίζεται με τη φλουορεσκεΐνη με την πάροδο του χρόνου βάσει καθημερινής αξιολόγησης και/ή απουσίας επανεπιθηλίωσης 5 ημέρες μετά την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα μπορούσαν επίσης να θεωρηθούν δυνητικά χρήσιμα κριτήρια που επηρεάζουν την κλινική απόφαση για πρόωρο τερματισμό της μελέτης. Ωστόσο, καθένα από αυτά τα ευρήματα δεν αρκεί από μόνο του για να δικαιολογήσει τον πρόωρο τερματισμό της μελέτης. Αφού εντοπιστούν σοβαρές επιδράσεις στους οφθαλμούς, θα πρέπει να καλείται θεράπων ή ειδικευμένος στα πειραματόζωα κτηνίατρος ή προσωπικό εκπαιδευμένο να εντοπίζει τις κλινικές βλάβες για κλινική εξέταση, ώστε να διαπιστώνεται αν ο συνδυασμός αυτών των επιδράσεων δικαιολογεί τον πρόωρο τερματισμό της μελέτης. Οι οφθαλμικές αντιδράσεις (του επιπεφυκότα, του κερατοειδούς και της ίριδας) θα πρέπει να βαθμολογούνται και οι βαθμοί να καταγράφονται 1, 24, 48 και 72 ώρες μετά την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (πίνακας 1). Τα ζώα που δεν εμφανίζουν οφθαλμικές βλάβες μπορούν να απομακρύνονται από τη δοκιμή το νωρίτερο 3 ημέρες μετά την ενστάλαξη της ουσίας. Τα ζώα που δεν εμφανίζουν σοβαρές οφθαλμικές βλάβες θα πρέπει να παρατηρούνται μέχρι αυτές να εξαλειφθούν ή για χρονικό διάστημα 21 ημερών, οπότε η μελέτη τερματίζεται. Οι παρατηρήσεις θα πρέπει να διενεργούνται και να καταγράφονται τουλάχιστον 1 ώρα, 24 ώρες, 48 ώρες, 72 ώρες, 7 ημέρες, 14 ημέρες και 21 ημέρες μετά την ΕΔΧ, με σκοπό να διαπιστώνεται η εξέλιξη των βλαβών και να κρίνεται αν αυτές είναι αναστρέψιμες ή μη. Θα πρέπει να διενεργούνται συχνότερες παρατηρήσεις, εάν είναι αναγκαίο, για να κριθεί αν τα πειραματόζωα θα πρέπει να θανατωθούν με ευθανασία ή να απομακρυνθούν από τη μελέτη λόγω αρνητικών αποτελεσμάτων.

Σε κάθε εξέταση θα πρέπει να καταγράφονται οι βαθμοί των οφθαλμικών βλαβών (πίνακας 1). Θα πρέπει επίσης να αναφέρονται τυχόν άλλες βλάβες του οφθαλμού (π.χ. σχηματισμός πάννου, χρώση, αλλαγές στον πρόσθιο θάλαμο) ή συστημικές δυσμενείς επιδράσεις.

Η εξέταση των αντιδράσεων μπορεί να διευκολυνθεί με τη χρήση διόφθαλμου οφθαλμοσκοπίου, φορητής σχισμοειδούς λυχνίας, βιομικροσκοπίου ή άλλου κατάλληλου οργάνου. Μετά την καταγραφή των παρατηρήσεων του πρώτου 24ώρου, οι οφθαλμοί μπορούν να εξετάζονται περαιτέρω με τη βοήθεια φλουορεσκεΐνης.

Η διαβάθμιση των οφθαλμικών αποκρίσεων είναι κατ' ανάγκη υποκειμενική. Για να διευκολυνθεί η εναρμόνιση της διαβάθμισης των οφθαλμικών αποκρίσεων και να βοηθηθούν, αφενός, τα εργαστήρια δοκιμών και, αφετέρου, το προσωπικό που εκτελεί και ερμηνεύει τις παρατηρήσεις, απαιτείται κατάλληλη εκπαίδευση του εν λόγω προσωπικού στο χρησιμοποιούμενο σύστημα βαθμολόγησης.

▼M7

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

Η βαθμολογία του οφθαλμικού ερεθισμού θα πρέπει να αξιολογείται σε συνδυασμό με το είδος και τη σοβαρότητα των βλαβών, καθώς και με το κατά πόσον αυτές είναι αναστρέψιμες. Οι επιμέρους βαθμοί δεν αντιπροσωπεύουν ένα απόλυτο πρότυπο για τις ερεθιστικές ιδιότητες των χημικών ουσιών, δεδομένου ότι αξιολογούνται και άλλες επιδράσεις της υπό δοκιμή ουσίας. Αντίθετα, θα πρέπει να θεωρούνται τιμές αναφοράς και έχουν αξία μόνον εφόσον τεκμηριώνονται με πλήρη περιγραφή και αξιολόγηση όλων των παρατηρήσεων.

Έκθεση δοκιμής

Στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται τα ακόλουθα στοιχεία:

Αιτιολόγηση της διεξαγωγής δοκιμής in vivo: ανάλυση βάρους της απόδειξης των δεδομένων που προϋπήρχαν, συμπεριλαμβανομένων των αποτελεσμάτων της στρατηγικής διαδοχικών δοκιμών:

— περιγραφή των σχετικών δεδομένων που έχουν προκύψει από προηγούμενες δοκιμές·

— δεδομένα που προέκυψαν σε κάθε στάδιο της στρατηγικής δοκιμών·

— περιγραφή των δοκιμών in vitro που πραγματοποιήθηκαν, με λεπτομέρειες για τις διαδικασίες και τα αποτελέσματα που ελήφθησαν με τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες/ουσίες αναφοράς·

— περιγραφή της μελέτης του δερματικού ερεθισμού/διάβρωσης in vivo που πραγματοποιήθηκε, καθώς και των αποτελεσμάτων της·

— ανάλυση βάρους της απόδειξης προκειμένου να διεξαχθεί μελέτη in vivo.

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

— δεδομένα ταυτοποίησης (π.χ. χημική ονομασία και αριθμός CAS, εφόσον υπάρχει, καθαρότητα, γνωστές ξένες προσμείξεις, πηγή, αριθμός παρτίδας)·

— φυσική μορφή και φυσικές και χημικές ιδιότητες (π.χ. pH, πτητικότητα, διαλυτότητα, σταθερότητα, αντίδραση με το νερό)·

— στην περίπτωση των μειγμάτων, θα πρέπει να προσδιορίζονται τα συστατικά, μεταξύ άλλων με δεδομένα ταυτοποίησης των συστατικών ουσιών (π.χ. χημικές ονομασίες και, εάν υπάρχουν, αριθμοί CAS), και οι συγκεντρώσεις τους·

— εφαρμοζόμενη δόση.

Φορέας:

— ταυτοποίηση, συγκέντρωση (κατά περίπτωση), όγκος που χρησιμοποιήθηκε·

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα.

Ζώα δοκιμής:

— είδος/φυλή που χρησιμοποιήθηκε, αιτιολόγηση της χρήσης άλλων ζώων αντί αλφικών κουνελιών·

— ηλικία κάθε ζώου κατά την έναρξη της μελέτης·

— αριθμός ζώων κάθε φύλου στις ομάδες δοκιμής και μαρτύρων (εφόσον απαιτούνται)·

— βάρος κάθε ζώου στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής·

— προέλευση των ζώων, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσιο κ.λπ.

▼**M7**

Αναισθητικά και αναλγητικά:

— δόσεις και χρόνοι χορήγησης τοπικών αναισθητικών και συστημικών αναλγητικών·

— εάν χρησιμοποιήθηκε τοπικό αναισθητικό, ταυτοποίηση, καθαρότητα, τύπος και πιθανή αλληλεπίδραση με την υπό δοκιμή χημική ουσία.

Αποτελέσματα:

— περιγραφή της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε για τη βαθμολόγηση του ερεθισμού σε κάθε χρονική στιγμή παρατήρησης (π.χ. φορητή σχισμοειδής λυχνία, βιομικροσκόπιο, φλουορεσκεΐνη)·

— καταχώριση σε πίνακα των δεδομένων που αφορούν την ερεθιστική/διαβρωτική απόκριση για κάθε ζώο σε κάθε χρονική στιγμή παρατήρησης μέχρι την απομάκρυνσή του από τη δοκιμή·

— αναλυτική περιγραφή του είδους και της έκτασης του ερεθισμού ή της διάβρωσης που παρατηρήθηκε·

— περιγραφή άλλων βλαβών που ενδεχομένως παρατηρήθηκαν στον οφθαλμό (π.χ. νεοαγγείωση, σχηματισμός πάννου, συμφύσεις, χρώση)·

— περιγραφή άλλων δυσμενών τοπικών επιδράσεων εκτός της περιοχής των οφθαλμών και συστημικών δυσμενών επιδράσεων, καταγραφή των κλινικών σημείων πόνου και δυσφορίας, ψηφιακές φωτογραφίες, καθώς και τυχόν ιστοπαθολογικά ευρήματα.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα των μελετών ερεθισμού των οφθαλμών που έχουν διεξαχθεί σε πειραματόζωα μπορούν να μεταφερθούν στον άνθρωπο μόνον ως ένα σημείο. Σε πολλές περιπτώσεις το αλφικό κουνέλι είναι πιο ευαίσθητο από τον άνθρωπο στα ερεθιστικά ή διαβρωτικά των οφθαλμών.

Κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων θα πρέπει να καταβάλλεται προσοχή για να μη λαμβάνεται υπόψη ο ερεθισμός που οφείλεται σε δευτεροπαθείς λοιμώξεις.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Barratt, M.D., *et al.* (1995), The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard, ECVAM Workshop Report 8, ATLA 23, 410 - 429.

(2) de Silva, O., *et al.* (1997), Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies, Food Chem. Toxicol 35, 159 - 164.

(3) Worth A.P. and Fentem J.H. (1999), A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161-177.

(4) Young, J.R., *et al.* (1988), Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals, Toxicol. *In Vitro*, 2, 19 - 26.

(5) Neun, D.J. (1993), Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH, J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227 - 231.

(6) Fentem, J.H., *et al.* (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, Toxicology *in vitro* 12, pp.483 - 524.

(7) Κεφάλαιο Β. 4 του παρόντος παραρτήματος, *Οξεία τοξικότητα, Ερεθισμός/διάβρωση του δέρματος*.

▼**M7**

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 19. (http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

(9) Wright EM, Marcella KL, Woodson JF. (1985), Animal pain: evaluation and control, Lab Animal, May/June, 20-36.

(10) National Research Council (NRC) (2008), Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals, Washington, DC: The National Academies Press.

(11) National Research Council (NRC) (2009), Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals, Washington, DC: The National Academies Press.

(12) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report: Recommendations for Routine Use of Topical Anesthetics, Systemic Analgesics, and Humane Endpoints to Avoid or Minimize Pain and Distress in Ocular Safety Testing, NIH Publication No. 10-7514. Research Triangle Park, NC, USA: National Institute of Environmental Health Sciences.

http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/OcuAnest- TMER.htm

(13) Κεφάλαιο Β.40 του παρόντος παραρτήματος, *Διάβρωση του δέρματος in vitro: δοκιμή διαδερμικής ηλεκτρικής αντίστασης (TER)*.

(14) Κεφάλαιο Β.40α του παρόντος παραρτήματος, *Διάβρωση του δέρματος in vitro: δοκιμή σε μοντέλο ανθρώπινου δέρματος*.

(15) OECD (2006), *Test No. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Paris.

(16) Κεφάλαιο Β. 47 του παρόντος παραρτήματος, *Μέθοδος δοκιμών αδιαφάνειας* και διαπερατότητας του βόειου κερατοειδούς για τον προσδιορισμό i) χημικών ουσιών που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη και ii) χημικών ουσιών που δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη.

(17) Κεφάλαιο Β. 48 του παρόντος παραρτήματος, Μέθοδος δοκιμών σε απομονωμένους οφθαλμούς ορνιθίων για τον προσδιορισμό i) χημικών ουσιών που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη και ii) χημικών ουσιών που δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη.

(18) U.S. EPA (2003), Label Review Manual: 3rd Edition, EPA737-B-96-001, Washington, DC: U.S., Environmental Protection Agency.

(19) UN (2011), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fourth revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications.

(20) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 16ης Δεκεμβρίου 2008 για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων, την τροποποίηση και την κατάργηση των οδηγιών 67/548/ΕΟΚ και 1999/45/ΕΚ και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006. Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης L353, 1-1355.

(21) ECHA Guidance on information requirements and chemical safety assessment, Chapter R.7a: Endpoint specific guidance.

http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

▼**M7**

Πίνακας 1

Διαβάθμιση των οφθαλμικών κακώσεων

Κερατοειδής	Βαθμός
Αδιαφάνεια: βαθμός θολερότητας (η μέτρηση θα πρέπει να λαμβάνεται από την πιο θολή περιοχή) (*)	
Καμία εξέλκωση ούτε αδιαφάνεια	0
Διάσπαρτες ή διάχυτες αδιαφανείς περιοχές (εκτός από ελαφρό θάμπωμα της φυσιολογικής στιλπνότητας)· σαφώς διακρινόμενες λεπτομέρειες της ίριδας	1
Ευδιάκριτη ημιδιαφανής περιοχή· ελαφρά συγκάλυψη των λεπτομερειών της ίριδας·	2
Μαργαροειδής περιοχή· πλήρης συγκάλυψη των λεπτομερειών της ίριδας· μόλις διακρινόμενο μέγεθος της κόρης	3
Αδιαφανής κερατοειδής· μη διακρινόμενη ίριδα	4
Μέγιστος δυνατός βαθμός: 4	
Ίριδα	
Φυσιολογική	0
Εμφανής βάθυνση των πτυχώσεων, συμφόρηση, οίδημα, μέτρια περικεράτια υπεραιμία·ή ένεση· φωτοευαίσθητη ίριδα (η καθυστέρηση αντίδρασης θεωρείται επίδραση)	1
Αιμορραγία, μακροσκοπικώς ορατή καταστροφή ή καμία αντίδραση στο φως	2
Μέγιστος δυνατός βαθμός: 2	
Επιπεφυκώς	
Ερυθρότητα (αναφέρεται στον βλεφαρικό και βολβικό επιπεφυκότα· εκτός του κερατοειδούς και της ίριδας)	
Φυσιολογικός	0
Υπεραιμία ορισμένων αιμοφόρων αγγείων (ένεση)	1
Διάχυτο πορφυρό χρώμα· δυσδιάκριτα τα επιμέρους αιμοφόρα αγγεία	2
Διάχυτο ερυθρό χρώμα βοείου κρέατος	3
Μέγιστος δυνατός βαθμός: 3	
Χήμωση	
Οίδημα (αναφέρεται στα βλέφαρα ή/και στη σκαρδαμυκτική μεμβράνη)	
Φυσιολογικό	0
Οίδημα ελαφρώς μεγαλύτερο του φυσιολογικού	1
Εμφανές οίδημα με μερική αναστροφή των βλεφάρων	2
Οίδημα με τα βλέφαρα σχεδόν ημίκλειστα	3
Οίδημα με τα βλέφαρα σχεδόν κλειστά	4
Μέγιστος δυνατός βαθμός: 4	

(*) Θα πρέπει να σημειώνεται η έκταση της αδιαφανούς περιοχής

▼M7

Προσάρτημα

ΟΡΙΣΜΟΙ

Όξινο/αλκαλικό απόθεμα: Για όξινα παρασκευάσματα, η ποσότητα (g) υδροξειδίου του νατρίου/100 g του παρασκευάσματος που απαιτείται για την επίτευξη συγκεκριμένου pH. Για αλκαλικά παρασκευάσματα, η ποσότητα (g) υδροξειδίου του νατρίου που ισοδυναμεί με τα g θειικού οξέος/100 g του παρασκευάσματος που απαιτούνται για την επίτευξη συγκεκριμένου pH (Young et al. 1988).

Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Μη ερεθιστικά: Ουσίες που δεν ταξινομούνται ως ερεθιστικές για τους οφθαλμούς κατηγορίας EPA I, II ή III· ή ουσίες ερεθιστικές για τους οφθαλμούς των κατηγοριών 1, 2, 2A ή 2B του GHS· ή των κατηγοριών 1 ή 2 της ΕΕ (17) (18) (19).

Διαβρωτικό των οφθαλμών: α) χημική ουσία που προκαλεί μη αναστρέψιμη βλάβη στους οφθαλμικούς ιστούς· β) χημικές ουσίες που ταξινομούνται ως ερεθιστικά των οφθαλμών, κατηγορίας 1 του GHS ή ερεθιστικές για τους οφθαλμούς κατηγορίας I της EPA ή κατηγορίας 1 της ΕΕ (17) (18) (19).

Ερεθιστικό των οφθαλμών: α) χημική ουσία που προκαλεί αναστρέψιμη βλάβη στους οφθαλμούς· β) χημικές ουσίες που ταξινομούνται ως ερεθιστικές για τους οφθαλμούς, κατηγορίας II ή III της EPA· ή ερεθιστικά των οφθαλμών ή κατηγορίας 2, 2A ή 2B του GHS· ή κατηγορίας 2 της ΕΕ (17) (18) (19).

Ισχυρό ερεθιστικό των οφθαλμών: α) χημική ουσία που προκαλεί βλάβη στους οφθαλμικούς ιστούς, η οποία δεν υποχωρεί εντός 21 ημερών από την εφαρμογή της ή προκαλεί σοβαρή φυσική εξασθένιση της όρασης· β) χημικές ουσίες που ταξινομούνται ως ερεθιστικές για τους οφθαλμούς κατηγορίας 1 του GHS ή ερεθιστικά των οφθαλμών κατηγορίας I της EPA ή κατηγορίας 1 της ΕΕ (17) (18) (19).

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Κλιμακωτή προσέγγιση: στρατηγική δοκιμών κατά στάδια, στο πλαίσιο της οποίας όλες οι υφιστάμενες πληροφορίες για μια υπό δοκιμή χημική ουσία εξετάζονται με συγκεκριμένη σειρά, με χρήση διαδικασίας βάρους της απόδειξης σε κάθε στάδιο, προκειμένου να διαπιστώνεται, πριν από τη μετάβαση στο επόμενο στάδιο, αν για μια απόφαση ταξινόμησης κινδύνου διατίθενται επαρκείς πληροφορίες. Εάν σε υπό δοκιμή χημική ουσία μπορεί να αποδοθεί δυναμικό ερεθιστικότητας βάσει των υφιστάμενων πληροφοριών, δεν απαιτούνται περαιτέρω δοκιμές. Εάν βάσει των υφιστάμενων πληροφοριών δεν είναι εφικτή η απόδοση δυναμικού ερεθιστικότητας σε υπό δοκιμή χημική ουσία, εφαρμόζεται κλιμακωτή διαδικασία διαδοχικών δοκιμών σε ζώα έως ότου καταστεί εφικτή η βέβαιη ταξινόμηση της ουσίας.

Ανάλυση βάρους της απόδειξης (διαδικασία): Τα δυνατά και τα αδύνατα σημεία μιας συλλογής πληροφοριών χρησιμοποιούνται ως βάση για την εξαγωγή συμπεράσματος το οποίο μπορεί να μην είναι προφανές από τα επιμέρους δεδομένα.

▼M7

ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ Β. 5 [1]

ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΔΙΑΔΟΧΙΚΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ ΓΙΑ ΕΡΕΘΙΣΜΟ ΚΑΙ ΔΙΑΒΡΩΣΗ ΤΩΝ ΟΦΘΑΛΜΩΝ

Γενικές παρατηρήσεις

Προς όφελος τόσο της ποιότητας του επιστημονικού έργου, όσο και της καλής μεταχείρισης των ζώων, έχει μεγάλη σημασία να αποφεύγεται η περιττή χρήση πειραματόζωων και να ελαχιστοποιείται η διεξαγωγή δοκιμών που είναι πιθανόν να τους προκαλέσουν σοβαρές αντιδράσεις. Πριν αντιμετωπιστεί το ενδεχόμενο διεξαγωγής δοκιμών in vivo, θα πρέπει να αξιολογούνται όλα τα στοιχεία που αφορούν τις πιθανές διαβρωτικές/ερεθιστικές επιδράσεις των χημικών ουσιών στους οφθαλμούς. Ενδέχεται να υπάρχουν ήδη αποδεικτικά στοιχεία που επαρκούν για την ταξινόμηση μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας από πλευράς διαβρωτικού ή ερεθιστικού για τους οφθαλμούς δυναμικού, χωρίς να είναι αναγκαία η διεξαγωγή δοκιμών σε πειραματόζωα. Η χρησιμοποίηση επομένως της ανάλυσης βάρους της απόδειξης και μιας στρατηγικής διαδοχικών δοκιμών ελαχιστοποιεί την ανάγκη διεξαγωγής δοκιμών in vivo, ιδίως εάν πιθανολογείται ότι η ουσία προκαλεί ισχυρές αντιδράσεις.

Συνιστάται η χρήση της ανάλυσης βάρους της απόδειξης για την αξιολόγηση των διαθέσιμων στοιχείων σχετικά με τον ερεθισμό και τη διάβρωση των οφθαλμών από χημικές ουσίες και για να κριθεί αν πρέπει να διεξαχθούν συμπληρωματικές μελέτες, εκτός από τις οφθαλμικές μελέτες in vivo, ώστε να διευκολυνθεί ο χαρακτηρισμός των συγκεκριμένων ιδιοτήτων. Εάν χρειάζονται περαιτέρω μελέτες, συνιστάται η εφαρμογή της στρατηγικής διαδοχικών δοκιμών για τη συλλογή των σχετικών πειραματικών δεδομένων. Στην περίπτωση των ουσιών που δεν έχουν υποβληθεί σε δοκιμές στο παρελθόν, η στρατηγική διαδοχικών δοκιμών θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τη συλλογή των δεδομένων που απαιτεί η αξιολόγηση της διαβρωτικής/ερεθιστικής για τους οφθαλμούς ικανότητας των ουσιών. Η αρχική στρατηγική δοκιμών που περιγράφεται στο παρόν συμπλήρωμα διαμορφώθηκε σε σεμινάριο εργασίας του ΟΟΣΑ (1). Στη συνέχεια επιβεβαιώθηκε και επεκτάθηκε στο Εναρμονισμένο Ολοκληρωμένο Σύστημα Ταξινόμησης Κινδύνων για τις Επιδράσεις των Χημικών Ουσιών στην Υγεία του ανθρώπου και στο Περιβάλλον, το οποίο εγκρίθηκε από την 28η κοινή συνεδρίαση της επιτροπής χημικών προϊόντων και της ομάδας εργασίας για τα χημικά προϊόντα, τον Νοέμβριο του 1998 (2), και επικαιροποιήθηκε από ομάδα εμπειρογνωμόνων του ΟΟΣΑ το 2011.

Η παρούσα στρατηγική δοκιμών δεν αποτελεί αναπόσπαστο μέρος της μεθόδου δοκιμών Β.5, αλλά εκφράζει τη συνιστώμενη προσέγγιση για τον προσδιορισμό των ερεθιστικών/διαβρωτικών για τους οφθαλμούς ιδιοτήτων. Η προσέγγιση αυτή αντιπροσωπεύει αφενός την ορθή πρακτική και, αφετέρου, ένα δεοντολογικό σημείο αναφοράς για τη διεξαγωγή δοκιμών οφθαλμικής διάβρωσης/ερεθισμού in vivo. Η μεθοδολογία δοκιμών παρέχει κατευθύνσεις για τη διεξαγωγή της δοκιμής in vivo και συγκεφαλαιώνει τους παράγοντες που θα πρέπει να εξετάζονται πριν αποφασιστεί η διενέργεια μιας τέτοιας δοκιμής. Η στρατηγική διαδοχικών δοκιμών παρέχει μια προσέγγιση βασισμένη στην ανάλυση βάρους της απόδειξης για την αξιολόγηση των διαθέσιμων δεδομένων σχετικά με τις ερεθιστικές/διαβρωτικές για τους οφθαλμούς ιδιότητες των χημικών ουσιών, καθώς και μια κλιμακωτή προσέγγιση για τη παραγωγή των σχετικών δεδομένων στην περίπτωση των χημικών ουσιών για τις οποίες χρειάζονται συμπληρωματικές μελέτες ή δεν έχουν εκπονηθεί μελέτες. Η εν λόγω στρατηγική περιλαμβάνει καταρχάς τη διεξαγωγή επικυρωμένων και αποδεκτών δοκιμών in vitro ή ex vivo και, στη συνέχεια, μελετών με τη μέθοδο δοκιμών Β.4 σε συγκεκριμένες περιστάσεις (3) (4).

Περιγραφή της κλιμακωτής στρατηγικής δοκιμών

Πριν από τη διεξαγωγή δοκιμών στο πλαίσιο της στρατηγικής διαδοχικών δοκιμών (διάγραμμα), θα πρέπει να αξιολογούνται όλα τα διαθέσιμα στοιχεία, προκειμένου να κριθεί αν είναι αναγκαίο να διεξαχθούν οφθαλμικές δοκιμές in vivo. Αν και είναι δυνατόν να προκύψουν σημαντικά στοιχεία από την αξιολόγηση

[1] Για τη χρήση στρατηγικής ολοκληρωμένων δοκιμών για τον ερεθισμό των οφθαλμών στο πλαίσιο του κανονισμού REACH, βλ. επίσης έγγραφο καθοδήγησης του ECHA σχετικά με τις απαιτούμενες πληροφορίες και την εκτίμηση χημικής ασφάλειας, κεφάλαιο R.7a: Endpoint specific guidance http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

▼M7

μεμονωμένων παραμέτρων (π.χ. ακραίες τιμές pH), θα πρέπει να εξετάζεται το σύνολο των υφισταμένων στοιχείων. Για να ληφθεί απόφαση με βάση ανάλυση βάρους της απόδειξης, θα πρέπει να αξιολογούνται όλα τα σημαντικά δεδομένα που αφορούν τις επιδράσεις της εκάστοτε χημικής ουσίας και των δομικών αναλόγων της και η απόφαση αυτή θα πρέπει να αιτιολογείται. Θα πρέπει να δίδεται έμφαση πρωτίστως στα διαθέσιμα δεδομένα για τις επιδράσεις χημικών ουσιών στον άνθρωπο και στα ζώα και, κατόπιν, στα αποτελέσματα δοκιμών in vitro ή ex vivo. Θα πρέπει να αποφεύγονται, στο μέτρο του δυνατού, οι μελέτες διαβρωτικών ουσιών in vivo. Οι παράγοντες που λαμβάνονται υπόψη στη στρατηγική δοκιμών περιλαμβάνουν:

Αξιολόγηση των υφιστάμενων δεδομένων για τις επιδράσεις στον άνθρωπο και στα ζώα και/ή των in vitro δοκιμών από επικυρωμένες και διεθνώς αποδεκτές μεθόδους (στάδιο 1).

Θα πρέπει να εξετάζονται πρώτα τα υφιστάμενα δεδομένα που αφορούν τον άνθρωπο, π.χ. από κλινικές μελέτες ή μελέτες επαγγελματικής έκθεσης και αναφορές περιστατικών, και/ή τα δεδομένα δοκιμών σε ζώα από οφθαλμικές μελέτες και/ή in vitro μελέτες από επικυρωμένες και διεθνώς αποδεκτές μεθόδους για τον ερεθισμό/τη διάβρωση των οφθαλμών, διότι αυτά παρέχουν πληροφορίες που αφορούν άμεσα τις επιδράσεις στους οφθαλμούς. Στη συνέχεια, θα πρέπει να αξιολογούνται τα διαθέσιμα δεδομένα από μελέτες στον άνθρωπο και/ή στα ζώα με αντικείμενο τη διερεύνηση του ερεθισμού/της διάβρωσης του δέρματος και/ή από μελέτες in vitro με επικυρωμένες και διεθνώς αποδεκτές μεθόδους για τη διάβρωση του δέρματος. Οι χημικές ουσίες που είναι γνωστά διαβρωτικά ή ισχυρά ερεθιστικά των οφθαλμών δεν θα πρέπει να ενσταλάζονται στους οφθαλμούς πειραματόζωων. Το ίδιο ισχύει για τις χημικές ουσίες που έχουν διαβρωτικές ή ισχυρές ερεθιστικές επιδράσεις στο δέρμα. Οι εν λόγω χημικές ουσίες θα πρέπει να θεωρούνται διαβρωτικές και/ή ερεθιστικές και για τους οφθαλμούς. Οι ουσίες για τις οποίες υπάρχουν επαρκή αποδεικτικά στοιχεία ότι δεν έχουν διαβρωτική ή ερεθιστική δράση, προερχόμενα από παλαιότερες οφθαλμικές μελέτες, δεν θα πρέπει επίσης να υποβάλλονται σε οφθαλμικές δοκιμές in vivo.

Ανάλυση της σχέσης δομής-δραστικότητας (SAR) (στάδιο 2).

Εάν υπάρχουν αποτελέσματα δοκιμών για ουσίες με παρεμφερή χημική δομή, αυτά θα πρέπει να εξετάζονται. Όταν τα διαθέσιμα δεδομένα για την επίδραση στον άνθρωπο και/ή στα ζώα ουσιών με παρεμφερή χημική δομή ή μειγμάτων τέτοιων ουσιών αρκούν για να καταδειχθεί το διαβρωτικό/ερεθιστικό για τους οφθαλμούς δυναμικό τους, είναι δυνατόν να υποτεθεί ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία προκαλεί την ίδια απόκριση. Στις περιπτώσεις αυτές, ίσως να μη χρειάζεται δοκιμή της χημικής ουσίας. Τα αρνητικά δεδομένα από μελέτες ουσιών με παρεμφερή χημική δομή ή μειγμάτων τέτοιων ουσιών δεν αποτελούν, βάσει της στρατηγικής διαδοχικών δοκιμών, επαρκή απόδειξη της απουσίας διαβρωτικής/ερεθιστικής ικανότητας μιας ουσίας. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται επικυρωμένες και αποδεκτές προσεγγίσεις SAR για τον προσδιορισμό του διαβρωτικού και του ερεθιστικού δυναμικού, τόσο ως προς το δέρμα όσο και ως προς τους οφθαλμούς.

Φυσικοχημικές ιδιότητες και χημική δραστικότητα (στάδιο 3).

Οι χημικές ουσίες που εμφανίζουν ακραίες τιμές pH, όπως ≤ 2,0 ή ≥11,5, είναι δυνατόν να έχουν ισχυρές τοπικές επιδράσεις. Εάν η ακραία τιμή pH χρησιμοποιείται ως βάση για τον χαρακτηρισμό μιας χημικής ουσίας ως διαβρωτικής ή ερεθιστικής για τους οφθαλμούς, μπορεί να λαμβάνεται υπόψη και το όξινο/αλκαλικό απόθεμά της (ρυθμιστική χωρητικότητα) (5) (6) (7). Εάν από τη ρυθμιστική χωρητικότητα συνάγεται ότι η χημική ουσία μπορεί να μην είναι διαβρωτική για τους οφθαλμούς (δηλ. χημικές ουσίες με ακραία τιμή pH και χαμηλό όξινο/αλκαλικό απόθεμα), θα πρέπει να διεξάγονται περαιτέρω δοκιμές για την επιβεβαίωση αυτής της υπόθεσης, κατά προτίμηση επικυρωμένες και αποδεκτές δοκιμές in vitro ή ex vivo (βλ. παράγραφο 10).

Μελέτη άλλων διαθέσιμων στοιχείων (στάδιο 4).

Στο στάδιο αυτό θα πρέπει να αξιολογούνται όλα τα διαθέσιμα στοιχεία σχετικά με τη συστημική τοξικότητα από τη δερματική οδό. Θα πρέπει επίσης να λαμβάνεται υπόψη η μέσω του δέρματος οξεία τοξικότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία έχει αποδειχθεί πολύ τοξική από τη δερματική οδό, μπορεί να μην χρειάζεται να υποβληθεί σε οφθαλμικές δοκιμές. Παρόλο που η οξεία τοξικότητα μέσω του δέρματος δεν σχετίζεται κατ' ανάγκη με τον ερεθισμό/τη διάβρωση των οφθαλμών, είναι δυνατόν να υποτεθεί ότι ένας

▼M7

παράγοντας υψηλής τοξικότητας από τη δερματική οδό θα έχει πολύ τοξική δράση και όταν ενσταλαχθεί στους οφθαλμούς. Η μελέτη των δεδομένων αυτών μπορεί επίσης να παρεμβληθεί μεταξύ των σταδίων 2 και 3.

Αξιολόγηση της δερματικής διαβρωτικής ικανότητας της χημικής ουσίας, εάν αυτό απαιτείται και για κανονιστικούς σκοπούς (στάδιο 5).

Το δυναμικό διάβρωσης και σοβαρού ερεθισμού του δέρματος θα πρέπει καταρχάς να αξιολογείται σύμφωνα με τη μέθοδο δοκιμών Β.4 (4) και το συνοδευτικό συμπλήρωμα (8), συμπεριλαμβανομένης της χρήσης επικυρωμένων και διεθνώς αποδεκτών μεθόδων δοκιμών in vitro για διάβρωση του δέρματος (9) (10) (11). Εάν αποδειχθεί ότι η χημική ουσία προκαλεί διάβρωση ή σοβαρό ερεθισμό του δέρματος, μπορεί επίσης να θεωρηθεί διαβρωτικό ή ισχυρό ερεθιστικό των οφθαλμών. Επομένως, δεν απαιτούνται περαιτέρω δοκιμές. Εάν η χημική ουσία δεν είναι διαβρωτικό ούτε ισχυρό ερεθιστικό του δέρματος, θα πρέπει να διεξάγεται δοκιμή in vitro ή ex vivo στους οφθαλμούς.

Αποτελέσματα δοκιμών in vitro ή ex vivo (στάδιο 6).

Οι χημικές ουσίες που έχουν εμφανίσει διαβρωτικές ή ισχυρές ερεθιστικές ιδιότητες σε δοκιμές in vitro ή ex vivo (12) (13), οι οποίες έχουν επικυρωθεί και είναι διεθνώς αποδεκτές ειδικά για την αξιολόγηση της διάβρωσης/του ερεθισμού των οφθαλμών, δεν χρειάζεται να ελέγχονται με δοκιμές σε ζώα. Τεκμαίρεται ότι οι εν λόγω χημικές ουσίες θα έχουν ανάλογες σοβαρές επιδράσεις και in vivo. Εάν δεν υπάρχουν επικυρωμένες και αποδεκτές δοκιμές in vitro/ex vivo, τα στάδια 5 και 6 παρακάμπτονται και εφαρμόζεται απευθείας το στάδιο 7.

Δοκιμή in vivo σε κουνέλια (στάδια 7 και 8):

Το πρώτο βήμα της οφθαλμικής δοκιμής in vivo θα πρέπει να είναι μια αρχική δοκιμή σε ένα μόνο ζώο. Εάν από τα αποτελέσματα αυτής της δοκιμής προκύπτει ότι η χημική ουσία είναι ισχυρό ερεθιστικό ή διαβρωτικό των οφθαλμών, δεν θα πρέπει να διεξάγονται άλλες δοκιμές. Εάν από αυτή τη δοκιμή δεν διαπιστωθούν διαβρωτικές ή ισχυρές ερεθιστικές επιδράσεις, διεξάγεται επιβεβαιωτική δοκιμή σε δύο επιπλέον ζώα. Ανάλογα με τα αποτελέσματα της επιβεβαιωτικής δοκιμής, ενδέχεται να απαιτούνται περαιτέρω δοκιμές. [βλ. μέθοδο δοκιμών Β.5]

▼M7

ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΔΟΚΙΜΩΝ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΓΙΑ ΕΡΕΘΙΣΜΟ/ΔΙΑΒΡΩΣΗ ΤΩΝ ΟΦΘΑΛΜΩΝ

	ΔΡΑΣΤΗΡΙΌΤΗΤΑ	ΕΥΡΉΜΑΤΑ	ΣΥΜΠΕΡΆΣΜΑ
1	Υφιστάμενα δεδομένα για τον άνθρωπο και τα ζώα και/ή δεδομένα δοκιμών in vitro με επικυρωμένες και διεθνώς αποδεκτές μεθόδους, τα οποία δείχνουν επιδράσεις στους οφθαλμούς.	Σοβαρή βλάβη των οφθαλμών	Κορυφαίο τελικό σημείο· η ουσία χαρακτηρίζεται διαβρωτικό των οφθαλμών. Δεν χρειάζονται δοκιμές.
		Ερεθιστικό των οφθαλμών	Κορυφαίο τελικό σημείο· η ουσία χαρακτηρίζεται ερεθιστικό των οφθαλμών. Δεν χρειάζονται δοκιμές.
		Μη διαβρωτικό/μη ερεθιστικό των οφθαλμών	Κορυφαίο τελικό σημείο· η ουσία χαρακτηρίζεται μη διαβρωτικό και μη ερεθιστικό των οφθαλμών. Δεν χρειάζονται δοκιμές.
	Υφιστάμενα δεδομένα για τον άνθρωπο και τα ζώα και/ή δεδομένα δοκιμών in vitro με επικυρωμένες και διεθνώς αποδεκτές μεθόδους, τα οποία δείχνουν διαβρωτικές επιδράσεις στο δέρμα	Διαβρωτικό του δέρματος	Τεκμαίρεται διαβρωτική επίδραση στους οφθαλμούς. Δεν χρειάζονται δοκιμές.
	Υφιστάμενα δεδομένα για τον άνθρωπο και τα ζώα και/ή δεδομένα δοκιμών in vitro με επικυρωμένες και διεθνώς αποδεκτές μεθόδους, τα οποία δείχνουν ισχυρές ερεθιστικές επιδράσεις στο δέρμα	Σοβαρό ερεθιστικό του δέρματος	Τεκμαίρεται ερεθιστική επίδραση στους οφθαλμούς. Δεν χρειάζονται δοκιμές.
	↓		
	Δεν υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία ή τα διαθέσιμα στοιχεία είναι αμφισβητήσιμα		
	↓		
2	Ανάλυση της σχέσης δομής-δραστικότητας (SAR) για διάβρωση/ερεθισμό των οφθαλμών	Πρόβλεψη σοβαρής βλάβης στους οφθαλμούς	Τεκμαίρεται διαβρωτική επίδραση στους οφθαλμούς. Δεν χρειάζονται δοκιμές.
		Πρόβλεψη ερεθισμού στους οφθαλμούς	Τεκμαίρεται ερεθιστική επίδραση στους οφθαλμούς. Δεν χρειάζονται δοκιμές.
	Ανάλυση SAR για διάβρωση του δέρματος	Πρόβλεψη διάβρωσης του δέρματος	Τεκμαίρεται διαβρωτική επίδραση στους οφθαλμούς. Δεν χρειάζονται δοκιμές.
	↓		
	Δεν είναι δυνατόν να γίνουν προβλέψεις ή οι προβλέψεις είναι αμφισβητήσιμες ή αρνητικές		
	↓		
3	Μέτρηση του pH (της ρυθμιστικής χωρητικότητας, εάν έχει σημασία)	pH ≤ 2 ή ≥ 11,5 (με μεγάλη ρυθμιστική χωρητικότητα, εάν έχει σημασία)	Τεκμαίρεται διαβρωτική επίδραση στους οφθαλμούς. Δεν χρειάζονται δοκιμές.
	↓		
	2 < pH < 11,5, ή pH ≤ 2,0 ή ≥ 11,5 με μικρή/μηδενική ρυθμιστική χωρητικότητα, εάν έχει σημασία		
	↓		
4	Εξέταση των υφιστάμενων δεδομένων συστημικής τοξικότητας από τη δερματική οδό	Υψηλή τοξικότητα στις συγκεντρώσεις που θα ελέγχονταν στους οφθαλμούς.	Η χημική ουσία είναι υπερβολικά τοξική για τη διεξαγωγή δοκιμών. Δεν χρειάζονται δοκιμές.

▼M7

	ΔΡΑΣΤΗΡΙΌΤΗΤΑ	ΕΥΡΉΜΑΤΑ	ΣΥΜΠΈΡΑΣΜΑ
	↓		
	Δεν υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία ή η χημική ουσία δεν είναι πολύ τοξική		
	↓		
5	Πειραματική αξιολόγηση του δυναμικού διάβρωσης του δέρματος σύμφωνα με τη στρατηγική δοκιμών του κεφαλαίου Β.4 του παρόντος παραρτήματος, εάν αυτό απαιτείται και για κανονιστικούς σκοπούς	Απόκριση διαβρωτικότητας ή σοβαρού ερεθισμού	Τεκμαίρεται ότι η ουσία είναι διαβρωτική για τους οφθαλμούς. Δεν χρειάζονται άλλες δοκιμές.
	↓		
	Η χημική ουσία δεν είναι διαβρωτική ούτε πολύ ερεθιστική για το δέρμα		
	↓		
6	Διεξαγωγή επικυρωμένων και αποδεκτών οφθαλμικών δοκιμών in vitro ή ex vivo	Απόκριση διαβρωτικότητας ή σοβαρού ερεθισμού	Τεκμαίρεται διαβρωτικότητα ή σοβαρός ερεθισμός των οφθαλμών, υπό την προϋπόθεση ότι η διεξαχθείσα δοκιμή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον χαρακτηρισμό διαβρωτικών/ισχυρών ερεθιστικών ουσιών και η χημική ουσία εμπίπτει στο πεδίο εφαρμογής της δοκιμής. Δεν χρειάζονται άλλες δοκιμές.
		Απόκριση ερεθισμού	Τεκμαίρεται ερεθισμός των οφθαλμών, υπό την προϋπόθεση ότι οι διεξαχθείσες δοκιμές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον ορθό χαρακτηρισμό διαβρωτικών, ισχυρών ερεθιστικών και ερεθιστικών ουσιών και η χημική ουσία εμπίπτει στο πεδίο εφαρμογής των δοκιμών. Δεν χρειάζονται άλλες δοκιμές.
		Απουσία απόκρισης ερεθισμού	Τεκμαίρεται ότι δεν υφίσταται ερεθισμός των οφθαλμών, υπό την προϋπόθεση ότι οι διεξαχθείσες δοκιμές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον ορθό χαρακτηρισμό των μη ερεθιστικών ουσιών, τη σωστή διάκρισή τους από τις χημικές ουσίες που είναι ερεθιστικά, ισχυρά ερεθιστικά ή διαβρωτικά των οφθαλμών και η χημική ουσία εμπίπτει στο πεδίο εφαρμογής της δοκιμής. Δεν χρειάζονται άλλες δοκιμές.
	↓		
	Δεν είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν επικυρωμένες και αποδεκτές οφθαλμικές δοκιμές in vitro ή ex vivo για να εξαχθεί συμπέρασμα		
	↓		

▼**M7**

	ΔΡΑΣΤΗΡΙΌΤΗΤΑ	ΕΥΡΉΜΑΤΑ	ΣΥΜΠΕΡΆΣΜΑ
7	Διεξαγωγή αρχικής οφθαλμικής δοκιμής in vivo σε κουνέλια με χρήση μόνον ενός ζώου	Σοβαρή βλάβη των οφθαλμών	Η ουσία χαρακτηρίζεται διαβρωτική για τους οφθαλμούς. Δεν χρειάζονται άλλες δοκιμές.
	↓		
	Απουσία σοβαρής βλάβης ή απουσία απόκρισης		
	↓		
8	Διεξαγωγή επιβεβαιωτικής δοκιμής σε ένα ή δύο επιπλέον ζώα	Διαβρωτικό ή ερεθιστικό	Η ουσία χαρακτηρίζεται διαβρωτικό ή ερεθιστικό των οφθαλμών. Δεν χρειάζονται περαιτέρω δοκιμές.
		Ούτε διαβρωτικό ούτε ερεθιστικό	Η ουσία χαρακτηρίζεται μη διαβρωτικό και μη ερεθιστικό των οφθαλμών. Δεν χρειάζονται περαιτέρω δοκιμές.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22 - 24 January 1996 (http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm).

(2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(3) Worth, A.P. and Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, 161-177.

(4) Κεφάλαιο B.4 του παρόντος παραρτήματος, Οξεία τοξικότητα, Ερεθισμός/διάβρωση του δέρματος.

(5) Young, J.R., How, M J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro*, 2, 19 - 26.

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxic. Toxicology *in vitro* 12, pp.483 - 524.

(7) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227 - 231.

(8) Συμπλήρωμα του κεφαλαίου B.4 του παρόντος παραρτήματος: Στρατηγική διαδοχικών δοκιμών (ακολουθιακός έλεγχος) για ερεθισμό και διάβρωση του δέρματος.

(9) Κεφάλαιο B.40 του παρόντος παραρτήματος: Διάβρωση του δέρματος in vitro: δοκιμή διαδερμικής ηλεκτρικής αντίστασης (TER).

(10) Κεφάλαιο B.40α του παρόντος παραρτήματος: Διάβρωση του δέρματος in vitro: δοκιμή σε μοντέλο ανθρώπινου δέρματος.

(11) OECD (2006), *Test No. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Paris.

▼**M7**

(12) Κεφάλαιο Β.47 του παρόντος παραρτήματος, Μέθοδος δοκιμών αδιαφάνειας και διαπερατότητας του βόειου κερατοειδούς για τον προσδιορισμό i) χημικών ουσιών που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη και ii) χημικών ουσιών που δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη.

(13) Κεφάλαιο Β.48 του παρόντος παραρτήματος, Μέθοδος δοκιμών σε απομονωμένους οφθαλμούς ορνιθίων για τον προσδιορισμό i) χημικών ουσιών που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη και ii) χημικών ουσιών που δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη.

▼B

B.6 ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Παρατηρήσεις

Η ευαισθησία των δοκιμών και η ικανότητά τους να ανιχνεύσουν πιθανούς ευαισθητοποιητές του δέρματος του ανθρώπου θεωρούνται σημαντικά στοιχεία για ένα σύστημα ταξινόμησης της τοξικότητας που αφορά τη δημόσια υγεία.

Δεν υπάρχει μία ενιαία μέθοδος δοκιμής που να προσδιορίζει επαρκώς όλες τις ουσίες οι οποίες δύνανται να προκαλέσουν ευαισθητοποίηση του δέρματος του ανθρώπου και που να είναι κατάλληλη για όλες τις ουσίες.

Στην επιλογή μιας δοκιμής, πρέπει να ληφθούν υπόψη παράγοντες όπως τα φυσικά χαρακτηριστικά μιας ουσίας συμπεριλαμβανομένης και της ικανότητας της να διεισδύει στο δέρμα.

Έχουν αναπτυχθεί δύο τύποι δοκιμών που χρησιμοποιούν ινδικά χοιρίδια; οι δοκιμές με βοηθητική ουσία, όπου μια αλλεργική κατάσταση ενεργοποιείται με τη διάλυση ή την παρασκευή εναιωρήματος της εξεταζόμενης ουσίας στο Freunds Complete Adjuvant (FCA) και οι δοκιμές χωρίς βοηθητική ουσία.

Οι δοκιμές με βοηθητική ουσία είναι ενδεχομένως πιο ακριβείς στην πρόβλεψη πιθανής ευαισθητοποιητικής αντίδρασης μιας ουσίας στο δέρμα του ανθρώπου, σε σχέση με τις μεθόδους στις οποίες δεν χρησιμοποιείται FCA και κατά συνέπεια προτιμώνται.

Η δοκιμή μεγιστοποίησης σε ινδικό χοιρίδιο (ΔΜΙΧ) είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη δοκιμή με βοηθητική ουσία. Αν και μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες μέθοδοι για την ανίχνευση της δυνατότητας μιας ουσίας να προκαλέσει αντίδραση ευαισθητοποίησης του δέρματος, η ΔΜΙΧ θεωρείται ότι είναι η προτιμότερη τεχνική με βοηθητική ουσία.

Για πολλές τάξεις χημικών ουσιών, οι δοκιμές χωρίς βοηθητική ουσία (από αυτές προτιμάται η δοκιμή Buehler) θεωρούνται λιγότερο ευαίσθητες.

Σε ορισμένες περιπτώσεις είναι σκόπιμο να επιλεγεί η δοκιμή Buehler η οποία περιλαμβάνει τοπική εφαρμογή αντί της ενδοδερμικής έγχυσης που χρησιμοποιείται στη ΔΜΙΧ. Η χρησιμοποίηση της δοκιμής Buehler πρέπει να αιτιολογείται επιστημονικά.

Στη μέθοδο αυτή περιγράφονται η δοκιμή μεγιστοποίησης σε ινδικά χοιρίδια (ΔΜΙΧ) και η δοκιμή Buehler. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες μέθοδοι με την προϋπόθεση ότι είναι έγκυρες και ότι αιτιολογούνται επιστημονικά.

Εάν προκύψει θετικό αποτέλεσμα από μία αξιόπιστη προκαταρκτική δοκιμή, η ελεγχόμενη ουσία μπορεί να χαρακτηρισθεί ως εν δυνάμει ευαισθητοποιός και ενδέχεται να μην είναι αναγκαία η διεξαγωγή ΔΜΙΧ. Ωστόσο, εάν προκύψει αρνητικό αποτέλεσμα σε μία τέτοια δοκιμή, θα πρέπει να γίνει η ΔΜΙΧ σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται κατωτέρω.

Βλέπε επίσης γενική εισαγωγή, μέρος Β.

▼B

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Ευαισθητοποίηση δέρματος: (αλλεργική δερματίτις εξ επαφής) δερματική αντίδραση ανοσολογικής φύσεως σε μια ουσία. Στον άνθρωπο, η αντίδραση αυτή μπορεί να χαρακτηρίζεται από κνησμό, ερύθημα, οίδημα, βλατίδες, φυσαλίδες, πομφόλυγες ή συνδυασμό αυτών. Σε άλλα είδη, οι αντιδράσεις είναι δυνατόν να διαφέρουν και να εμφανίζεται μόνο ερύθημα ή οίδημα

Έκθεση διέγερσης: πειραματική έκθεση υποκειμένου στην ελεγχόμενη ουσία με σκοπό την πρόκληση κατάστασης υπερευαισθησίας.

Περίοδος διέγερσης: περίοδος μιας τουλάχιστον εβδομάδας μετά την έκθεση διέγερσης κατά τη διάρκεια της οποίας είναι δυνατόν να εκδηλωθεί υπερευαισθησία.

Έκθεση πρόκλησης: πειραματική έκθεση, μετά την περίοδο διέγερσης, υποκειμένου εκτεθέντος προηγουμένως σε εξεταζόμενη ουσία, προκειμένου να διαπιστωθεί αν το υποκείμενο αυτό αντιδρά με υπερευαισθησία.

1.3. ΟΥΣΙΑΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Η ευαισθησία και η αξιοπιστία της χρησιμοποιηθείσας πειραματικής τεχνικής πρέπει να αξιολογούνται ανά εξάμηνο με τη χρήση ουσιών οι οποίες είναι γνωστό ότι μπορούν να προκαλέσουν ήπια έως μέτρια ευαισθητοποίηση του δέρματος.

Εφόσον η δοκιμή έχει διεξαχθεί ορθά, θα πρέπει να αναμένεται για τους ήπιους έως μέτριους ευαισθητοποιητές ποσοστό απόκρισης τουλάχιστον 30 % στις δοκιμές με βοηθητική ουσία και τουλάχιστον 15 % στις δοκιμές χωρίς βοηθητική ουσία.

Προτιμούνται οι ακόλουθες ουσίες

Αριθ. CAS	Αρθ EINECS	Ονομασία EINECS	Κοινή Ονομασία
101-86-0	202-983-3	α-εξυλοκινναμαλδεύδη	α-εξυλοκινναμαλδεύδη
149-30-4	205-736-8	βενζοσειαζολο-2-θειόλη (μερκαπτοβενζοθειαζόλη)	kaptax
94-07-7	202-303-5	δενζοκαΐνη	νορκαίνη

Σε ορισμένες δεόντως αιτιολογημένες περιπτώσεις είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν άλλες ουσίες που πληρούν τα προαναφερθέντα κριτήρια.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Τα πειραματόζωα εκτίθενται αρχικά στη δοκιμαζόμενη ουσία με ενδοδερμικές ενέσεις και/ή επιδερμική επίθεση (έκθεση διέγερσης). Μετά από μια περίοδο ανάπαυσης 10 έως 14 ημερών (περίοδος διέγερσης), κατά τη διάρκεια της οποίας είναι δυνατόν να εμφανιστεί ανοσολογική αντίδραση, τα ζώα εκτίθενται σε μια δόση πρόκλησης Η έκταση και ο βαθμός της δερματικής αντίδρασης των πειραματοζώων στην έκθεση πρόκλησης συγκρίνεται με την αντίστοιχη αντίδραση των ζώων μαρτύρων τα οποία αφού εκτεθούν σε σκεύασμα placebo (κατά τη διέγερση) υποβάλλονται σε έκθεση πρόκλησης.

1.5. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΔΟΚΙΜΗΣ

Σε περίπτωση που απαιτείται απομάκρυνση της ελεγχόμενης ουσίας από το δέρμα, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί νερό ή κατάλληλος διαλύτης ώστε να μην αλλοιωθεί η εμφανισθείσα αντίδραση και να διατηρηθεί η ακεραιότητα της επιδερμίδας

▼B

1.5.1. *Δοκιμή μεγιστοποίησης σε ινδικό χοιρίδιο (ΔΜΙΧ)*

1.5.1.1. Προετοιμασία

Υγιή νεαρά ενήλικα ινδικά χοιρίδια (albino) εγκλιματίζονται στις συνθήκες του εργαστηρίου επί 5 τουλάχιστον ημέρες πριν από την έναρξη της δοκιμής Πριν από τη δοκιμή τα ζώα λαμβάνονται τυχαία και χωρίζονται σε ομάδες αγωγής Το τρίχωμα αφαιρείται με κούρεμα, ξύρισμα ή, εφ όσον είναι δυνατόν, με χημική αποτρίχωση, ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο δοκιμής Λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγεται η λύση της συνεχείας του δέρματος. Τα ζώα ζυγίζονται πριν από την έναρξη της δοκιμής και στο τέλος της·

1.5.1.2. Συνθήκες δοκιμής

1.5.1.2.1. Πειραματόζωα

Χρησιμοποιούνται συνήθεις φυλές ινδικών χοιριδίων albino εργαστηρίου.

1.5.1.2.2. Αριθμός και φύλο

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν αρσενικά και/ή θηλυκά ζώα. Αν χρησιμοποιηθούν θηλυκά, αυτά θα πρέπει να είναι άτοκα και να μην ευρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης.

Για την ομάδα αγωγής χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 10 ζώα και για την ομάδα των μαρτύρων τουλάχιστον 5 ζώα. Όταν έχουν χρησιμοποιηθεί λιγότερα από 20 πειραματόζωα και λιγότερα από 10 ζώα-μάρτυρες και δεν είναι δυνατόν να συναχθεί συμπέρασμα για την ευαισθητοποιώ δράση της ουσίας, συνιστάται ιδιαιτέρως η διεξαγωγή δοκιμής και με άλλα ζώα ώστε να συμπληρωθεί ο αριθμός των 20 πειραματόζωων και 10 μαρτύρων τουλάχιστον.

1.5.1.2.3. Επίπεδα δόσεων

Η χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση δοκιμαζόμενης ουσίας σε κάθε έκθεση διέγερσης πρέπει να είναι καλώς ανεκτή διασυστημικά και να αντιπροσωπεύει την υψηλότερη συγκέντρωση που προκαλεί ήπιο έως μέτριας εντάσεως ερεθισμό του δέρματος. Η χρησιμοποιούμενη στην έκθεση πρόκλησης συγκέντρωση πρέπει να αντιπροσωπεύει την υψηλότερη δόση που δεν προκαλεί ερεθισμό. Εφ όσον απαιτείται, οι κατάλληλες συγκεντρώσεις προσδιορίζονται από πιλοτική μελέτη με 2 ή 3 πειραματόζωα. Για το σκοπό αυτό, είναι σκόπιμο να χρησιμοποιούνται ζώα που έχουν υποβληθεί σε αγωγή με FCA.

1.5.1.3. Διαδικασία

1.5.1.3.1. Διέγερση

Ημέρα 0 — ομάδα αγωγής

Στην περιοχή του ώμου από την οποία έχει αφαιρεθεί προηγουμένως το τρίχωμα διενεργούνται τρία ζεύγη ενδοδερμικών ενέσεων των 0,1 ml, το καθένα εκατέρωθεν της σπονδυλικής στήλης.

Ένεση 1: μείγμα FCA/νερό ή φυσιολογικό ορό αναλογίας 1:1 (v/v).

Ένεση 2: επιλεγμένη συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας σε κατάλληλο φορέα.

Ένεση 3: παρασκεύασμα της ελεγχόμενης ουσίας στην επιλεγμένη συγκέντρωση σε μείγμα FCA/νερό ή φυσιολογικό ορό αναλογίας 1:1 (v/v).

Στην ένεση 3, οι υδατοδιαλυτές ουσίες διαλύονται στην υδατική φάση προτού αναμειχθούν με το FCA. Για τις λιποδιαλυτές ή αδιάλυτες ουσίες, σχηματίζεται εναιώρημα στο FCA προτού αναμειχθούν με την υδατική φάση. Η τελική συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας ισούται με εκείνη της ένεσης 2.

▼B

Οι ενέσεις 1 και 2 διενεργούνται σε μικρή απόσταση μεταξύ τους πολύ κοντά στο κεφάλι ενώ η ένεση 3 διενεργείται προς το ουραίο τμήμα της εξεταζόμενης περιοχής.

Ημέρα 0 — ομάδα μάρτυρας

Διενεργούνται τρία ζεύγη ενδοδερμικών ενέσεων των 0,1 ml στις ίδιες θέσεις με την ομάδα αγωγής.

Ένεση 1: μείγμα FCA/νερό ή φυσιολογικό ορό αναλογίας 1:1 (v/v).

Ένεση 2: μη αραιωμένος φορέας

Ένεση 3: παρασκεύασμα του φορέα σε συγκέντρωση 50 % w/v σε μείγμα FCA και νερού ή φυσιολογικού ορού αναλογίας 1:1 (v/v).

5η-7η ημέρα — ομάδα αγωγής και ομάδα μάρτυρας

Σε περίπτωση που η ουσία δεν είναι ερεθιστική για το δέρμα, είκοσι τέσσερις περίπου ώρες πριν αχό την τοπική εφαρμογή διέγερσης, και αφού προηγηθεί κούρεμα και/ή ξύρισμα του τριχώματος της εξεταζόμενης περιοχής αυτή επιχρίεται με 0,5 ml 10 % δωδεκυλοθειικού νατρίου σε βαζελίνη, προκειμένου να προκληθεί τοπικός ερεθισμός.

6η-8η ημέρα — ομάδα αγωγής

Αφαιρείται και πάλι το τρίχωμα από την εξεταζόμενη περιοχή. Διηθητικό χαρτί διαστάσεων 2 cm × 4 cm κορέννυται με την ελεγχόμενη ουσία σε κατάλληλο φορέα, εφαρμόζεται στην εξεταζόμενη περιοχή και διατηρείται σε επαφή με το δέρμα επί 48 ώρες με πιεστικό επίδεσμο. Η επιλογή του φορέα πρέπει να αιτιολογείται. Ουσίες σε στερεή μορφή λεπτοκονιοποιούνται και ενσωματώνονται σε κατάλληλο φορέα. Υγρές ουσίες μπορούν να εφαρμόζονται χωρίς προηγούμενη αραίωση, εφόσον είναι σκόπιμο.

6η-8η ημέρα — ομάδα μάρτυρας

Αφαιρείται και πάλι το τρίχωμα από την εξεταζόμενη περιοχή στην οποία εφαρμόζεται στη συνέχεια μόνον ο φορέας με τον τρόπο που περιγράφεται ανωτέρω, και διατηρείται σε επαφή με το δέρμα επί 48 ώρες με αδιαπέραστο επίδεσμο.

1.5.1.3.2. Πρόκληση

20ή-22η ημέρα — ομάδα αγωγής και ομάδα μάρτυρας

Αφαιρείται το τρίχωμα από τις πλευρές των ζώων της ομάδας αγωγής και της ομάδας μαρτύρων. Στη μία πλευρά των ζώων εφαρμόζεται επίθεμα ή κάψουλα με την ελεγχόμενη ουσία και εφόσον είναι σκόπιμο, στην άλλη πλευρά εφαρμόζεται επίθεμα ή κάψουλα που περιέχει μόνο φορέα. Τα επιθέματα διατηρούνται σε επαφή με το δέρμα επί 24 ώρες με αδιαπέραστο επίδεσμο.

1.5.1.3.3. Παρατήρηση και βαθμολόγηση: ομάδα αγωγής και ομάδα μάρτυρας

— 21 περίπου ώρες μετά την απομάκρυνση του επιθέματος η περιοχή πρόκλησης καθαρίζεται, κουρεύεται και/ή ξυρίζεται και αποτριχώνεται εάν είναι αναγκαίο,

— 3 περίπου ώρες αργότερα (περίπου 48 ώρες από την έναρξη της πρόκλησης) παρατηρείται η αντίδραση του δέρματος και καταγράφεται σύμφωνα με τους βαθμούς του προσαρτήματος,

— 24 περίπου ώρες μετά την παρατήρηση αυτή, διενεργείται δεύτερη παρατήρηση (72 ώρες) η οποία και καταγράφεται.

Συνιστάται τυφλή ανάγνωση των αποτελεσμάτων από τα ζώα δοκιμής και τους μάρτυρες.

Εάν απαιτείται αποσαφήνιση των ληφθέντων αποτελεσμάτων από την πρώτη πρόκληση, θα πρέπει να εξεταστεί το ενδεχόμενο διεξαγωγής δεύτερης πρόκλησης (επαναπρόκλήση), μια εβδομάδα περίπου μετά την πρώτη, με νέα ομάδα μάρτυρα, εφόσον είναι αναγκαίο. Επαναπρόκληση μπορεί να διεξαχθεί και με την αρχική ομάδα μάρτυρα.

▼B

Όλες οι δερματικές αντιδράσεις και τα ασυνήθη ευρήματα, συμπεριλαμβανομένων των διασυστημικών αντιδράσεων, που προκύπτουν από τις διαδικασίες διέγερσης και πρόκλησης πρέπει να παρατηρούνται και να καταγράφονται σύμφωνα με την κλίμακα Magnusson/Kligman (βλ. προσάρτημα). Για την αποσαφήνιση αμφισβητήσιμων αντιδράσεων μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλες διαδικασίες όπως η ιστοπαθολογική εξέταση ή η μέτρηση του πάχους των πτυχώσεων του δέρματος.

1.5.2. *Δοκιμή Buehler*

1.5.2.1. Προετοιμασία

Υγιή νεαρά ενήλικα ινδικά χοιρίδια albino εγκλιματίζονται στις συνθήκες του εργαστηρίου επί 5 τουλάχιστον ημέρες πριν από την έναρξη της δοκιμής. Πριν από τη δοκιμή, τα ζώα λαμβάνονται τυχαία και χωρίζονται σε ομάδες αγωγής. Το τρίχωμα αφαιρείται με κούρεμα, ξύρισμα ή, εφ' όσον είναι δυνατόν με χημική αποτρίχωση, ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο δοκιμής, Λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγεται η λύση της συνεχείας του δέρματος. Τα ζώα ζυγίζονται πριν από την έναρξη της δοκιμής και στο τέλος της.

1.5.2.2. Συνθήκες δοκιμής

1.52.2.1. Πειραματόζωα

Χρησιμοποιούνται συνήθεις φυλές ινδικών χοιριδίων albino εργαστηρίου.

1.5.2.2.2. Αριθμός και φύλο

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν αρσενικά και/ή θηλυκά ζώα. Αν χρησιμοποιηθούν θηλυκά, αυτά πρέπει να είναι άτοκα και να μην ευρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης

Για την ομάδα αγωγής χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 20 ζώα και για την ομάδα των μαρτύρων τουλάχιστον 10 ζώα.

1.5.2.2.3. Επίπεδα δόσεων

Η χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση δοκιμαζόμενης ουσίας σε κάθε έκθεση διέγερσης πρέπει να αντιπροσωπεύει την υψηλότερη δυνατή συγκέντρωση που προκαλεί ήπιο αλλά όχι υπέρμετρο ερεθισμό. Η χρησιμοποιούμενη στην έκθεση πρόκλησης συγκέντρωση πρέπει να αντιπροσωπεύει την υψηλότερη δόση που δεν προκαλεί ερεθισμό. Εφόσον απαιτείται, οι κατάλληλες συγκεντρώσεις προσδιορίζονται από πιλοτική μελέτη με 2 ή 3 πειραματόζωα.

Για τις υδατοδιαλυτές ουσίες ως φορέας συνίσταται το νερό ή αραιό διάλυμα μη ερεθιστικής τασιενεργού ουσίας. Για τις άλλες ελεγχόμενες ουσίες προτιμάται η χρήση μείγματος 80 % αιθανόλης/νερού στην έκθεση διέγερσης και ακετόνης στην έκθεση πρόκλησης

1.5.2.3. Διαδικασία

1.5.2.3.1. Διέγερση

Ημέρα 0 — ομάδα αγωγής

Αφαιρείται το τρίχωμα από τη μια πλευρά του ζώου {με κούρεμα). Το επίθεμα δοκιμής κορέννυται με ελεγχόμενη ουσία, σε κατάλληλο φορέα (η επιλογή του φορέα πρέπει να αιτιολογείται· υγρές ουσίες μπορούν να χρησιμοποιούνται, αν είναι σκόπιμο, χωρίς προηγούμενη αραίωση). Το επίθεμα δοκιμής εφαρμόζεται επί της εξεταζόμενης περιοχής και διατηρείται σε επαφή με το δέρμα επί 6 ώρες με τη βοήθεια αδιαπέραστου επιδέσμου ή κάψουλας και καταλλήλου επιδέσμου.

▼B

Το επίθεμα δοκιμής πρέπει να είναι αδιαπέραστο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί στρογγυλό ή τετράγωνο επικάλλυμα από βαμβάκι διαστάσεων 4-6 cm^2 περίπου. Θεωρείται σκόπιμη η χρησιμοποίηση διάταξης συγκράτησης για την εξασφάλιση της αδιαπερατότητας. Σε περίπτωση περιτύλιξης της υπό αγωγή περιοχής ενδέχεται να απαιτηθούν επιπλέον εκθέσεις στην ουσία.

Ημέρα 0 — ομάδα μάρτυρας

Αφαιρείται το τρίχωμα από τη μια πλευρά του ζώου (με κούρεμα). Εφαρμόζεται μόνον ο φορέας με τον τρόπο που περιγράφεται για την ομάδα αγωγής. Το επίθεμα δοκιμής διατηρείται σε επαφή με το δέρμα επί 6 ώρες με τη βοήθεια αδιαπέραστου επιδέσμου ή κάψουλας και κατάλληλου επιδέσμου. Εάν είναι δυνατόν να αποδειχθεί ότι η δοκιμή με σκεύασμα placebo σε ομάδα μάρτυρα δεν είναι αναγκαία, επιτρέπεται να χρησιμοποιηθεί ομάδα μάρτυρας στην οποία δεν χορηγείται καμία ουσία.

6η-8η και I3η-!5η ημέρα — ομάδα αγωγής και ομάδα μάρτυρας

την 6η-8η ημέρα και επίσης την 13η-15η ημέρα, πραγματοποιείται η ίδια εργασία όπως και την ημέρα 0 στην ίδια εξεταζόμενη περιοχή (μετά από αφαίρεση του τριχώματος αν είναι αναγκαίο) της ίδιας πλευράς.

1.5.2.3.2. Πρόκληση

27η-29η ημέρα — ομάδα αγωγής και ομάδα μάρτυρας

Αφαιρείται το τρίχωμα (με κούρεμα) από την άλλη πλευρά των ζώων αγωγής και ζώων μαρτύρων η οποία δεν έχει εκτεθεί στην ελεγχόμενη ουσία. Στο οπίσθιο τμήμα της πλευράς αυτής εφαρμόζεται αδιαπέραστος επίδεσμος ή κάψουλα που περέχει κατάλληλη ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας στη μέγιστη συγκέντρωση που δεν προκαλεί ερεθισμό.

Όταν είναι σκόπιμο, εφαρμόζεται στο εμπρόσθιο μέρος της ίδιας πλευράς των ζώων αγωγής και των ζώων μαρτύρων αδιαπέραστος επίδεσμος ή κάψουλα που περιέχει μόνο φορέα. Τα επιθέματα ή οι κάψουλες διατηρούνται σε επαφή με το δέρμα επί 6 ώρες με τη βοήθεια κατάλληλου επιδέσμου.

1.5.2.3.3. Παρατήρηση και βαθμολόγηση

— περίπου 21 ώρες μετά την απομάκρυνση του επιθέματος αφαιρείται το τρίχωμα από την περιοχή πρόκλησης,

— περίπου τρεις ώρες αργότερα (δηλαδή 30 περίπου ώρες μετά την εφαρμογή του επιθέματος πρόκλησης) παρατηρούνται οι αντιδράσεις του δέρματος και καταγράφονται σύμφωνα με τους βαθμούς του προσαρτήματος,

— περίπου 24 ώρες μετά την τριαντακοντάωρη παρατήρηση (δηλαδή 54 περίπου ώρες μετά την εφαρμογή του επιθέματος πρόκλησης) παρατηρούνται εκ νέου και καταγράφονται οι αντιδράσεις του δέρματος.

Συνίσταται τυφλή ανάγνωση των αποτελεσμάτων από τα ζώα δοκιμής και τους μάρτυρες.

Εάν απαιτείται αποσαφήνιση των ληφθέντων αποτελεσμάτων από την πρώτη πρόκληση, θα πρέπει να εξεταστεί το ενδεχόμενο διεξαγωγής δεύτερης πρόκλησης (επαναπρόκληση), μια εβδομάδα περίπου μετά την πρώτη, με νέα ομάδα μάρτυρα, εφόσον είναι αναγκαίο. Επαναπρόκληση μπορεί να διεξαχθεί και με την αρχική ομάδα μάρτυρα.

▼B

Όλες οι δερματικές αντιδράσεις και τα ασυνήθη ευρήματα, συμπεριλαμβανομένων των διασυστημικών αντιδράσεων, που προκύπτουν από τις διαδικασίες διέγερσης και πρόκλησης πρέπει να παρατηρούνται και να καταγράφονται σύμφωνα με την κλίμακα Magnusson/Kligman (βλέπε προσάρτημα). Για την αποσαφήνιση αμφισβητήσιμων αντιδράσεων μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλες διαδικασίες όπως η ιστοπαθολογική εξέταση ή η μέτρηση του πάχους των πτυχώσεων του δέρματος.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ (ΔΜΙΧ ΚΑΙ ΔΟΚΙΜΗ BUEHLER)**

Τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα στον οποίο παρουσιάζονται για κάθε ζώο οι δερματικές αντιδράσεις που αντιστοιχούν σε κάθε παρατήρηση.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ (ΔΜΙΧ ΚΑΙ ΔΟΚΙΜΗ BUEHLER)**

Σε περίπτωση που πραγματοποιήθηκε προκαταρκτική δοκιμή πριν από τη δοκιμή με ινδικά χοιρίδια παρέχονται περιγραφή ή τα στοιχεία αναφοράς της δοκιμής (επί παραδείγματι, δοκιμή τοπικού λεμφαδένα — LLNA, δοκιμή οιδήματος αυτιού ποντικού — MEST) συμπεριλαμβανομένων των λεπτομερειών της διαδικασίας καθώς και τα αποτελέσματα που ελήφθησαν τόσο με την ελεγχόμενη ουσία όσο και με τις ουσίες αναφοράς.

Έκθεση δοκιμής (ΔΜΙΧ και δοκιμή Buehler)

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει, εφόσον είναι δυνατόν, τις ακόλουθες πληροφορίες.

Για τα πειραματόζωα:

— φυλή των χρησιμοποιηθέντων ινδικών χοιριδίων,

— αριθμός ηλικία και φύλο των ζώων,

— προέλευση, συνθήκες στέγασης διατροφής κ.λπ.,

— βάρος κάθε ζώου κατά την έναρξη της δοκιμής.

Για τις συνθήκες δοκιμής:

— τεχνική προετοιμασίας της περιοχής εφαρμογής της ουσίας,

— λεπτομέρειες σχετικά με το επιδεσμικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε και την τεχνική της εφαρμογής του,

— αποτέλεσμα της πιλοτικής μελέτης και πόρισμα σχετικά με τις συγκεντρώσεις διέγερσης και πρόκλησης που πρέπει να χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή,

— λεπτομέρειες για την προετοιμασία, εφαρμογή και απομάκρυνση της ουσίας,

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα,

— συγκεντρώσεις φορέα και δοκιμαζόμενης ουσίας που χρησιμοποιήθηκαν για τις εκθέσεις διέγερσης και πρόκλησης και συνολική ποσότητα ουσίας που εφαρμόστηκε για διέγερση και πρόκληση.

Για τα αποτελέσματα:

— περίληψη των αποτελεσμάτων του τελευταίου ελέγχου ευαισθησίας και αξιοπιστίας (βλέπε 1.3) συμπεριλαμβανομένων πληροφοριών για την ουσία, τη συγκέντρωση και το φορέα που χρησιμοποιήθηκαν,

▼B

— πληροφορίες για κάθε ζώο συμπεριλαμβανομένου του συστήματος βαθμολόγησης,

— αναλυτική περιγραφή της φύσης και του βαθμού των εκδηλώσεων που παρατηρήθηκαν,

— τυχόν ιστοπαθολογικά ευρήματα.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων.

Συμπεράσματα.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Η παρούσα μέθοδος είναι παραπλήσια της ΤΟ 406 του ΟΟΣΑ.

▼B

Προσάρτημα

ΠΙΝΑΚΑΣ:

Κλίμακα Magnusson/Kligman για την αξιολόγηση των αντιδράσεων στη δοκιμή πρόκλησης με επίθεμα

0 = καμία ορατή μεταβολή

1 = διακριτικό ή πλακώδες ερύθημα

2 = μέτριας έντασης και συρρέον ερύθημα

3 = έντονο ερύθημα και οίδημα.

▼M4

B.7 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ, 28 ΗΜΕΡΩΝ, ΜΕ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΔΟΣΗ ΣΕ ΤΡΩΚΤΙΚΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 407 του ΟΟΣΑ (2008). Η αρχική κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 407 εκδόθηκε το 1981. Το 1995 εκδόθηκε αναθεωρημένη έκδοση για τη λήψη πρόσθετων πληροφοριών από τα ζώα που χρησιμοποιούνται στη μελέτη, ιδίως όσον αφορά τη νευροτοξικότητα και την ανοσοτοξικότητα.

2. Το 1998 ο ΟΟΣΑ δρομολόγησε μια δραστηριότητα πρώτης προτεραιότητας με σκοπό την αναθεώρηση των υφιστάμενων κατευθυντήριων γραμμών δοκιμών και την ανάπτυξη νέων για τη διαλογή και τη δοκιμή δυνητικών ενδοκρινικών διαταρακτών (8). Ένα στοιχείο της δραστηριότητας αφορούσε την επικαιροποίηση της υφιστάμενης κατευθυντήριας γραμμής του ΟΟΣΑ για τη «Μελέτη τοξικότητας από το στόμα, 28 ημερών, με επαναλαμβανόμενη δόση σε τρωκτικά» (TG 407) με παραμέτρους κατάλληλες για την ανίχνευση της ενδοκρινικής δραστικότητας των ελεγχόμενων χημικών ουσιών. Η διαδικασία αυτή υπήχθη σε εκτεταμένο διεθνές πρόγραμμα δοκιμών για τον έλεγχο της καταλληλότητας και της δυνατότητας πρακτικής εφαρμογής των επιπρόσθετων παραμέτρων, των επιδόσεων των παραμέτρων αυτών στην περίπτωση των χημικών ουσιών με (αντι)οιστρογόνο, (αντι)ανδρογόνο και (αντι)θυρεοειδική δράση, της ενδοεργαστηριακής και διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας και της αλληλεπίδρασης των νέων παραμέτρων με αυτές που απαιτούνταν βάσει της προηγούμενης TG 407. Προέκυψε μεγάλος όγκος δεδομένων, τα οποία συγκεντρώθηκαν και αξιολογήθηκαν αναλυτικά σε εκτενή έκθεση του ΟΟΣΑ (9). Η παρούσα επικαιροποιημένη μέθοδος δοκιμών B.7 (ισοδύναμη με την TG 407) είναι το αποτέλεσμα της πείρας και των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν κατά τη διάρκεια του διεθνούς προγράμματος δοκιμών. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών επιτρέπει το συσχετισμό ορισμένων ενδοκρινικών επιδράσεων με άλλες τοξικολογικές επιδράσεις.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

3. Κατά την εκτίμηση και αξιολόγηση των τοξικών χαρακτηριστικών μιας χημικής ουσίας, μπορεί να προσδιοριστεί η τοξικότητά της από το στόμα με τη χρήση επαναλαμβανόμενης δόσης μετά τη λήψη αρχικών πληροφοριών για την τοξικότητα μέσω δοκιμών οξείας τοξικότητας. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών αποσκοπεί στη διερεύνηση των επιδράσεων σε ένα ευρύτατο φάσμα δυνητικών στόχων τοξικότητας. Παρέχει πληροφορίες για τους πιθανούς κινδύνους για την υγεία που ενδέχεται να προκληθούν από την επανειλημμένη έκθεση για σχετικά περιορισμένο χρονικό διάστημα, συμπεριλαμβανομένων των επιδράσεων στο νευρικό, το ανοσοποιητικό και το ενδοκρινικό σύστημα. Όταν αφορά αυτά τα συγκεκριμένα καταληκτικά σημεία, προβλέπεται ότι η μέθοδος εντοπίζει τις χημικές ουσίες με νευροτοξικό δυναμικό, πράγμα το οποίο μπορεί να δικαιολογεί περαιτέρω εις βάθος διερεύνηση του θέματος, και τις χημικές ουσίες που παρεμποδίζουν τη φυσιολογία του θυρεοειδούς. Η μέθοδος μπορεί επίσης να παρέχει δεδομένα για χημικές ουσίες που προσβάλλουν τα αναπαραγωγικά όργανα νεαρών ενήλικων αρσενικών και θηλυκών ζώων, καθώς και ενδείξεις για τις επιδράσεις στο ανοσοποιητικό σύστημα.

4. Τα αποτελέσματα της παρούσας μεθόδου δοκιμών B.7 θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό και την εκτίμηση των κινδύνων. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις σχετικές με το ενδοκρινικό σύστημα παραμέτρους θα πρέπει να μελετώνται στο πλαίσιο του εννοιολογικού πλαισίου για τον έλεγχο και την αξιολόγηση χημικών ενδοκρινικών διαταρακτών (OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals) του ΟΟΣΑ (11). Η μέθοδος περιλαμβάνει τη βασική μελέτη τοξικότητας με επαναλαμβανόμενη δόση, που μπορεί να χρησιμοποιείται για χημικές ουσίες για τις οποίες δεν δικαιολογείται η διεξαγωγή μελέτης 90 ημερών (π.χ. όταν ο όγκος παραγωγής δεν υπερβαίνει συγκεκριμένα όρια) ή ως προκαταρκτικό στάδιο μιας μακροπρόθεσμης μελέτης. Η διάρκεια της έκθεσης θα πρέπει να είναι 28 ημέρες.

▼M4

5. Το διεθνές πρόγραμμα που εφαρμόστηκε με σκοπό την επικύρωση παραμέτρων κατάλληλων για τη δυνητική ενδεχόμενη ανίχνευση της ενδοκρινικής δραστικότητας ελεγχόμενων χημικών ουσιών κατέδειξε ότι η ποιότητα των δεδομένων που λαμβάνονται με την παρούσα μέθοδο δοκιμών Β.7 εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την πείρα του εργαστηρίου. Αυτό αφορά συγκεκριμένα τον ιστοπαθολογικό προσδιορισμό των κυκλικών αλλαγών στα θηλυκά αναπαραγωγικά όργανα και τον προσδιορισμό του βάρους των μικρών ορμονοεξαρτώμενων οργάνων που είναι δύσκολο να ανατμηθούν. Έχουν καταρτιστεί έγγραφα καθοδήγησης σχετικά με την ιστοπαθολογία (19), τα οποία είναι διαθέσιμα στον δημόσιο δικτυακό τόπο του ΟΟΣΑ για τις κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών. Σκοπός τους είναι να βοηθούν τους παθολογοανατόμους στις εξετάσεις τους και να συμβάλλουν στην αύξηση της ευαισθησίας της δοκιμασίας. Διαπιστώθηκε ότι διάφορες παράμετροι είναι ενδεικτικές ενδοκρινικής τοξικότητας και έχουν ενσωματωθεί στη μέθοδο δοκιμών. Προτείνονται ως προαιρετικά καταληκτικά σημεία παράμετροι για τις οποίες τα διαθέσιμα δεδομένα δεν επαρκούσαν για την απόδειξη της χρησιμότητάς τους ή για τις οποίες δεν προέκυψαν από το πρόγραμμα επικύρωσης ισχυρές αποδείξεις της ικανότητάς τους να συμβάλλουν στην ανίχνευση ενδοκρινικών διαταρακτών (βλέπε προσάρτημα 2).

6. Βάσει των δεδομένων που προέκυψαν από τη διαδικασία επικύρωσης, πρέπει να τονιστεί ότι η ευαισθησία της παρούσας δοκιμασίας δεν επαρκεί για τον εντοπισμό όλων των ουσιών που έχουν (αντι)ανδρογόνο ή (αντι)οιστρογόνο δράση (9). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν εφαρμόζεται κατά τη διάρκεια των σταδίων της ζωής που είναι περισσότερο ευαίσθητα στην ενδοκρινική διαταραχή. Μολαταύτα, μέσω της μεθόδου εντοπίστηκαν, κατά τη διάρκεια της διαδικασίας επικύρωσης, ουσίες με ασθενή και ισχυρή επίδραση στη λειτουργία του θυρεοειδούς, καθώς και ουσίες με ισχυρή και μέτρια ενδοκρινική δραστικότητα, οι οποίες δρουν μέσω των υποδοχέων οιστρογόνων ή ανδρογόνων. Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις δεν κατέστη δυνατός ο εντοπισμός ενδοκρινικώς δραστικών ουσιών που προσβάλλουν ασθενώς τους υποδοχείς οιστρογόνων ή ανδρογόνων. Συνεπώς, η μέθοδος δεν μπορεί να περιγραφεί ως δοκιμασία διαλογής για ενδοκρινική δραστικότητα.

7. Κατά συνέπεια, η απουσία αποτελεσμάτων σε σχέση με αυτούς τους τρόπους δράσης δεν μπορεί να θεωρηθεί ως απόδειξη της απουσίας επιδράσεων στο ενδοκρινικό σύστημα. Επομένως, όσον αφορά τις επιδράσεις μέσω του ενδοκρινικού συστήματος, ο χαρακτηρισμός των ουσιών θα πρέπει να μη βασίζεται μόνο στα αποτελέσματα της παρούσας μεθόδου δοκιμών, αλλά να χρησιμοποιείται σε μια προσέγγιση βάσει του βάρους της μαρτυρίας, που να περιλαμβάνει όλα τα υπάρχοντα δεδομένα για μια χημική ουσία για τον χαρακτηρισμό της δυνητικής ενδοκρινικής δραστικότητας. Για τον λόγο αυτό, η λήψη κανονιστικών αποφάσεων σχετικά με την ενδοκρινική δραστικότητα (χαρακτηρισμός ουσιών) θα πρέπει να αποτελεί ευρεία προσέγγιση που δεν βασίζεται αποκλειστικά στα αποτελέσματα της εφαρμογής της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

8. Είναι παραδεκτό ότι σε όλες οι διαδικασίες που βασίζονται σε ζώα πρέπει να τηρούνται τα τοπικά πρότυπα φροντίδας των ζώων. Η κατωτέρω περιγραφόμενη φροντίδα και μεταχείριση αποτελεί ελάχιστο πρότυπο επιδόσεων και αντικαθίσταται από τους τοπικούς κανονισμούς στις περιπτώσεις που αυτοί είναι αυστηρότεροι. Περισσότερες κατευθύνσεις για την καλή μεταχείριση των ζώων παρέχονται από τον ΟΟΣΑ (14).

9. Οι χρησιμοποιούμενοι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

10. Η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται από το στόμα σε ημερήσιες διαβαθμισμένες δόσεις, σε διάφορες ομάδες πειραματόζωων: ένα επίπεδο δόσης ανά ομάδα, για περίοδο 28 ημερών. Τα ζώα εξετάζονται με προσοχή καθημερινά κατά τη διάρκεια της περιόδου χορήγησης για τη διαπίστωση τοξικών εκδηλώσεων. Τα ζώα που πεθαίνουν ή θανατώνονται με ευθανασία κατά τη διάρκεια της δοκιμής νεκροτομούνται, ενώ στο τέλος της δοκιμής, αυτά που έχουν επιζήσει θανατώνονται με ευθανασία και νεκροτομούνται επίσης. Η μελέτη των 28 ημερών παρέχει πληροφορίες σχετικά με τις επιδράσεις της επανειλημμένης έκθεσης από το στόμα και μπορεί να καταδείξει την ανάγκη για περαιτέρω, πιο μακροπρόθεσμες μελέτες. Επίσης,

▼M4

μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με την επιλογή συγκεντρώσεων για πιο μακροπρόθεσμες μελέτες. Τα δεδομένα που προκύπτουν από τη χρήση της μεθόδου δοκιμών προβλέπεται να επιτρέπουν τον χαρακτηρισμό της τοξικότητας της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, να παρέχουν ενδείξεις για τη σχέση δόσης-απόκρισης και να επιτρέπουν τον προσδιορισμό του επιπέδου στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις (NOAEL).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Επιλογή των ειδών ζώων

11. Το προτιμότερο είδος τρωκτικών είναι ο επίμυς, αν και μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη τρωκτικών. Η διερεύνηση των παραμέτρων που προσδιορίζονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών B.7 σε άλλα είδη τρωκτικών πρέπει να αιτιολογείται αναλυτικά. Παρόλο που είναι βιολογικά πιθανοφανές ότι άλλα είδη θα πρέπει να αντιδρούν στις τοξικές ουσίες κατά τρόπο παρόμοιο με τον επίμυ, η χρήση μικρότερων ειδών ενδέχεται να οδηγήσει σε αυξημένη μεταβλητότητα, λόγω των τεχνικών προκλήσεων που συνεπάγεται η ανατομή μικρότερων οργάνων. Στο διεθνές πρόγραμμα επικύρωσης για την ανίχνευση ενδοκρινικών διαταρακτών, ο επίμυς ήταν το μόνο είδος που χρησιμοποιήθηκε. Πρέπει να χρησιμοποιούνται νεαρά, υγιή ενήλικα ζώα των συνήθων εργαστηριακών φυλών. Τα θηλυκά ζώα πρέπει να είναι άτοκα και να μη βρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης. Η χορήγηση της ουσίας πρέπει να αρχίζει το ταχύτερο δυνατό μετά τον απογαλακτισμό και, οπωσδήποτε, σε ηλικία μικρότερη των εννέα εβδομάδων. Στην αρχή της μελέτης, η διακύμανση των βαρών των χρησιμοποιούμενων ζώων θα πρέπει να είναι ελάχιστη και να μην υπερβαίνει το ± 20 % της μέσης τιμής, για κάθε φύλο. Σε περίπτωση που διεξάγεται μελέτη με επαναλαμβανόμενη δόση από το στόμα ως προκαταρκτικό στάδιο πιο μακροπρόθεσμης μελέτης, είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται ζώα της ίδιας φυλής και προέλευσης και στις δύο μελέτες.

Στέγαση και διατροφή

12. Σε όλες οι διαδικασίες πρέπει να τηρούνται τα τοπικά πρότυπα φροντίδας των πειραματόζωων. Η θερμοκρασία στην αίθουσα πειραματόζωων θα πρέπει να είναι 22 °C (± 3 °C). Παρόλο που η σχετική υγρασία θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τα διαστήματα του καθαρισμού της αίθουσας, το επιδιωκόμενο επίπεδο θα πρέπει να είναι 50-60 %. Ο φωτισμός πρέπει να είναι τεχνητός και η φωτοπερίοδος 12ωρη. Όσον αφορά τη διατροφή, μπορούν να χρησιμοποιούνται συμβατικά εργαστηριακά σιτηρέσια με παροχή απεριόριστου πόσιμου νερού. Η επιλογή του σιτηρεσίου ενδέχεται να επηρεάζεται από την ανάγκη κατάλληλης πρόσμιξης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, όταν αυτή χορηγείται με την παρούσα μέθοδο. Τα ζώα θα πρέπει να στεγάζονται σε μικρές ομάδες του ίδιου φύλου. Επιτρέπεται η ατομική στέγαση, εάν αιτιολογείται επιστημονικά. Σε περίπτωση ομαδικής στέγασης, κάθε κλωβός δεν πρέπει να περιέχει περισσότερα από πέντε ζώα.

13. Η τροφή πρέπει να υποβάλλεται τακτικά σε ανάλυση ώστε να εντοπίζονται τυχόν ξένες προσμείξεις. Ένα δείγμα του σιτηρεσίου θα πρέπει να διατηρείται έως την οριστικοποίηση της έκθεσης.

Προετοιμασία των ζώων

14. Υγιή νεαρά ενήλικα ζώα κατανέμονται τυχαία σε ομάδες-μάρτυρες και ομάδες αγωγής. Η διάταξη των κλωβών στον χώρο πρέπει να ελαχιστοποιεί τις οφειλόμενες στη θέση τους επιδράσεις. Τα ζώα σημαδεύονται και διατηρούνται στους κλωβούς τους επί πέντε τουλάχιστον ημέρες πριν από την έναρξη της αγωγής, προκειμένου να εγκλιματιστούν στις συνθήκες του εργαστηρίου.

Παρασκευή των δόσεων

15. Η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με καθετήρα ή μέσω του σιτηρεσίου ή του πόσιμου νερού. Η τεχνική χορήγησης της ουσίας από το στόμα εξαρτάται από τον σκοπό της μελέτης και από τις φυσικές/χημικές/τοξικοκινητικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

▼M4

16. Εφόσον είναι αναγκαίο, παρασκευάζεται διάλυμα ή εναιώρημα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε κατάλληλο φορέα. Συνιστάται να εξετάζεται ως πρώτη επιλογή, εφόσον είναι δυνατόν, η χρήση υδατικού διαλύματος/εναιωρήματος, έπειτα η χρήση διαλύματος/εναιωρήματος σε έλαιο (π.χ. αραβοσιτέλαιο) και, ως τελευταία επιλογή, η χρήση διαλύματος σε άλλο φορέα. Σε περίπτωση που ο φορέας δεν είναι το νερό, πρέπει να είναι γνωστά τα τοξικά χαρακτηριστικά του και να προσδιορίζεται η σταθερότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στον φορέα.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αριθμός και φύλο των ζώων

17. Για κάθε επίπεδο δόσεων πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 10 ζώα (πέντε θηλυκά και πέντε αρσενικά). Εάν έχουν προγραμματιστεί ενδιάμεσες θανατώσεις ζώων, ο αριθμός των ζώων ανά ομάδα πρέπει να αυξάνεται κατά τον αριθμό των ζώων που πρόκειται να θανατωθούν πριν από την ολοκλήρωση της μελέτης. Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης επιπρόσθετης δορυφορικής ομάδας δέκα ζώων (πέντε ανά φύλο) στην ομάδα-μάρτυρα και στην ομάδα μέγιστης δόσης, με σκοπό την παρατήρηση της αναστρεψιμότητας, της εμμονής ή της καθυστερημένης εμφάνισης τοξικών επιδράσεων επί 14 ημέρες τουλάχιστον μετά την αγωγή.

Δοσολογία

18. Γενικά, πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τρεις ομάδες δοκιμής και μία ομάδα-μάρτυρας. Ωστόσο, αν από την αξιολόγηση άλλων δεδομένων προκύπτει ότι η χορήγηση ημερήσιας δόσης 1 000 mg/kg βάρους σώματος δεν αναμένεται να έχει επίδραση, μπορεί να διεξάγεται οριακή δοκιμή. Εάν δεν διατίθενται κατάλληλα δεδομένα, είναι δυνατόν να εκπονηθεί μελέτη καθορισμού του εύρους (ζώα της ίδιας φυλής και προέλευσης) για να διευκολύνει τον καθορισμό των δόσεων που θα χρησιμοποιηθούν. Με εξαίρεση την αγωγή με την ελεγχόμενη χημική ουσία, τα ζώα της ομάδας-μάρτυρα πρέπει να υφίστανται την ίδια ακριβώς μεταχείριση με τα ζώα της ομάδας δοκιμής. Εάν χρησιμοποιείται φορέας για τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, η ομάδα-μάρτυρας πρέπει να λαμβάνει τον φορέα στον μέγιστο χρησιμοποιούμενο όγκο.

19. Για την επιλογή των επιπέδων δόσης πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τυχόν διαθέσιμα τοξικολογικά και (τοξικο-)κινητικά δεδομένα που αφορούν την ελεγχόμενη χημική ουσία ή συγγενείς με αυτή ουσίες. Η υψηλότερη δόση πρέπει να επιλέγεται με σκοπό να επιφέρει τοξικές επιδράσεις αλλά όχι τον θάνατο ή μεγάλη ταλαιπωρία. Στη συνέχεια, επιλέγεται φθίνουσα σειρά δόσεων, έτσι ώστε να καταδειχθούν η σχέση της απόκρισης με τη δόση και η χαμηλότερη δόση στην οποία δεν παρατηρούνται τοξικές επιδράσεις (NOAEL). Συχνά, η βέλτιστη επιλογή για τον καθορισμό των ελαττούμενων δόσεων είναι τα υποδιπλάσια ή υποτετραπλάσια διαστήματα μεταξύ αυτών, ενώ είναι πολλές φορές προτιμότερο να προστίθεται μια τέταρτη ομάδα δοκιμής αντί να χρησιμοποιούνται εξαιρετικά μεγάλα διαστήματα μεταξύ των δόσεων (π.χ. με λόγο ακολουθίας μεγαλύτερο από 10).

20. Όταν παρατηρείται γενική τοξικότητα (π.χ. μειωμένο βάρος σώματος, επιδράσεις στο ήπαρ, την καρδιά, τους πνεύμονες ή τα νεφρά κ.λπ.) ή άλλη αλλαγή που μπορεί να μην είναι τοξική αντίδραση (π.χ. μειωμένη πρόσληψη τροφής, διόγκωση του ήπατος), οι παρατηρούμενες επιδράσεις στα καταληκτικά σημεία που συνδέονται με ευαισθησία του ανοσοποιητικού, του νευρικού ή του ενδοκρινικού συστήματος θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή.

Οριακή δοκιμή

21. Εάν μια δοκιμή σύμφωνα με τις περιγραφόμενες για την παρούσα μελέτη διαδικασίες, με επίπεδο δόσης τουλάχιστον 1 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα ή, εφόσον πρόκειται για χορήγηση μέσω του σιτηρεσίου ή του πόσιμου νερού, με αντίστοιχη εκατοστιαία αναλογία στο σιτηρέσιο ή στο πόσιμο νερό (σε σχέση με το βάρος του σώματος), δεν έχει ως αποτέλεσμα παρατηρήσιμες τοξικές επιδράσεις και εάν, βάσει των διαθέσιμων δεδομένων για χημικές ουσίες ανάλογης δομής, δεν αναμένεται τοξικότητα, η πλήρης μελέτη με τρία επίπεδα δόσης μπορεί να μην είναι απαραίτητη. Η οριακή δοκιμή εφαρμόζεται εφόσον η έκθεση του ανθρώπου δεν καταδεικνύει την ανάγκη χρησιμοποίησης υψηλοτέρου επίπεδου δόσης.

▼M4

Χορήγηση των δόσεων

22. Η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται στα ζώα καθημερινά επί 7 ημέρες την εβδομάδα για περίοδο 28 ημερών. Όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με καθετήρα, η χορήγηση πρέπει να γίνεται εφάπαξ με τη βοήθεια στομαχικού καθετήρα ή κατάλληλης διασωλήνωσης. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου και δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1 ml / 100 g βάρους σώματος ή, εάν πρόκειται για υδατικό διάλυμα, τα 2 ml / 100 g βάρους σώματος. Εκτός από την περίπτωση των ερεθιστικών ή διαβρωτικών χημικών ουσιών, οι οποίες σε υψηλότερες συγκεντρώσεις προκαλούν κατά κανόνα έξαρση των επιδράσεων, η μεταβλητότητα των όγκων δοκιμής πρέπει να ελαχιστοποιείται με ρύθμιση της συγκέντρωσης, ώστε να εξασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλα τα επίπεδα δόσης.

23. Για τις χημικές ουσίες που χορηγούνται μέσω του σιτηρεσίου ή του πόσιμου νερού έχει σημασία να εξασφαλίζεται ότι οι χορηγούμενες ποσότητες ελεγχόμενης χημικής ουσίας δεν παρεμποδίζουν το κανονικό διατροφικό ισοζύγιο ή ισοζύγιο νερού. Όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται μέσω του σιτηρεσίου, πρέπει να χρησιμοποιείται είτε σταθερή συγκέντρωση στο σιτηρέσιο (ppm) είτε σταθερό επίπεδο δόσης, εκφρασμένο επί του βάρους σώματος του ζώου, και να διευκρινίζεται ποια από τις δύο δυνατότητες έχει επιλεγεί. Για χημικές ουσίες που χορηγούνται με καθετήρα, η δόση πρέπει να χορηγείται την ίδια περίπου ώρα κάθε ημέρα και να ρυθμίζεται κατά τρόπο ώστε να διατηρείται σταθερό επίπεδο δόσης ως προς το βάρος του σώματος. Σε περίπτωση που η μελέτη επαναλαμβανόμενης δόσης διεξάγεται ως προκαταρκτικό στάδιο μακροπρόθεσμης μελέτης, πρέπει να χρησιμοποιείται παρόμοιο σιτηρέσιο και στις δύο μελέτες.

Παρατηρήσεις

24. Η περίοδος παρατήρησης διαρκεί 28 ημέρες. Τα ζώα των δορυφορικών ομάδων που προορίζονται για μεταπαρακολούθηση πρέπει να αναμένουν τουλάχιστον 14 ημέρες χωρίς να υποβληθούν σε αγωγή, προκειμένου να διαπιστώνεται καθυστερημένη εμφάνιση ή εμμονή τοξικών επιδράσεων ή ανάρρωση από αυτές.

25. Γενικές κλινικές παρατηρήσεις πρέπει να διεξάγονται τουλάχιστον μια φορά ημερησίως, κατά προτίμηση την (τις) ίδια(-ες) ώρα(-ες) και λαμβανομένου υπόψη του χρόνου κορύφωσης των αναμενόμενων επιδράσεων μετά τη χορήγηση της δόσης. Η κατάσταση της υγείας των ζώων πρέπει να καταγράφεται. Όλα τα ζώα εξετάζονται τουλάχιστον δύο φορές ημερησίως για τη διαπίστωση νοσηρότητας και θνησιμότητας.

26. Όλα τα ζώα πρέπει να υποβάλλονται σε λεπτομερή κλινική παρατήρηση μία φορά πριν από την πρώτη έκθεση (προκειμένου να γίνουν συγκρίσεις μεταξύ των διαφόρων ζώων) και, στη συνέχεια, τουλάχιστον μια φορά εβδομαδιαίως. Οι παρατηρήσεις αυτές πρέπει να γίνονται, κατά προτίμηση, την ίδια ώρα της ημέρας, σε τυποποιημένο χώρο έξω από τους κλωβούς κάθε φορά, και να καταγράφονται προσεκτικά, κατά προτίμηση με τη χρήση συστημάτων βαθμολόγησης τα οποία καθορίζει λεπτομερώς το εργαστήριο. Πρέπει να καταβάλλεται κάθε προσπάθεια ώστε οι συνθήκες της δοκιμής να παρουσιάζουν την ελάχιστη δυνατή μεταβλητότητα και οι παρατηρήσεις να γίνονται κατά προτίμηση από άτομα που δεν γνωρίζουν την αγωγή. Καταγράφονται, μεταξύ άλλων, οι αλλαγές στο δέρμα, στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς, στους βλεννογόνους, εκκρίσεις και απεκκρίσεις, καθώς και συμπτώματα από το αυτόνομο νευρικό σύστημα (όπως δακρύρροια, ανόρθωση τριχών, μεταβολή της διαμέτρου της κόρης του οφθαλμού, ασύνηθες αναπνευστικό πρότυπο). Καταγράφονται επίσης οι αλλαγές στο βάδισμα, στη στάση του σώματος και στην αντίδραση κατά τη μεταχείριση, καθώς και η εμφάνιση κλονικών ή τονικών κινήσεων, στερεότυπων κινήσεων (όπως υπερβολική περιποίηση, συνεχείς περιστροφές) ή περίεργης συμπεριφοράς (όπως αυτοακρωτηριασμός, βάδισμα προς τα πίσω) (2).

27. Την τέταρτη εβδομάδα έκθεσης αξιολογούνται οι αντιδράσεις των αισθητηρίων οργάνων σε διαφόρων ειδών ερεθίσματα (2) (π.χ. ακουστικά, οπτικά και ιδιοδεκτικά ερεθίσματα) (3)(4)(5), η δύναμη της λαβής (6) και η κινητικότητα (7). Λεπτομέρειες σχετικά με τις διαδικασίες που μπορούν να ακολουθούνται παρέχονται στις αντίστοιχες βιβλιογραφικές παραπομπές. Ωστόσο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικές διαδικασίες αντί των αναφερόμενων στις παραπομπές.

▼M4

28. Οι παρατηρήσεις των λειτουργιών κατά την τέταρτη εβδομάδα έκθεσης μπορούν να παραλείπονται, εάν η μελέτη εκπονείται ως προκαταρτικό στάδιο μελέτης υποχρόνιας τοξικότητας (90 ημερών). Στην περίπτωση αυτή, οι παρατηρήσεις των λειτουργιών θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται στην επόμενη αυτή μελέτη. Από την άλλη πλευρά όμως, η ύπαρξη δεδομένων για τις λειτουργίες από τη μελέτη επαναλαμβανόμενης δόσης μπορεί να διευκολύνει την επιλογή επιπέδων δόσης για τη μετέπειτα μελέτη υποχρόνιας τοξικότητας.

29. Κατ' εξαίρεση, οι παρατηρήσεις των λειτουργιών μπορούν επίσης να παραλείπονται όταν οι ομάδες εμφανίζουν εκδηλώσεις τοξικότητας σε βαθμό που παρεμποδίζει σημαντικά τις επιδόσεις της λειτουργικής δοκιμής.

30. Κατά τη νεκροψία είναι δυνατόν να προσδιοριστεί ο κύκλος οίστρου όλων των θηλυκών ζώων (προαιρετικά) με τη λήψη κολπικών επιχρισμάτων. Οι παρατηρήσεις αυτές παρέχουν πληροφορίες σχετικά με το στάδιο του κύκλου οίστρου κατά τον χρόνο θανάτωσης και βοηθούν στην ιστολογική αξιολόγηση των ευαίσθητων στα οιστρογόνα ιστών [βλέπε καθοδήγηση σχετικά με την ιστοπαθολογία (19)].

Βάρος σώματος και κατανάλωση τροφής και νερού

31. Όλα τα ζώα πρέπει να ζυγίζονται τουλάχιστον μια φορά ανά εβδομάδα. Με την ίδια συχνότητα πρέπει να μετράται η κατανάλωση τροφής. Εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται μέσω του πόσιμου νερού, η κατανάλωσή του πρέπει επίσης να μετράται τουλάχιστον μια φορά ανά εβδομάδα.

Αιματολογία

32. Στο τέλος της περιόδου δοκιμής πρέπει να διεξάγονται οι ακόλουθες αιματολογικές εξετάσεις: προσδιορισμός αιματοκρίτη, συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης, αριθμού ερυθρών αιμοσφαιρίων, δικτυοερυθροκυττάρων, αριθμού λευκών αιμοσφαιρίων και λευκοκυτταρικού τύπου, αριθμού αιμοπεταλίων, χρόνου πήξεως και πηκτικότητας του αίματος. Εάν υπάρχουν υπόνοιες ότι η ελεγχόμενη χημική ουσία ή οι θεωρητικοί μεταβολίτες της έχουν οξειδωτικές ιδιότητες, θα πρέπει να προσδιορίζονται επίσης, μεταξύ άλλων, η συγκέντρωση μεθαιμοσφαιρίνης και τα σωμάτια Heinz.

33. Τα δείγματα αίματος πρέπει να λαμβάνονται από καθορισμένο σημείο ακριβώς πριν από τη θανάτωση των ζώων ή κατά τη διάρκειά της και να διατηρούνται υπό κατάλληλες συνθήκες. Τα ζώα πρέπει να υποβάλλονται σε ολονύκτια νηστεία πριν από την ευθανασία ([1]).

Κλινική βιοχημεία

34. Πρέπει να διεξάγονται βιοχημικές εξετάσεις για τη διερεύνηση σοβαρών τοξικών επιδράσεων στους ιστούς, και ειδικότερα στα νεφρά και στο ήπαρ, σε δείγματα αίματος που έχουν ληφθεί από όλα τα ζώα αμέσως πριν από τη θανάτωσή τους ζώων ή κατά τη διάρκειά της (δεν λαμβάνεται αίμα από ετοιμοθάνατα ζώα και/ή από ζώα που θανατώνονται πριν από το τέλος της δοκιμής). Οι εξετάσεις πλάσματος ή ορού αίματος περιλαμβάνουν προσδιορισμό νατρίου, καλίου, γλυκόζης, ολικής χοληστερόλης, ουρίας, κρεατινίνης, ολικών πρωτεϊνών και αλβουμίνης, δύο τουλάχιστον ενζύμων που είναι ενδεικτικά ηπατοκυτταρικών επιδράσεων (όπως η αλανινο-αμινοτρανσφεράση, η ασπαραγινική αμινοτρασφεράση, η αλκαλική φωσφατάση, η γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάση και η γλουταμική αφυδρογονάση) και χολικών οξέων. Η μέτρηση και άλλων ενζύμων (ηπατικής ή άλλης προέλευσης) και της χολερυθρίνης είναι δυνατόν να παρέχει χρήσιμες πληροφορίες σε ορισμένες περιπτώσεις.

35. Κατά την τελευταία εβδομάδα της μελέτης μπορούν να διεξάγονται, προαιρετικά, οι ακόλουθες αναλύσεις ούρων σε ούρα που συλλέγονται σε καθορισμένο χρόνο: προσδιορισμός όψης, όγκου, ωσμωτικότητας ή ειδικού βάρους, pH, πρωτεϊνών, γλυκόζης και αίματος/αιμοκυττάρων.

([1]) Για ορισμένες μετρήσεις στον ορό και στο πλάσμα του αίματος, και ιδίως της γλυκόζης, προτιμάται να έχουν υποβληθεί τα ζώα σε ολονύκτια νηστεία. Ο κυριότερος λόγος για την προτίμηση αυτή είναι ότι η αυξημένη μεταβλητότητα, που είναι αναπόφευκτη σε περίπτωση μη υποβολής σε νηστεία, τείνει να συγκαλύπτει ορισμένες ανεπαίσθητες επιδράσεις δυσχεραίνοντας την ερμηνεία. Από την άλλη πλευρά όμως, η νηστεία αυτή μπορεί να παρεμποδίσει τον γενικό μεταβολισμό των ζώων και, ιδίως στις μελέτες διατροφής, να διαταράξει την καθημερινή έκθεση στην ελεγχόμενη χημική ουσία. Σε περίπτωση επιλογής της ολονύκτιας νηστείας, οι βιοχημικές εξετάσεις πρέπει να διεξάγονται μετά τις παρατηρήσεις των λειτουργιών κατά την 4η εβδομάδα της μελέτης.

▼M4

36. Επιπλέον, πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο αναζήτησης, στο πλάσμα ή στον ορό, δεικτών γενικής βλάβης των ιστών. Άλλοι προσδιορισμοί που πρέπει να διεξάγονται όταν οι γνωστές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας είναι δυνατόν να προσβάλουν, ή υπάρχουν υπόνοιες ότι προσβάλλουν, τα μεταβολικά χαρακτηριστικά αφορούν το ασβέστιο, τα φωσφορικά άλατα, τα τριγλυκερίδια, ειδικές ορμόνες και τη χολινεστεράση. Οι προσδιορισμοί αυτοί απαιτούνται για χημικές ουσίες ορισμένων κατηγοριών ή σε συγκεκριμένες περιπτώσεις.

37. Η φύλαξη δειγμάτων πλάσματος ή ορού για τη μέτρηση των θυρεοειδικών ορμονών (T3, T4) και της θυρεοτροπίνης (προαιρετικά) ενδέχεται να αποδειχθεί χρήσιμη, αν υπάρχουν ενδείξεις επίδρασης στον άξονα υπόφυσης-θυρεοειδούς, παρά το γεγονός ότι δεν κατέστη δυνατόν να αποδειχθεί κατά τη διεθνή αξιολόγηση των σχετικών με το ενδοκρινικό σύστημα καταληκτικών σημείων αν ο προσδιορισμός των ορμονών T3, T4 και TSH παρέχει σαφές πλεονέκτημα Τα δείγματα αυτά ψύχονται στους – 20° για αποθήκευση. Οι ακόλουθοι παράγοντες ενδέχεται να επηρεάζουν τη μεταβλητότητα και τις απόλυτες τιμές συγκέντρωσης των προσδιοριζόμενων ορμονών:

— ο χρόνος θανάτωσης, λόγω της ημερήσιας διακύμανσης των συγκεντρώσεων ορμονών,

— η μέθοδος θανάτωσης ώστε να αποφεύγεται η πρόκληση περιττού άγχους στα ζώα που μπορεί να επηρεάσει τις συγκεντρώσεις ορμονών,

— οι σειρές αντιδραστηρίων (κιτ) ορμονικού προσδιορισμού που ενδέχεται να διαφέρουν ως προς τις τυπικές καμπύλες τους.

Ο οριστικός εντοπισμός των χημικών ουσιών που δρουν στον θυρεοειδή είναι πιο αξιόπιστος όταν βασίζεται σε ιστοπαθολογική ανάλυση αντί των επιπέδων των ορμονών.

38. Τα δείγματα πλάσματος που προορίζονται ειδικά για ορμονικό προσδιορισμό θα πρέπει να λαμβάνονται σε συγκρίσιμη ώρα της ημέρας. Συνιστάται να αποφασίζεται ο προσδιορισμός των ορμονών T3, T4 και TSH με κριτήριο τις ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις του θυρεοειδούς. Οι αριθμητικές τιμές που προκύπτουν από ανάλυση των συγκεντρώσεων ορμονών διαφέρουν ανάλογα με τα διάφορα κιτ δοκιμασιών που είναι διαθέσιμα στο εμπόριο. Κατά συνέπεια, ενδέχεται να μην είναι δυνατός ο καθορισμός κριτηρίων επιδόσεων με βάση ενιαία ιστορικά δεδομένα. Εναλλακτικά, τα εργαστήρια θα πρέπει να προσπαθούν να διατηρούν τους συντελεστές μεταβλητότητας στους μάρτυρες σε επίπεδα κάτω του 25 για την T3 και την T4 και κάτω του 35 για την TSH. Όλες οι συγκεντρώσεις πρέπει να καταγράφονται σε ng/ml.

39. Εάν τα ιστορικά δεδομένα αναφοράς είναι ανεπαρκή, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο προσδιορισμού των αιματολογικών και βιοχημικών μεταβλητών πριν από την έναρξη της χορήγησης των δόσεων ή, κατά προτίμηση, σε μια ομάδα ζώων που δεν περιλαμβάνεται στις πειραματικές ομάδες.

ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΑ

Νεκροψία

40. Όλα τα ζώα της μελέτης υποβάλλονται σε πλήρη, λεπτομερή νεκροψία/νεκροτομή η οποία περιλαμβάνει προσεκτική εξέταση της εξωτερικής επιφάνειας του σώματος, όλων των στομίων, της κρανιακής, θωρακικής και περιτοναϊκής κοιλότητας και του περιεχομένου τους. Ήπαρ, νεφρά, επινεφρίδια, όρχεις, επιδιδυμίδες, προστάτης + σπερματοδόχες κύστεις με τους πηκτικούς αδένες ως σύνολο, θύμος αδένας, σπλήνα, εγκέφαλος και καρδιά όλων των ζώων (εκτός των ετοιμοθάνατων και αυτών που θανατώνονται πριν από το τέλος της μελέτης) πρέπει να απαλλάσσονται από τους προσφυόμενους ιστούς και να ζυγίζονται για τον προσδιορισμό του υγρού βάρους, το ταχύτερο δυνατόν μετά την ανατομή ώστε να αποφεύγεται η ξήρανσή τους. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται κατά τον καθαρισμό του συμπλέγματος του προστάτη, ώστε να μην προκαλείται διάτρηση των σπερματοδόχων κύστεων που είναι πλήρεις υγρού. Εναλλακτικά, οι σπερματοδόχες κύστεις και ο προστάτης μπορούν να καθαρίζονται από ιστούς και να ζυγίζονται μετά τη μονιμοποίηση.

▼M4

41. Επιπλέον, δύο άλλοι ιστοί μπορούν να ζυγίζονται προαιρετικά, το συντομότερο δυνατόν μετά την ανατομή, ώστε να αποφεύγεται η ξήρανσή τους: το ζεύγος των ωοθηκών (υγρό βάρος) και η μήτρα, συμπεριλαμβανομένου του τραχήλου [καθοδήγηση για την αφαίρεση και την προετοιμασία των ιστών της μήτρας για ζύγιση παρέχει η TG 440 του ΟΟΣΑ (18)].

42. Μετά τη μονιμοποίηση μπορεί να προσδιορίζεται (προαιρετικά) το βάρος του θυρεοειδούς. Ο καθαρισμός θα πρέπει και στην περίπτωση αυτή να πραγματοποιείται με μεγάλη προσοχή και μόνο μετά τη μονιμοποίηση, ώστε να μην προκαλείται βλάβη στους ιστούς. Οι βλάβες των ιστών μπορούν να θέσουν σε κίνδυνο την ιστοπαθολογική ανάλυση.

43. Οι ακόλουθοι ιστοί πρέπει να διατηρούνται στο καταλληλότερο μονιμοποιητικό υλικό, τόσο για το είδος του ιστού όσο και για την ιστοπαθολογική εξέταση για την οποία προορίζεται (βλέπε παράγραφο 47): κάθε ιστός που εμφανίζει μακροσκοπικές αλλοιώσεις, εγκέφαλος (αντιπροσωπευτικές περιοχές του κυρίου τμήματος, της παρεγκεφαλίδας και της γέφυρας), νωτιαίος μυελός, οφθαλμοί, στομάχι, λεπτό και παχύ έντερο (συμπεριλαμβανομένων των Παϋέριων πλακών), ήπαρ, νεφρά, επινεφρίδια, σπλήνα, καρδιά, θύμος αδένας, θυρεοειδής αδένας, τραχείας και πνεύμονες (διατηρημένοι με εμφύσηση μονιμοποιητικού υλικού, ακολουθούμενη από εμβάπτιση), γεννητικοί αδένες (όρχεις και ωοθήκες), άλλα όργανα του γεννητικού συστήματος (μήτρα και τράχηλος της μήτρας, επιδιδυμίδες, προστάτης + σπερματοδόχες κύστεις με τους πηκτικούς αδένες), κολπική κοιλότητα, ουροδόχος κύστη, λεμφαδένες [πέραν του πλέον άμεσου αδένα αποχέτευσης, θα πρέπει να λαμβάνεται και άλλος ένας λεμφαδένας σύμφωνα με την πείρα του εργαστηρίου (15)], περιφερειακό νεύρο (ισχιακό ή κνημιαίο), κατά προτίμηση ευρισκόμενο πολύ κοντά στον μυ, σκελετικός μυς και οστό με μυελό των οστών (τομή ή, εναλλακτικά, πρόσφατο παρασκεύασμα αναρροφηθέντος μυελού). Συνιστάται να μονιμοποιούνται οι όρχεις με εμβάπτιση σε μονιμοποιητικό υλικό Bouin ή τροποποιημένο μονιμοποιητικό υλικό Davidson (16) (17). Ο ινώδης χιτώνας (tunica albuginea) πρέπει να διατρυπάται με βελόνα, με ήπιες κινήσεις, σε μικρό βάθος και στα δύο άκρα ώστε να είναι δυνατή η ταχεία διείσδυση του μονιμοποιητικού υλικού. Βάσει των κλινικών και άλλων ευρημάτων, ενδέχεται να πρέπει να εξεταστούν επιπρόσθετοι ιστοί. Κάθε όργανο που, λόγω των γνωστών ιδιοτήτων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, θεωρείται πιθανό να αποτελεί όργανο-στόχο, πρέπει επίσης να διατηρείται.

44. Από τους ακόλουθους ιστούς είναι δυνατόν να ληφθούν πολύτιμες ενδείξεις για ενδοκρινικές επιδράσεις: γεννητικοί αδένες (όρχεις και ωοθήκες), άλλα όργανα του γεννητικού συστήματος (μήτρα και τράχηλος της μήτρας, επιδιδυμίδες, σπερματοδόχες κύστεις με τους πηκτικούς αδένες, ραχαιοπλάγιος και κοιλιακός λοβός προστάτη), κολπική κοιλότητα, υπόφυση, αρσενικός μαστικός αδένας, θυρεοειδής και επινεφρίδιος αδένας. Δεν έχουν τεκμηριωθεί επαρκώς οι αλλαγές στους αρσενικούς μαστικούς αδένες, αλλά η παράμετρος αυτή ενδέχεται να είναι πολύ ευαίσθητη σε ουσίες με οιστρογόνο δράση. Η παρατήρηση οργάνων/ιστών που δεν αναφέρονται στην παράγραφο 43 είναι προαιρετική (βλέπε προσάρτημα 2).

45. Το έγγραφο καθοδήγησης σχετικά με την ιστοπαθολογία (19) παρέχει επιπρόσθετες πληροφορίες για την ανατομή, τη μονιμοποίηση, την τομή και την ιστολογική ανάλυση των ενδοκρινικών ιστών.

46. Από το διεθνές πρόγραμμα δοκιμών προέκυψαν ορισμένα αποδεικτικά στοιχεία, σύμφωνα με τα οποία ανεπαίσθητες ενδοκρινικές επιδράσεις χημικών ουσιών με μικρή ικανότητα προσβολής της ομοιόστασης των σεξουαλικών ορμονών είναι δυνατόν να εντοπιστούν μέσω της διαταραχής του συγχρονισμού του κύκλου του οίστρου σε διάφορους ιστούς και, σε μικρότερο βαθμό, μέσω εμφανών ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων στα θηλυκά αναπαραγωγικά όργανα. Παρά την απουσία ακλόνητων αποδείξεων των επιδράσεων αυτών, συνιστάται να λαμβάνονται υπόψη τα στοιχεία πιθανής ασυγχρονίας του κύκλου του οίστρου κατά την ερμηνεία της ιστοπαθολογίας των ωοθηκών (κύτταρα του θυλακίου, της θήκης και των κοκκίων), της μήτρας, του τραχήλου και του κόλπου. Στη σύγκριση αυτή θα μπορούσε να συμπεριληφθεί, εφόσον αξιολογείται, και το στάδιο του κύκλου που προσδιορίζεται με κολπικά επιχρίσματα.

▼M4

Ιστοπαθολογία

47. Τα διατηρημένα όργανα και ιστοί όλων των ζώων των ομάδων-μαρτύρων και των ομάδων υψηλής δόσης πρέπει να υποβάλλονται σε πλήρη ιστοπαθολογική εξέταση. Σε περίπτωση που παρατηρηθούν αλλοιώσεις συνδεόμενες με την αγωγή στην ομάδα υψηλής δόσης, η εξέταση πρέπει να επεκτείνεται και στα ζώα των ομάδων που έλαβαν όλες τις υπόλοιπες δόσεις.

48. Εξετάζονται όλες οι μακροσκοπικές αλλοιώσεις.

49. Σε περίπτωση που έχει χρησιμοποιηθεί δορυφορική ομάδα, υποβάλλονται σε ιστοπαθολογική εξέταση οι ιστοί και τα όργανα που διαπιστώθηκε ότι παρουσίασαν επιδράσεις στις ομάδες αγωγής.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Δεδομένα

50. Πρέπει να παρέχονται δεδομένα για κάθε ζώο. Επιπλέον, όλα τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα ο οποίος περιλαμβάνει, για κάθε ομάδα αγωγής, τον αριθμό των ζώων κατά την έναρξη της δοκιμής, τον αριθμό των ζώων που βρέθηκαν νεκρά κατά τη διάρκεια της δοκιμής ή θανατώθηκαν για να μην ταλαιπωρηθούν και τον χρόνο θανάτου ή ευθανασίας, τον αριθμό των ζώων που εμφάνισαν εκδηλώσεις τοξικότητας, περιγραφή των παρατηρηθέντων συμπτωμάτων τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένων του χρόνου εμφάνισης, της διάρκειας και της σοβαρότητάς τους, τον αριθμό των ζώων που παρουσίασαν αλλοιώσεις, τον τύπο και τη σοβαρότητα των αλλοιώσεων, καθώς και το ποσοστό των ζώων που εμφάνισαν καθέναν από τους τύπους αλλοιώσεων.

51. Όταν είναι δυνατόν, τα αριθμητικά αποτελέσματα πρέπει να αξιολογούνται με τη βοήθεια κατάλληλης στατιστικής μεθόδου γενικής αποδοχής. Με τη σύγκριση των επιδράσεων σε ένα εύρος δόσεων αποφεύγεται η χρήση πολλών δοκιμών t. Οι στατιστικές μέθοδοι πρέπει να επιλέγονται κατά τον σχεδιασμό της μελέτης.

52. Για τον ποιοτικό έλεγχο προτείνεται η συλλογή ιστορικών δεδομένων ως μάρτυρα και ο υπολογισμός συντελεστών μεταβλητότητας για τα αριθμητικά δεδομένα, ιδίως όσον αφορά τις παραμέτρους που συνδέονται με την ανίχνευση ενδοκρινικών διαταρακτών. Τα δεδομένα αυτά μπορούν να χρησιμοποιούνται για συγκρίσεις κατά την αξιολόγηση πραγματικών μελετών.

Έκθεση δοκιμής

53. Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Ελεγχόμενη χημική ουσία:

— φυσική μορφή, καθαρότητα και φυσικοχημικές ιδιότητες,

— στοιχεία ταυτότητας.

Φορέας (κατά περίπτωση):

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα, εάν δεν πρόκειται για νερό.

Πειραματόζωα:

— είδος/φυλή χρησιμοποιηθέντων ζώων,

— αριθμός ηλικία και φύλο των ζώων,

— προέλευση, συνθήκες στέγασης, διατροφή κ.λπ.,

— βάρος κάθε ζώου κατά την έναρξη της δοκιμής,

— αιτιολόγηση της επιλογής άλλου είδους εκτός από τον επίμυ.

Συνθήκες δοκιμής:

— αιτιολόγηση της επιλογής του επιπέδου δόσης,

— λεπτομέρειες σχετικά με το παρασκεύασμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας/τροφής, επιτευχθείσα συγκέντρωση, σταθερότητα και ομοιογένεια του παρασκευάσματος,

▼**M4**

— λεπτομέρειες σχετικά με τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας,

— κατά περίπτωση, μετατροπή της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο σιτηρέσιο ή το πόσιμο νερό (ppm) σε πραγματική δόση (mg/kg βάρους σώματος/ημέρα),

— λεπτομέρειες σχετικά με την ποιότητα της τροφής και του νερού.

Προαιρετικά καταληκτικά σημεία που διερευνήθηκαν

— κατάλογος των προαιρετικών καταληκτικών σημείων που διερευνήθηκαν.

Αποτελέσματα:

— βάρος σώματος/μεταβολές του βάρους σώματος,

— κατά περίπτωση, κατανάλωση τροφής και νερού,

— δεδομένα τοξικής αντίδρασης κατά φύλο και επίπεδο δόσης, συμπεριλαμβανομένων των τοξικών εκδηλώσεων,

— φύση, σοβαρότητα και διάρκεια των κλινικών παρατηρήσεων (αναστρέψιμων και μη),

— αξιολόγηση των αισθητηρίων λειτουργιών, της δύναμης της λαβής και της κινητικότητας,

— αιματολογικές εξετάσεις με τις αντίστοιχες τιμές αναφοράς,

— βιοχημικές εξετάσεις με τις αντίστοιχες τιμές αναφοράς,

— βάρος σώματος κατά την ευθανασία και βάρος των οργάνων,

— ευρήματα νεκροψίας,

— αναλυτική περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών ευρημάτων,

— δεδομένα για την απορρόφηση, εφόσον διατίθενται,

— στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, εφόσον κρίνεται σκόπιμο.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

▼**M4**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

NOAEL είναι η συντομογραφία του όρου «no observed adverse effect level». Πρόκειται για το ανώτατο επίπεδο δόσης στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις σχετιζόμενες με την αγωγή.

Ανδρογονικότητα είναι η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να δρα όπως μια φυσική ανδρογόνος ορμόνη (π.χ. τεστοστερόνη) στον οργανισμό θηλαστικού.

Αντιανδρογονικότητα είναι η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να καταστέλλει τη δράση μιας φυσικής ανδρογόνου ορμόνης (π.χ. τεστοστερόνη) στον οργανισμό ενός θηλαστικού.

Αντιθυρεοειδική δράστικότητα είναι η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να καταστέλλει τη δράση μιας φυσικής θυρεοειδικής ορμόνης (π.χ. T_3) στον οργανισμό ενός θηλαστικού.

Αντιοιστρογονικότητα είναι η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να καταστέλλει τη δράση μιας φυσικής οιστρογόνου ορμόνης (π.χ. 17β-οιστραδιόλη) στον οργανισμό θηλαστικού.

Δόση είναι η χορηγούμενη ποσότητα ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Η δόση εκφράζεται σε βάρος ελεγχόμενης χημικής ουσίας ανά μονάδα βάρους πειραματόζωου ανά ημέρα (π.χ. mg/kg βάρους σώματος/ημέρα) ή σε σταθερή συγκέντρωση στην τροφή.

Δοσολογία είναι ένας γενικός όρος που περιλαμβάνει τη δόση, καθώς και τη συχνότητα και τη διάρκεια χορήγησής της.

Έκδηλη τοξικότητα είναι ένας γενικός όρος που δηλώνει σαφή σημεία τοξικότητας μετά από χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Αυτά πρέπει να επαρκούν για την εκτίμηση του κινδύνου και να είναι τέτοια ώστε η αύξηση της χορηγούμενης δόσης να αναμένεται ότι θα προκαλέσει σοβαρές τοξικές εκδηλώσεις και πιθανώς θνησιμότητα.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Επικύρωση είναι μια επιστημονική διαδικασία σχεδιασμένη για τον χαρακτηρισμό των λειτουργικών απαιτήσεων και περιορισμών των μεθόδων δοκιμών και την απόδειξη της αξιοπιστίας και της καταλληλότητάς τους για συγκεκριμένο σκοπό.

Θυρεοειδική δραστικότητα είναι η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να δρα όπως μια φυσική θυρεοειδική ορμόνη (π.χ. T_3) στον οργανισμό θηλαστικού.

Οιστρογονικότητα είναι η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να δρα όπως μια φυσική οιστρογόνος ορμόνη (π.χ. 17β-οιστραδιόλη) στον οργανισμό θηλαστικού.

▼**M4**

Προσάρτημα 2

Συνιστώμενα καταληκτικά σημεία για την ανίχνευση ενδοκρινικών διαταρακτών στην παρούσα μέθοδο δοκιμών B.7

Υποχρεωτικά καταληκτικά σημεία	Προαιρετικά καταληκτικά σημεία
Βάρος	
— Όρχεις — Επιδιδυμίδες — Επινεφρίδια — Προστάτης + σπερματοδόχες κύστες με τους πηκτικούς αδένες	— Ωοθήκες — Μήτρα, συμπεριλαμβανομένου του τραχήλου της — Θυρεοειδής
Ιστοπαθολογία	
— Γεννητικοί αδένες: — όρχεις και — ωοθήκες — Άλλα όργανα του γεννητικού συστήματος: — επιδιδυμίδες, — προστάτης + σπερματοδόχες κύστεις με τους πηκτικούς αδένες, — μήτρα, συμπεριλαμβανομένου του τραχήλου της — Επινεφρίδια — Θυρεοειδής — Κόλπος	— Κολπικά επιχρίσματα — Αρσενικοί μαστικοί αδένες — Υπόφυση
Μέτρηση ορμονών	
	— Κυκλοφορούντα επίπεδα T3, T4 — Κυκλοφορούντα επίπεδα TSH

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) OECD (Paris, 1992). Chairman's Report of the Meeting of the ad hoc Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity.

(2) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No 60.

(3) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

(4) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol Environ. Health 9: 691-704.

(5) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

(6) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

▼**M4**

(7) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

(8) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11 March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(9) OECD. (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No 59, ENV/JM/MONO(2006)26.

(10) OECD (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No 21, ENV/JM/MONO(2002)8.

(11) OECD (2012).Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.html

(12) OECD (2006). Final Summary report of the meeting of the Validation Management Group for mammalian testing. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.

(13) OECD. Draft Summary record of the meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.

(14) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(15) Haley P, Perry R, Ennulat D, Frame S, Johnson C, Lapointe J-M, Nyska A, Snyder PW, Walker D, Walter G (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. Toxicol Pathol 33: 404-407.

(16) Hess RA, Moore BJ (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (eds). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.

(17) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM.(2002) Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. Toxicol. Pathol. 30, 524-533.

(18) OECD (2007). OECD Guideline for Testing of Chemicals No 440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties.

(19) OECD (2009). Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents ENV/JM/Mono(2009)11.

▼M4

Β.8. ΥΠΟΞΕΙΑ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ: ΜΕΛΕΤΗ 28 ΗΜΕΡΩΝ

ΣΥΝΟΨΗ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών Β.8 έχει σχεδιαστεί για τον πλήρη χαρακτηρισμό της τοξικότητας ελεγχόμενων χημικών ουσιών που χορηγούνται μέσω της αναπνευστικής οδού, μετά από επανειλημμένη έκθεση για περιορισμένη χρονική περίοδο (28 ημέρες), καθώς και για την παροχή δεδομένων για ποσοτικές εκτιμήσεις των αναπνευστικών κινδύνων. Ομάδες τουλάχιστον 5 αρσενικών και 5 θηλυκών τρωκτικών εκτίθενται για 6 ώρες ημερησίως επί 28 ημέρες α) στην ελεγχόμενη χημική ουσία, σε τρία ή περισσότερα επίπεδα συγκέντρωσης, β) σε φιλτραρισμένο αέρα (αρνητικός μάρτυρας) και/ή γ) στον φορέα (μάρτυρας για τον φορέα). Τα ζώα εκτίθενται γενικά επί 5 ημέρες ανά εβδομάδα, αλλά επιτρέπεται επίσης η έκθεση επί 7 ημέρες ανά εβδομάδα. Στη δοκιμή υποβάλλονται πάντα αρσενικά και θηλυκά ζώα, αλλά μπορούν να εκτίθενται σε διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης, εάν είναι γνωστό ότι ένα φύλο είναι πιο ευαίσθητο σε δεδομένη ελεγχόμενη χημική ουσία. Η παρούσα μέθοδος παρέχει στον διευθυντή της μελέτης την ευελιξία να συμπεριλαμβάνει στη μελέτη δορυφορικές ομάδες (αναστρεψιμότητας), βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL), νευρολογικές εξετάσεις και πρόσθετες εκτιμήσεις κλινικής παθολογίας και ιστοπαθολογίας, με σκοπό τον ακριβέστερο χαρακτηρισμό της τοξικότητας της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 412 του ΟΟΣΑ (2009). Η αρχική κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 412 (TG 412) για την υποξεία αναπνευστική τοξικότητα εκδόθηκε το 1981 (1). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών Β.8 (ισοδύναμη με την αναθεωρημένη TG 412) έχει επικαιροποιηθεί ώστε να αντανακλά την πρόοδο της επιστήμης και να ανταποκρίνεται στις τρέχουσες και τις μελλοντικές κανονιστικές ανάγκες.

2. Η παρούσα μέθοδος επιτρέπει τον χαρακτηρισμό των δυσμενών επιδράσεων που προκαλούνται από επανειλημμένη καθημερινή αναπνευστική έκθεση σε μια ελεγχόμενη χημική ουσία για 28 ημέρες. Τα δεδομένα που προκύπτουν από μελέτες υποξείας αναπνευστικής τοξικότητας 28 ημερών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ποσοτικές εκτιμήσεις κινδύνων [εάν δεν ακολουθήσει μελέτη υποχρόνιας αναπνευστικής τοξικότητας 90 ημερών (κεφάλαιο Β.29 του παρόντος παραρτήματος)]. Τα δεδομένα παρέχουν επίσης πληροφορίες σχετικά με την επιλογή συγκεντρώσεων για πιο μακροπρόθεσμες μελέτες, όπως η μελέτη υποχρόνιας αναπνευστικής τοξικότητας 90 ημερών. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν προορίζεται ειδικά για τον έλεγχο νανοϋλικών. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών παρατίθενται στο τέλος του παρόντος κεφαλαίου και στο έγγραφο καθοδήγησης GD 39 (2).

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

3. Πριν από τη διεξαγωγή της μελέτης το εργαστήριο θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη όλες τις διαθέσιμες πληροφορίες για την ελεγχόμενη χημική ουσία, ώστε να βελτιώνεται η ποιότητα της μελέτης και να ελαχιστοποιείται η χρήση ζώων. Πληροφορίες που βοηθούν στην επιλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων δοκιμής είναι, μεταξύ άλλων, η ταυτότητα, η χημική δομή και οι φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τα αποτελέσματα δοκιμών τοξικότητας in vitro ή in vivo, οι προβλεπόμενες χρήσεις και η δυνητική έκθεση του ανθρώπου, τα διαθέσιμα δεδομένα (Q)SAR και τοξικολογικά δεδομένα για δομικά συγγενείς ουσίες και τα δεδομένα που προέρχονται από δοκιμές οξείας αναπνευστικής τοξικότητας. Εάν αναμένεται ή παρατηρείται κατά τη διάρκεια της μελέτης νευροτοξικότητα, ο διευθυντής της μελέτης μπορεί να επιλέξει να συμπεριλάβει κατάλληλες αξιολογήσεις, όπως δέσμη παρατηρήσεων λειτουργιών (functional observational battery — FOB) και μέτρηση της κινητικής δραστηριότητας. Αν και το χρονοδιάγραμμα της έκθεσης που σχετίζεται με ειδικές εξετάσεις ενδέχεται να είναι κρίσιμης σημασίας, η εκτέλεση αυτών των πρόσθετων δραστηριοτήτων δεν θα πρέπει να περισπά τον σχεδιασμό της κυρίως μελέτης.

▼M4

4. Διαλύματα διαβρωτικών ή ερεθιστικών ελεγχόμενων χημικών ουσιών μπορούν να υποβάλλονται στη δοκιμή σε συγκεντρώσεις που να έχουν ως αποτέλεσμα τον επιθυμητό βαθμό τοξικότητας [βλέπε έγγραφο GD 39 (2)]. Κατά την έκθεση ζώων σε αυτά τα υλικά, οι συγκεντρώσεις στόχου θα πρέπει να τόσο χαμηλές ώστε να μην προκαλούν έντονο πόνο και δυσφορία, αλλά να αρκούν για την επέκταση της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης σε επίπεδα που επιτυγχάνουν τους κανονιστικούς και επιστημονικούς στόχους της δοκιμής. Οι συγκεντρώσεις αυτές θα πρέπει να επιλέγονται ανάλογα με την περίπτωση, κατά προτίμηση βάσει καταλλήλως σχεδιασμένης μελέτης καθορισμού εύρους που επιτρέπει τη λήψη πληροφοριών σχετικά με το κρίσιμο καταληκτικό σημείο, τυχόν όριο ερεθισμού και τον χρόνο εμφάνισης των εκδηλώσεων (βλέπε παραγράφους 11-13). Θα πρέπει να αιτιολογείται η επιλογή των συγκεντρώσεων.

5. Τα ετοιμοθάνατα ζώα, καθώς και εκείνα που παρουσιάζουν έντονο πόνο ή έντονη και διαρκή δυσφορία, πρέπει να θανατώνονται με ευθανασία. Τα ετοιμοθάνατα ζώα αντιμετωπίζονται όπως εκείνα που πεθαίνουν κατά τη δοκιμή. Τα κριτήρια για τη λήψη της απόφασης να θανατωθούν ετοιμοθάνατα ή βαρέως πάσχοντα ζώα, καθώς και κατευθύνσεις για την αναγνώριση των ενδείξεων προβλέψιμου ή επικείμενου θανάτου, αποτελούν το αντικείμενο εγγράφου καθοδήγησης του ΟΟΣΑ για τα λιγότερο βάναυσα καταληκτικά σημεία (3).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Επιλογή των ειδών ζώων

6. Πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή νεαρά, ενήλικα τρωκτικά των συνήθων εργαστηριακών φυλών. Το προτιμώμενο είδος είναι ο επίμυς. Εάν χρησιμοποιούνται άλλα είδη πρέπει να παρέχεται σχετική αιτιολόγηση.

Προετοιμασία των ζώων

7. Τα θηλυκά ζώα πρέπει να είναι άτοκα και να μη βρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης. Κατά την ημέρα τυχαιοποίησης, τα ζώα πρέπει να είναι νεαρά ενήλικα, ηλικίας 7 έως 9 εβδομάδων. Η διακύμανσης των βαρών σώματος πρέπει να είναι ± 20 % του μέσου βάρους των ζώων κάθε φύλου. Τα ζώα επιλέγονται τυχαία, σημαδεύονται για να μπορούν να αναγνωριστούν και παραμένουν στους κλωβούς τους επί 5 τουλάχιστον ημέρες πριν από την έναρξη της δοκιμής, προκειμένου να εγκλιματιστούν στις συνθήκες του εργαστηρίου.

Ζωοτεχνία

8. Κάθε ζώο πρέπει να ταυτοποιείται, εάν είναι δυνατόν με υποδόριο αναμεταδότη, ώστε να διευκολύνεται η παρατήρηση και να μη δημιουργείται σύγχυση. Η θερμοκρασία στην αίθουσα πειραματόζωων θα πρέπει να είναι 22 ± 3 °C. Η σχετική υγρασία θα πρέπει να διατηρείται, σε ιδανικές συνθήκες, εντός ενός εύρους 30 έως 70 %, αν και αυτό ενδέχεται να μην είναι δυνατό όταν χρησιμοποιείται το νερό ως φορέας. Πριν και μετά την έκθεση, τα ζώα πρέπει γενικά να στεγάζονται σε κλωβούς σε ομάδες ανά φύλο και συγκέντρωση, αλλά ο αριθμός των ζώων ανά κλωβό πρέπει να μην εμποδίζει την παρατήρηση κάθε ζώου και να ελαχιστοποιεί τις απώλειες λόγω κανιβαλισμού ή μαχών. Όταν τα ζώα πρόκειται να εκτεθούν μόνο ρινικά, ενδέχεται να είναι απαραίτητο να εγκλιματιστούν στους σωλήνες συγκράτησης. Οι σωλήνες συγκράτησης δεν θα πρέπει να προκαλούν στα ζώα περιττή φυσική ή θερμική δυσφορία ή δυσφορία λόγω ακινητοποίησης. Η συγκράτηση ενδέχεται να επηρεάζει τα φυσικά καταληκτικά σημεία, όπως τη θερμοκρασία του σώματος (υπερθερμία) και/ή τον όγκο του αναπνεόμενου αέρα ανά λεπτό. Εάν υπάρχουν γενικά δεδομένα που δείχνουν ότι δεν προκαλούνται τέτοιες αλλαγές σε σημαντικό βαθμό, δεν είναι απαραίτητη η εκ των προτέρων προσαρμογή στους σωλήνες συγκράτησης. Τα ζώα που εκτίθενται ολόσωμα σε αερόλυμα θα πρέπει να στεγάζονται ατομικά κατά τη διάρκεια της έκθεσης, ώστε να αποφεύγεται η διήθηση του ελεγχόμενου αερολύματος μέσω του τριχώματος των ζώων που στεγάζονται στον ίδιο κλωβό. Μπορούν να χρησιμοποιούνται συμβατικά και πιστοποιημένα εργαστηριακά σιτηρέσια, εκτός από την περίοδο της έκθεσης, συνοδευόμενα από απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού από το δίκτυο ύδρευσης. Ο φωτισμός θα πρέπει να είναι τεχνητός, με φωτοπερίοδο 12 ωρών.

▼M4

Θάλαμοι εισπνοής

9. Κατά την επιλογή θαλάμου εισπνοής θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη η φύση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και ο στόχος της δοκιμής. Προτιμώμενος τρόπος έκθεσης είναι η ρινική έκθεση (ο όρος περιλαμβάνει την κεφαλική, τη ρινική και τη ρυγχική έκθεση). Η ρινική έκθεση προτιμάται γενικά για μελέτες με υγρά ή στερεά αερολύματα και για ατμούς που είναι δυνατόν να συμπυκνωθούν σχηματίζοντας αερολύματα. Ειδικοί στόχοι της μελέτης ενδέχεται να επιτυγχάνονται καλύτερα με την εφαρμογή ολόσωμης έκθεσης, αλλά αυτό θα πρέπει να αιτιολογείται στην έκθεση της μελέτης. Για να εξασφαλίζεται η σταθερότητα της ατμόσφαιρας κατά τη χρήση θαλάμου ολόσωμης έκθεσης, ο συνολικός «όγκος» των πειραματόζωων δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 5 % του όγκου του θαλάμου. Οι αρχές των τεχνικών ρινικής και ολόσωμης έκθεσης, καθώς και τα ιδιαίτερα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά τους, εξετάζονται στο έγγραφο GD 39 (2).

ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

Οριακές συγκεντρώσεις

10. Σε αντίθεση με τις μελέτες οξείας τοξικότητας, δεν υπάρχουν καθορισμένες οριακές συγκεντρώσεις στις μελέτες υποξείας αναπνευστικής τοξικότητας 28 ημερών. Η μέγιστη ελεγχόμενη συγκέντρωση θα πρέπει να εξαρτάται από 1) τη μέγιστη εφικτή συγκέντρωση, 2) το επίπεδο έκθεσης του ανθρώπου στη χειρότερη περίπτωση, 3) την ανάγκη διατήρησης επαρκούς παροχής οξυγόνου και/ή 4) ζητήματα καλής μεταχείρισης των ζώων. Εάν δεν υπάρχουν όρια βάσει δεδομένων, μπορούν να χρησιμοποιούνται τα όρια οξείας τοξικότητας του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 (13) (ήτοι, μέγιστη συγκέντρωση 5 mg/l για αερολύματα, 20 mg/l για ατμούς και 20 000 ppm για αέρια)· βλέπε έγγραφο GD 39 (2). Τυχόν αναγκαία υπέρβαση των ορίων αυτών κατά τις δοκιμές με αέρια ή ιδιαιτέρως πτητικές ελεγχόμενες χημικές ουσίες (π.χ. ψυκτικά μέσα) θα πρέπει να αιτιολογείται. Η οριακή συγκέντρωση θα πρέπει να προκαλεί την εκδήλωση αδιαμφισβήτητης τοξικότητας, χωρίς περιττό άγχος για τα ζώα και χωρίς επίδραση στη μακροζωία τους (3).

Μελέτη καθορισμού εύρους

11. Πριν από την έναρξη της κυρίως μελέτης, ενδέχεται να πρέπει να εκπονηθεί μελέτη καθορισμού εύρους. Η μελέτη καθορισμού εύρους είναι πιο εκτενής από την αναγνωριστική μελέτη διότι δεν περιορίζεται στην επιλογή συγκεντρώσεων. Οι γνώσεις που αποκτώνται από τη μελέτη καθορισμού εύρους μπορούν να οδηγήσουν στην επιτυχία της κυρίως μελέτης. Μια μελέτη καθορισμού εύρους μπορεί, παραδείγματος χάριν, να παρέχει τεχνικές πληροφορίες σχετικά με αναλυτικές μεθόδους, την κατανομή μεγέθους σωματιδίων, την ανακάλυψη τοξικών μηχανισμών, δεδομένα κλινικής παθολογίας και ιστοπαθολογίας, και εκτιμήσεις των συγκεντρώσεων NOAEL και MTC στην κυρίως μελέτη. Ο διευθυντής της μελέτης μπορεί να επιλέξει να χρησιμοποιήσει τη μελέτη καθορισμού εύρους για να προσδιορίσει το όριο ερεθισμού της αναπνευστικής οδού (π.χ. μέσω ιστολογικής ανάλυσης της αναπνευστικής οδού, τεστ λειτουργίας των πνευμόνων ή βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος), την ανώτερη συγκέντρωση που είναι ανεκτή χωρίς να προκαλείται περιττό άγχος στα ζώα και τις παραμέτρους που χαρακτηρίζουν με τον καλύτερο τρόπο την τοξικότητα μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

12. Η μελέτη καθορισμού εύρους μπορεί να περιλαμβάνει ένα ή περισσότερα επίπεδα συγκέντρωσης. Δεν θα πρέπει να εκτίθενται περισσότερα από τρία αρσενικά και τρία θηλυκά ζώα σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης. Η μελέτη καθορισμού εύρους θα πρέπει να διαρκεί τουλάχιστον 5 μέρες και γενικά έως 14 ημέρες. Στην έκθεση της μελέτης θα πρέπει να αιτιολογείται η επιλογή συγκεντρώσεων για την κυρίως μελέτη. Στόχος της κυρίως μελέτης είναι να καταδειχθεί η σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης βάσει των προβλέψεων σχετικά με το πλέον ευαίσθητο καταληκτικό σημείο. Η χαμηλή συγκέντρωση θα πρέπει, σε ιδανικές συνθήκες, να είναι η συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις, ενώ η υψηλή συγκέντρωση θα πρέπει να προκαλεί την εκδήλωση αδιαμφισβήτητης τοξικότητας, χωρίς περιττό άγχος για τα ζώα και χωρίς επίδραση στη μακροζωία τους (3).

▼M4

13. Κατά την επιλογή επιπέδων συγκέντρωσης για τη μελέτη καθορισμού εύρους, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όλες οι διαθέσιμες πληροφορίες, συμπεριλαμβανομένων των σχέσεων δομής-δράσης και των δεδομένων που αφορούν παρόμοιες χημικές ουσίες (βλέπε παράγραφο 3). Η μελέτη καθορισμού εύρους μπορεί να επαληθεύσει/διαψεύσει τα θεωρούμενα ως πλέον ευαίσθητα από μηχανιστικής πλευράς καταληκτικά σημεία, π.χ. αναστολή της χολινεστεράσης από οργανοφωσφορικές ενώσεις, σχηματισμός μεθαιμοσφαιρίνης από ερυθροκυτταροτοξικούς παράγοντες, θυρεοειδικές ορμόνες (T_3, T_4), προκειμένου για θυρεοτοξικές ουσίες, πρωτεΐνες, LDH ή ουδετερόφυλα σε βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, προκειμένου για αβλαβή δυσδιάλυτα σωματίδια ή ερεθιστικά για τους πνεύμονες αερολύματα.

Κυρίως μελέτη

14. Η κυρίως μελέτη υποξείας τοξικότητας περιλαμβάνει γενικά τρία επίπεδα συγκέντρωσης και, επίσης, παράλληλους αρνητικούς μάρτυρες (αέρας) και/ή μάρτυρες για τον φορέα, κατά περίπτωση (βλέπε παράγραφο 17). Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται όλα τα διαθέσιμα δεδομένα για τη διευκόλυνση της επιλογής κατάλληλων επιπέδων έκθεσης, συμπεριλαμβανομένων των αποτελεσμάτων μελετών συστημικής τοξικότητας, του μεταβολισμού και της κινητικής (ιδιαίτερη έμφαση πρέπει να δίνεται στην αποφυγή υψηλών επιπέδων συγκέντρωσης που προκαλούν κορεσμό των κινητικών διαδικασιών). Κάθε ομάδα δοκιμής περιλαμβάνει τουλάχιστον 10 τρωκτικά (5 αρσενικά και 5 θηλυκά), τα οποία εκτίθενται στην ελεγχόμενη χημική ουσία για 6 ώρες ημερησίως επί 5 ημέρες ανά εβδομάδα, για περίοδο 4 εβδομάδων (η συνολική διάρκεια της μελέτης είναι 28 ημέρες). Τα ζώα μπορούν επίσης να εκτίθενται επί 7 ημέρες ανά εβδομάδα (π.χ. κατά τις δοκιμές με εισπνεόμενα φαρμακευτικά προϊόντα). Εάν είναι γνωστό ότι ένα φύλο είναι περισσότερο ευαίσθητο σε δεδομένη ελεγχόμενη χημική ουσία, τα δύο φύλα μπορούν να εκτίθενται σε διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης, ώστε να βελτιστοποιείται η σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 15. Σε περίπτωση ρινικής έκθεσης άλλων ειδών τρωκτικών εκτός των επιμύων, οι μέγιστες περίοδοι έκθεσης μπορούν να προσαρμόζονται ώστε να ελαχιστοποιείται η δυσφορία που νιώθει το κάθε είδος. Εάν η διάρκεια έκθεσης είναι μικρότερη των 6 ωρών/ημέρα ή όταν είναι απαραίτητο να διεξαχθεί μελέτη μακρόχρονης ολόσωμης έκθεσης (π.χ. 22 ώρες/ημέρα), θα πρέπει να παρέχεται σχετική αιτιολόγηση [βλέπε έγγραφο GD 39 (2)]. Κατά την περίοδο έκθεσης τα ζώα θα πρέπει να στερούνται τροφής, εκτός εάν η έκθεση υπερβαίνει τις 6 ώρες. Νερό μπορεί να παρέχεται καθ' όλη τη διάρκεια της ολόσωμης έκθεσης.

15. Οι επιλεγόμενες συγκεντρώσεις στόχου θα πρέπει να εντοπίζουν τα όργανα-στόχους και να καταδεικνύουν σαφή σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης:

— Το υψηλό επίπεδο συγκέντρωσης θα πρέπει να έχει τοξικές επιδράσεις αλλά να μην προκαλεί παρατεταμένες εκδηλώσεις τοξικότητας ή θανάτους, που θα καθιστούσαν άσκοπη την αξιολόγηση.

— Τα ενδιάμεσα επίπεδα συγκέντρωσης θα πρέπει να απέχουν χρονικά έτσι ώστε να επιτυγχάνεται διαβάθμιση των τοξικών επιδράσεων ανάμεσα στη χαμηλή και την υψηλή συγκέντρωση.

— Το χαμηλό επίπεδο συγκέντρωσης θα πρέπει να προκαλεί ελάχιστες ή μηδενικές ενδείξεις τοξικότητας.

Δορυφορική μελέτη (αναστρεψιμότητας)

16. Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί δορυφορική μελέτη (αναστρεψιμότητας) με σκοπό την παρατήρηση της αναστρεψιμότητας, της εμμονής ή της καθυστερημένης εμφάνισης τοξικότητας για κατάλληλο χρονικό διάστημα μετά την αγωγή, τουλάχιστον όμως επί 14 ημέρες. Οι δορυφορικές ομάδες (αναστρεψιμότητας) αποτελούνται από πέντε αρσενικά και πέντε θηλυκά ζώα που εκτίθενται ταυτόχρονα με τα πειραματόζωα της κυρίως μελέτης. Οι ομάδες της δορυφορικής μελέτης (αναστρεψιμότητας) θα πρέπει να εκτίθενται στην ελεγχόμενη χημική ουσία στο υψηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης, ενώ θα πρέπει να υπάρχουν και παράλληλοι μάρτυρες για τον αέρα και/ή τον φορέα, κατά περίπτωση (βλέπε παράγραφο 17).

▼M4

Ζώα-μάρτυρες

17. Τα ζώα που χρησιμοποιούνται ως παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες (αέρας) θα πρέπει να υφίστανται την ίδια μεταχείριση με τα ζώα των ομάδων δοκιμής, με τη μόνη διαφορά ότι τα πρώτα εκτίθενται σε φιλτραρισμένο αέρα και όχι στην ελεγχόμενη χημική ουσία. Όταν χρησιμοποιείται νερό ή άλλη ουσία για να υποβοηθήσει τη δημιουργία της πειραματικής ατμόσφαιρας, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται στη μελέτη ομάδα-μάρτυρας για τον φορέα αντί της ομάδας αρνητικού μάρτυρα (αέρας). Ως φορέας θα πρέπει να χρησιμοποιείται το νερό, εφόσον είναι δυνατόν. Όταν χρησιμοποιείται νερό ως φορέας, τα ζώα-μάρτυρες θα πρέπει να εκτίθενται σε αέρα με την ίδια σχετική υγρασία όπως οι ομάδες έκθεσης. Η επιλογή κατάλληλου φορέα θα πρέπει να βασίζεται σε καταλλήλως διεξαχθείσα προκαταρκτική μελέτη ή σε ιστορικά δεδομένα. Εάν δεν είναι αρκούντως γνωστή η τοξικότητα του φορέα, ο διευθυντής της μελέτης μπορεί να επιλέξει να χρησιμοποιήσει και αρνητικούς μάρτυρες (αέρας) και μάρτυρες για τον φορέα, αλλά αυτό δεν συνιστάται. Εάν, βάσει ιστορικών δεδομένων, ο φορέας δεν είναι τοξικός, δεν χρειάζεται ομάδα αρνητικού μάρτυρα (αέρας) αλλά μόνο ομάδα-μάρτυρας για τον φορέα. Εάν η προκαταρκτική μελέτη μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας που έχει μορφοποιηθεί σε φορέα δεν αποκαλύψει τοξικότητα, θεωρείται ότι ο φορέας δεν είναι τοξικός στην ελεγχθείσα συγκέντρωση, οπότε θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί μάρτυρας για τον συγκεκριμένο φορέα.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΚΘΕΣΗΣ

Χορήγηση των συγκεντρώσεων

18. Τα ζώα εκτίθενται στην ελεγχόμενη ουσία σε μορφή αερίου, ατμών, αερολύματος ή μείγματος αυτών. Η φυσική κατάσταση που ελέγχεται εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, την επιλεχθείσα συγκέντρωση και/ή τη φυσική μορφή που είναι πιθανότερο να υπάρχει κατά τον χειρισμό και τη χρήση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Υγροσκοπικές και χημικά δραστικές ελεγχόμενες χημικές ουσίες θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή υπό συνθήκες ξηρού αέρα. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μην παράγονται εκρηκτικές συγκεντρώσεις. Τα σωματιδιακά υλικά μπορούν να υποβάλλονται σε μηχανικές διεργασίες ώστε να μειώνεται το μέγεθος των σωματιδίων. Περαιτέρω καθοδήγηση παρέχει το έγγραφο GD 39 (2).

Κατανομή μεγέθους σωματιδίων

19. Πρέπει να προσδιορίζεται η κατανομή μεγέθους σωματιδίων για όλα τα αερολύματα και για ατμούς που ενδέχεται να συμπυκνωθούν σχηματίζοντας αερολύματα. Για να είναι δυνατή η έκθεση όλων των σχετικών περιοχών της αναπνευστικής οδού, συνιστώνται αερολύματα με διάμεσο αεροδυναμικής διαμέτρου κατά μάζα (MMAD) 1 έως 3 μm, με γεωμετρική τυπική απόκλιση (σ_g) 1,5 έως 3,0 (4). Παρόλο που θα πρέπει να καταβάλλονται εύλογες προσπάθειες για τη συμμόρφωση με το πρότυπο αυτό, εάν αυτό δεν είναι δυνατόν θα πρέπει να αναφέρεται η γνώμη των ειδικών. Παραδείγματος χάριν, σωματίδια καπνών μετάλλων μπορεί να υπολείπονται του προτύπου αυτού, ενώ φορτισμένα σωματίδια και ίνες μπορεί να το υπερβαίνουν.

Παρασκεύασμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε φορέα

20. Σε ιδανικές συνθήκες, η ελεγχόμενη χημική ουσία θα πρέπει να υποβάλλεται σε δοκιμή χωρίς φορέα. Εάν είναι απαραίτητη η χρήση φορέα για την επίτευξη κατάλληλης συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και κατάλληλου μεγέθους σωματιδίων, θα πρέπει να προτιμάται το νερό. Κάθε φορά που μια ελεγχόμενη χημική ουσία διαλύεται σε φορέα, πρέπει να καταδεικνύεται η σταθερότητά της.

ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΕΚΘΕΣΗΣ

Ροή αέρα στον θάλαμο

21. Η ροή του αέρα μέσω του θαλάμου έκθεσης πρέπει να ελέγχεται προσεκτικά, να παρακολουθείται συνεχώς και να καταγράφεται τουλάχιστον σε ωριαία βάση κατά τη διάρκεια κάθε έκθεσης. Η παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο της συγκέντρωσης στην πειραματική ατμόσφαιρα (ή της χρονικής σταθερότητας) είναι ολοκληρωτική μέτρηση όλων των δυναμικών

▼M4

παραμέτρων και αποτελεί έμμεσο τρόπο ελέγχου όλων των σχετικών δυναμικών αναπνευστικών παραμέτρων. Εάν η συγκέντρωση παρακολουθείται σε πραγματικό χρόνο, η συχνότητα μέτρησης των ροών αέρα μπορεί να μειωθεί σε μία μόνο μέτρηση ανά έκθεση ανά ημέρα. Θα πρέπει να λαμβάνεται ειδική μέριμνα για την αποφυγή της εκ νέου αναπνοής στους θαλάμους ρινικής έκθεσης. Η συγκέντρωση οξυγόνου πρέπει να είναι τουλάχιστον 19 % και η συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα να μην υπερβαίνει το 1 %. Εάν υπάρχει λόγος να θεωρείται ότι δεν μπορεί να τηρηθεί το πρότυπο αυτό, πρέπει να μετρώνται οι συγκεντρώσεις οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα. Εάν οι μετρήσεις κατά την πρώτη ημέρα έκθεσης δείχνουν ότι τα αέρια αυτά βρίσκονται σε κατάλληλα επίπεδα, δεν είναι απαραίτητο να εκτελούνται περαιτέρω μετρήσεις.

Θερμοκρασία και σχετική υγρασία του θαλάμου

22. Η θερμοκρασία του θαλάμου πρέπει να διατηρείται στους 22 ± 3 °C. Η σχετική υγρασία στη ζώνη αναπνοής των ζώων, τόσο στη ρινική όσο και στην ολόσωμη έκθεση, θα πρέπει να παρακολουθείται συνεχώς και να καταγράφεται ανά ώρα κατά τη διάρκεια κάθε έκθεσης, εφόσον είναι δυνατόν. Η σχετική υγρασία θα πρέπει κατά προτίμηση να διατηρείται σε επίπεδα 30 έως 70 %, αλλά αυτό μπορεί να είναι είτε ανέφικτο (π.χ. κατά τη δοκιμή μειγμάτων που έχουν ως βάση το νερό) ή μη μετρήσιμο, λόγω αλληλεπίδρασης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας με τη μέθοδο δοκιμών.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: ονομαστική συγκέντρωση

23. Εάν είναι εφικτό, θα πρέπει να υπολογίζεται και να καταγράφεται η ονομαστική συγκέντρωση στον θάλαμο έκθεσης. Η ονομαστική συγκέντρωση ορίζεται ως η μάζα της παραγόμενης ελεγχόμενης χημικής ουσίας διά του συνολικού όγκου αέρα που διαβιβάζεται μέσω του συστήματος του θαλάμου εισπνοής. Η ονομαστική συγκέντρωση δεν χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό της έκθεσης των ζώων, αλλά η σύγκρισή της με την πραγματική συγκέντρωση παρέχει ένδειξη για την απόδοση παραγωγής του συστήματος δοκιμών και, συνεπώς, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό προβλημάτων παραγωγής.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: πραγματική συγκέντρωση

24. Η πραγματική συγκέντρωση ορίζεται ως η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε δείγμα που λαμβάνεται από τη ζώνη αναπνοής των ζώων σε θάλαμο εισπνοής. Οι πραγματικές συγκεντρώσεις μπορούν να ληφθούν είτε με ειδικές μεθόδους (π.χ. άμεση δειγματοληψία, μέθοδοι προσρόφησης ή χημικής αντίδρασης και επακόλουθος αναλυτικός χαρακτηρισμός) είτε με μη ειδικές μεθόδους, όπως η σταθμική ανάλυση με ηθμό. Η χρήση σταθμικής ανάλυσης είναι αποδεκτή μόνο για αερολύματα σκόνης ενός μέρους ή για αερολύματα υγρών χαμηλής πτητικότητας και θα πρέπει να υποστηρίζεται από κατάλληλους χαρακτηρισμούς της ελεγχόμενης ουσίας πριν από τη μελέτη. Η συγκέντρωση αερολυμάτων σκόνης πολλών μερών μπορεί επίσης να προσδιοριστεί με σταθμική ανάλυση. Ωστόσο, απαιτούνται εν προκειμένω αναλυτικά δεδομένα που να καταδεικνύουν ότι η σύνθεση του αερομεταφερόμενου υλικού είναι παρόμοια με εκείνη του αρχικού υλικού. Εάν οι πληροφορίες αυτές δεν είναι διαθέσιμες, ενδέχεται να απαιτείται εκ νέου ανάλυση της ελεγχόμενης ουσίας (ιδανικά, στην αερομεταφερόμενη κατάσταση) ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της μελέτης. Για ουσίες σε μορφή αερολύματος που είναι δυνατόν να εξατμιστούν ή να εξαχνωθούν, θα πρέπει να αποδεικνύεται ότι συλλέγονται όλες οι φάσεις με την επιλεγείσα μέθοδο.

25. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται μία παρτίδα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης, εάν είναι δυνατόν, και το δοκίμιο να αποθηκεύεται υπό συνθήκες που διατηρούν την καθαρότητα, την ομοιογένεια και τη σταθερότητά του. Πριν από την έναρξη της μελέτης, η ελεγχόμενη ουσία θα πρέπει να χαρακτηρίζεται, μεταξύ άλλων ως προς την καθαρότητά της και, εάν είναι τεχνικά εφικτό, ως προς την ταυτότητα και τις ποσότητες των ταυτοποιημένων ρύπων και προσμείξεων. Αυτό μπορεί να καταδειχθεί, μεταξύ άλλων, από τα ακόλουθα δεδομένα: χρόνος κατακράτησης και εμβαδόν της σχετικής κορυφής, μοριακό βάρος μέσω αναλύσεων φασματομετρίας μάζας ή αεριοχρωματογραφίας ή άλλες εκτιμήσεις. Παρόλο που η ταυτότητα του ελεγχόμενου δείγματος δεν αποτελεί ευθύνη του εργαστηρίου, θα ήταν σκόπιμο να επιβεβαιώνει το εργαστήριο, έστω και σε περιορισμένο βαθμό, τον χαρακτηρισμό από τον χορηγό (π.χ. χρώμα, φυσική κατάσταση κ.λπ.).

▼M4

26. Η ατμόσφαιρα έκθεσης θα πρέπει να διατηρείται κατά το δυνατόν σταθερή. Μπορεί να χρησιμοποιείται συσκευή παρακολούθησης σε πραγματικό χρόνο, όπως φωτόμετρο αερολυμάτων για τα αερολύματα ή αναλυτής ολικών υδρογονανθράκων για τους ατμούς, προκειμένου να καταδεικνύεται η σταθερότητα των συνθηκών έκθεσης. Η πραγματική συγκέντρωση στον θάλαμο θα πρέπει να μετράται τουλάχιστον 3 φορές κατά τη διάρκεια κάθε ημέρας έκθεσης σε κάθε επίπεδο έκθεσης. Εάν δεν είναι εφικτό λόγω περιορισμένης ταχύτητας ροής του αέρα ή χαμηλών συγκεντρώσεων, είναι αποδεκτή η λήψη ενός δείγματος ανά περίοδο έκθεσης. Σε ιδανικές συνθήκες, το δείγμα αυτό θα πρέπει να συλλέγεται καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης. Τα επιμέρους δείγματα συγκέντρωσης στον θάλαμο δεν θα πρέπει να αποκλίνουν από τη μέση συγκέντρωση του θαλάμου περισσότερο από ± 10 %, προκειμένου για αέρια και ατμούς, και ± 20 % προκειμένου για υγρά ή στερεά αερολύματα. Πρέπει να υπολογίζεται και να καταγράφεται ο χρόνος εξισορρόπησης του θαλάμου (t_{95}). Η διάρκεια μιας έκθεσης καλύπτει τον χρόνο παραγωγής της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, στον οποίο λαμβάνονται υπόψη οι χρόνοι που απαιτούνται για την εξισορρόπηση του θαλάμου (t_{95}) και τη διάσπαση. Καθοδήγηση για την εκτίμηση του t_{95} παρέχει το έγγραφο GD 39 (2).

27. Στην περίπτωση πολύ σύνθετων μειγμάτων, αποτελούμενων από αέρια/ατμούς και αερολύματα (π.χ. ατμόσφαιρες καύσης και ελεγχόμενες χημικές ουσίες εξωθούμενες από στοχοστρεφή προϊόντα/συσκευές τελικής χρήσης), κάθε φάση ενδέχεται να συμπεριφέρεται διαφορετικά σε θάλαμο εισπνοής. Ως εκ τούτου, θα πρέπει να επιλέγεται τουλάχιστον μία ουσία-δείκτης (αναλύτης), συνήθως η κύρια δραστική ουσία του μείγματος, από κάθε φάση (αέριο/ατμοί και αερόλυμα). Όταν η ελεγχόμενη ουσία είναι μείγμα, η αναλυτική συγκέντρωση θα πρέπει να αναφέρεται για ολόκληρο το μείγμα και όχι μόνο για το δραστικό συστατικό ή την ουσία-δείκτη (αναλύτης). Πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με τις πραγματικές συγκεντρώσεις παρέχονται στο έγγραφο GD 39 (2).

Ελεγχόμενη χημική ουσία: κατανομή μεγέθους σωματιδίων

28. Θα πρέπει να προσδιορίζεται η κατανομή μεγέθους των σωματιδίων των αερολυμάτων τουλάχιστον σε εβδομαδιαία βάση για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης, με τη χρήση κρουστικού διαχωριστήρα ή εναλλακτικού οργάνου, όπως ο αεροδυναμικός κατανεμητής σωματιδίων (APS). Εάν μπορεί να αποδειχθεί ισοδυναμία των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με κρουστικό διαχωριστήρα και με το εναλλακτικό όργανο, επιτρέπεται να χρησιμοποιείται το εναλλακτικό όργανο καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης.

29. Παράλληλα με το κύριο όργανο θα πρέπει να χρησιμοποιείται μια δεύτερη συσκευή, όπως σταθμικός ηθμός ή πλυντρίδα αερίου/φυσαλιδοδείκτης, για να επιβεβαιώνει την απόδοση συλλογής του κύριου οργάνου. Η κατά μάζα συγκέντρωση που λαμβάνεται με ανάλυση μεγέθους σωματιδίων θα πρέπει να περικλείεται εντός των εύλογων ορίων συγκέντρωσης κατά μάζα που προκύπτουν από σταθμική ανάλυση [βλέπε GD 39 (2)]. Εάν μπορεί να αποδειχθεί ισοδυναμία σε όλες τις ελεγχόμενες συγκεντρώσεις σε πρώιμο στάδιο της μελέτης, μπορούν να παραλείπονται οι περαιτέρω επιβεβαιωτικές μετρήσεις. Για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων, θα πρέπει να λαμβάνονται μέτρα ώστε να ελαχιστοποιούνται τα αβέβαια δεδομένα που ενδέχεται να οδηγούν σε ανάγκη επανάληψης μιας μελέτης.

30. Θα πρέπει να προσδιορίζεται η κατανομή μεγέθους σωματιδίων στην περίπτωση των ατμών, εάν υπάρχει πιθανότητα η συμπύκνωση των ατμών να οδηγήσει στον σχηματισμό αερολύματος ή εάν ανιχνεύονται σε ατμόσφαιρα ατμών σωματίδια με δυναμικό σχηματισμού μεικτών φάσεων.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

31. Τα ζώα θα πρέπει να υποβάλλονται σε κλινική παρατήρηση πριν, κατά τη διάρκεια και μετά την περίοδο έκθεσης. Μπορεί να ενδείκνυνται συχνότερες παρατηρήσεις ανάλογα με την αντίδραση των ζώων κατά τη διάρκεια της έκθεσης. Όταν δεν είναι δυνατή η παρατήρηση των ζώων λόγω της χρήσης σωλήνων συγκράτησης, ανεπαρκούς φωτισμού των θαλάμων ολόσωμης έκθεσης ή αδιαφανούς ατμόσφαιρας, θα πρέπει να παρατηρούνται προσεκτικά τα ζώα μετά την έκθεση. Μέσω παρατηρήσεων πριν από την έκθεση της επόμενης ημέρας είναι δυνατόν να αξιολογηθεί τυχόν αναστρεψιμότητα ή επιδείνωση των τοξικών επιδράσεων.

▼M4

32. Όλες οι παρατηρήσεις καταγράφονται χωριστά για κάθε ζώο. Ο χρόνος θανάτου των ζώων που θανατώνονται προκειμένου να μην ταλαιπωρηθούν ή βρίσκονται νεκρά καταγράφεται με τη μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια.

33. Οι παρατηρήσεις στον κλωβό θα πρέπει να περιλαμβάνουν τις αλλαγές στο δέρμα και στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους, στο αναπνευστικό, στο κυκλοφοριακό και στο νευρικό σύστημα, καθώς και τις αλλαγές στη σωματοκινητική δραστηριότητα και στον τρόπο συμπεριφοράς. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίδεται στην παρατήρηση τρόμου, σπασμών, σιελόρροιας, διάρροιας, λήθαργου, ύπνου και κώματος. Η μέτρηση της θερμοκρασίας του ορθού μπορεί να παρέχει υποστηρικτικά αποδεικτικά στοιχεία αντανακλαστικής βραδύπνοιας ή υποθερμίας/υπερθερμίας που σχετίζεται με την αγωγή ή τη στέρηση της ελευθερίας. Είναι δυνατόν να συμπεριλαμβάνονται επίσης στο πρωτόκολλο της μελέτης πρόσθετες αξιολογήσεις που αφορούν, μεταξύ άλλων, την κινητική, τη βιοπαρακολούθηση, τη λειτουργία των πνευμόνων, την κατακράτηση δυσδιάλυτων υλικών τα οποία συσσωρεύονται στους ιστούς των πνευμόνων και τις αλλαγές στη συμπεριφορά.

ΒΑΡΟΣ ΣΩΜΑΤΟΣ

34. Θα πρέπει να καταγράφεται το βάρος κάθε ζώου λίγο πριν από την πρώτη έκθεση (ημέρα 0) και, στη συνέχεια, δύο φορές την εβδομάδα (π.χ. κάθε Παρασκευή και Δευτέρα, ώστε να καταδεικνύεται η ανάρρωση μετά από Σαββατοκύριακο χωρίς έκθεση, ή ανά χρονικά διαστήματα που επιτρέπουν την αξιολόγηση της συστημικής τοξικότητας), καθώς και κατά τον χρόνο θανάτου ή ευθανασίας. Εάν δεν εμφανιστούν επιδράσεις κατά τις πρώτες 2 εβδομάδες, το βάρος του σώματος των ζώων μπορεί να μετράται σε εβδομαδιαία βάση για το υπόλοιπο της μελέτης. Η ζύγιση των δορυφορικών ζώων (αναστρεψιμότητας), όταν χρησιμοποιούνται, θα πρέπει να συνεχίζεται σε εβδομαδιαία βάση καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου ανάρρωσης. Κατά την ολοκλήρωση της μελέτης, θα πρέπει να ζυγίζονται όλα τα ζώα λίγο πριν από τη θανάτωση ώστε να υπολογίζονται χωρίς συστηματικά σφάλματα οι λόγοι βάρους οργάνων προς βάρος σώματος.

ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΝΕΡΟΥ

35. Η κατανάλωση τροφής θα πρέπει να μετράται σε εβδομαδιαία βάση. Μπορεί επίσης να μετράται η κατανάλωση νερού.

ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

36. Θα πρέπει να πραγματοποιούνται εκτιμήσεις κλινικής παθολογίας για όλα τα ζώα, συμπεριλαμβανομένων των ζώων-μαρτύρων και των δορυφορικών ζώων (αναστρεψιμότητας), κατά τη θανάτωσή τους. Το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από το τέλος της έκθεσης έως την αιμοληψία θα πρέπει να καταγράφεται, ιδίως όταν η αποκατάσταση του εξεταζόμενου καταληκτικού σημείου είναι ταχεία. Ενδείκνυται η δειγματοληψία μετά το τέλος της έκθεσης για τις παραμέτρους με μικρό χρόνο υποδιπλασιασμού στο πλάσμα (π.χ. COHb, CHE και MetHb).

37. Στον πίνακα 1 παρατίθενται οι παράμετροι κλινικής παθολογίας που απαιτούνται γενικά σε όλες τις τοξικολογικές μελέτες. Δεν απαιτείται συστηματική ανάλυση ούρων, αλλά μπορεί να γίνεται όταν κρίνεται χρήσιμο βάσει της αναμενόμενης ή παρατηρούμενης τοξικότητας. Ο διευθυντής της μελέτης μπορεί να επιλέξει να αξιολογήσει πρόσθετες παραμέτρους για τον καλύτερο χαρακτηρισμό της τοξικότητας μιας χημικής ουσίας (π.χ. χολινεστεράση, λιπίδια, ορμόνες, οξεοβασική ισορροπία, μεθαιμοσφαιρίνη ή σωμάτια Heinz, κινάση κρεατίνης, λόγος μυελικών κυττάρων/ερυθρών αιμοσφαιρίων, τροπονίνες, αέρια αρτηριακού αίματος, γαλακτική αφυδρογονάση, αφυδρογονάση σορβιτόλης, γλουταμική αφυδρογονάση και γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάση).

▼M4

Πίνακας 1

Τυπικές παράμετροι κλινικής παθολογίας

Αιματολογία	
Αριθμός ερυθροκυττάρων	Αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων
Αιματοκρίτης	Λευκοκυτταρικός τύπος
Συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης	Αριθμός αιμοπεταλίων
Μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης	Πηκτικότητα (επιλέγεται ένα):
Μέσος όγκος ερυθρών αιμοσφαιρίων	— Χρόνος προθρομβίνης
Μέση πυκνότητα αιμοσφαιρίνης	— Χρόνος πήξης
Δικτυοερυθροκύτταρα	— Μερικός χρόνος θρομβοπλαστίνης
Κλινική χημεία	
Γλυκόζη (*)	Αλανινο-αμινοτρανσφεράση
Ολική χοληστερόλη	Ασπαργινική αμινοτρανσφεράση
Τριγλυκερίδια	Αλκαλική φωσφατάση
Άζωτο ουρίας αίματος	Κάλιο
Ολική χολερυθρίνη	Νάτριο
Κρεατινίνη	Ασβέστιο
Ολικές πρωτεΐνες	Φωσφόρος
Αλβουμίνη	Χλωριούχα άλατα
Σφαιρίνη	
Ανάλυση ούρων (προαιρετική)	
Όψη (χρώμα και θολερότητα)	Ολικές πρωτεΐνες
Όγκος	Γλυκόζη
Ειδικό βάρος ή ωσμοτικότητα	Αίμα/Αιμοκύτταρα
pH	

(*) Δεδομένου ότι η μακρά περίοδος νηστείας μπορεί να επιφέρει συστηματικό σφάλμα στις μετρήσεις γλυκόζης των ζώων που υποβάλλονται σε αγωγή σε σχέση με τα ζώα-μάρτυρες, ο διευθυντής της μελέτης θα πρέπει να κρίνει αν είναι σκόπιμο να υποβληθούν τα ζώα σε νηστεία. Εάν εφαρμόζεται περίοδος νηστείας, θα πρέπει να είναι κατάλληλη για τα χρησιμοποιούμενα είδη. Στην περίπτωση των επιμύων, η περίοδος αυτή μπορεί να είναι 16 ώρες (ολονύκτια νηστεία). Ο προσδιορισμός της γλυκόζης μετά από νηστεία μπορεί να εκτελείται μετά από ολονύκτια νηστεία κατά την τελευταία εβδομάδα έκθεσης ή μετά από ολονύχτια νηστεία πριν από τη νεκροψία (στη δεύτερη περίπτωση, ταυτόχρονα με τη μέτρηση όλων των άλλων παραμέτρων κλινικής παθολογίας).

38. Εάν υπάρχουν ενδείξεις απόθεσης και κατακράτησης κυρίως στην κατώτερη αναπνευστική οδό (ήτοι στις κυψελίδες), το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) μπορεί να είναι η προτιμητέα τεχνική για την ποσοτική ανάλυση παραμέτρων δόσης-επιδράσεων βάσει παραδοχών, με εστίαση στην κυψελίτιδα, την πνευμονική φλεγμονή και τη φωσφολιπίδωση. Με τον τρόπο αυτόν διερευνώνται κατάλληλα οι αλλαγές στις κακώσεις των κυψελίδων βάσει της σχέσης δόσης-απόκρισης και της χρονικής διάρκειας. Το υγρό του BAL μπορεί να υποβληθεί σε ανάλυση για τον προσδιορισμό του αριθμού λευκών αιμοσφαιρίων και του λευκοκυτταρικού τύπου, των ολικών πρωτεϊνών και της γαλακτικής αφυδρογονάσης. Άλλες παράμετροι που μπορούν να εξετάζονται είναι αυτές που παρέχουν ενδείξεις κακώσεων των λυσοσωμάτων, φωσφολιπίδωσης, ίνωσης και ερεθιστικής ή αλλεργικής φλεγμονής, συμπεριλαμβανομένου ενδεχομένως του προσδιορισμού προφλεγμονωδών κυτοκινών/χημοκινών. Οι μετρήσεις BAL συμπληρώνουν γενικά τα αποτελέσματα των ιστοπαθολογικών εξετάσεων αλλά δεν μπορούν να τις αντικαταστήσουν. Καθοδήγηση για τον τρόπο έκπλυσης των πνευμόνων παρέχει το έγγραφο GD 39 (2).

▼M4

ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΒΑΡΟΣ ΤΩΝ ΟΡΓΑΝΩΝ

39. Όλα τα πειραματόζωα, συμπεριλαμβανομένων όσων πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμής ή αποσύρονται από τη μελέτη για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων, πρέπει να υποβάλλονται σε πλήρη αφαίμαξη (εάν είναι εφικτό) και νεκροψία. Θα πρέπει να καταγράφεται ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ του τέλους της τελευταίας έκθεσης κάθε ζώου και της θανάτωσής του. Εάν δεν μπορεί να γίνει νεκροψία αμέσως μετά την ανακάλυψη νεκρού ζώου, το ζώο θα πρέπει να ψύχεται (όχι να καταψύχεται) σε θερμοκρασία αρκετά χαμηλή ώστε να ελαχιστοποιείται η αυτόλυση. Η νεκροψία θα πρέπει να εκτελείται το ταχύτερο δυνατόν, κατά κανόνα εντός μιας ή δύο ημερών. Όλες οι μακροσκοπικές παθολογικές αλλοιώσεις θα πρέπει να καταγράφονται για κάθε ζώο, με ιδιαίτερη προσοχή σε τυχόν αλλοιώσεις της αναπνευστικής οδού.

40. Στον πίνακα 2 εμφαίνονται τα όργανα και οι ιστοί που θα πρέπει να διατηρούνται σε κατάλληλο μέσο κατά τη νεκροψία για ιστοπαθολογική εξέταση. Η διατήρηση των οργάνων και ιστών που αναφέρονται εντός αγκίστρων, καθώς και άλλων οργάνων και ιστών επαφίεται στη διακριτική ευχέρεια του διευθυντή της μελέτης. Τα όργανα που αναφέρονται με **έντονους χαρακτήρες** θα πρέπει να καθαρίζονται από ιστούς και να ζυγίζονται υγρά το συντομότερο δυνατό μετά την ανατομή, ώστε να αποφεύγεται η ξήρανσή τους. Ο θυρεοειδής αδένας και οι επιδιδυμίδες θα πρέπει να ζυγίζονται μόνο εάν χρειάζεται, διότι τεχνητές ενδείξεις (artefacts) που οφείλονται στον καθαρισμό είναι δυνατόν να εμποδίσουν την ιστοπαθολογική αξιολόγηση. Οι ιστοί και τα όργανα θα πρέπει να μονιμοποιούνται σε φορμαλίνη με ρυθμιστικό διάλυμα 10 % ή άλλο κατάλληλο μονιμοποιητικό υλικό, αμέσως μετά τη νεκροψία και τουλάχιστον 24-48 ώρες πριν από τον καθαρισμό τους από ιστούς, ανάλογα με το μονιμοποιητικό υλικό που θα χρησιμοποιηθεί.

Πίνακας 2

Διατηρούμενα όργανα και ιστοί κατά τη νεκροψία

Επινεφρίδια	Σπερματοδόχες κύστεις
Μυελός των οστών (και/ή πρόσφατα αναρροφηθείς μυελός των οστών)	Νωτιαίος μυελός (αυχενικός, μεσοθωρακικός και οσφυϊκός)
Εγκέφαλος (συμπεριλαμβανομένων τομών του εγκεφάλου, της παρεγκεφαλίδας και του προμήκη μυελού/της γέφυρας)	**Σπλήνα**
[Οφθαλμοί (αμφιβληστροειδής, οπτικό νεύρο) και βλέφαρα]	Στομάχι
Καρδιά	**Όρχεις**
Νεφροί	**Θύμος**
Λάρυγγας (3 επίπεδα, 1 επίπεδο πρέπει να περιλαμβάνει τη βάση της επιγλωττίδας)	Θυρεοειδής
Ήπαρ	Τραχεία (τουλάχιστον 2 επίπεδα, συμπεριλαμβανομένης 1 διαμήκους τομής μέσω της τρόπιδας και 1 εγκάρσιας τομής)
Πνεύμονας (όλοι οι λοβοί σε ένα επίπεδο, συμπεριλαμβανομένων των κυρίων βρόγχων)	[Ουροδόχος κύστη]
Λεμφαδένες από την πυλαία περιοχή του πνεύμονα, ιδίως στην περίπτωση δυσδιάλυτων ελεγχόμενων χημικών ουσιών σε σωματιδιακή μορφή. Για περισσότερο ενδελεχείς εξετάσεις και/ή μελέτες με ανοσολογική εστίαση, μπορεί να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης περισσότερων λεμφαδένων, π.χ. από τη μεσοθωρακική, την αυχενική/υπογνάθια και/ή την ωτική περιοχή.	Μήτρα
Ρινοφαρυγγικοί ιστοί (τουλάχιστον 4 επίπεδα· 1 επίπεδο πρέπει να περιλαμβάνει τον ρινοφαρυγγικό πόρο και τον λεμφικό ιστό που συνοδεύει τη ρινική κοιλότητα (NALT).	Όλοι οι ιστοί με μακροσκοπικές αλλοιώσεις
Οισοφάγος	
[Οσφρητικός βολβός]	
Ωοθήκες	

▼M4

41. Οι πνεύμονες θα πρέπει να αφαιρούνται άθικτοι, να ζυγίζονται και να διαποτίζονται με κατάλληλο μονιμοποιητικό υλικό υπό πίεση 20-30 cm στήλης νερού ώστε να εξασφαλίζεται η διατήρηση της δομής τους (5). Πρέπει να συλλέγονται τομές όλων των λοβών σε ένα επίπεδο, συμπεριλαμβανομένων των κυρίων βρόγχων, αλλά σε περίπτωση έκπλυσης των πνευμόνων, ο λοβός που δεν έχει εκπλυθεί θα πρέπει να τέμνεται σε τρία επίπεδα (όχι σειριακές τομές).

42. Θα πρέπει να εξετάζονται τουλάχιστον 4 επίπεδα των ρινοφαρυγγικών ιστών, ένα από τα οποία θα πρέπει να περιλαμβάνει τον ρινοφαρυγγικό πόρο (5, 6, 7, 8, 9), ώστε να εξετάζονται επαρκώς το πλακώδες, το μεταβατικό (μη βλεφαριδοφόρο αναπνευστικό), το αναπνευστικό (βλεφαριδοφόρο αναπνευστικό) και το οσφρητικό επιθήλιο, καθώς και ο λεμφικός ιστός αποχέτευσης (NALT· 10, 11). Θα πρέπει να εξετάζονται τρία επίπεδα του λάρυγγα, ένα από τα οποία πρέπει να περιλαμβάνει τη βάση της επιγλωττίδας (12). Θα πρέπει να εξετάζονται τουλάχιστον δύο επίπεδα της τραχείας, συμπεριλαμβανομένης μιας διαμήκους τομής, μέσω της τρόπιδας, της διακλάδωσης των εξωπνευμονικών βρόχων και μιας εγκάρσιας τομής.

ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

43. Θα πρέπει να διενεργείται ιστοπαθολογική αξιολόγηση όλων των οργάνων και ιστών που αναφέρονται στον πίνακα 2, για την ομάδα μάρτυρα και τις ομάδες υψηλής συγκέντρωσης και για όλα τα ζώα που πεθαίνουν ή θανατώνονται κατά τη διάρκεια της μελέτης. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίδεται στην αναπνευστική οδό, στα όργανα-στόχο και στις μακροσκοπικές βλάβες. Τα όργανα και οι ιστοί που παρουσιάζουν βλάβες στην ομάδα υψηλής συγκέντρωσης θα πρέπει να εξετάζονται σε όλες τις ομάδες. Ο διευθυντής της μελέτης μπορεί να επιλέξει να διενεργήσει ιστοπαθολογική αξιολόγηση επιπρόσθετων ομάδων ώστε να καταδειχθεί σαφής σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης. Σε περίπτωση που έχει χρησιμοποιηθεί δορυφορική ομάδα (αναστρεψιμότητας), απαιτείται ιστοπαθολογική αξιολόγηση όλων των ιστών και των οργάνων που διαπιστώθηκε ότι παρουσίασαν αλλοιώσεις στις ομάδες αγωγής. Εάν στην ομάδα υψηλής έκθεσης σημειωθεί υπερβολικός αριθμός πρώιμων θανάτων ή άλλων προβλημάτων που επηρεάζουν αρνητικά τη σημαντικότητα των δεδομένων, θα πρέπει να γίνει ιστοπαθολογική εξέταση στην ομάδα της αμέσως επόμενης χαμηλότερης συγκέντρωσης. Θα πρέπει να επιχειρείται συσχετισμός των μακροσκοπικών παρατηρήσεων με τα μικροσκοπικά ευρήματα.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Δεδομένα

44. Θα πρέπει να παρέχονται δεδομένα για κάθε ζώο σχετικά με το βάρος του, την κατανάλωση τροφής, την κλινική παθολογία, την παθολογοανατομία, το βάρος των οργάνων του και την ιστοπαθολογία. Τα δεδομένα κλινικής παρατήρησης πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα ο οποίος περιλαμβάνει, για κάθε ομάδα δοκιμής, τον αριθμό των χρησιμοποιηθέντων ζώων, τον αριθμό των ζώων που εμφάνισαν συγκεκριμένες τοξικές εκδηλώσεις, τον αριθμό των ζώων που βρέθηκαν νεκρά κατά τη διάρκεια της δοκιμής ή θανατώθηκαν για να μην ταλαιπωρηθούν, τον χρόνο θανάτου κάθε ζώου, περιγραφή και χρονική εξέλιξη των τοξικών επιδράσεων, αναστρεψιμότητα και ευρήματα νεκροψίας. Όλα τα αποτελέσματα, ποσοτικά και συμπτωματικά, πρέπει να αξιολογούνται με κατάλληλη στατιστική μέθοδο. Μπορεί να χρησιμοποιηείται οποιαδήποτε στατιστική μέθοδος γενικής αποδοχής, η οποία πρέπει να επιλέγεται κατά τον σχεδιασμό της μελέτης.

Έκθεση δοκιμής

45. Η έκθεση της δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία, κατά περίπτωση:

Πειραματόζωα και ζωοτεχνία

— περιγραφή των συνθηκών στέγασης σε κλωβούς, συμπεριλαμβανομένων των εξής: αριθμός (ή μεταβολή του αριθμού) ζώων ανά κλωβό, στρωμνή, θερμοκρασία και σχετική υγρασία του περιβάλλοντος, φωτοπερίοδος και προσδιορισμός του σιτηρεσίου,

▼M4

— είδος/φυλή που χρησιμοποιήθηκε και αιτιολόγηση της χρήσης άλλου είδους πλην του επίμυ· μπορούν να παρέχονται δεδομένα πηγής και ιστορικά δεδομένα, εφόσον προέρχονται από ζώα που έχουν υποβληθεί σε παρόμοιες συνθήκες έκθεσης, στέγασης και νηστείας,

— αριθμός ηλικία και φύλο των ζώων,

— μέθοδος τυχαιοποίησης,

— περιγραφή τυχόν προετοιμασίας πριν από τον έλεγχο, συμπεριλαμβανομένων του σιτηρεσίου, της περιόδου υγειονομικής απομόνωσης και της αγωγής για ασθένειες.

Ελεγχόμενη χημική ουσία

— φυσική κατάσταση, καθαρότητα και, κατά περίπτωση, φυσικές και χημικές ιδιότητες (συμπεριλαμβανομένης της ισομερείωσης),

— στοιχεία ταυτότητας και αριθμός CAS, εάν είναι γνωστός.

Φορέας

— αιτιολόγηση της χρήσης φορέα και της επιλογής του φορέα (εάν δεν είναι το νερό),

— ιστορικά ή παράλληλα δεδομένα που καταδεικνύουν ότι ο φορέας δεν επηρεάζει το αποτέλεσμα της μελέτης.

Θάλαμος εισπνοής

— αναλυτική περιγραφή του θαλάμου εισπνοής, συμπεριλαμβανομένων του όγκου και ενός διαγράμματος,

— πηγή και περιγραφή του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται για την έκθεση των ζώων, καθώς και για τη δημιουργία της ατμόσφαιρας,

— εξοπλισμός για τη μέτρηση της θερμοκρασίας, της υγρασίας, του μεγέθους σωματιδίων και της πραγματικής συγκέντρωσης,

— πηγή αέρα και χρησιμοποιούμενο σύστημα κλιματισμού,

— μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη βαθμονόμηση του εξοπλισμού ώστε να εξασφαλίζεται ομοιογενής πειραματική ατμόσφαιρα,

— διαφορά πίεσης (θετική ή αρνητική),

— θύρες έκθεσης ανά θάλαμο (ρινική έκθεση)· θέση των ζώων στον θάλαμο (ολόσωμη έκθεση),

— σταθερότητα της πειραματικής ατμόσφαιρας,

— θέση των αισθητήρων θερμοκρασίας και υγρασίας και δειγματοληψία της πειραματικής ατμόσφαιρας στον θάλαμο,

— επεξεργασία του παρεχόμενου/απαγόμενου αέρα,

— ταχύτητες ροής αέρα, ταχύτητα ροής αέρα/θύρα έκθεσης (ρινική έκθεση) ή φορτίο ζώων/θάλαμο (ολόσωμη έκθεση),

— χρόνος για την επίτευξη ισορροπίας στον θάλαμο εισπνοής (t95),

— αριθμός αλλαγών όγκου ανά ώρα,

— συσκευές μέτρησης (κατά περίπτωση).

Δεδομένα έκθεσης

— αιτιολόγηση της επιλογής της συγκέντρωσης στόχου για την κυρίως μελέτη,

▼M4

— ονομαστικές συγκεντρώσεις (συνολική μάζα της παραγόμενης ελεγχόμενης χημικής ουσίας μέσα στον θάλαμο εισπνοής διά του όγκου αέρα που διαβιβάζεται μέσω του θαλάμου),

— πραγματικές συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που λαμβάνονται από τη ζώνη αναπνοής των ζώων· για μείγματα που παράγουν ετερογενείς φυσικές μορφές (αέρια, ατμούς, αερολύματα), καθεμιά μπορεί να αναλύεται χωριστά,

— όλες οι ατμοσφαιρικές συγκεντρώσεις θα πρέπει να αναφέρονται σε μονάδες μάζας (mg/l mg/m^3 κ.λπ.) και όχι σε μονάδες όγκου (ppm, ppb κ.λπ.),

— κατανομή μεγέθους σωματιδίων, διάμεσος αεροδυναμικής διαμέτρου κατά μάζα (MMAD) και γεωμετρική τυπική απόκλιση (σ_g), συμπεριλαμβανομένων των μεθόδων υπολογισμού τους. Θα πρέπει να αναφέρονται οι επιμέρους αναλύσεις μεγέθους σωματιδίων.

Συνθήκες δοκιμής

— λεπτομερή στοιχεία για το παρασκεύασμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, συμπεριλαμβανομένων λεπτομερειών σχετικά με τις διαδικασίες που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν για τη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων στερεών ή για την παρασκευή διαλυμάτων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας,

— περιγραφή (κατά προτίμηση συνοδευόμενη από διάγραμμα) του εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία της πειραματικής ατμόσφαιρας και την έκθεση των ζώων σε αυτή,

— λεπτομερή στοιχεία σχετικά με τον εξοπλισμό που χρησιμοποιήθηκε για την παρακολούθηση της θερμοκρασίας του θαλάμου, της υγρασίας του και της ροής αέρα σε αυτόν (δηλαδή καμπύλη βαθμονόμησης),

— λεπτομερή στοιχεία σχετικά με τον εξοπλισμό που χρησιμοποιήθηκε για τη συλλογή δειγμάτων για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης και της κατανομής μεγέθους σωματιδίων στον θάλαμο,

— λεπτομερή στοιχεία για τη χημική αναλυτική μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε και την επικύρωσή της (συμπεριλαμβανομένης της απόδοσης ανάκτησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας από το μέσο δειγματοληψίας),

— μέθοδος τυχαιοποίησης κατά την κατανομή των ζώων στις ομάδες δοκιμής και μαρτύρων,

— λεπτομερή στοιχεία για την ποιότητα της τροφής και του νερού (συμπεριλαμβανομένων του είδους και της πηγής του σιτηρεσίου και της πηγής του νερού),

— αιτιολόγηση της επιλογής των συγκεντρώσεων δοκιμής.

Αποτελέσματα

— πίνακας με τη θερμοκρασία του θαλάμου, την υγρασία του και τη ροή αέρα σε αυτόν,

— πίνακας με τα δεδομένα ονομαστικών και πραγματικών συγκεντρώσεων στον θάλαμο,

— πίνακας με τα δεδομένα μεγέθους σωματιδίων, συμπεριλαμβανομένων δεδομένων για τη συλλογή του δείγματος ανάλυσης, της κατανομής μεγέθους σωματιδίων και των υπολογισμών της MMAD και της σ_g,

— πίνακας με τα δεδομένα απόκρισης και το επίπεδο συγκέντρωσης για κάθε ζώο (δηλαδή ζώα που παρουσίασαν εκδηλώσεις τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένης της θνησιμότητας, και φύση, σοβαρότητα, χρόνος εμφάνισης και διάρκεια των επιδράσεων),

▼**M4**

— πίνακας με το βάρος κάθε ζώου,

— πίνακας με την κατανάλωση τροφής,

— πίνακας με τα δεδομένα κλινικής παθολογίας,

— ευρήματα νεκροψίας και ιστοπαθολογικά ευρήματα για καθένα από τα ζώα, εφόσον υπάρχουν,

— πίνακας με άλλες παραμέτρους που μετρήθηκαν.

Συζήτηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

— Ιδιαίτερη έμφαση θα πρέπει να δίδεται στην περιγραφή των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την εκπλήρωση των κριτηρίων της παρούσας μεθόδου δοκιμών, π.χ. της οριακής συγκέντρωσης ή του μεγέθους σωματιδίων.

— Θα πρέπει να καλύπτεται το ζήτημα της εισπνευσιμότητας των σωματιδίων βάσει των συνολικών ευρημάτων, ιδίως εάν τα σχετικά με το μέγεθος των σωματιδίων κριτήρια δεν ήταν δυνατό να εκπληρωθούν.

— Η συνολική αξιολόγηση της μελέτης πρέπει να περιλαμβάνει τη συνέπεια μεταξύ των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των ονομαστικών και πραγματικών συγκεντρώσεων και τη σχέση της πραγματικής προς την ονομαστική συγκέντρωση.

— Θα πρέπει να αναφέρεται η πιθανή αιτία θανάτου και ο επικρατέστερος τρόπος δράσης (συστημική δράση έναντι τοπικής).

— Θα πρέπει να παρέχονται εξηγήσεις εάν χρειάστηκε να θανατωθούν με ευθανασία ζώα που υπέφεραν ή εμφάνιζαν εκδηλώσεις έντονης και διαρκούς δυσφορίας, βάσει των κριτηρίων του εγγράφου καθοδήγησης του ΟΟΣΑ για τα λιγότερο βάναυσα καταληκτικά σημεία (3).

— Θα πρέπει να προσδιορίζονται τα όργανα-στόχοι.

— Θα πρέπει να προσδιορίζονται οι τιμές NOAEL και LOAEL.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) OECD (1981), Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 412, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) OECD (2009), Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(3) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(4) Whalan J.E. και Redden J.C. (1994), Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies, Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

(5) Dungworth D.L., Tyler W.S., Plopper C.E. (1985), Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. και Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229-258.

(6) Young J.T. (1981), Histopathological examination of the rat nasal cavity, *Fundam. Appl. Toxicol.* 1: 309-312.

(7) Harkema J.R. (1990), Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants, *Environ. Health Perspect.* 85: 231-238.

▼**M4**

(8) Woutersen R.A., Garderen-Hoetmer A., van Slootweg P.J., Feron V.J. (1994), Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans, στο: Waalkes M.P. και Ward J.M. (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

(9) Mery S., Gross E.A., Joyner D.R., Godo M., Morgan K.T. (1994), Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice, *Toxicol. Pathol.* 22: 353-372.

(10) Kuper C.F., Koornstra P.J., Hameleers D.M.H., Biewenga J., Spit B.J., Duijvestijn A.M., Breda Vriesman van P.J.C., Sminia T. (1992), The role of nasopharyngeal lymphoid tissue, *Immunol. Today* 13: 219-224.

(11) Kuper C.F., Arts J.H.E., Feron V.J. (2003), Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue, *Toxicol. Lett.* 140-141: 281-285.

(12) Lewis D.J. (1981), Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia, *Journal of Anatomy* 132(3): 419-428.

(13) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων, την τροποποίηση και την κατάργηση των οδηγιών 67/548/ΕΟΚ και 1999/45/ΕΚ και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 (ΕΕ L 353 της 31.12.2008, σ. 1).

▼**M4**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΣ

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών..

▼B

B.9. **ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗΣ (28 ΗΜΕΡΕΣ) ΔΟΣΗΣ (ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ)**

1 **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Βλέπε Γενική Εισαγωγή Μέρος Β (Α).

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Βλέπε Γενική Εισαγωγή, Μέρος Β (Β).

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Ουδεμία.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η εξεταζόμενη ουσία εφαρμόζεται καθημερινά στο δέρμα σε διαβαθμισμένες δόσεις, σε διάφορες ομάδες πειραματόζωων, μία δόση ανά ομάδα, για μια χρονική περίοδο 28 ημερών. Κατά τη διάρκεια της περιόδου εφαρμογής, τα ζώα εξετάζονται καθημερινά για τη διαπίστωση τοξικών συμπτωμάτων. Τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμής, όπως και αυτά που επιζούν στη λήξη της, νεκροτομούνται.

1.5. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Ουδέν.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.6.1. **Προετοιμασίες**

Τα ζώα κρατούνται κάτω από τις πειραματικές συνθήκες εγκλωβισμού και διατροφής για 5 τουλάχιστον ημέρες πριν από τη δοκιμασία. Πριν από τη δοκιμή υγιή, νεαρά ζώα ξεχωρίζονται τυχαία και κατανέμονται στις πειραματικές ομάδες και τις ομάδες μαρτύρων. Λίγο πριν αρχίσει η δοκιμή το τρίχωμα ψαλιδίζεται από την περιοχή της ράχης του κορμού των πειραματόζωων. Μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθεί το ξύρισμα για την απομάκρυνση του τριχώματος, αλλά αυτό πρέπει να γίνεται 24 ώρες περίπου πριν από τη δοκιμή. Επανάληψη του ψαλιδίσματος ή του ξυρίσματος χρειάζεται συνήθως κάθε εβδομάδα. Το ψαλίδισμα ή ξύρισμα πρέπει να γίνεται με προσοχή, ώστε να αποφεύγεται η απόξεση του δέρματος. Πρέπει να καθαρίζεται μια περιοχή για την εφαρμογή της εξεταζόμενης ουσίας, η οποία δεν πρέπει να είναι μικρότερη από το 10 % της επιφάνειας του σώματος. Όταν αποφασίζονται οι διαστάσεις της περιοχής που πρέπει να καθαριστεί και να καλυφθεί με την εξεταζόμενη ουσία, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το βάρος του ζώου. Όταν ελέγχονται στερεά, τα οποία μπορούν να κονιοποιηθούν, πρέπει να υγραίνονται αρκετά με νερό ή αν χρειαστεί με κατάλληλο φορέα, για να εξασφαλιστεί η καλή επαφή με το δέρμα. Οι υγρές ουσίες χρησιμοποιούνται συνήθως αδιάλυτες. Η εφαρμογή γίνεται καθημερινά 5 έως 7 ημέρες την εβδομάδα.

1.6.2. **Πειραματικές συνθήκες**

1.6.2.1. *Πειραματόζωα*

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ενήλικας επίμυς, κουνέλι ή ινδικό χοιρίδιο. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη, η χρήση τους όμως απαιτεί αιτιολόγηση.

▼B

Στην αρχή της μελέτης, το εύρος της διαφοράς βαρών των χρησιμοποιούμενων ζώων δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το ± 20 % της ενδεδειγμένης μέσης τιμής.

1.6.2.2. *Αριθμός και φύλο*

Σε κάθε επίπεδο δόσεων πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 10 ζώα (5 θηλυκά και 5 αρσενικά) με υγιές δέρμα. Τα θηλυκά πρέπει να είναι άτοκα και να μη βρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης. Εάν έχουν προγραμματιστεί ενδιάμεσες θανατώσεις ζώων, τότε ο αριθμός των ζώων ανά ομάδα πρέπει να αυξηθεί με τον αριθμό των ζώων που είναι προγραμματισμένο να θανατωθούν πριν από τη συμπλήρωση της μελέτης. Επιπλέον, μια δορυφορική ομάδα από 10 ζώα (5 ζώα ανά φύλο) μπορεί να εκτεθεί στην υψηλότερη δόση για 28 ημέρες και να εξετασθεί για επαναφορά, εμμονή ή αργοπορημένη εμφάνιση των τοξικών επιδράσεων για ένα χρονικό διάστημα 14 ημερών μετά το πέρας της δηλητηρίασης. Χρησιμοποιείται επίσης και μία δορυφορική ομάδα από 10 ζώα μάρτυρες (πέντε ζώα κατά φύλο).

1.6.2.3. *Επίπεδα δόσεων*

Απαιτούνται τουλάχιστον τρία επίπεδα δόσεων και ένας μάρτυρας ή ένας μάρτυρας του φορέα, αν χρησιμοποιείται φορέας. Η περίοδος έκθεσης πρέπει να είναι τουλάχιστον 6 ώρες την ημέρα. Η εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να γίνεται την ίδια ώρα κάθε μέρα και να προσαρμόζεται κατά διαστήματα (μια ή δύο φορές την εβδομάδα), έτσι ώστε να διατηρείται ένα σταθερό επίπεδο δόσεων σε σχέση με το βάρος του σώματος των ζώων. Τα ζώα στην ομάδα του μάρτυρα πρέπει να υπόκεινται στην ίδια μεταχείριση με τα πειραματόζωα, εξαιρουμένης της εφαρμογής της εξεταζόμενης ουσίας. Όταν χρησιμοποιείται φορέας για διευκόλυνση της χορήγησης της δόσης, η ομάδα του μάρτυρα πρέπει να παίρνει τη δόση κατά τον ίδιο τρόπο με την ομάδα των πειραματόζωων και η ποσότητα της δόσης να είναι ίδια με την υψηλότερη δόση που παίρνουν τα πειραματόζωα. Η υψηλότερη δόση θα πρέπει να προκαλεί τοξικές επιδράσεις, αλλά λίγους ή καθόλου θανάτους. Η χαμηλότερη δόση δεν θα πρέπει να προκαλεί συμπτώματα τοξικότητας. Όταν υπάρχει μια ευχερής εκτίμηση της ανθρώπινης έκθεσης, η χαμηλότερη δόση θα πρέπει να την υπερβαίνει. Η ενδιάμεση δόση, στην πιο ιδανική περίπτωση, θα πρέπει να προκαλεί ελάχιστα ευδιάκριτα τοξικά συμπτώματα. Εάν χρησιμοποιούνται περισσότερες από μία ενδιάμεσες δόσεις, τότε αυτές πρέπει να απέχουν έτσι μεταξύ τους ώστε να προκαλούν διαβαθμισμένες τοξικές επιδράσεις. Στις χαμηλές και στις ενδιάμεσες ομάδες, όπως και στους μάρτυρες, η συχνότητα των θανάτων θα πρέπει να είναι χαμηλή, ώστε να επιτρέπει μια χρήσιμη αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Εάν η εφαρμογή της εξεταζόμενης ουσίας προκαλεί σοβαρό δερματικό ερεθισμό, οι συγκεντρώσεις θα πρέπει να ελαττωθούν και αυτό μπορεί να ελαττώσει ή να εξαφανίσει τις άλλες τοξικές επιδράσεις στην υψηλότερη δόση. Επιπλέον, αν το δέρμα έχει υποστεί σοβαρή βλάβη, είναι δυνατόν να χρειαστεί, να ακυρωθεί η μελέτη και να επιχειρηθεί ένα νέο πείραμα με χαμηλότερες συγκεντρώσεις.

1.6.2.4. *Οριακή δοκιμή*

Αν μια προκαταρκτική μελέτη με μια δόση 1 000 mg/kg ή και μεγαλύτερη, σχετική με το πιθανό όριο έκθεσης του ανθρώπινου πληθυσμού, εάν είναι γνωστό, δεν προκαλεί καμιά τοξική επίδραση, ο περαιτέρω πειραματισμός μπορεί να μη θεωρηθεί αναγκαίος.

1.6.2.5. *Περίοδος παρατήρησης*

Τα πειραματόζωα πρέπει να παρατηρούνται καθημερινά για φαινόμενα τοξικότητας. Ο χρόνος θανάτου και ο χρόνος κατά τον οποίο εμφανίζονται και εξαφανίζονται τα τοξικά συμπτώματα πρέπει να καταγράφονται.

▼B

1.6.3. **Διαδικασία**

Τα ζώα πρέπει να εγκλωβίζονται μεμονωμένα. Η επέμβαση στα ζώα με την εξεταζόμενη ουσία γίνεται, στην πιο ιδανική περίπτωση, 7 ημέρες την εβδομάδα, για μια περίοδο 28 ημερών. Τα ζώα κάθε δορυφορικής ομάδας που προγραμματίστηκαν για συνεχείς παρατηρήσεις πρέπει να διατηρηθούν για 14 επιπλέον ημέρες χωρίς επέμβαση, για να εξακριβωθεί η ανάρρωση από τις τοξικές επιδράσεις ή η εμμονή τους. Ο χρόνος έκθεσης πρέπει να είναι τουλάχιστον 6 ώρες την ημέρα.

Η εξεταζόμενη ουσία πρέπει να εφαρμόζεται ομοιόμορφα σε μια έκταση, η οποία είναι περίπου το 10 % της όλης επιφάνειας του σώματος. Με πολύ τοξικές ουσίες η καλυπτόμενη επιφάνεια μπορεί να είναι μικρότερη, αλλά όσο γίνεται περισσότερη από την επιφάνεια πρέπει να καλύπτεται με μία λεπτή και ομοιόμορφη στοιβάδα ουσίας.

Η εξεταζόμενη ουσία, κρατιέται σ' επαφή με το δέρμα κατά τη διάρκεια της έκθεσης, με τη βοήθεια επιδέσμου από πορώδη γάζα και μιας μη ερεθιστικής ταινίας. Η δοκιμαζόμενη περιοχή πρέπει, επιπλέον, να καλύπτεται κατάλληλα, ώστε να συγκρατείται ο επίδεσμος και η εξεταζόμενη ουσία και έτσι να εξασφαλίζεται η μη κατάποσή της από τα πειραματόζωα. Για να αποφευχθεί η κατάποση της εξεταζόμενης ουσίας, μπορεί να χρησιμοποιούνται επίσης συσκευές περιορισμού των ζώων, αλλά δεν συνιστάται η μέθοδος της απόλυτης ακινησίας. Ως εναλλακτική λύση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα «προστατευτικό κολλάρο».

Η ουσία που μένει σαν υπόλειμμα, στο τέλος της περιόδου έκθεσης, θα πρέπει να απομακρύνεται όταν αυτό είναι δυνατό με νερό ή άλλη κατάλληλη μέθοδο καθαρισμού του δέρματος.

Όλα τα πειραματόζωα πρέπει να εξετάζονται καθημερινά και να καταγράφονται τα τοξικά συμπτώματα, ο χρόνος έναρξής τους, ο βαθμός και η διάρκειά τους. Οι παρατηρήσεις πρέπει να περιλαμβάνουν αλλοιώσεις στο δέρμα και στο τρίχωμα, στα μάτια και στους βλεννογόνους, όπως επίσης στο αναπνευστικό, κυκλοφοριακό, αυτόνομο και κεντρικό νευρικό σύστημα, στη σωματοκινητική δραστηριότητα και στον τρόπο συμπεριφοράς. Πρέπει, επίσης, να γίνονται μετρήσεις της κατανάλωσης τροφής και του βάρους των ζώων μια φορά την εβδομάδα. Η κανονική παρατήρηση των ζώων είναι απαραίτητη για να εξασφαλίζεται ότι δεν υπάρχει απώλεια πειραματόζωων εξαιτίας κανιβαλισμού, αυτόλυσης των ιστών ή κακής στέγασης. Στο τέλος της πειραματικής περιόδου, όλα τα επιζώντα ζώα στις μη δορυφορικές ομάδες νεκροτομούνται. Τα ετοιμοθάνατα ζώα και τα ζώα που παρουσιάζουν συμπτώματα έντονου πόνου και δυσφορίας θα πρέπει να απομακρύνονται, μόλις αυτό γίνεται αντιληπτό, να θανατώνονται ανώδυνα και να νεκροτομούνται.

Οι παρακάτω εξετάσεις θα πρέπει να γίνουν στο τέλος της δοκιμής σε όλα τα ζώα, των μαρτύρων συμπεριλαμβανομένων:

1) αιματολογικές που να περιλαμβάνουν τουλάχιστον μετρήσεις αιματοκρίτη, αιμοσφαιρίνης, μετρήσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων, λευκών και λευκοκυτταρικού τύπου, και μια μέτρηση της πηκτικότητας του αίματος·

2) κλινικές βιοχημικές μετρήσεις του αίματος που περιλαμβάνουν τουλάχιστον μια παράμετρο της λειτουργίας του ήπατος και των νεφρών: αλανίνο-αμινοτρανσφεράση του ορού (αρχικά γνωστή σαν γλουταμίνη-πυροσταφυλική τρανσαμινάση του ορού), ασπαρτική αμινοτρανσφεράση του ορού (αρχικά γνωστή σαν γλουταμινι-κή οξαλοοξική τρανσαμινάση του ορού), άζωτο ουρίας, αλβουμίνη, κρεατινίνη αίματος, ολική χολερυθρίνη και ολικές πρωτεΐνες του ορού.

Άλλοι προσδιορισμοί, οι οποίοι μπορεί να είναι αναγκαίοι για την τοξικολογική αξιολόγηση, περιλαμβάνουν: ασβέστιο, φωσφόρο, χλώριο, νάτριο, κάλιο, δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη, ανάλυση λιπιδίων, ορμονών, ισορροπία οξέων/βάσεων, μεθαιμοσφαιρίνη και δραστικότητα χολινεστεράσης.

▼B

Μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθούν και άλλοι βιοχημικοί προσδιορισμοί για την επέκταση της έρευνας των παρατηρηθεισών επιδράσεων.

1.6.4. **Μακροσκοπική νεκροψία**

Όλα τα ζώα της μελέτης πρέπει να υποβληθούν σε μία πλήρη μακροσκοπική νεκροψία. Το συκώτι, οι νεφροί, τα επινεφρίδια και οι όρχεις πρέπει να ζυγιστούν νωπά, όσο το δυνατό γρηγορότερα μετά την ανατομή για την αποφυγή αποξήρανσης. Τα όργανα και οι ιστοί, δηλ. φυσιολογικό και εκτεθειμένο δέρμα, συκώτι, νεφρά, σπλήνα, όρχεις, επινεφρίδια, καρδιά και όργανα στόχοι (δηλαδή τα όργανα εκείνα που εμφανίζουν μακροσκοπικές αλλοιώσεις ή μεταβολές μεγέθους) θα πρέπει να διατηρούνται σ' ένα κατάλληλο μέσο για την πιθανή, μελλοντική ιστοπαθολογική εξέταση.

1.6.5. **Ιστοπαθολογική εξέταση**

Η ιστοπαθολογική εξέταση πρέπει να γίνεται στα διατηρηθέντα όργανα των ζώων της ομάδας της υψηλότερης δόσης και των μαρτύρων. Τα όργανα και οι ιστοί που παρουσιάζουν ανωμαλίες, που μπορεί να αποδοθούν στην υψηλότερη δόση της εξεταζόμενης ουσίας, πρέπει να εξετάζονται και σ' όλες τις ομάδες χαμηλότερων δόσεων. Τα ζώα της δορυφορικής ομάδας πρέπει να εξετάζονται ιστολογικά με ιδιαίτερη έμφαση για κείνα τα όργανα που διαπιστώθηκε ότι δείχνουν ανωμαλίες στις άλλες ομάδες.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα, στον οποίο να φαίνεται, για κάθε πειραματική ομάδα, ο αριθμός των ζώων που εμφανίζουν κάθε τύπο αλλοίωσης.

Όλα τα παρατηρούμενα αποτελέσματα πρέπει να αξιολογούνται με μια κατάλληλη στατιστική μέθοδο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε αναγνωρισμένη στατιστική μέθοδος.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει, αν είναι δυνατόν, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— δεδομένα ζώων (είδος, φυλή, πηγή, συνθήκες περιβάλλοντος, διατροφή, κ.λπ.)·

— πειραματικές συνθήκες (συμπεριλαμβανομένου και του τύπου του επιδέσμου: προσροφητικού ή μη προσροφητικού)·

— επίπεδα δόσεων (συμπεριλαμβανομένου του φορέα, αν χρησιμοποιήθηκε) και συγκεντρώσεις·

— μη τοξικά επίπεδα, όταν είναι δυνατόν·

— δεδομένα τοξικών αποκρίσεων ανά δόση και φύλο·

— χρόνο θανάτου των ζώων κατά τη διάρκεια της μελέτης ή αν τα ζώα επιζούν έως το τέλος·

— τοξικές ή άλλες επιδράσεις·

— το χρόνο που παρατηρήθηκε κάθε ανωμαλία και τη διαδοχική πορεία τους·

— δεδομένα βάρους σώματος και κατανάλωσης τροφής·

— αιματολογικές εξετάσεις που χρησιμοποιήθηκαν και αποτελέσματα·

▼B

— κλινικές βιοχημικές εξετάσεις που χρησιμοποιήθηκαν και αποτελέσματα·

— ευρήματα νεκροψίας·

— λεπτομερή περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών ευρημάτων·

— στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, όταν αυτό είναι δυνατό·

— συζήτηση των αποτελεσμάτων·

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ

Βλέπε Γενική Εισαγωγή Μέρος Β (Δ).

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Βλέπε Γενική Εισαγωγή Μέρος Β (Ε).

▼M7

Β.10. ΔΟΚΙΜΉ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΏΝ ΕΚΤΡΟΠΏΝ IN VITRO ΣΕ ΘΗΛΑΣΤΙΚΆ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 473 του ΟΟΣΑ (2016). Αποτελεί μέρος μιας σειράς μεθόδων δοκιμών γενετικής τοξικολογίας. Έχει συνταχθεί ένα έγγραφο του ΟΟΣΑ με συνοπτικές πληροφορίες για τις δοκιμές γενετικής τοξικολογίας και μια επισκόπηση των πρόσφατων αλλαγών που έγιναν σε αυτές τις κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών (1).

Σκοπός της δοκιμής χρωμοσωμικών εκτροπών in vitro είναι ο εντοπισμός χημικών ουσιών που προκαλούν δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές σε καλλιεργημένα κύτταρα θηλαστικών (2) (3) (4). Οι δομικές εκτροπές μπορεί να είναι δύο τύπων, χρωμοσωμικές ή χρωματιδικές. Στους προσδιορισμούς χρωμοσωμικών εκτροπών in vitro μπορεί να παρουσιαστεί πολυπλοειδία (συμπεριλαμβανομένου του ενδοαναδιπλασιασμού). Ενώ τα ανευπλοειδογόνα μπορούν να επάγουν πολυπλοειδία, η πολυπλοειδία δεν αποτελεί αφ' εαυτής ένδειξη ανευπλοειδογόνου δυναμικού, αλλά μπορεί να υποδηλώνει απλώς διατάραξη του κυτταρικού κύκλου ή κυτταροτοξικότητα (5). Η παρούσα δοκιμή δεν έχει σχεδιαστεί για τη μέτρηση της ανευπλοειδίας. Για την ανίχνευση ανευπλοειδίας συνιστάται η διεξαγωγή δοκιμής μικροπυρήνων in vitro (6).

Στη δοκιμή χρωμοσωμικών εκτροπών in vitro μπορούν να χρησιμοποιούνται καλλιέργειες καθιερωμένων κυτταρικών σειρών ή πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων ανθρώπου ή τρωκτικών. Τα χρησιμοποιούμενα κύτταρα θα πρέπει να επιλέγονται με βάση την ικανότητα ανάπτυξης σε καλλιέργεια, τη σταθερότητα του καρυότυπου (συμπεριλαμβανομένου του χρωμοσωμικού αριθμού) και την αυθόρμητη συχνότητα χρωμοσωμικών εκτροπών (7). Τα μέχρι σήμερα διαθέσιμα δεδομένα δεν επιτρέπουν τη διατύπωση αυστηρών συστάσεων, αλλά υποδηλώνουν ότι είναι σημαντικό να λαμβάνονται υπόψη, κατά την αξιολόγηση των χημικών κινδύνων, η κατάσταση της p53, η γενετική σταθερότητα (καρυότυπος), η ικανότητα επιδιόρθωσης του DNA και η προέλευση (από τρωκτικά ή τον άνθρωπο) των κυττάρων που επιλέγονται για τη δοκιμή. Ως εκ τούτου, παροτρύνονται οι χρήστες της παρούσας μεθόδου δοκιμών να λαμβάνουν υπόψη την επίδραση αυτών και άλλων κυτταρικών χαρακτηριστικών στις επιδόσεις των κυτταρικών σειρών ως προς την ανίχνευση της επαγωγής χρωμοσωμικών εκτροπών, καθώς εξελίσσεται η επιστημονική γνώση σε αυτόν τον τομέα.

Οι χρησιμοποιούμενοι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Οι δοκιμές που διεξάγονται in vitro απαιτούν κατά κανόνα τη χρήση εξωγενούς πηγής μεταβολικής ενεργοποίησης, εκτός εάν τα κύτταρα διαθέτουν ικανότητα μεταβολισμού των υπό δοκιμή χημικών ουσιών. Το εξωγενές σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης δεν μιμείται απόλυτα τις συνθήκες που επικρατούν in vivo. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγονται συνθήκες που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε τεχνητά θετικά αποτελέσματα, δηλ. χρωμοσωμική βλάβη που δεν προκαλείται από άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των χρωμοσωμάτων· στις συνθήκες αυτές περιλαμβάνονται οι μεταβολές του pH ή της ωσμωμοριακότητας (8) (9) (10), η αλληλεπίδραση με τα συστατικά του θρεπτικού μέσου (11) (12) και τα υπέρμετρα επίπεδα κυτταροτοξικότητας (13) (14) (15) (16).

Η παρούσα δοκιμή χρησιμοποιείται για την ανίχνευση χρωμοσωμικών εκτροπών που μπορεί να προκύψουν από κλαστογόνα συμβάντα. Η ανάλυση της επαγωγής χρωμοσωμικών εκτροπών θα πρέπει να διενεργείται με τη χρήση κυττάρων στο στάδιο της μετάφασης. Είναι, συνεπώς, απαραίτητο να φθάνουν τα κύτταρα στο στάδιο της μίτωσης, τόσο στις καλλιέργειες που υποβάλλονται σε μεταχείριση όσο και σε εκείνες που δεν υποβάλλονται. Για τα βιομηχανικά νανοϋλικά, ενδέχεται να χρειάζονται ειδικές προσαρμογές της παρούσας μεθόδου δοκιμών, οι οποίες όμως δεν περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών.

Πριν από τη χρήση της μεθόδου δοκιμών σε μείγμα για την παραγωγή δεδομένων για συγκεκριμένο ρυθμιστικό σκοπό, θα πρέπει να εξετάζεται αν — και, εάν ναι, για ποιον λόγο — αυτή μπορεί να αποδώσει επαρκή αποτελέσματα για τον επιδιωκόμενο σκοπό. Οι εκτιμήσεις αυτές δεν είναι αναγκαίες όταν οι κανονιστικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τον έλεγχο του μείγματος.

▼M7

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων ή κυττάρων άλλων θηλαστικών εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία με και χωρίς εξωγενή πηγή μεταβολικής ενεργοποίησης, εκτός εάν χρησιμοποιούνται κύτταρα με επαρκή μεταβολική ικανότητα (βλ. παράγραφο 13). Σε κατάλληλα προκαθορισμένα διαστήματα μετά την έναρξη της έκθεσης των κυτταροκαλλιεργειών στην υπό δοκιμή χημική ουσία, αυτές υποβάλλονται σε μεταχείριση με χημική ουσία διακοπής της μετάφασης (π.χ. Colcemid™ ή κολχικίνη) και ακολουθεί συλλογή, χρώση και μικροσκοπική εξέταση των μεταφασικών κυττάρων για να διαπιστωθεί η παρουσία εκτροπών χρωματιδικού και χρωμοσωμικού τύπου.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Προετοιμασίες

Κύτταρα

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες κυτταρικές σειρές (π.χ. κύτταρα ωοθηκών κινεζικού κρικητού (CHO), κύτταρα πνεύμονα κινέζικου κρικητού V79, κύτταρα πνεύμονα κινεζικού κρικητού (CHL)/IU, TK6) ή πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος ανθρώπου ή άλλων θηλαστικών (7). Η επιλογή των χρησιμοποιούμενων κυτταρικών σειρών θα πρέπει να αιτιολογείται επιστημονικά. Για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων, όταν χρησιμοποιούνται πρωτογενή κύτταρα, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρησιμοποίησης, εφόσον είναι εφικτή, ανθρώπινων πρωτογενών κυττάρων που έχουν ληφθεί σύμφωνα με τις σχετικές δεοντολογικές αρχές και κανονιστικές ρυθμίσεις. Τα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος θα πρέπει να λαμβάνονται από νεαρά άτομα (ηλικίας περίπου 18-35 ετών), που δεν καπνίζουν, δεν πάσχουν από γνωστή νόσο και δεν έχουν εκτεθεί πρόσφατα σε γονιδιοτοξικούς παράγοντες (π.χ. χημικές ουσίες, ιοντίζουσες ακτινοβολίες) σε επίπεδα τα οποία θα μπορούσαν να αυξήσουν την επίπτωση (incidence) υποβάθρου των χρωμοσωμικών εκτροπών. Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται χαμηλή και σταθερή επίπτωση υποβάθρου των χρωμοσωμικών εκτροπών. Η γραμμή βάσης της επίπτωσης των χρωμοσωμικών εκτροπών αυξάνεται με την ηλικία, τάση που είναι εντονότερη στις γυναίκες απ' ό,τι στους άνδρες (17) (18). Εάν συνδυάζονται προς χρήση κύτταρα από περισσότερους του ενός δότες, θα πρέπει να προσδιορίζεται ο αριθμός των δοτών. Είναι αναγκαίο να αποδεικνύεται ότι τα κύτταρα έχουν διαιρεθεί κατά το διάστημα που μεσολαβεί από την έναρξη της μεταχείρισης με την υπό δοκιμή χημική ουσία μέχρι τη δειγματοληψία τους. Οι κυτταροκαλλιέργειες διατηρούνται σε εκθετική φάση ανάπτυξης κυττάρων (κυτταρικές σειρές) ή διεγείρονται για να διαιρεθούν (πρωτογενείς καλλιέργειες λεμφοκυττάρων), ώστε τα κύτταρα να εκτίθενται σε διάφορα στάδια του κυτταρικού κύκλου, δεδομένου ότι μπορεί να μην είναι γνωστή η ευαισθησία κάθε σταδίου στις υπό δοκιμή χημικές ουσίες. Κατά κανόνα, τα πρωτογενή κύτταρα που χρειάζονται διέγερση από μιτογόνους παράγοντες για τη διαίρεσή τους δεν είναι πλέον συγχρονισμένα κατά τη διάρκεια της έκθεσης στην υπό δοκιμή χημική ουσία (π.χ. ανθρώπινα λεμφοκύτταρα μετά από 48ωρη διέγερση με μιτογόνο). Η χρήση συγχρονισμένων κυττάρων κατά τη διάρκεια της μεταχείρισης δεν συνιστάται, αλλά μπορεί να γίνει δεκτή εφόσον αυτό αιτιολογείται.

Θρεπτικά μέσα και συνθήκες καλλιέργειας

Για τη διατήρηση των καλλιεργειών θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλο θρεπτικό μέσο και κατάλληλες συνθήκες επώασης (δοχεία καλλιέργειας, ατμόσφαιρα με ύγρανση και 5 % CO_2, κατά περίπτωση, θερμοκρασία επώασης 37 °C). Θα πρέπει να ελέγχονται τακτικά στις κυτταρικές σειρές η σταθερότητα του χαρακτηριστικού χρωμοσωμικού αριθμού και η απουσία μόλυνσης από μυκόπλασμα (7) (19) και τα κύτταρα δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται εάν έχουν μολυνθεί ή έχει μεταβληθεί ο χαρακτηριστικός χρωμοσωμικός αριθμός. Η φυσιολογική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου των κυτταρικών σειρών ή πρωτογενών καλλιεργειών που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο δοκιμών θα πρέπει να καθορίζεται και να είναι συνεπής με τα δημοσιευμένα χαρακτηριστικά των κυττάρων (20).

Παρασκευή των καλλιεργειών

Κυτταρικές σειρές: τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται από αποθεματικές καλλιέργειες, εμβολιαζόμενα σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας σε πυκνότητα τέτοια ώστε τα υπό μορφή εναιωρήματος ή μονοστιβάδας κύτταρα να εξακολουθούν να αναπτύσσονται εκθετικά μέχρι τη συλλογή τους (π.χ. θα πρέπει να αποφεύγεται η συρροή κυττάρων που αναπτύσσονται σε μονοστιβάδες).

▼M7

Λεμφοκύτταρα: ολικό αίμα με αντιπηκτικό (π.χ. ηπαρίνη) ή διαχωρισμένα λεμφοκύτταρα καλλιεργούνται (π.χ. για 48 ώρες προκειμένου για ανθρώπινα λεμφοκύτταρα) παρουσία μιτογόνου [π.χ. φυτοαιμοσυγκολλητίνη (PHA) προκειμένου για ανθρώπινα λεμφοκύτταρα], με σκοπό την επαγωγή κυτταρικής διαίρεσης πριν από την έκθεση στην υπό δοκιμή χημική ουσία.

Μεταβολική ενεργοποίηση

Όταν χρησιμοποιούνται κύτταρα με ανεπαρκή ενδογενή μεταβολική ικανότητα, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται και εξωγενή συστήματα μεταβολισμού. Το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο σύστημα, που συνιστάται ως προεπιλογή, εκτός αντίθετης αιτιολόγησης, είναι ένα μεταμιτοχονδριακό κλάσμα εμπλουτισμένο με συμπαράγοντα (S9), το οποίο παρασκευάζεται από ήπαρ τρωκτικών (κατά κανόνα επιμύων), κατεργασμένο με παράγοντα ενζυμικής επαγωγής, όπως το Aroclor 1254 (21) (22) (23) ή ο συνδυασμός φαινοβαρβιτάλης και β-ναφθοφλαβόνης (24) (25) (26) (27) (28) (29). Ο συνδυασμός αυτός δεν αντιβαίνει στη Σύμβαση της Στοκχόλμης για τους έμμονους οργανικούς ρύπους (30) και έχει αποδειχθεί εξίσου αποτελεσματικός με το Aroclor 1254 στην επαγωγή οξειδασών μεικτής λειτουργίας (24) (25) (26) (28). Το κλάσμα S9 χρησιμοποιείται συνήθως σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 1 έως 2 % (κ.ό.), αλλά οι οποίες επιτρέπεται να αυξηθούν σε 10 % (κ.ό.) στο τελικό δοκιμαστικό θρεπτικό μέσο. Η χρήση προϊόντων που μειώνουν τον μιτωτικό δείκτη, και ιδίως προϊόντων που συμπλοκοποιούν το ασβέστιο (31), θα πρέπει να αποφεύγεται κατά τη μεταχείριση. Η επιλογή του τύπου και της συγκέντρωσης του χρησιμοποιούμενου εξωγενούς συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης ή μεταβολικού επαγωγέα μπορεί να επηρεαστεί από την κατηγορία των υπό δοκιμή χημικών ουσιών.

Παρασκεύασμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας

Οι στερεές υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να διαλύονται σε κατάλληλους διαλύτες και να αραιώνονται, εφόσον χρειάζεται, πριν από τη μεταχείριση των κυττάρων (βλ. παράγραφο 23). Οι υγρές υπό δοκιμή χημικές ουσίες επιτρέπεται να προστίθενται κατευθείαν στο σύστημα δοκιμής και/ή να αραιώνονται πριν από τη μεταχείριση του συστήματος δοκιμής. Οι αέριες ή πτητικές υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να υποβάλλονται στη δοκιμή με κατάλληλες τροποποιήσεις των τυποποιημένων πρωτοκόλλων, π.χ. μεταχείριση σε σφραγισμένα δοχεία καλλιέργειας (32) (33) (34). Τα παρασκευάσματα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να ετοιμάζονται ακριβώς πριν από τη μεταχείριση, εκτός αν τα στοιχεία σχετικά με τη σταθερότητα της ουσίας αποδεικνύουν ότι είναι αποδεκτή η φύλαξη.

Συνθήκες δοκιμής

Διαλύτες

Θα πρέπει να επιλέγεται διαλύτης που να βελτιστοποιεί τη διαλυτότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, χωρίς να επηρεάζει δυσμενώς τη διεξαγωγή της δοκιμής, π.χ. μεταβάλλοντας την ανάπτυξη των κυττάρων, πλήττοντας την ακεραιότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, αντιδρώντας με τα δοχεία καλλιέργειας ή αποδυναμώνοντας το σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης. Συνιστάται να εξετάζεται πρώτα, στο μέτρο του δυνατού, αν μπορεί να χρησιμοποιηθεί υδατικός διαλύτης (ή θρεπτικό μέσο καλλιέργειας). Καθιερωμένοι διαλύτες είναι, για παράδειγμα, το νερό και το διμεθυλοσουλφοξείδιο. Η συγκέντρωση του διαλύτη στο τελικό θρεπτικό μέσο μεταχείρισης δεν θα πρέπει να υπερβαίνει γενικά το 1 % (κ.ό.), προκειμένου για οργανικούς διαλύτες, και το 10 % (κ.ό.) στην περίπτωση των υδατικών διαλυτών (αλατούχο διάλυμα ή νερό). Εάν χρησιμοποιούνται μη καθιερωμένοι διαλύτες (π.χ. αιθανόλη ή ακετόνη), η χρήση τους θα πρέπει να τεκμηριώνεται με στοιχεία που αποδεικνύουν τη συμβατότητά τους με τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες και με το σύστημα δοκιμής, καθώς και την απουσία γενετικής τοξικότητας στη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση. Εάν δεν υπάρχουν αυτά τα στοιχεία, είναι σημαντικό να συμπεριλαμβάνονται μάρτυρες που δεν υποβάλλονται σε μεταχείριση (βλ. προσάρτημα 1) για να αποδεικνύεται ότι ο επιλεγμένος διαλύτης δεν επάγει επιβλαβείς ή κλαστογόνες επιδράσεις.

Μέτρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταροτοξικότητας και επιλογή των συγκεντρώσεων μεταχείρισης

Κατά τον καθορισμό της υψηλότερης συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να αποφεύγονται οι συγκεντρώσεις που μπορούν να οδηγήσουν σε τεχνητά θετικές αποκρίσεις, όπως εκείνες που προκαλούν υπέρμετρη κυτταροτοξικότητα (βλ. παράγραφο 22), καθίζηση στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (βλ. παράγραφο 23) ή έντονες μεταβολές του pH ή της ωσμωμοριακότητας (βλ. παράγραφο 5). Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία προκαλεί έντονη μεταβολή

▼M7

του pH του θρεπτικού μέσου κατά την προσθήκη της, το pH μπορεί να ρυθμίζεται με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος στο τελικό θρεπτικό μέσο δοκιμής, με σκοπό να αποφεύγονται τα τεχνητά θετικά αποτελέσματα και να διατηρούνται κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας.

Μετράται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός για να εξασφαλίζεται ότι επαρκής αριθμός κυττάρων που υποβάλλονται σε μεταχείριση έχουν φθάσει στο στάδιο της μίτωσης κατά τη διάρκεια της δοκιμής και ότι οι μεταχειρίσεις διεξάγονται σε κατάλληλα επίπεδα κυτταροτοξικότητας (βλ. παραγράφους 18 και 22). Η κυτταροτοξικότητα θα πρέπει να προσδιορίζεται με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση στο κύριο πείραμα, με τη χρήση κατάλληλης ένδειξης θανάτου και ανάπτυξης των κυττάρων. Μολονότι η αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας σε αρχική δοκιμή μπορεί να είναι χρήσιμη για τον ακριβέστερο καθορισμό των συγκεντρώσεων που θα χρησιμοποιηθούν στο κύριο πείραμα, δεν είναι υποχρεωτική η διεξαγωγή αρχικής δοκιμής. Η διεξαγωγή αρχικής δοκιμής δεν θα πρέπει να αντικαθιστά τη μέτρηση της κυτταροτοξικότητας στο κύριο πείραμα.

Ο σχετικός διπλασιασμός του πληθυσμού (Relative Population Doubling/RPD) και η σχετική αύξηση του αριθμού κυττάρων (Relative Increase in Cell Count/RICC) είναι κατάλληλες μέθοδοι εκτίμησης της κυτταροτοξικότητας σε κυτταρογενετικές δοκιμές (13) (15) (35) (36) (55) (βλ. μαθηματικούς τύπους στο προσάρτημα 2). Σε περίπτωση μακροχρόνιας μεταχείρισης και εάν οι χρόνοι δειγματοληψιών μετά την έναρξη της μεταχείρισης είναι μεγαλύτεροι από τη φυσιολογική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, πολλαπλασιαζόμενη επί 1,5 (δηλ. συνολικά υπερτριπλάσιοι της διάρκειας του κυτταρικού κύκλου), η κυτταροτοξικότητα ενδέχεται να υποεκτιμηθεί με τον RPD (37). Υπό αυτές τις συνθήκες, η RICC θα αποτελούσε ενδεχομένως καλύτερο μέσο μέτρησης, ενώ η αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας μετά από χρονικό διάστημα ίσο με το γινόμενο της φυσιολογικής διάρκεια του κυτταρικού κύκλου επί 1,5 θα παρείχε χρήσιμη εκτίμηση με τη βοήθεια του RPD.

Για τα λεμφοκύτταρα σε πρωτογενείς καλλιέργειες, ο μιτωτικός δείκτης (MI) είναι μέτρο των κυτταροτοξικών/κυτταροστατικών επιδράσεων, αλλά επηρεάζεται από τον χρόνο μέτρησής του μετά την αγωγή, τον χρησιμοποιούμενο μιτογόνο παράγοντα και την πιθανή διατάραξη του κυτταρικού κύκλου. Ωστόσο, ο MI είναι αποδεκτός, επειδή άλλες μετρήσεις της κυτταροτοξικότητας μπορεί να είναι περίπλοκες και μη πρακτικές και να μην εφαρμόζονται στον στοχευόμενο πληθυσμό λεμφοκυττάρων που αναπτύσσονται αποκρινόμενα σε διέγερση από τη PHA.

Ενώ η RICC και ο RPD στην περίπτωση των κυτταρικών σειρών και ο MI για τις πρωτογενείς καλλιέργειες λεμφοκυττάρων είναι οι συνιστώμενες παράμετροι κυτταροτοξικότητας, άλλοι δείκτες (π.χ. ακεραιότητα των κυττάρων, απόπτωση, νέκρωση, κυτταρικός κύκλος) θα μπορούσαν να παράσχουν χρήσιμες επιπλέον πληροφορίες.

Θα πρέπει να αξιολογούνται τουλάχιστον τρεις συγκεντρώσεις δοκιμής (χωρίς τον διαλύτη και τους θετικούς μάρτυρες) που πληρούν τα κριτήρια αποδοχής (ενδεδειγμένη κυτταροτοξικότητα, αριθμός κυττάρων, κ.λπ.). Ανεξάρτητα από τα είδη κυττάρων (κυτταρικές σειρές ή πρωτογενείς καλλιέργειες λεμφοκυττάρων), μπορούν να χρησιμοποιούνται σε κάθε συγκέντρωση δοκιμής είτε πολλαπλές πανομοιότυπες καλλιέργειες (επαναλήψεις) είτε μονές καλλιέργειες. Αν και συνιστάται η χρήση διπλών καλλιεργειών, οι μονές καλλιέργειες είναι επίσης αποδεκτές, υπό τον όρο ότι καταμετράται ο ίδιος συνολικός αριθμός κυττάρων, ανεξαρτήτως του αν πρόκειται για μονές ή για διπλές καλλιέργειες. Η χρήση μονών καλλιεργειών ενδείκνυται κατ' εξοχήν όταν αξιολογούνται περισσότερες από 3 συγκεντρώσεις (βλ. παράγραφο 31). Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις ανεξάρτητες επαναλήψεις σε δεδομένη συγκέντρωση μπορούν να συνενώνονται για την ανάλυση δεδομένων (38). Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες με ελάχιστη ή μηδενική κυτταροτοξικότητα, κατάλληλες είναι συνήθως οι συγκεντρώσεις που απέχουν μεταξύ τους κατά παράγοντα ίσο με 2 ή 3 περίπου. Σε περίπτωση κυτταροτοξικότητας, οι επιλεγόμενες συγκεντρώσεις δοκιμής θα πρέπει να καλύπτουν ένα εύρος τιμών κυμαινόμενο από τη συγκέντρωση που προκαλεί την κυτταροτοξικότητα η οποία περιγράφεται στην παράγραφο 22 μέχρι τις συγκεντρώσεις στις οποίες παρατηρείται μέτρια και ελάχιστη ή μηδενική κυτταροτοξικότητα. Πολλές υπό δοκιμή χημικές ουσίες παρουσιάζουν καμπύλες συγκέντρωσης-απόκρισης με μεγάλη κλίση και, για να ληφθούν δεδομένα σε χαμηλή

▼M7

ή μέτρια κυτταροτοξικότητα ή για να μελετηθεί λεπτομερώς η σχέση δόσης-απόκρισης, είναι αναγκαία η χρήση συγκεντρώσεων με μικρότερα διαστήματα μεταξύ τους και/ή περισσότερων από τρεις συγκεντρώσεις (μονές καλλιέργειες ή επαναλήψεις), ιδίως σε περιπτώσεις όπου απαιτείται επανάληψη του πειράματος (βλ. παράγραφο 47).

Εάν η μέγιστη συγκέντρωση βασίζεται στην κυτταροτοξικότητα, η υψηλότερη συγκέντρωση θα πρέπει να αποσκοπεί στην επίτευξη κυτταροτοξικότητας 55 ± 5 %, με τη χρήση των συνιστώμενων παραμέτρων κυτταροτοξικότητας (δηλ. μείωση της RICC ή του RPD στην περίπτωση των κυτταρικών σειρών και μείωση του MI προκειμένου για πρωτογενείς καλλιέργειες λεμφοκυττάρων σε 45 ± 5 % του παράλληλου αρνητικού μάρτυρα). Τα θετικά αποτελέσματα που προκύπτουν μόνο στο ανώτερο άκρο του εν λόγω εύρους κυτταροτοξικότητας 55 ± 5 % θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή (13).

Για δυσδιάλυτες υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν είναι κυτταροτοξικές σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από τη συγκέντρωση μέγιστης διαλυτότητας, η υψηλότερη αναλυόμενη συγκέντρωση θα πρέπει να επιφέρει θολερότητα ή ίζημα ορατό με γυμνό οφθαλμό ή με τη βοήθεια ανεστραμμένου μικροσκοπίου στο τέλος της μεταχείρισης με την υπό δοκιμή χημική ουσία. Ακόμη και αν εμφανίζεται κυτταροτοξικότητα σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από τη συγκέντρωση μέγιστης διαλυτότητας, συνιστάται να διεξάγεται η δοκιμή σε μία μόνο συγκέντρωση που επιφέρει θολερότητα ή ορατό ίζημα, διότι μπορεί να προκύψουν τεχνητές επιδράσεις από το ίζημα. Στη συγκέντρωση που επιφέρει ίζημα, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να διασφαλίζεται ότι το τελευταίο δεν παρεμποδίζει τη διεξαγωγή της δοκιμής (π.χ. τη χρώση ή την καταμέτρηση). Ο προσδιορισμός της διαλυτότητας στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας πριν από το πείραμα μπορεί να είναι χρήσιμος.

Εάν δεν παρατηρηθεί ίζημα ούτε περιοριστική κυτταροτοξικότητα, η ανώτατη συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να αντιστοιχεί στη μικρότερη από τις τιμές 10 mM, 2 mg/ml ή 2 μl/ml (39) (40) (41). Όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν έχει καθορισμένη σύνθεση, π.χ. ουσίες άγνωστης ή μεταβλητής σύνθεσης, πολύπλοκα προϊόντα αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά (UVCB) (42), εκχυλίσματα από το περιβάλλον κλπ., η ανώτατη συγκέντρωση θα πρέπει ενδεχομένως να είναι υψηλότερη (π.χ. 5 mg/ml), ελλείψει επαρκούς κυτταροτοξικότητας, προκειμένου να αυξηθεί η συγκέντρωση του κάθε συστατικού. Επισημαίνεται, ωστόσο, ότι οι απαιτήσεις αυτές μπορεί να διαφέρουν για τα φαρμακευτικά προϊόντα για τον άνθρωπο (43).

Μάρτυρες

Σε κάθε χρόνο συλλογής, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες (βλ. παράγραφο 15), αποτελούμενοι μόνο από τον διαλύτη στο θρεπτικό μέσο της μεταχείρισης και υποβαλλόμενοι στην ίδια μεταχείριση όπως και οι καλλιέργειες.

Απαιτούνται παράλληλοι θετικοί μάρτυρες για να αποδεικνύεται αφενός η ικανότητα του εργαστηρίου να αναγνωρίζει τα κλαστογόνα υπό τις συνθήκες του χρησιμοποιούμενου πρωτοκόλλου δοκιμής και, αφετέρου, η αποτελεσματικότητα του εξωγενούς συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης, κατά περίπτωση. Παραδείγματα θετικών μαρτύρων παρέχονται κατωτέρω στον πίνακα 1. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικοί θετικοί χημικοί μάρτυρες, εφόσον η χρήση τους αιτιολογείται. Επειδή οι δοκιμές γενετικής τοξικότητας in vitro σε κύτταρα θηλαστικών είναι επαρκώς τυποποιημένες, η χρήση θετικών μαρτύρων μπορεί να περιορίζεται σε κλαστογόνα που απαιτούν μεταβολική ενεργοποίηση. Αυτή η απόκριση ενός μόνο θετικού μάρτυρα καταδεικνύει τόσο τη δραστικότητα του συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης όσο και την αποκρισιμότητα του συστήματος δοκιμής, υπό την προϋπόθεση ότι εκτελείται ταυτόχρονα με τη δοκιμή χωρίς ενεργοποίηση και επί την ίδια διάρκεια μεταχείρισης. Ωστόσο, σε περίπτωση μακροχρόνιας μεταχείρισης (χωρίς S9) θα πρέπει να προβλέπεται χωριστός θετικός μάρτυρας, διότι η διάρκεια της μεταχείρισης διαφέρει από αυτήν της δοκιμής με μεταβολική ενεργοποίηση. Κάθε θετικός μάρτυρας θα πρέπει να χρησιμοποιείται σε μία ή περισσότερες συγκεντρώσεις που αναμένεται να έχουν ως αποτέλεσμα αναπαραγώγιμη και ανιχνεύσιμη αύξηση σε σχέση με την τιμή υποβάθρου, για να καταδεικνύεται η ευαισθησία του συστήματος δοκιμής (δηλ. σαφείς επιδράσεις, οι οποίες όμως δεν αποκαλύπτουν αμέσως την ταυτότητα των κωδικοποιημένων αντικειμενοφόρων πλακών στον εξεταστή), και η απόκριση δεν θα πρέπει να διακυβεύεται εξαιτίας κυτταροτοξικότητας που υπερβαίνει τα όρια που προβλέπονται στη μέθοδο δοκιμών.

▼M7

Πίνακας 1

Συνιστώμενες χημικές ουσίες αναφοράς για την αξιολόγηση της τεχνικής ικανότητας του εργαστηρίου και την επιλογή θετικών μαρτύρων

Κατηγορία:	Χημική ουσία	Αριθμός CAS
1. Κλαστογόνα που δρουν χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση		
	Μεθανοσουλφονικός μεθυλεστέρας	66-27-3
	Μιτομυκίνη C	50-07-7
	4-Νιτροκινολιν-N-οξείδιο	56-57-5
	Κυτοσίνη αραβινοσίδη	147-94-4
2. Κλαστογόνα που απαιτούν μεταβολική ενεργοποίηση		
	Βενζο(a)πυρένιο	50-32-8
	Κυκλοφωσφαμίδιο	50-18-0

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Μεταχείριση με την υπό δοκιμή χημική ουσία

Πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα υποβάλλονται σε μεταχείριση με την υπό δοκιμή χημική ουσία με και χωρίς σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης.

Χρόνος συλλογής καλλιέργειας

Για την ενδελεχή αξιολόγηση που θα χρειαστεί προκειμένου να αποφασιστεί ότι η έκβαση της δοκιμής είναι αρνητική, θα πρέπει να τηρούνται και οι τρεις ακόλουθες πειραματικές συνθήκες σε βραχυχρόνια μεταχείριση με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση και σε μακροχρόνια μεταχείριση χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση (βλ. παραγράφους 43, 44 και 45):

— Τα κύτταρα θα πρέπει να εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση για 3-6 ώρες και να λαμβάνεται δείγμα μετά την παρέλευση χρονικού διαστήματος που ισοδυναμεί περίπου με το γινόμενο της φυσιολογικής διάρκειας του κυτταρικού κύκλου επί 1,5 από την έναρξη της μεταχείρισης (18),

— Τα κύτταρα θα πρέπει να εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία με μεταβολική ενεργοποίηση για 3-6 ώρες και να λαμβάνεται δείγμα μετά την παρέλευση χρονικού διαστήματος που ισοδυναμεί περίπου με το γινόμενο της φυσιολογικής διάρκειας του κυτταρικού κύκλου επί 1,5 μετά την έναρξη της μεταχείρισης (18),

— Τα κύτταρα θα πρέπει να εκτίθενται συνεχώς χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση μέχρι τη δειγματοληψία σε χρόνο που ισοδυναμεί περίπου με το γινόμενο της φυσιολογικής διάρκειας του κυτταρικού κύκλου επί 1,5. Ορισμένες χημικές ουσίες (π.χ. νουκλεοσιδικά ανάλογα) μπορεί να ανιχνεύονται ευκολότερα όταν οι χρόνοι μεταχείρισης/δειγματοληψίας υπερβαίνουν το γινόμενο της φυσιολογικής διάρκειας του κυτταρικού κύκλου επί 1,5 (24).

Σε περίπτωση που οποιαδήποτε από τις ανωτέρω πειραματικές συνθήκες οδηγεί σε θετική απόκριση, μπορεί να μη χρειάζεται να διερευνηθεί άλλο σχήμα μεταχείρισης.

Παρασκευάσματα χρωμοσωμάτων

Οι κυτταροκαλλιέργειες υποβάλλονται σε κατεργασία με Colcemid ή κολχικίνη, συνήθως για μία έως τρεις ώρες πριν από τη συλλογή. Κάθε κυτταροκαλλιέργεια συλλέγεται και υποβάλλεται χωριστά σε κατεργασία για την προετοιμασία των παρασκευασμάτων χρωμοσωμάτων. Η προετοιμασία των παρασκευασμάτων χρωμοσωμάτων περιλαμβάνει κατεργασία των κυττάρων με υπότονο διάλυμα,

▼M7

μονιμοποίηση και χρώση. Στο τέλος της μεταχείρισης διάρκειας 3-6 ωρών είναι πιθανή η παρουσία μιτωτικών κυττάρων (αναγνωρίζονται από το στρογγυλό σχήμα τους και από την απόσπασή τους από την επιφάνεια) στις μονοστιβάδες. Επειδή τα εν λόγω μιτωτικά κύτταρα αποσπώνται εύκολα, είναι πιθανή η απώλειά τους κατά την απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου που περιέχει την υπό δοκιμή χημική ουσία. Εάν υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν σημαντική αύξηση του αριθμού των μιτωτικών κυττάρων σε σχέση με τους μάρτυρες, γεγονός που υποδηλώνει πιθανή διακοπή της μίτωσης, τα κύτταρα θα πρέπει να συλλέγονται με φυγοκέντρηση και να επανεισάγονται στις καλλιέργειες, ώστε να αποφεύγεται η απώλεια κυττάρων που υφίστανται μίτωση και αντιμετωπίζουν κίνδυνο χρωμοσωμικής εκτροπής κατά τον χρόνο της συλλογής.

Ανάλυση

Όλες οι αντικειμενοφόρες πλάκες, συμπεριλαμβανομένων των πλακών των θετικών και αρνητικών μαρτύρων, θα πρέπει να κωδικοποιούνται χωριστά, πριν από τη μικροσκοπική εξέταση για τον εντοπισμό χρωμοσωμικών εκτροπών. Επειδή οι διαδικασίες μονιμοποίησης συνεπάγονται συχνά απώλεια χρωμοσωμάτων σε ένα ποσοστό των μεταφασικών κυττάρων, τα καταμετρούμενα κύτταρα θα πρέπει να περιέχουν αριθμό κεντρομεριδίων ίσο με τον χαρακτηριστικό αριθμό ± 2.

Για να συναχθεί το συμπέρασμα ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι σαφώς αρνητική, θα πρέπει να καταμετρώνται τουλάχιστον 300 καλώς επιστρωμένα μεταφασικά κύτταρα ανά συγκέντρωση και ανά μάρτυρα (βλ. παράγραφο 45). Το 300 κύτταρα θα πρέπει να κατανέμονται ισομερώς μεταξύ των επαναλήψεων, όταν χρησιμοποιούνται καλλιέργειες επανάληψης. Όταν χρησιμοποιούνται μονές καλλιέργειες ανά συγκέντρωση (βλ. παράγραφο 21), θα πρέπει να καταμετρώνται τουλάχιστον 300 καλώς επιστρωμένα μεταφασικά κύτταρα από κάθε μονή καλλιέργεια. Η καταμέτρηση 300 κυττάρων έχει το πλεονέκτημα ότι αυξάνει τη στατιστική ισχύ της δοκιμής και επιπλέον σπάνια παρατηρούνται μηδενικές τιμές (εκτιμάται ότι το ποσοστό τους είναι μόλις 5 %) (44). Ο αριθμός των καταμετρούμενων μεταφασικών κυττάρων μπορεί να μειωθεί εάν παρατηρηθεί υψηλός αριθμός κυττάρων με χρωμοσωμικές εκτροπές και η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται σαφώς θετική.

Θα πρέπει να καταμετρώνται τα κύτταρα με δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές, με και χωρίς τα χάσματα. Οι ρήξεις και τα χάσματα ορίζονται στο προσάρτημα 1 σύμφωνα με τις βιβλιογραφικές παραπομπές (45) (46). Οι χρωματιδικού και οι χρωμοσωμικού τύπου εκτροπές θα πρέπει να καταγράφονται χωριστά και να ταξινομούνται σε υποκατηγορίες (ρήξεις, ανταλλαγές). Οι διαδικασίες που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο θα πρέπει να διασφαλίζουν τη διενέργεια της ανάλυσης χρωμοσωμικών εκτροπών από επαρκώς καταρτισμένους εξεταστές και, κατά περίπτωση, την αξιολόγηση της ανάλυσης από ομότιμους κριτές.

Αν και σκοπός της δοκιμής είναι ο εντοπισμός δομικών χρωμοσωμικών εκτροπών, είναι σημαντικό να καταγράφονται οι συχνότητες πολυπλοειδίας και ενδοαναδιπλασιασμού, εφόσον παρατηρηθούν. (βλέπε σημείο 2).

Τεχνική ικανότητα του εργαστηρίου

Για να εξασφαλίσει επαρκή εμπειρία με τη μέθοδο δοκιμών πριν τη χρησιμοποιήσει για δοκιμές ρουτίνας, το εργαστήριο θα πρέπει να έχει εκτελέσει σειρά πειραμάτων με θετικές χημικές ουσίες αναφοράς που δρουν μέσω διαφορετικών μηχανισμών, καθώς και με διάφορους αρνητικούς μάρτυρες (με τη χρήση διαφόρων διαλυτών/φορέων). Οι αποκρίσεις των εν λόγω θετικών και αρνητικών μαρτύρων θα πρέπει να συμφωνούν με τη βιβλιογραφία. Αυτό δεν ισχύει για τα εργαστήρια που έχουν πείρα, δηλ. διαθέτουν βάση ιστορικών δεδομένων, όπως ορίζεται στην παράγραφο 37.

Θα πρέπει να διερευνάται μια σειρά επιλεγμένων χημικών ουσιών που αποτελούν θετικούς μάρτυρες (βλ. πίνακα 1 στην παράγραφο 26), με βραχυχρόνια και μακροχρόνια μεταχείριση χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση, καθώς και με βραχυχρόνια μεταχείριση με μεταβολική ενεργοποίηση, για να καταδεικνύεται η τεχνική ικανότητα ανίχνευσης κλαστογόνων χημικών ουσιών και να διαπιστώνεται η αποτελεσματικότητα του συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης. Θα πρέπει να επιλέγεται ένα εύρος συγκεντρώσεων των επιλεγμένων χημικών ουσιών που να επιφέρουν αναπαραγώγιμες και σχετιζόμενες με τη συγκέντρωση αυξήσεις σε σχέση με τις τιμές υποβάθρου, για να αποδεικνύονται η ευαισθησία και το δυναμικό εύρος του συστήματος δοκιμής.

▼M7

Ιστορικά δεδομένα για μάρτυρες

Το εργαστήριο θα πρέπει να καθορίζει:

— εύρος και κατανομή ιστορικών δεδομένων για θετικούς μάρτυρες,

— εύρος και κατανομή ιστορικών δεδομένων για αρνητικούς μάρτυρες (χωρίς μεταχείριση, με διαλύτη).

Κατά την αρχική συγκέντρωση δεδομένων για ιστορική κατανομή όσον αφορά τους αρνητικούς μάρτυρες, οι παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες θα πρέπει να συμφωνούν με τα δημοσιευμένα δεδομένα για μάρτυρες, εφόσον υπάρχουν. Καθώς θα προστίθενται περισσότερα πειραματικά δεδομένα στην κατανομή των μαρτύρων, οι παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες θα πρέπει, στην ιδανική περίπτωση, να βρίσκονται εντός των ορίων ελέγχου σε επίπεδο 95 % της εν λόγω κατανομής (44) (47). Η βάση ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για αρνητικούς μάρτυρες θα πρέπει αρχικά να δημιουργείται με δεδομένα από τουλάχιστον 10 πειράματα, αν και είναι προτιμότερο να αποτελείται από τουλάχιστον 20 πειράματα που έχουν εκτελεστεί σε συγκρίσιμες πειραματικές συνθήκες. Τα εργαστήρια θα πρέπει να χρησιμοποιούν μεθόδους ποιοτικού ελέγχου, όπως διαγράμματα ελέγχου [π.χ. διαγράμματα C ή X-bar (48)], για να προσδιορίζουν τη μεταβλητότητα των δεδομένων τους που αφορούν τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες και να αποδεικνύουν ότι έχουν «υπό έλεγχο» τη μεθοδολογία (44). Περαιτέρω συστάσεις για τον τρόπο δημιουργίας και χρήσης των ιστορικών δεδομένων (δηλ. κριτήρια προσθήκης στοιχείων στα ιστορικά δεδομένα και αποκλεισμού στοιχείων από αυτά, καθώς και κριτήρια αποδοχής συγκεκριμένου πειράματος) έχουν διατυπωθεί στη βιβλιογραφία (47).

Κάθε αλλαγή του πειραματικού πρωτοκόλλου θα πρέπει να μελετάται υπό το πρίσμα της συμφωνίας της με τις υφιστάμενες βάσεις ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για μάρτυρες. Τυχόν σημαντικές ανακολουθίες θα πρέπει να έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία νέας βάσης ιστορικών δεδομένων για μάρτυρες.

Τα δεδομένα για αρνητικούς μάρτυρες θα πρέπει να είναι η επίπτωση των κυττάρων με χρωμοσωμικές εκτροπές από μονές καλλιέργειες ή από το άθροισμα των καλλιεργειών επανάληψης, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 21. Οι παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες θα πρέπει, στην ιδανική περίπτωση, να βρίσκονται εντός των ορίων ελέγχου σε επίπεδο 95 % της κατανομής της βάσης ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για αρνητικούς μάρτυρες (44) (47). Όταν τα δεδομένα για παράλληλους αρνητικούς μάρτυρες δεν βρίσκονται εντός των ορίων ελέγχου σε επίπεδο 95 %, μπορεί να είναι αποδεκτή η προσθήκη τους στην ιστορική κατανομή μαρτύρων, εφόσον τα εν λόγω δεδομένα δεν είναι ακραίες έκτοπες τιμές και υπάρχουν στοιχεία που αποδεικνύουν ότι το σύστημα δοκιμής είναι «υπό έλεγχο» (βλ. παράγραφο 37) και ότι δεν πρόκειται για τεχνικό ή ανθρώπινο σφάλμα.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Παρουσίαση των αποτελεσμάτων

Το ποσοστό κυττάρων με μία ή περισσότερες δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές θα πρέπει να αξιολογείται. Οι χρωματιδικού και οι χρωμοσωμικού τύπου εκτροπές, ταξινομημένες σε υποκατηγορίες (ρήξεις, ανταλλαγές), θα πρέπει να καταγράφονται χωριστά με τον αριθμό και τη συχνότητα με τα οποία εμφανίζονται στις πειραματικές καλλιέργειες και στις καλλιέργειες-μάρτυρες. Τα χάσματα καταγράφονται και αναφέρονται χωριστά, αλλά δεν περιλαμβάνονται στη συνολική συχνότητα εκτροπών. Αναφέρεται το ποσοστό πολυπλοειδίας και/ή ενδοαναδιπλασιασμένων κυττάρων, εφόσον παρατηρούνται.

Θα πρέπει επίσης να καταγράφονται οι παράλληλες μετρήσεις κυτταροτοξικότητας για όλες τις υποβληθείσες σε μεταχείριση καλλιέργειες, καθώς και για τις καλλιέργειες που ήταν αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες στα κύρια πειράματα προσδιορισμού εκτροπών.

Θα πρέπει να παρέχονται δεδομένα για κάθε καλλιέργεια. Επιπλέον, όλα τα δεδομένα θα πρέπει να συγκεφαλαιώνονται σε μορφή πίνακα.

Κριτήρια αποδοχής

Η αποδοχή μιας δοκιμής βασίζεται στα ακόλουθα κριτήρια:

— Ο παράλληλος αρνητικός μάρτυρας θεωρείται αποδεκτός για προσθήκη στη βάση ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για αρνητικούς μάρτυρες, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 39.

▼M7

— Οι παράλληλοι θετικοί μάρτυρες (βλ. παράγραφο 26) θα πρέπει να επάγουν αποκρίσεις συμβατές με εκείνες που έχουν καταχωριστεί στη βάση ιστορικών δεδομένων για θετικούς μάρτυρες και να επιφέρουν στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα.

— Θα πρέπει να πληρούνται τα κριτήρια κυτταρικού πολλαπλασιασμού στον μάρτυρα με διαλύτη (παράγραφοι 17 και 18).

— Διεξήχθησαν δοκιμές και στις τρεις πειραματικές συνθήκες, εκτός εάν σε μία από αυτές τα αποτελέσματα ήταν θετικά (βλ. παράγραφο 28).

— Επαρκής αριθμός κυττάρων και συγκεντρώσεων είναι αναλύσιμος (παράγραφοι 31 και 21).

— Τα κριτήρια επιλογής της ανώτατης συγκέντρωσης είναι σύμφωνα με αυτά που περιγράφονται στις παραγράφους 22, 23 και 24.

Αξιολόγηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται σαφώς θετική εάν, σε οποιαδήποτε από τις πειραματικές συνθήκες που εξετάστηκαν (βλ. παράγραφο 28):

α) τουλάχιστον σε μία από τις συγκεντρώσεις δοκιμής εμφανίζεται στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα,

β) η αύξηση σχετίζεται με τη δόση, όταν αξιολογείται με κατάλληλο έλεγχο τάσης,

γ) κάποιο από τα αποτελέσματα βρίσκεται εκτός της κατανομής των ιστορικών δεδομένων για αρνητικούς μάρτυρες (π.χ. όρια ελέγχου σε επίπεδο 95 % με βάση την κατανομή Poisson· βλ. παράγραφο 39).

Όταν πληρούνται όλα αυτά τα κριτήρια, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται ικανή να επάγει χρωμοσωμικές εκτροπές σε καλλιεργημένα κύτταρα θηλαστικών σε αυτό το σύστημα δοκιμής. Συστάσεις για τις πλέον κατάλληλες στατιστικές μεθόδους έχουν διατυπωθεί στη βιβλιογραφία (49) (50) (51).

Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται σαφώς αρνητική εάν, σε όλες τις πειραματικές συνθήκες που εξετάστηκαν (βλ. παράγραφο 28):

α) σε καμία από τις συγκεντρώσεις δοκιμής δεν εμφανίζεται στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα,

β) δεν παρατηρείται αύξηση σχετιζόμενη με τη συγκέντρωση, όταν αξιολογείται με κατάλληλο έλεγχο τάσης,

γ) όλα τα αποτελέσματα βρίσκονται εντός της κατανομής των ιστορικών δεδομένων για αρνητικούς μάρτυρες (π.χ. όρια ελέγχου σε επίπεδο 95 % με βάση την κατανομή Poisson· βλ. παράγραφο 39).

Θεωρείται τότε ότι η υπό δοκιμή ουσία δεν είναι ικανή να επάγει χρωμοσωμικές εκτροπές σε καλλιεργημένα κύτταρα θηλαστικών σε αυτό το σύστημα δοκιμής.

Δεν απαιτείται επαλήθευση των σαφώς θετικών ή αρνητικών αποκρίσεων.

Όταν η απόκριση δεν είναι ούτε σαφώς αρνητική ούτε σαφώς θετική, όπως περιγράφεται ανωτέρω, ή για να διαπιστωθεί η βιολογική σημασία ενός αποτελέσματος, τα δεδομένα θα πρέπει να αξιολογούνται με βάση την κρίση των ειδικών και/ή περαιτέρω διερεύνηση. Η καταμέτρηση επιπλέον κυττάρων (κατά περίπτωση) ή η επανάληψη του πειράματος, ενδεχομένως με τη χρήση διαφορετικών πειραματικών συνθηκών [π.χ. διαστήματα μεταξύ των συγκεντρώσεων, άλλες συνθήκες μεταβολικής ενεργοποίησης (δηλ. συγκέντρωση ή προέλευση του S9)] θα μπορούσε να είναι χρήσιμη.

Σε σπάνιες περιπτώσεις, ακόμη και μετά από περαιτέρω διερεύνηση, το σύνολο δεδομένων δεν επιτρέπει την εξαγωγή συμπεράσματος για θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα και, κατά συνέπεια, η απόκριση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας κρίνεται διφορούμενη.

▼M7

Η αύξηση του αριθμού πολυπλοειδών κυττάρων μπορεί να σημαίνει ότι οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες είναι δυνάμει ικανές να αναστέλλουν τις μιτωτικές διεργασίες και να επάγουν αριθμητικές χρωμοσωμικές εκτροπές (52). Η αύξηση του αριθμού κυττάρων με ενδοαναδιπλασιασμένα χρωμοσώματα μπορεί να σημαίνει ότι οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες είναι δυνάμει ικανές να αναστέλλουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (53) (54) (βλ. παράγραφο 2). Επομένως, η επίπτωση των πολυπλοειδών κυττάρων και των κυττάρων με ενδοαναδιπλασιασμένα χρωμοσώματα θα πρέπει να καταγράφεται χωριστά.

Έκθεση δοκιμής

Στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

— πηγή, αριθμός παρτίδας, καταληκτική ημερομηνία χρήσης, αν υπάρχει·

— σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εάν είναι γνωστή·

— διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον διαλύτη, εάν είναι γνωστές·

— μέτρηση του pH, της ωσμωμοριακότητας και του ιζήματος του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας στο οποίο προστέθηκε η υπό δοκιμή χημική ουσία, κατά περίπτωση.

Μονοσυστατική ουσία:

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες·

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγματα:

— περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Διαλύτης:

— αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη·

— θα πρέπει επίσης να αναφέρεται η εκατοστιαία αναλογία του διαλύτη στο τελικό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας.

Κύτταρα:

— τύπος και προέλευση των κυττάρων·

— χαρακτηριστικά καρυότυπου και καταλληλότητα του χρησιμοποιηθέντος τύπου κυττάρων·

— απουσία μυκοπλάσματος, προκειμένου για κυτταρικές σειρές·

— για τις κυτταρικές σειρές, πληροφορίες για τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, τον χρόνο διπλασιασμού ή τον δείκτη πολλαπλασιασμού·

— φύλο των αιμοδοτών, ηλικία και κάθε σχετική με αυτούς σημαντική πληροφορία, ολικό αίμα ή διαχωρισμένα λεμφοκύτταρα, χρησιμοποιηθέν μιτογόνο·

— αριθμός ανακαλλιεργειών των κυτταρικών σειρών, εάν είναι διαθέσιμος·

— μέθοδοι διατήρησης των κυτταροκαλλιεργειών, προκειμένου για κυτταρικές σειρές·

— χαρακτηριστικός αριθμός χρωμοσωμάτων, προκειμένου για κυτταρικές σειρές.

▼**M7**

Συνθήκες δοκιμής:

— ταυτότητα και συγκέντρωση της χημικής ουσίας διακοπής της μετάφασης και διάρκεια έκθεσης των κυττάρων·

— συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εκφραζόμενη ως τελική συγκέντρωση στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (π.χ. μg ή mg/mL ή mM θρεπτικού μέσου καλλιέργειας)·

— αιτιολογία για την επιλογή των συγκεντρώσεων και του αριθμού καλλιεργειών, συμπεριλαμβανομένων π.χ. δεδομένων κυτταροτοξικότητας και περιορισμών από πλευράς διαλυτότητας·

— σύνθεση των θρεπτικών μέσων, συγκέντρωση CO_2, κατά περίπτωση, επίπεδο υγρασίας·

— συγκέντρωση (και/ή όγκος) του διαλύτη και της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που προστέθηκαν στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας·

— θερμοκρασία επώασης·

— χρόνος επώασης·

— διάρκεια της μεταχείρισης·

— χρόνος συλλογής μετά τη μεταχείριση·

— πυκνότητα των κυττάρων κατά τον εμβολιασμό, κατά περίπτωση·

— τύπος και σύσταση του συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης (πηγή του S9, μέθοδος παρασκευής του μείγματος S9, συγκέντρωση ή όγκος του μείγματος S9 και του S9 στο τελικό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, ποιοτικοί έλεγχοι του S9)·

— χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες, τελικές συγκεντρώσεις για κάθε συνθήκη δοκιμής·

— χρησιμοποιούμενες μέθοδοι ετοιμασίας των αντικειμενοφόρων πλακών και τεχνική χρώσης·

— κριτήρια αποδοχής των δοκιμών·

— κριτήρια για την καταμέτρηση των εκτροπών·

— αριθμός των μεταφασικών κυττάρων που αναλύθηκαν·

— μέθοδοι μέτρησης της κυτταροτοξικότητας·

— τυχόν συμπληρωματικές πληροφορίες που αφορούν την κυτταροτοξικότητα και τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε·

— κριτήρια χαρακτηρισμού των μελετών ως θετικών, αρνητικών ή αμφίβολων·

— μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό του pH, της ωσμωμοριακότητας και της καθίζησης.

Αποτελέσματα:

— αριθμός κυττάρων που υποβλήθηκαν σε μεταχείριση και αριθμός κυττάρων που συλλέχθηκαν για κάθε καλλιέργεια, όταν χρησιμοποιούνται κυτταρικές σειρές·

— μετρήσεις κυτταροτοξικότητας, π.χ. RPD, RICC, MI, άλλες παρατηρήσεις, εφόσον υπάρχουν·

— πληροφορίες για τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, τον χρόνο διπλασιασμού ή τον δείκτη πολλαπλασιασμού, όταν πρόκειται για κυτταρικές σειρές·

— σημεία καθίζησης και χρόνος προσδιορισμού·

▼M7

— ορισμός των εκτροπών, συμπεριλαμβανομένων των χασμάτων·

— αριθμός καταμετρηθέντων κυττάρων, αριθμός κυττάρων με χρωμοσωμικές εκτροπές και τύπος χρωμοσωμικών εκτροπών, χωριστά για κάθε υποβληθείσα σε μεταχείριση καλλιέργεια και καλλιέργεια-μάρτυρα, με και χωρίς τα χάσματα·

— αλλαγές στην πλοειδία (πολυπλοειδή κύτταρα και κύτταρα με ενδοαναδιπλασιασμένα χρωμοσώματα, αναφερόμενα χωριστά), εφόσον παρατηρήθηκαν·

— σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης, όπου είναι δυνατόν·

— δεδομένα για παράλληλους αρνητικούς μάρτυρες (με διαλύτη) και θετικούς μάρτυρες (συγκεντρώσεις και διαλύτες)·

— ιστορικά δεδομένα για τους αρνητικούς (με διαλύτη) και θετικούς μάρτυρες, με πεδία τιμών, μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις και όρια ελέγχου σε επίπεδο 95 % για την κατανομή, καθώς και πλήθος των δεδομένων·

— στατιστικές αναλύσεις, τιμές p, εάν υπάρχουν.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(2) Evans, H.J. (1976), «Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens», in *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol. 4, Hollaender, A. (ed.), Plenum Press, New York and London, pp. 1-29

(3) Ishidate, M. Jr., T. Sofuni (1985), «The *in vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture» in *Progress in Mutation Research*, Vol. 5, Ashby, J. *et al*. (eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York- Oxford, pp. 427-432.

(4) Galloway, S.M. *et al.* (1987), Chromosomal aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.

(5) Muehlbauer, P.A. *et al.* (2008), «Improving dose selection and identification of aneugens in the *in vitro* chromosome aberration test by integration of flow cytometry-based methods», *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/4, pp. 318-327.

(6) Κεφάλαιο B.49 του παρόντος παραρτήματος: *Δοκιμή μικροπυρήνων in vitro σε κύτταρα θηλαστικών.*

(7) ILSI paper (draft), Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, F. Darroudi, M. Honma, A. Czich, J van Benthem, S. Galloway, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, D.J. Kirkland, Recommendations for good cell culture practices in genotoxicity testing.

(8) Scott, D. et al. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol.257/2, pp. 147-204.

(9) Morita, T. et al. (1992), Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 268/2, pp. 297-305.

(10) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environmental and Molecular Mutagen*esis, Vol. 8/6, pp. 789-886.

▼**M7**

(11) Long, L.H. *et al*. (2007), Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,* Vol. 634/1-2, pp. 177-183.

(12) Nesslany, F. et al. (2008), Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/6, pp. 439-452.

(13) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 191-201.

(14) Kirkland, D. et al. (2005), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. I: Sensitivity, specificity and relative predictivity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 584/1-2, pp. 1–256.

(15) Greenwood, S. *et al*. (2004), Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the *in vitro* assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 43/1, pp. 36–44.

(16) Hilliard, C.A. et al. (1998), Chromosome aberrations *in vitro* related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 31/4, pp. 316–326.

(17) Hedner K. et al. (1982), Sister chromatid exchanges and structural chromosomal aberrations in relation to age and sex, *Human Genetics*, Vol. 62, pp. 305-309.

(18) Ramsey M.J. et al. (1995), The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting, *Mutation Research*, Vol. 338, pp. 95-106.

(19) Coecke S. *et al.* (2005), Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, Vol. 33/3, pp. 261-287.

(20) Henderson, L. et al. (1997), Industrial Genotoxicology Group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies, *Mutagenesis*, Vol.12/3, pp.163-167.

(21) Ames, B.N., J. McCann, E. Yamasaki (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 31/6, pp. 347-363.

(22) Maron, D.M., B.N. Ames (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 113/3-4, pp. 173-215.

(23) Natarajan, A.T. et al. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Res*earch, Vol. 37/1, pp. 83-90.

(24) Matsuoka, A., M. Hayashi, M. Jr. Ishidate (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *in vitro*, *Mutation Research/ Genetic Toxicology*, Vol. 66/3, pp. 277-290.

(25) Ong, T.-m. et al. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology,* Vol. 4/1, pp. 55-65.

(26) Elliot, B.M. et al. (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, Vol. 7/3, pp. 175-177.

▼M7

(27) Matsushima, T. et al. (1976), «A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems», in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. et al. (eds.), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(28) Galloway, S.M. et al. (1994). Report from Working Group on *in vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, pp. 241-261.

(29) Johnson, T.E., D.R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 28/1, pp. 51-59.

(30) UNEP (2001), σύμβαση της Στοκχόλμης για τους έμμονους οργανικούς ρύπους, Πρόγραμμα των Ηνωμένων Εθνών για το Περιβάλλον (UNEP). Διαθέσιμο στην ηλεκτρονική διεύθυνση: http://www.pops.int/.

(31) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987), Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes, *Mutation Research*, Vol. 190/3, pp. 225-8.

(32) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982), «CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids», in *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, pp. 91-103.

(33) Zamora, P.O. et al. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 5/6, pp. 795-801.

(34) Asakura, M. et al. (2008), An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay, *Mutation Research*, Vol. 652/2, pp. 122-130.

(35) Lorge, E. et al. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 655/1-2, pp. 1-3.

(36) Galloway, S. et al. (2011), Workshop summary: Top concentration for *in vitro* mammalian cell genotoxicity assays; and Report from working group on toxicity measures and top concentration for *in vitro* cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus), *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 77-83.

(37) Honma, M. (2011), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 724/1-2, pp. 86-87.

(38) Richardson, C. et al. (1989), *Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays. Στο: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(39) OECD (2014), Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487) ENV/JM/TG(2014)17. Διατίθεται κατόπιν αιτήσεως.

(40) Morita, T., M. Honma, K. Morikawa (2012), Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 741/1-2, pp. 32-56.

(41) Brookmire, L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013), Evaluation of the Highest Concentrations Used in the In Vitro Chromosome Aberrations Assay, Environmental and Molecular Muagenesis, Vol. 54/1, pp. 36-43.

▼**M7**

(42) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011), Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: Ουσίες UVCB, http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt.

(43) USFDA (2012), International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Διαθέσιμο στην ηλεκτρονική διεύθυνση: https://federalregister.gov/a/2012-13774.

(44) OECD (2014), «Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS)», Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.

(45) ISCN (2013), An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Schaffer, L.G., J. MacGowan-Gordon, M. Schmid (eds.), Karger Publishers Inc., Connecticut.

(46) Scott, D. et al. (1990), «Metaphase chromosome aberration assays in vitro», in Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 62-86.

(47) Hayashi, M. et al. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, Mutation Research, Vol. 723/2, pp. 87-90.

(48) Ryan, T. P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd Edition, John Wiley and Sons, New York.

(49) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003), Statistical Methods for Rates and Proportions, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York.

(50) Galloway, S.M. et al. (1987), Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.

(51) Richardson, C. et al. (1989), «Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays», in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(52) Warr, T.J., E.M. Parry, J.M. Parry (1993), A comparison of two in vitro mammalian cell cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy using 10 known or suspected aneugens, Mutation Research, Vol. 287/1, pp. 29-46.

(53) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, Mutation Research, Vol. 119/3, pp. 403-413.

(54) Huang, Y., C. Change, J.E. Trosko (1983), Aphidicolin — induced endoreduplication in Chinese hamster cells, Cancer Research, Vol. 43/3, pp. 1362-1364.

(55) Soper, K.A., S.M. Galloway (1994), Cytotoxicity measurement in in vitro chromosome aberration test and micronucleus test, Mutation Research, Vol. 312, pp. 139-149.

▼**M7**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ανευπλοειδία: κάθε απόκλιση από τον φυσιολογικό διπλοειδή (ή απλοειδή) αριθμό χρωμοσωμάτων κατά ένα ή περισσότερα χρωμοσώματα, όχι όμως κατά πλήρεις σειρές χρωμοσωμάτων (πολυπλοειδία).

Απόπτωση: προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, ο οποίος χαρακτηρίζεται από μια σειρά σταδίων που οδηγούν στη διάσπαση των κυττάρων προς περικλειόμενα από κυτταρική μεμβράνη σωματίδια τα οποία, στη συνέχεια, απομακρύνονται με φαγοκυττάρωση ή αποβολή.

Κυτταρικός πολλαπλασιασμός: αύξηση του αριθμού των κυττάρων η οποία είναι αποτέλεσμα της μιτωτικής τους διαίρεσης.

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Ρήξη χρωματίδας: ασυνέχεια μεμονωμένης χρωματίδας στην οποία υπάρχει σαφής αποστοίχιση μίας από τις χρωματίδες.

Χάσμα χρωματίδας: αχρωμάτιστη περιοχή (αχρωματική βλάβη) μεμονωμένης χρωματίδας, στην οποία αυτή εμφανίζει ελάχιστη αποστοίχιση.

Εκτροπή χρωματιδικού τύπου: δομική χρωμοσωμική βλάβη που εκδηλώνεται ως ρήξη μεμονωμένων χρωματίδων ή ρήξη και επανένωση μεταξύ χρωματίδων.

Εκτροπή χρωμοσωμικού τύπου: δομική χρωμοσωμική βλάβη που εκδηλώνεται ως ρήξη ή ρήξη και επανένωση και των δύο χρωματίδων στην ίδια θέση.

Κλαστογόνο: κάθε χημική ουσία που προκαλεί δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές σε πληθυσμούς κυττάρων ή ευκαρυωτικούς οργανισμούς.

Συγκεντρώσεις: τελικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας.

Κυτταροτοξικότητα: στους προσδιορισμούς που καλύπτονται από την παρούσα μέθοδο δοκιμών και για τους οποίους χρησιμοποιούνται κυτταρικές σειρές, η κυτταροτοξικότητα εκφράζεται ως μείωση του σχετικού διπλασιασμού του πληθυσμού (RPD) ή της σχετικής αύξησης του αριθμού κυττάρων (RICC) των κυττάρων που υποβάλλονται σε μεταχείριση, σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (βλ. παράγραφο 17 και προσάρτημα 2). Στους προσδιορισμούς που καλύπτονται από την παρούσα μέθοδο δοκιμών και για τους οποίους χρησιμοποιούνται πρωτογενείς καλλιέργειες λεμφοκυττάρων, η κυτταροτοξικότητα εκφράζεται ως μείωση του μιτωτικού δείκτη (MI) των κυττάρων που υποβάλλονται σε μεταχείριση, σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (βλ. παράγραφο 18 και προσάρτημα 2).

Ενδοαναδιπλασιασμός: διεργασία κατά την οποία έπειτα από μια φάση S με αντιγραφή του DNA, ο πυρήνας δεν υφίσταται μίτωση αλλά αρχίζει μια νέα φάση S. Το αποτέλεσμα είναι χρωμοσώματα με 4, 8, 16... χρωματίδες.

Γονιδιοτοξικός: γενικός όρος που καλύπτει τους παράγοντες που προκαλούν κάθε είδους βλάβη του DNA ή του χρωμοσώματος, μεταξύ των οποίων τις ρήξεις, τις απαλείψεις, τις χημικές προσθήκες, τις τροποποιήσεις και συνδέσεις νουκλεοτιδίων, τις αναδιατάξεις, τις γονιδιακές μεταλλάξεις, τις χρωμοσωμικές εκτροπές και την ανευπλοειδία. Δεν προκαλούν όλα τα είδη γονιδιοτοξικών επιδράσεων μεταλλάξεις ή μόνιμη χρωμοσωμική βλάβη.

Μιτωτικός δείκτης (Mitotic index/MI): ο λόγος του αριθμού κυττάρων που βρίσκονται σε μετάφαση προς τον συνολικό αριθμό κυττάρων που παρατηρούνται σε έναν κυτταρικό πληθυσμό· αποτελεί ένδειξη του βαθμού πολλαπλασιασμού του εν λόγω πληθυσμού.

Μίτωση: διαίρεση του κυτταρικού πυρήνα, η οποία συνήθως χωρίζεται σε πρόφαση, προμετάφαση, μετάφαση, ανάφαση και τελόφαση.

Μεταλλαξιογόνο: παράγοντας που προκαλεί κληρονομήσιμη μεταβολή μίας ή περισσότερων ακολουθιών ζευγών βάσεων του DNA στα γονίδια ή της δομής των χρωμοσωμάτων (χρωμοσωμικές εκτροπές).

▼M7

Αριθμητική εκτροπή: μεταβολή του χρωμοσωμικού αριθμού από τον φυσιολογικό αριθμό που χαρακτηρίζει τα χρησιμοποιούμενα κύτταρα.

Πολυπλοειδία: αριθμητικές χρωμοσωμικές εκτροπές σε κύτταρα ή οργανισμούς, οι οποίες αφορούν πλήρεις σειρές χρωμοσωμάτων, σε αντίθεση με εκείνες που αφορούν ένα ή περισσότερα μεμονωμένα χρωμοσώματα (ανευπλοειδία).

Κατάσταση της p53: η πρωτεΐνη p53 συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, την απόπτωση και την επιδιόρθωση του DNA. Τα κύτταρα που παρουσιάζουν έλλειψη λειτουργικής πρωτεΐνης p53, αδυνατώντας να διακόψουν τον κυτταρικό κύκλο ή να εξαλείψουν τα κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη μέσω της απόπτωσης ή άλλων μηχανισμών (π.χ. επαγωγή της επιδιόρθωσης του DNA) που σχετίζονται με τις λειτουργίες απόκρισης της p53 σε βλάβες του DNA, θα πρέπει θεωρητικά να είναι πιο επιρρεπή σε γονιδιακές μεταλλάξεις ή χρωμοσωμικές εκτροπές.

Σχετική αύξηση του αριθμού κυττάρων (Relative Increase in Cell Counts/ RICC): η αύξηση του αριθμού των κυττάρων σε καλλιέργειες που εκτίθενται σε χημικές ουσίες σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που δεν εκτίθενται, λόγος που εκφράζεται ως ποσοστό.

Σχετικός διπλασιασμός του πληθυσμού (RPD): η αύξηση των διπλασιασμών του κυτταρικού πληθυσμού σε καλλιέργειες που εκτίθενται σε χημικές ουσίες σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που δεν εκτίθενται, λόγος που εκφράζεται ως ποσοστό.

Ηπατικό κλάσμα S9: υπερκείμενο υγρό ομογενοποιήματος ήπατος μετά από φυγοκέντρηση σε 9 000 g, δηλ. ανεπεξέργαστο εκχύλισμα ήπατος.

Μείγμα S9: μείγμα του ηπατικού κλάσματος S9 με συμπαράγοντες που είναι αναγκαίοι για τη δράση των μεταβολικών ενζύμων.

Μάρτυρας με διαλύτη: γενικός όρος για τον προσδιορισμό των καλλιεργειών-μαρτύρων που λαμβάνουν μόνο τον διαλύτη ο οποίος χρησιμοποιείται για τη διάλυση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Δομική εκτροπή: μεταβολή της δομής των χρωμοσωμάτων που μπορεί να ανιχνευθεί με μικροσκοπική εξέταση του σταδίου της μετάφασης της κυτταρικής διαίρεσης και γίνεται αντιληπτή με τη μορφή απαλείψεων και θραυσμάτων, ενδοανταλλαγών ή διανταλλαγών.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Μάρτυρες που δεν υποβάλλονται σε μεταχείριση: καλλιέργειες που δεν υφίστανται καμία μεταχείριση (δηλ. ούτε με την υπό δοκιμή χημική ουσία ούτε με διαλύτη), αλλά ετοιμάζονται ταυτόχρονα με τις καλλιέργειες που λαμβάνουν την υπό δοκιμή χημική ουσία και με τον ίδιο τρόπο.

▼M7

Προσάρτημα 2

ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΟΙ ΤΥΠΟΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

Μιτωτικός δείκτης (Mitotic index/MI):

$$\mathbf{MI}(\%) = \frac{\text{αριθμός κυττάρων σε μίτωση}}{\text{συνολικός αριθμός καταμετρούμενων κυττάρων}} \times 100$$

Συνιστάται η **σχετική αύξηση του αριθμού κυττάρων (RICC)** ή ο **σχετικός διπλασιασμός του πληθυσμού (RPD)**, επειδή και στις δύο αυτές παραμέτρους λαμβάνεται υπόψη το ποσοστό του κυτταρικού πληθυσμού που έχει υποστεί διαίρεση.

$$\mathbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{αύξηση αριθμού κυττάρων στις καλλιέργειες μεταχείρισης(τελική} - \text{αρχική}))}{(\text{αύξηση αριθμού κυττάρων στις καλλιέργειες} - \text{μάρτυρες(τελική} - \text{αρχική}))} \times 100$$

$$\mathbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{διπλασιασμοί πληθυσμού στις καλλιέργειες μεταχείρισης})}{(\text{διπλασιασμοί πληθυσμού στις καλλιέργειες} - \text{μάρτυρες})} \times 100$$

όπου:

Διπλασιασμός πληθυσμού = [log (αριθ. κυττάρων μετά την μεταχείριση ÷ αρχικός αριθ. κυττάρων)] ÷ log 2

Για παράδειγμα, μια τιμή RICC ή RPD ίση με 53 % υποδηλώνει ποσοστό κυτταροτοξικότητας/ κυτταρόστασης 47 %, ενώ ένα ποσοστό κυτταροτοξικότητας/κυτταρόστασης 55 %, μετρούμενης με τον δείκτη MI, σημαίνει ότι ο πραγματικός MI είναι το 45 % του μάρτυρα.

Σε κάθε περίπτωση, θα πρέπει να μετράται ο αριθμός κυττάρων πριν από τη μεταχείριση και να είναι ο ίδιος στις υποβαλλόμενες σε μεταχείριση καλλιέργειες και στις καλλιέργειες που αποτελούν τον αρνητικό μάρτυρα.

Ο RCC (δηλ. ο λόγος «αριθμός κυττάρων στις καλλιέργειες μεταχείρισης/αριθμός κυττάρων στις καλλιέργειες-μάρτυρες») είχε χρησιμοποιηθεί ως παράμετρος κυτταροτοξικότητας στο παρελθόν, αλλά δεν συνιστάται πλέον, διότι μπορεί να οδηγήσει σε υποεκτίμηση της κυτταροτοξικότητας.

Στις καλλιέργειες που αποτελούν τον αρνητικό μάρτυρα, ο διπλασιασμός του πληθυσμού θα πρέπει να συμβιβάζεται με την υποχρέωση δειγματοληψίας κυττάρων μετά τη μεταχείριση σε χρόνο που ισοδυναμεί περίπου με το γινόμενο της φυσιολογικής διάρκειας του κυτταρικού κύκλου επί 1,5 και ο μιτωτικός δείκτης θα πρέπει να είναι αρκετά υψηλότερος ώστε να επιτυγχάνεται ικανός αριθμός μιτωτικών κυττάρων και αξιόπιστος υπολογισμός της μείωσης κατά 50 %.

▼M7

Β.11. ΔΟΚΙΜΉ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΩΝ ΕΚΤΡΟΠΏΝ ΣΕ ΜΥΕΛΌ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 475 του ΟΟΣΑ (2016). Αποτελεί μέρος μιας σειράς μεθόδων δοκιμών γενετικής τοξικολογίας. Έχει συνταχθεί ένα έγγραφο του ΟΟΣΑ με συνοπτικές πληροφορίες για τις δοκιμές γενετικής τοξικολογίας και μια επισκόπηση των πρόσφατων αλλαγών που έγιναν σε αυτές τις κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών (1).

Η δοκιμή χρωμοσωμικών εκτροπών in vivo σε μυελό των οστών θηλαστικών είναι ιδιαίτερα σημαντική για την αξιολόγηση της γονιδιοτοξικότητας, διότι οι παράγοντες των διεργασιών μεταβολισμού, φαρμακοκινητικής και επιδιόρθωσης του DNA in vivo, αν και μπορεί να διαφέρουν μεταξύ των ειδών, είναι ενεργοί και συμβάλλουν στις αποκρίσεις. Οι προσδιορισμοί in vivo είναι επίσης χρήσιμοι για την περαιτέρω διερεύνηση της γονιδιοτοξικότητας που ανιχνεύεται με σύστημα in vitro.

Η δοκιμή χρωμοσωμικών εκτροπών in vivo σε θηλαστικά χρησιμοποιείται για την ανίχνευση δομικών χρωμοσωμικών εκτροπών που επάγονται από τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες στα κύτταρα του μυελού των οστών ζώων, συνήθως τρωκτικών (2) (3) (4) (5). Οι δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές μπορεί να είναι δύο τύπων, χρωμοσωμικές ή χρωματιδικές. Αν και οι περισσότερες γονιδιοτοξικές εκτροπές που επάγονται από χημικές ουσίες είναι χρωματιδικού τύπου, εμφανίζονται, ωστόσο, και εκτροπές χρωμοσωμικού τύπου. Οι χρωμοσωμικές βλάβες και τα συναφή συμβάντα αποτελούν το αίτιο πολλών γενετικών ασθενειών του ανθρώπου και υπάρχουν αρκετά στοιχεία που αποδεικνύουν ότι, όταν αυτές οι βλάβες και τα συναφή συμβάντα προκαλούν αλλοιώσεις σε ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια, συνδέονται με την εμφάνιση καρκίνου στον άνθρωπο και σε πειραματικά συστήματα. Στους προσδιορισμούς χρωμοσωμικών εκτροπών in vivo μπορεί να παρουσιαστεί πολυπλοειδία (συμπεριλαμβανομένου του ενδοαναδιπλασιασμού). Εντούτοις, η αύξηση της πολυπλοειδίας δεν αποτελεί αφ' εαυτής ένδειξη ανευπλοειδογόνου δυναμικού και μπορεί απλώς να υποδηλώνει διατάραξη του κυτταρικού κύκλου ή κυτταροτοξικότητα. Η παρούσα δοκιμή δεν έχει σχεδιαστεί για τη μέτρηση της ανευπλοειδίας. Οι συνιστώμενες δοκιμές για την ανίχνευση ανευπλοειδίας in vivo και in vitro είναι η δοκιμή μικροπυρήνων in vivo σε ερυθροκύτταρα θηλαστικών (κεφάλαιο Β.12 του παρόντος παραρτήματος) και η δοκιμή μικροπυρήνων in vitro σε κύτταρα θηλαστικών (κεφάλαιο Β. 49 του παρόντος παραρτήματος), αντίστοιχα.

Οι ορισμοί των χρησιμοποιούμενων όρων παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

Στην παρούσα δοκιμή χρησιμοποιούνται συνήθως τρωκτικά, αλλά μπορεί, σε ορισμένες περιπτώσεις, να είναι κατάλληλα και άλλα είδη, εφόσον αυτό αιτιολογείται επιστημονικά. Ο στοχευόμενος ιστός στην παρούσα δοκιμή είναι ο μυελός των οστών, επειδή παρουσιάζει έντονη αγγείωση και περιέχει πληθυσμό κυττάρων με ταχύ κυτταρικό κύκλο που μπορούν εύκολα να απομονωθούν και να υποβληθούν σε επεξεργασία. Η επιστημονική αιτιολόγηση της χρήσης άλλων ειδών εκτός από επίμυες και ποντικούς θα πρέπει να περιλαμβάνεται στην έκθεση δοκιμής. Εάν χρησιμοποιούνται άλλα είδη εκτός των τρωκτικών, συνιστάται να ενσωματώνεται η μέτρηση των χρωμοσωμικών εκτροπών μυελού των οστών σε άλλη κατάλληλη δοκιμή τοξικότητας.

Εάν υπάρχουν ενδείξεις ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία ή οι μεταβολίτες της δεν θα φθάσουν στον στοχευόμενο ιστό, μπορεί να μην ενδείκνυται η χρήση της παρούσας δοκιμής.

Πριν από τη χρήση της μεθόδου δοκιμών σε μείγμα για την παραγωγή δεδομένων για συγκεκριμένο ρυθμιστικό σκοπό, θα πρέπει να εξετάζεται αν — και, εάν ναι, για ποιον λόγο — αυτή μπορεί να αποδώσει επαρκή αποτελέσματα για τον επιδιωκόμενο σκοπό. Οι εκτιμήσεις αυτές δεν είναι αναγκαίες όταν οι κανονιστικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τον έλεγχο του μείγματος.

▼M7

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Τα ζώα εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία από κατάλληλη οδό έκθεσης και θανατώνονται με ευθανασία σε εύθετο χρόνο μετά τη μεταχείριση. Πριν από την ευθανασία, τα ζώα υποβάλλονται σε μεταχείριση με παράγοντα διακοπής της μετάφασης (π.χ. κολχικίνη ή Colcemid). Ακολουθεί ετοιμασία χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων από κύτταρα του μυελού των οστών, χρώση των παρασκευασμάτων και ανάλυση των μεταφασικών κυττάρων για τον εντοπισμό χρωμοσωμικών εκτροπών.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

Έρευνες τεχνικής ικανότητας

Για να τεκμηριώσει πως διαθέτει επαρκή εμπειρία στη διεξαγωγή της δοκιμής πριν τη χρησιμοποιήσει για δοκιμές ρουτίνας, το εργαστήριο θα πρέπει να έχει αποδείξει την ικανότητά του να αναπαράγει τα αναμενόμενα αποτελέσματα με βάση δημοσιευμένα δεδομένα [π.χ. (6)] για συχνότητες χρωμοσωμικών εκτροπών, με τουλάχιστον δύο χημικές ουσίες ως θετικούς μάρτυρες (συμπεριλαμβανομένων των ασθενών αποκρίσεων που επάγονται από χαμηλές δόσεις θετικών μαρτύρων), όπως αυτές που απαριθμούνται στον πίνακα 1, καθώς και με συμβατούς μάρτυρες με φορέα/διαλύτη (βλ. παράγραφο 22). Στα πειράματα αυτά θα πρέπει να χρησιμοποιούνται δόσεις που παρέχουν αναπαραγώγιμες αυξήσεις σχετιζόμενες με τις δόσεις και καταδεικνύουν την ευαισθησία και τη δυναμική περιοχή του συστήματος δοκιμής στον στοχευόμενο ιστό (μυελό των οστών) και να εφαρμόζεται η μέθοδος καταμέτρησης που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί στο εργαστήριο. Η απαίτηση αυτή δεν ισχύει για τα εργαστήρια που έχουν πείρα, δηλ. διαθέτουν βάση ιστορικών δεδομένων, όπως ορίζεται στις παραγράφους 10-14.

Ιστορικά δεδομένα μαρτύρων

Κατά τη διάρκεια των ερευνών τεχνικής ικανότητας, το εργαστήριο θα πρέπει να καθορίζει:

— εύρος και κατανομή ιστορικών δεδομένων για θετικούς μάρτυρες και

— εύρος και κατανομή ιστορικών δεδομένων για αρνητικούς μάρτυρες.

Κατά την αρχική συγκέντρωση ιστορικών δεδομένων για κατανομή όσον αφορά τους αρνητικούς μάρτυρες, οι παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες θα πρέπει να συμφωνούν με τα δημοσιευμένα δεδομένα για μάρτυρες, εφόσον υπάρχουν. Καθώς θα προστίθενται περισσότερα πειραματικά δεδομένα στην κατανομή των ιστορικών δεδομένων μαρτύρων, οι παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες θα πρέπει, στην ιδανική περίπτωση, να βρίσκονται εντός των ορίων ελέγχου σε επίπεδο 95 % της εν λόγω κατανομής. Η βάση ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για αρνητικούς μάρτυρες θα πρέπει να είναι στατιστικά ανθεκτική για να διασφαλίζει την ικανότητα του εργαστηρίου να αξιολογεί την κατανομή των δεδομένων του που αφορούν τους αρνητικούς μάρτυρες. Από τη βιβλιογραφία συνάγεται ότι ενδέχεται να απαιτούνται τουλάχιστον 10 πειράματα, αν και είναι προτιμότερο η βάση δεδομένων να αποτελείται από τουλάχιστον 20 πειράματα που έχουν εκτελεστεί σε συγκρίσιμες πειραματικές συνθήκες. Τα εργαστήρια θα πρέπει να χρησιμοποιούν μεθόδους ποιοτικού ελέγχου, όπως διαγράμματα ελέγχου [π.χ. διαγράμματα C ή X-bar (7)], για να προσδιορίζουν τη μεταβλητότητα των δεδομένων τους και να αποδεικνύουν ότι έχουν «υπό έλεγχο» τη μεθοδολογία. Περαιτέρω συστάσεις για τον τρόπο δημιουργίας και χρήσης των ιστορικών δεδομένων (δηλ. κριτήρια προσθήκης στοιχείων στα ιστορικά δεδομένα και αποκλεισμού στοιχείων από αυτά, καθώς και κριτήρια αποδοχής συγκεκριμένου πειράματος) έχουν διατυπωθεί στη βιβλιογραφία (8).

Εάν το εργαστήριο δεν συμπληρώσει επαρκή αριθμό πειραμάτων για τον καθορισμό στατιστικά ανθεκτικής κατανομής αρνητικών μαρτύρων (βλ. παράγραφο 11) κατά τη διάρκεια των ερευνών τεχνικής ικανότητας (που περιγράφονται στην παράγραφο 9), είναι αποδεκτή η κατασκευή της κατανομής κατά τις πρώτες δοκιμές ρουτίνας. Κατά την εφαρμογή της προσέγγισης αυτής θα πρέπει να τηρούνται οι συστάσεις που έχουν διατυπωθεί στη βιβλιογραφία (8) και τα αποτελέσματα που προκύπτουν για τους αρνητικούς μάρτυρες στα σχετικά πειράματα θα πρέπει και πάλι να συμφωνούν με τα δημοσιευμένα δεδομένα για αρνητικούς μάρτυρες.

▼M7

Κάθε αλλαγή του πειραματικού πρωτοκόλλου θα πρέπει να μελετάται υπό το πρίσμα της επίπτωσής της στη διατήρηση της συμφωνίας των δεδομένων που προκύπτουν προς την υφιστάμενη βάση ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για μάρτυρες. Μόνο σημαντικές ανακολουθίες θα πρέπει να έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία νέας βάσης ιστορικών δεδομένων ελέγχου, όταν η κρίση εμπειρογνωμόνων διαπιστώσει ότι διαφέρει από την προηγούμενη κατανομή (βλ. παράγραφο 11). Για τη διεξαγωγή πραγματικής δοκιμής κατά την περίοδο της αντικατάστασης, ενδέχεται να μην είναι αναγκαία μια πλήρης βάση δεδομένων για αρνητικούς μάρτυρες, με την προϋπόθεση ότι το εργαστήριο μπορεί να αποδείξει ότι οι τιμές του για τους παράλληλους αρνητικούς μάρτυρες εξακολουθούν να συμφωνούν είτε με την προηγούμενη βάση δεδομένων του είτε με τα αντίστοιχα δημοσιευμένα δεδομένα.

Τα δεδομένα για αρνητικούς μάρτυρες θα πρέπει να είναι η επίπτωση (incidence) των χρωμοσωμικών εκτροπών (χωρίς τα χάσματα) σε κάθε ζώο. Οι παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες θα πρέπει, στην ιδανική περίπτωση, να βρίσκονται εντός των ορίων ελέγχου σε επίπεδο 95 % της κατανομής της βάσης ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για αρνητικούς μάρτυρες. Όταν τα δεδομένα για παράλληλους αρνητικούς μάρτυρες δεν βρίσκονται εντός των ορίων ελέγχου σε επίπεδο 95 %, μπορεί να είναι αποδεκτή η προσθήκη τους στην κατανομή ιστορικών δεδομένων μαρτύρων, εφόσον τα εν λόγω δεδομένα δεν είναι ακραίες έκτοπες τιμές και υπάρχουν στοιχεία που αποδεικνύουν ότι το σύστημα δοκιμής είναι «υπό έλεγχο» (βλ. παράγραφο 11) και ότι δεν πρόκειται για τεχνικό ή ανθρώπινο σφάλμα.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Προετοιμασίες

Επιλογή ζωικού είδους

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή νεαρά ενήλικα ζώα που ανήκουν σε συνήθεις εργαστηριακές φυλές. Συνήθως χρησιμοποιούνται επίμυες, αλλά μπορεί να είναι κατάλληλοι και οι ποντικοί. Η χρήση άλλων κατάλληλων ειδών θηλαστικών επιτρέπεται, εφόσον αιτιολογείται επιστημονικά στην έκθεση.

Συνθήκες στέγασης και σίτισης των ζώων

Για τα τρωκτικά, η θερμοκρασία στην αίθουσα πειραματόζωων θα πρέπει να είναι 22 °C (± 3 °C). Η σχετική υγρασία, η ιδανική τιμή της οποίας είναι 50-60 %, θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 40 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού της αίθουσας. Ο φωτισμός θα πρέπει να είναι τεχνητός, με φωτοπερίοδο 12 ωρών. Για τη διατροφή των ζώων μπορούν να χρησιμοποιούνται τα κλασικά εργαστηριακά σιτηρέσια, με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού. Όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται με την τροφή, η ανάγκη επαρκούς πρόσμειξης της ουσίας είναι δυνατόν να επηρεάσει την επιλογή σιτηρεσίου. Τα τρωκτικά θα πρέπει να στεγάζονται σε μικρές ομάδες (όχι περισσότερα από πέντε ανά κλωβό) του ίδιου φύλου και της ίδιας μεταχείρισης, εφόσον δεν αναμένεται επιθετική συμπεριφορά, κατά προτίμηση σε κλωβούς με συμπαγές δάπεδο με κατάλληλο εμπλουτισμό του περιβάλλοντος. Η ατομική στέγαση των ζώων επιτρέπεται, μόνον εάν αιτιολογείται επιστημονικά.

Προετοιμασία των ζώων

Κατά κανόνα χρησιμοποιούνται υγιή νεαρά ενήλικα ζώα (για τα τρωκτικά, η ιδανική ηλικία είναι μεταξύ 6 και 10 εβδομάδων κατά την έναρξη της μεταχείρισης, αν και είναι επίσης αποδεκτά ζώα λίγο μεγαλύτερης ηλικίας), τα οποία κατανέμονται τυχαία στις ομάδες μαρτύρων και μεταχείρισης. Τα ζώα ταυτοποιούνται μοναδικά με χρήση ανώδυνης, ελάχιστα επεμβατικής μεθόδου (π.χ. δακτύλιοι, ετικέτες, μικροτσίπ ή βιομετρική ταυτοποίηση, αλλά όχι αποκοπή τμήματος αυτιού ή δακτύλου). Οι κλωβοί θα πρέπει να διατάσσονται με τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται οι πιθανές επιδράσεις της θέσης τους. Θα πρέπει να αποφεύγεται η διασταυρούμενη μόλυνση από τον θετικό μάρτυρα και την υπό δοκιμή χημική ουσία. Στην αρχή της δοκιμής, οι διαφορές βάρους των ζώων θα πρέπει να είναι ελάχιστες και να μην υπερβαίνουν το ± 20 % του μέσου βάρους κάθε φύλου.

Παρασκευή των δόσεων

Οι στερεές υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να διαλύονται ή να διασπείρονται (σχηματισμός εναιωρήματος) σε κατάλληλους διαλύτες ή φορείς ή να αναμειγνύονται με την τροφή ή το πόσιμο νερό, πριν χορηγηθούν στα ζώα. Οι υγρές

▼M7

υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορούν να χορηγούνται ως έχουν ή να αραιώνονται πριν από τη χορήγηση. Σε περίπτωση έκθεσης μέσω της εισπνοής, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορούν να χορηγούνται ως αέριο, ατμοί ή αερόλυμα στερεού/υγρού, ανάλογα με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσφατα παρασκευάσματα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εκτός αν τα στοιχεία σχετικά με τη σταθερότητά της καταδεικνύουν ότι είναι αποδεκτή η φύλαξή της και καθορίζουν τις κατάλληλες συνθήκες φύλαξης.

Διαλύτης/φορέας

Ο διαλύτης/φορέας θα πρέπει να μην έχει τοξικές επιδράσεις στα χρησιμοποιούμενα επίπεδα δόσεων ούτε να υπάρχουν υπόνοιες για χημική αντίδρασή του με τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες. Εφόσον χρησιμοποιείται άλλος διαλύτης/φορέας εκτός των καθιερωμένων, η χρήση του θα πρέπει να τεκμηριώνεται με δεδομένα αναφοράς που αποδεικνύουν τη συμβατότητά του. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατό, να εξετάζεται πρώτα αν μπορεί να χρησιμοποιηθεί υδατικός διαλύτης/φορέας. Παραδείγματα ευρέως χρησιμοποιούμενων συμβατών διαλυτών/φορέων είναι, μεταξύ άλλων, το νερό, ο φυσιολογικός ορός (ισότονο αλατούχο διάλυμα), το διάλυμα μεθυλοκυτταρίνης, το διάλυμα άλατος της καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης με νάτριο, το ελαιόλαδο και το αραβοσιτέλαιο. Εάν δεν υπάρχουν ιστορικά ή δημοσιευμένα δεδομένα για μάρτυρες που να αποδεικνύουν ότι ένας άτυπος διαλύτης/φορέας δεν επάγει δομικές εκτροπές ή άλλες επιβλαβείς επιδράσεις, θα πρέπει να διενεργείται μια αρχική μελέτη για να διαπιστωθεί η δυνατότητα αποδοχής των μαρτύρων με διαλύτη/φορέα.

Μάρτυρες

Θετικοί μάρτυρες

Κάθε δοκιμή θα πρέπει κανονικά να περιλαμβάνει μια ομάδα ζώων που υποβάλλονται σε μεταχείριση με χημική ουσία η οποία χρησιμεύει ως θετικός μάρτυρας. Η εν λόγω ομάδα μπορεί να παραλείπεται, εάν το εργαστήριο δοκιμών έχει αποδείξει την τεχνική του ικανότητα διεξαγωγής της δοκιμής και έχει καθορίσει εύρος ιστορικών δεδομένων για θετικούς μάρτυρες. Εάν δεν συμπεριλαμβάνεται ομάδα παράλληλων θετικών μαρτύρων, κάθε πείραμα θα πρέπει να περιλαμβάνει μάρτυρες καταμέτρησης (μονιμοποιημένες αντικειμενοφόρες πλάκες χωρίς χρώση). Αυτοί μπορούν να ληφθούν με την προσθήκη κατάλληλων δειγμάτων αναφοράς κατά την καταμέτρηση στο πλαίσιο της μελέτης, τα οποία έχουν ληφθεί και φυλαχθεί από χωριστό πείραμα με θετικούς μάρτυρες που εκτελείται σε τακτά διαστήματα (π.χ. ανά 6 έως 18 μήνες) στο εργαστήριο διεξαγωγής της δοκιμής· για παράδειγμα, κατά τον έλεγχο της τεχνικής ικανότητας και, στη συνέχεια, σε τακτική βάση, όποτε είναι αναγκαίο.

Οι χημικές ουσίες που χρησιμεύουν ως θετικοί μάρτυρες θα πρέπει να επιφέρουν με αξιοπιστία ανιχνεύσιμη αύξηση της συχνότητας των κυττάρων με δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές σε σχέση με την αυθόρμητη συχνότητα. Οι δόσεις των θετικών μαρτύρων θα πρέπει να επιλέγονται έτσι ώστε οι επιδράσεις να είναι σαφείς αλλά να μην αποκαλύπτουν αμέσως την ταυτότητα των κωδικοποιημένων δειγμάτων στον εξεταστή. Είναι αποδεκτό να χορηγούνται οι θετικοί μάρτυρες και από οδό διαφορετική από εκείνη της χορήγησης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, με τη χρήση διαφορετικού προγράμματος αγωγής, και να διενεργείται η δειγματοληψία μόνο σε μία χρονική στιγμή. Επιπροσθέτως, μπορεί να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης θετικών μαρτύρων συγγενούς χημικής τάξης, κατά περίπτωση. Παραδείγματα χημικών ουσιών που αποτελούν θετικούς μάρτυρες περιλαμβάνονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1

Παραδείγματα χημικών ουσιών που αποτελούν θετικούς μάρτυρες

Χημική ουσία	Αριθμός CAS
Μεθανοσουλφονικός αιθυλεστέρας	62-50-0
Μεθανοσουλφονικός μεθυλεστέρας	66-27-3
Αιθυλονιτροζουρία	759-73-9
Μιτομυκίνη C	50-07-7
Μονοένυδρο κυκλοφωσφαμίδιο	50-18-0 (6055-19-2)
Τριαιθυλενομελαμίνη	51-18-3

▼M7

Αρνητικοί μάρτυρες

Σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας θα πρέπει να περιλαμβάνεται ομάδα ζώων ως αρνητικός μάρτυρας, η οποία υφίσταται τους ίδιους χειρισμούς όπως οι ομάδες μεταχείρισης, με μόνη διαφορά το ότι δεν εκτίθεται στην υπό δοκιμή χημική ουσία. Εάν για τη χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας χρησιμοποιείται διαλύτης/φορέας, αυτός θα πρέπει να χορηγείται και στην ομάδα-μάρτυρα. Ωστόσο, εάν από ιστορικά δεδομένα για τους αρνητικούς μάρτυρες προκύπτουν σταθερές τιμές μεταβλητότητας και συχνότητες κυττάρων με χρωμοσωμικές εκτροπές μεταξύ των ζώων σε κάθε δειγματοληψία για το εργαστήριο δοκιμών, μπορεί να απαιτείται μία μόνο δειγματοληψία για τον αρνητικό μάρτυρα. Σε περίπτωση μίας μόνο δειγματοληψίας για τους αρνητικούς μάρτυρες, αυτή θα πρέπει να διενεργείται κατά τον χρόνο της πρώτης δειγματοληψίας στο πλαίσιο της μελέτης.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αριθμός και φύλο των ζώων

Η απόκριση μικροπυρήνων είναι γενικά παρόμοια μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ζώων (9) και αναμένεται ότι αυτό θα ισχύει και για τις δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές· ως εκ τούτου, οι περισσότερες μελέτες θα μπορούσαν να διεξαχθούν σε οποιοδήποτε φύλο. Δεδομένα που καταδεικνύουν ουσιαστικές διαφορές μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ζώων (π.χ. διαφορές συστημικής τοξικότητας, μεταβολισμού, βιοδιαθεσιμότητας, τοξικότητας για τον μυελό των οστών, κ.λπ., συμπεριλαμβανομένων εκείνων που έχουν προκύψει, π.χ., από μελέτη προσδιορισμού εύρους τιμών) υποστηρίζουν τη χρησιμοποίηση ζώων και των δύο φύλων. Στην περίπτωση αυτή, ίσως είναι σκόπιμο να διεξάγεται μελέτη και στα δύο φύλα, π.χ. στο πλαίσιο μελετών τοξικότητας με επαναλαμβανόμενες δόσεις. Σε περίπτωση χρήσης και των δύο φύλων, θα ήταν ενδεχομένως σκόπιμη η εφαρμογή παραγοντικού σχεδιασμού. Λεπτομέρειες σχετικά με τον τρόπο ανάλυσης των δεδομένων με τη χρήση αυτού του σχεδιασμού παρέχονται στο προσάρτημα 2.

Το μέγεθος των ομάδων κατά την έναρξη της μελέτης θα πρέπει να καθορίζεται με γνώμονα την εξασφάλιση, ανά ομάδα, 5 τουλάχιστον αναλύσιμων ζώων του ίδιου φύλου ή, εάν χρησιμοποιούνται ζώα και των δύο φύλων, από κάθε φύλο. Όταν η έκθεση του ανθρώπου σε μια χημική ουσία αφορά μόνο το ένα φύλο, όπως π.χ. στην περίπτωση ορισμένων φαρμακευτικών προϊόντων, η δοκιμή θα πρέπει να διεξάγεται σε ζώα του αντίστοιχου φύλου. Ενδεικτικά, όσον αφορά τις τυπικές απαιτήσεις για τον μέγιστο αριθμό ζώων, για μια μελέτη σε μυελό των οστών με δύο χρόνους δειγματοληψίας, τρεις ομάδες δόσης και μια ομάδα παράλληλων αρνητικών μαρτύρων, συν μια ομάδα θετικών μαρτύρων (κάθε ομάδα αποτελούμενη από πέντε ζώα του ίδιου φύλου), θα απαιτούνταν 45 ζώα.

Επίπεδα δόσεων

Εάν χρειάζεται προκαταρκτική μελέτη προσδιορισμού εύρους τιμών επειδή δεν υπάρχουν ήδη κατάλληλα δεδομένα για να υποβοηθήσουν την επιλογή δόσεων, η εν λόγω μελέτη θα πρέπει να διεξάγεται στο ίδιο εργαστήριο, με τη χρήση του ίδιου είδους, φυλής, φύλου ζώων και σχήματος μεταχείρισης όπως στην κύρια μελέτη (10). Η μελέτη θα πρέπει να αποσκοπεί στον προσδιορισμό της μέγιστης ανεκτής δόσης (ΜΑΔ), η οποία ορίζεται ως η ανώτατη δόση που μπορεί να γίνει ανεκτή χωρίς εκδήλωση τοξικότητας που περιορίζει τη μελέτη, σε σχέση με τη διάρκεια της μελέτης (π.χ. που προκαλεί μείωση του σωματικού βάρους ή κυτταροτοξικότητα για το αιμοποιητικό σύστημα), αλλά δεν προκαλεί θάνατο ούτε εκδήλωση πόνου, ταλαιπωρίας ή δυσφορίας που καθιστούν αναγκαία τη θανάτωση με ευθανασία (11).

Η ανώτατη δόση μπορεί επίσης να οριστεί ως η δόση που προκαλεί ορισμένες ενδείξεις τοξικότητας για τον μυελό των οστών.

Οι χημικές ουσίες που παρουσιάζουν κορεσμό τοξικοκινητικών ιδιοτήτων ή επάγουν διεργασίες αποτοξίνωσης που μπορεί να επιφέρουν μείωση της έκθεσης μετά από μακροχρόνια αγωγή ίσως αποτελούν εξαιρέσεις από τα κριτήρια καθορισμού των δόσεων και θα πρέπει να αξιολογούνται κατά περίπτωση.

Για να ληφθούν πληροφορίες σχετικά με τη σχέση δόσης-απόκρισης, μια ολοκληρωμένη μελέτη θα πρέπει να περιλαμβάνει ομάδα αρνητικού μάρτυρα και τουλάχιστον τρία επίπεδα δόσεων, τα οποία κατά κανόνα διαφέρουν κατά έναν συντελεστή ίσο με το 2, αλλά πάντως όχι μεγαλύτερο του 4. Εάν η υπό δοκιμή

▼M7

χημική ουσία δεν προκαλεί τοξικότητα σε μελέτη προσδιορισμού εύρους τιμών ή με βάση τα υπάρχοντα δεδομένα, η ανώτατη δόση για εφάπαξ χορήγηση θα πρέπει να είναι 2 000 mg/kg σωματικού βάρους. Ωστόσο, εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία προκαλεί τοξικότητα, η ΜΑΔ θα πρέπει να είναι η ανώτατη χορηγούμενη δόση και τα χρησιμοποιούμενα επίπεδα δόσεων θα πρέπει, κατά προτίμηση, να καλύπτουν το εύρος από τη μέγιστη δόση μέχρι τη δόση που προκαλεί ελάχιστη ή μηδενική τοξικότητα. Όταν παρατηρείται τοξικότητα στον στοχευόμενο ιστό (μυελό των οστών) σε όλα τα ελεγχόμενα επίπεδα δόσεων, συνιστάται η διεξαγωγή περαιτέρω μελέτης με μη τοξικές δόσεις. Οι μελέτες που αποσκοπούν στον πληρέστερο χαρακτηρισμό των ποσοτικών στοιχείων σχετικά με τη σχέση δόσης-απόκρισης ενδέχεται να απαιτούν πρόσθετες ομάδες δόσης. Για ορισμένα είδη υπό δοκιμή χημικών ουσιών (π.χ. φαρμακευτικά προϊόντα για τον άνθρωπο) που καλύπτονται από ειδικές απαιτήσεις, αυτά τα όρια μπορεί να διαφέρουν.

Οριακή δοκιμή

Εάν τα πειράματα προσδιορισμού εύρους δόσεων ή υφιστάμενα δεδομένα για συγγενείς φυλές ζώων δείχνουν ότι ένα σχήμα μεταχείρισης με τουλάχιστον την οριακή δόση (που περιγράφεται κατωτέρω) δεν επιφέρει παρατηρήσιμες τοξικές επιδράσεις (που περιλαμβάνουν την απουσία μείωσης του πολλαπλασιασμού του μυελού των οστών ή άλλης ένδειξης κυτταροτοξικότητας στον στοχευόμενο ιστό) και δεν αναμένεται γονιδιοτοξικότητα με βάση μελέτες γονιδιοτοξικότητας in vitro ή δεδομένα για χημικές ουσίες παρόμοιας δομής, μπορεί να κριθεί περιττή η διεξαγωγή πλήρους μελέτης με τρία επίπεδα δόσεων, υπό τον όρο ότι έχει αποδειχθεί ότι οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες φθάνουν στον στοχευόμενο ιστό (μυελός των οστών). Σε αυτές τις περιπτώσεις, ενδέχεται να αρκεί ένα μόνο επίπεδο δόσης, ίσο με την οριακή δόση. Για περίοδο χορήγησης > 14 ημερών, η οριακή δόση είναι 1 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα. Για περιόδους χορήγησης 14 ή λιγότερων ημερών, η οριακή δόση είναι 2 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα.

Χορήγηση των δόσεων

Κατά τον σχεδιασμό της δοκιμής θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η προβλεπόμενη οδός έκθεσης του ανθρώπου. Επιτρέπεται επομένως η αιτιολογημένη επιλογή οδών έκθεσης όπως μέσω της τροφής ή του πόσιμου νερού, με τοπική εφαρμογή, υποδόρια ή ενδοφλέβια ένεση, από το στόμα (με στομαχικό καθετήρα), μέσω της εισπνοής, η ενδοτραχειακή οδός ή η εμφύτευση. Σε κάθε περίπτωση, η οδός έκθεσης θα πρέπει να επιλέγεται κατά τρόπο ώστε να εξασφαλίζεται επαρκής έκθεση του ή των στοχευόμενων ιστών. Η ενδοπεριτοναϊκή ένεση δεν συνιστάται κατά κανόνα, διότι δεν αποτελεί σκοπούμενη οδό έκθεσης του ανθρώπου, και θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο με ειδική επιστημονική αιτιολόγηση. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία αναμειγνύεται με την τροφή ή το πόσιμο νερό, ιδίως στην περίπτωση των εφάπαξ δόσεων, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε το χρονικό διάστημα μεταξύ της κατανάλωσης τροφής και νερού και της δειγματοληψίας να επαρκεί για την ανίχνευση των επιδράσεων (βλ. παραγράφους 33-34). Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί με στομαχικό καθετήρα ή ένεση κάθε φορά εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Ο όγκος δεν θα πρέπει κανονικά να υπερβαίνει το 1 ml/100 g σωματικού βάρους, εκτός από την περίπτωση των υδατικών διαλυμάτων, όπου επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται κατά μέγιστο όριο 2 ml/100 g σωματικού βάρους. Η χρήση μεγαλύτερων όγκων θα πρέπει να αιτιολογείται. Η μεταβλητότητα των όγκων δοκιμής θα πρέπει να ελαχιστοποιείται με ρύθμιση της συγκέντρωσης, ώστε να εξασφαλίζεται η χορήγηση σταθερού όγκου σε σχέση με το σωματικό βάρος σε όλα τα επίπεδα δόσεων, εκτός από την περίπτωση των ερεθιστικών ή διαβρωτικών χημικών ουσιών, των οποίων οι επιδράσεις κατά κανόνα επιδεινώνονται όταν αυξάνονται οι συγκεντρώσεις.

Πρόγραμμα μεταχείρισης

Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες χορηγούνται συνήθως εφάπαξ, αλλά μπορούν να χορηγηθούν και σε διαιρεμένες δόσεις (δηλ. δύο ή περισσότερες δόσεις την ίδια ημέρα, που δεν απέχουν χρονικά μεταξύ τους περισσότερο από 2-3 ώρες) για να διευκολύνεται η χορήγηση μεγάλων όγκων. Υπό τις περιστάσεις αυτές ή κατά τη χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μέσω της εισπνοής, ο χρόνος δειγματοληψίας θα πρέπει να προγραμματίζεται με βάση τον χρόνο της τελευταίας χορήγησης ή το τέλος της έκθεσης.

Υπάρχουν ελάχιστα διαθέσιμα δεδομένα σχετικά με την καταλληλότητα ενός πρωτοκόλλου επαναλαμβανόμενων δόσεων για την παρούσα δοκιμή. Ωστόσο, όταν είναι σκόπιμη η ενσωμάτωσή της σε δοκιμή τοξικότητας επαναλαμβανόμενων δόσεων, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για την αποφυγή της απώλειας

▼M7

μιτωτικών κυττάρων που έχουν υποστεί χρωμοσωμική βλάβη, όπως θα μπορούσε να συμβεί με τοξικές δόσεις. Η ενοποίηση αυτή είναι αποδεκτή, όταν η ανώτατη δόση είναι μεγαλύτερη ή ίση προς την οριακή δόση (βλ. παράγραφο 29) και σε μία ομάδα δόσης χορηγείται η οριακή δόση για τη διάρκεια της περιόδου μεταχείρισης. Η δοκιμή μικροπυρήνων (μέθοδος δοκιμής B.12) θα πρέπει να θεωρείται η in vivo δοκιμή πρώτης επιλογής για χρωμοσωμικές εκτροπές, όταν κρίνεται σκόπιμη η ενσωμάτωση σε άλλες μελέτες.

Τα δείγματα μυελού των οστών θα πρέπει να λαμβάνονται σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές μετά τις εφάπαξ μεταχειρίσεις. Για τα τρωκτικά, το πρώτο διάστημα δειγματοληψίας θα πρέπει να είναι ο χρόνος που απαιτείται για τη συμπλήρωση της φυσιολογικής διάρκειας του κυτταρικού κύκλου, πολλαπλασιαζόμενης επί 1,5 (κανονικά 12-18 ώρες μετά την περίοδο μεταχείρισης). Επειδή ο απαιτούμενος χρόνος για την πρόσληψη και τον μεταβολισμό της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, καθώς και η επίδρασή της στην κινητική του κυτταρικού κύκλου, μπορεί να επηρεάσει τον βέλτιστο χρόνο για την ανίχνευση χρωμοσωμικής εκτροπής, συνιστάται η διενέργεια και δεύτερης δειγματοληψίας 24 ώρες μετά την πρώτη. Κατά τον χρόνο της πρώτης δειγματοληψίας, θα πρέπει να υποβάλλονται σε μεταχείριση όλες οι ομάδες δόσης και να συλλέγονται δείγματα για ανάλυση· ωστόσο, κατά τους μεταγενέστερους χρόνους δειγματοληψίας, αρκεί να χορηγηθεί μόνον η ανώτατη δόση. Εάν εφαρμόζεται δοσολογικό σχήμα που εκτείνεται σε περισσότερες από μία ημέρες με βάση επιστημονική αιτιολόγηση, θα πρέπει κατά κανόνα να διενεργείται μία δειγματοληψία σε χρόνο που ισοδυναμεί περίπου με τη φυσιολογική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου επί 1,5 από την τελική μεταχείριση.

Μετά τη μεταχείριση και πριν από τη συλλογή δειγμάτων, χορηγείται στα ζώα με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση κατάλληλη δόση παράγοντα διακοπής της μετάφασης (π.χ. Colcemid ή κολχικίνη) και, στη συνέχεια, συλλέγονται δείγματα μετά την παρέλευση κατάλληλου χρονικού διαστήματος. Για τους ποντικούς, η καταλληλότερη στιγμή είναι περίπου 3-5 ώρες πριν από τη συλλογή και για τους επίμυες είναι 2-5 ώρες. Κύτταρα από το μυελό των οστών συλλέγονται, διογκώνονται, μονιμοποιούνται, χρωματίζονται και εξετάζονται για τον εντοπισμό χρωμοσωμικών εκτροπών (12).

Παρατηρήσεις

Τα πειραματόζωα θα πρέπει να υποβάλλονται σε γενική κλινική εξέταση και τα κλινικά σημεία να καταγράφονται τουλάχιστον μία φορά ημερησίως, κατά προτίμηση την ίδια ώρα και λαμβανομένου υπόψη του χρόνου κορύφωσης των αναμενόμενων επιδράσεων μετά τη χορήγηση της δόσης. Όλα τα ζώα θα πρέπει να εξετάζονται τουλάχιστον δύο φορές ημερησίως κατά την περίοδο της χορήγησης για τη διαπίστωση τυχόν νοσηρότητας και θνησιμότητας. Όλα τα ζώα πρέπει να ζυγίζονται κατά την έναρξη της μελέτης, τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα κατά τη διάρκεια των μελετών για τις επαναλαμβανόμενες δόσεις και κατά την ευθανασία. Σε μελέτες διάρκειας τουλάχιστον μίας εβδομάδας, η κατανάλωση τροφής θα πρέπει να μετράται τουλάχιστον εβδομαδιαίως. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται με το πόσιμο νερό, η κατανάλωση νερού θα πρέπει να μετράται σε κάθε αλλαγή νερού και τουλάχιστον εβδομαδιαίως. Τα ζώα που εμφανίζουν μη θανατηφόρους δείκτες υπερβολικής τοξικότητας θα πρέπει να υποβάλλονται σε ευθανασία πριν από τη λήξη της περιόδου δοκιμής (11).

Έκθεση του στοχευόμενου ιστού

Θα πρέπει να λαμβάνεται δείγμα αίματος σε κατάλληλους χρόνους για να είναι δυνατή η διερεύνηση των επιπέδων των υπό δοκιμή χημικών ουσιών στο πλάσμα, ώστε να αποδεικνύεται η έκθεση του μυελού των οστών, όταν αυτό δικαιολογείται και δεν υπάρχουν άλλα δεδομένα έκθεσης (βλ. παράγραφο 44).

Παρασκευάσματα μυελού των οστών και χρωμοσωμάτων

Αμέσως μετά τη θανάτωση με ευθανασία, λαμβάνονται κύτταρα μυελού των οστών από τα μηριαία ή τα κνημιαία οστά των ζώων, εκτίθενται σε υπότονο διάλυμα και μονιμοποιούνται. Τα μεταφασικά κύτταρα επιστρώνονται έπειτα σε αντικειμενοφόρες πλάκες και χρωματίζονται με τη χρήση καθιερωμένων μεθόδων [βλ. (3) (12)].

▼M7

Ανάλυση

Όλες οι αντικειμενοφόρες πλάκες, συμπεριλαμβανομένων των πλακών με τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες, θα πρέπει να κωδικοποιούνται χωριστά πριν από την ανάλυση και να τυχαιοποιούνται, έτσι ώστε ο εξεταστής να μη γνωρίζει τη συνθήκη μεταχείρισης.

Θα πρέπει να προσδιορίζεται ο μιτωτικός δείκτης ως παράμετρος κυτταροξικότητας σε 1 000 τουλάχιστον κύτταρα ανά ζώο από όλα τα ζώα που υποβάλλονται σε μεταχείριση (και τους θετικούς μάρτυρες), καθώς και από εκείνα που δεν υποβάλλονται σε μεταχείριση ή χρησιμεύουν ως αρνητικοί μάρτυρες με φορέα/διαλύτη.

Θα πρέπει να αναλύονται τουλάχιστον 200 μεταφασικά κύτταρα ανά ζώο για τη διαπίστωση δομικών χρωμοσωμικών εκτροπών με και χωρίς τα χάσματα (6). Ωστόσο, εάν η βάση δεδομένων για ιστορικούς αρνητικούς μάρτυρες δείχνει ότι η μέση συχνότητα υποβάθρου των δομικών χρωμοσωμικών εκτροπών είναι < 1 % στο εργαστήριο δοκιμών, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο καταμέτρησης πρόσθετων κυττάρων. Οι χρωματιδικού και χρωμοσωμικού τύπου εκτροπές θα πρέπει να καταγράφονται χωριστά και να ταξινομούνται σε υποκατηγορίες (ρήξεις, ανταλλαγές). Οι διαδικασίες που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο θα πρέπει να διασφαλίζουν τη διενέργεια της ανάλυσης χρωμοσωμικών εκτροπών από επαρκώς καταρτισμένους εξεταστές και, κατά περίπτωση, την αξιολόγηση της ανάλυσης από ομότιμους κριτές. Επειδή αναγνωρίζεται ότι οι διαδικασίες ετοιμασίας των αντικειμενοφόρων πλακών προκαλούν συχνά θραύση ενός ποσοστού μεταφασικών κυττάρων με συνακόλουθη απώλεια χρωμοσωμάτων, τα καταμετρούμενα κύτταρα θα πρέπει να περιέχουν αριθμό κεντρομεριδίων τουλάχιστον ίσο με $2n \pm 2$, όπου n είναι ο απλοειδής αριθμός χρωμοσωμάτων για το εξεταζόμενο ζωικό είδος.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Τα δεδομένα για κάθε ζώο θα πρέπει να παρουσιάζονται σε μορφή πίνακα. Ο μιτωτικός δείκτης, ο αριθμός των καταμετρηθέντων μεταφασικών κυττάρων, ο αριθμός εκτροπών ανά μεταφασικό κύτταρο και το ποσοστό των μεταφασικών κυττάρων με δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές θα πρέπει να αξιολογούνται για κάθε ζώο. Οι διάφοροι τύποι δομικών χρωμοσωμικών εκτροπών θα πρέπει να αναφέρονται με τον αριθμό και τη συχνότητά τους για τις ομάδες μεταχείρισης και τις ομάδες μαρτύρων. Τα χάσματα, καθώς και τα πολυπλοειδή κύτταρα και τα κύτταρα με ενδοαναδιπλασιασμένα χρωμοσώματα καταγράφονται χωριστά. Η συχνότητα των χασμάτων αναφέρεται αλλά γενικά δεν περιλαμβάνεται στην ανάλυση της συχνότητας των συνολικών δομικών εκτροπών. Εφόσον δεν υπάρχουν ενδείξεις διαφοράς αποκρίσεως μεταξύ των φύλων, τα δεδομένα μπορούν να συνδυάζονται για στατιστική ανάλυση. Θα πρέπει επίσης να αναφέρονται δεδομένα σχετικά με την τοξικότητα για τα ζώα και με τα κλινικά σημεία.

Κριτήρια αποδοχής

Τα ακόλουθα κριτήρια καθορίζουν την αποδοχή της δοκιμής:

α) Θεωρείται αποδεκτή η προσθήκη των δεδομένων για τους παράλληλους αρνητικούς μάρτυρες στη βάση ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για μάρτυρες (βλ. παραγράφους 11-14).

β) Οι παράλληλοι θετικοί μάρτυρες ή οι μάρτυρες καταμέτρησης θα πρέπει να επάγουν αποκρίσεις συμβατές με εκείνες που έχουν καταχωριστεί στη βάση ιστορικών δεδομένων για θετικούς μάρτυρες και να επιφέρουν στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες (βλ. παραγράφους 20-21).

γ) Αναλύεται ο απαιτούμενος αριθμός δόσεων και κυττάρων.

δ) Τα κριτήρια επιλογής της ανώτατης δόσης είναι σύμφωνα με αυτά που περιγράφονται στις παραγράφους 25-28.

Αξιολόγηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται σαφώς θετική εάν:

▼M7

α) τουλάχιστον μία από τις ομάδες μεταχείρισης παρουσιάζει στατιστικά σημαντική αύξηση της συχνότητας κυττάρων με δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές (χωρίς τα χάσματα) σε σχέση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα,

β) Η αύξηση αυτή σχετίζεται με τη δόση σε έναν τουλάχιστον χρόνο δειγματοληψίας, όταν αξιολογείται με κατάλληλη δοκιμασία τάσης, και

γ) κάποιο από τα αποτελέσματα βρίσκεται εκτός της κατανομής των δεδομένων για ιστορικούς αρνητικούς μάρτυρες (π.χ. όρια ελέγχου σε επίπεδο 95 % με βάση την κατανομή Poisson).

Εάν εξετάζεται μόνο η ανώτατη δόση σε συγκεκριμένο χρόνο δειγματοληψίας, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται σαφώς θετική εάν προκύπτει στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα και τα αποτελέσματα βρίσκονται εκτός της κατανομής των ιστορικών δεδομένων για αρνητικούς μάρτυρες (π.χ. όρια ελέγχου σε επίπεδο 95 % με βάση την κατανομή Poisson). Συστάσεις για τις πλέον κατάλληλες στατιστικές μεθόδους παρέχονται στη βιβλιογραφία (13). Όταν διενεργείται ανάλυση της σχέσης δόσης-απόκρισης, θα πρέπει να αναλύονται τουλάχιστον τρεις ομάδες που έλαβαν δόσεις. Στις στατιστικές δοκιμασίες θα πρέπει να χρησιμοποιείται το ζώο ως πειραματική μονάδα. Τα θετικά αποτελέσματα της δοκιμής χρωμοσωμικών εκτροπών υποδηλώνουν ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία επάγει δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές στον μυελό των οστών του εξεταζόμενου ζωικού είδους.

Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται σαφώς αρνητική εάν, σε όλες τις πειραματικές συνθήκες που εξετάστηκαν:

α) καμία από τις ομάδες μεταχείρισης δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική αύξηση της συχνότητας κυττάρων με δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές (χωρίς τα χάσματα) σε σχέση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα,

β) δεν υπάρχει σχετιζόμενη με τη δόση αύξηση σε κανέναν χρόνο δειγματοληψίας, όταν αξιολογείται με κατάλληλο έλεγχο τάσης,

γ) όλα τα αποτελέσματα βρίσκονται εντός της κατανομής των ιστορικών δεδομένων για αρνητικούς μάρτυρες (π.χ. όρια ελέγχου σε επίπεδο 95 % με βάση την κατανομή Poisson) και

δ) υπήρξε έκθεση του μυελού των οστών στις υπό δοκιμή χημικές ουσίες.

Συστάσεις για τις πλέον κατάλληλες στατιστικές μεθόδους έχουν διατυπωθεί στη βιβλιογραφία (13). Στα στοιχεία που αποδεικνύουν την έκθεση του μυελού των οστών σε υπό δοκιμή χημική ουσία μπορεί να περιλαμβάνονται η μείωση του μιτωτικού δείκτη και η μέτρηση των επιπέδων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο πλάσμα ή στο αίμα. Στην περίπτωση ενδοφλέβιας χορήγησης, δεν απαιτούνται αποδεικτικά στοιχεία της έκθεσης. Εναλλακτικά, για να αποδειχθεί η έκθεση του μυελού των οστών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν δεδομένα ADME (απορρόφηση-κατανομή-μεταβολισμός-απέκκριση) που προκύπτουν από ανεξάρτητη μελέτη με τη χρησιμοποίηση της ίδιας οδού χορήγησης και του ίδιου ζωικού είδους. Τα αρνητικά αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι, στις συνθήκες της δοκιμής, η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν επάγει δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές στον μυελό των οστών του εξεταζόμενου ζωικού είδους.

Δεν απαιτείται επαλήθευση των σαφώς θετικών ή σαφώς αρνητικών αποκρίσεων.

Σε περίπτωση που η απόκριση δεν είναι σαφώς θετική ούτε σαφώς αρνητική και για να διαπιστωθεί η βιολογική σημασία ενός αποτελέσματος (π.χ. ασθενής ή οριακή αύξηση), τα δεδομένα θα πρέπει να αξιολογούνται κατά την κρίση των ειδικών και/ή με περαιτέρω διερεύνηση των υφιστάμενων ολοκληρωμένων πειραμάτων. Σε ορισμένες περιπτώσεις, θα είναι ενδεχομένως χρήσιμη η ανάλυση περισσότερων κυττάρων ή η επανάληψη του πειράματος με τη χρήση τροποποιημένων πειραματικών συνθηκών.

▼M7

Σε σπάνιες περιπτώσεις, ακόμη και μετά από περαιτέρω διερεύνηση, τα δεδομένα δεν επιτρέπουν την εξαγωγή συμπεράσματος για θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα με την υπό δοκιμή χημική ουσία και, κατά συνέπεια, η μελέτη κρίνεται διφορούμενη.

Οι συχνότητες εμφάνισης μεταφασικών κυττάρων με πολυπλοειδία και ενδοαναδιπλασιασμό επί του συνόλου των μεταφασικών κυττάρων θα πρέπει να καταγράφονται χωριστά. Η αύξηση του αριθμού κυττάρων με πολυπλοειδία και/ή ενδοαναδιπλασιασμό μπορεί να σημαίνει ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι δυνάμει ικανή να αναστέλλει τις μιτωτικές διεργασίες ή την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (βλ. παράγραφο 3).

Έκθεση δοκιμής

Στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται τα ακόλουθα στοιχεία:

Συνοπτική παρουσίαση

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

— πηγή, αριθμός παρτίδας, καταληκτική ημερομηνία χρήσης, αν υπάρχει·

— σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εάν είναι γνωστή.

Μονοσυστατική ουσία:

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες·

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγματα:

— περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Παρασκεύασμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας:

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα·

— διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον διαλύτη/φορέα, εάν είναι γνωστές·

— σκευάσματα για χορήγηση μέσω της τροφής, του πόσιμου νερού ή της εισπνοής·

— αναλυτικοί προσδιορισμοί στα σκευάσματα (π.χ. σταθερότητα, ομοιογένεια, ονομαστικές συγκεντρώσεις), όταν έχουν διενεργηθεί.

Ζώα δοκιμής:

— είδος/φυλή που χρησιμοποιήθηκε και αιτιολόγηση της χρήσης του/της·

— αριθμός, ηλικία και φύλο των ζώων·

— προέλευση των ζώων, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσιο κ.λπ.·

— μέθοδος ατομικής ταυτοποίησης των ζώων·

— για βραχυπρόθεσμες μελέτες: βάρος κάθε ζώου κατά την έναρξη και τη λήξη της δοκιμής· για μελέτες διάρκειας μεγαλύτερης της μίας εβδομάδας: βάρος κάθε ζώου κατά τη διάρκεια της μελέτης και κατανάλωση τροφής. Θα πρέπει να περιλαμβάνονται το εύρος τιμών, η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση του σωματικού βάρους για κάθε ομάδα.

▼**M7**

Συνθήκες δοκιμής:

— θετικός και αρνητικός μάρτυρας (μάρτυρας με φορέα/διαλύτη)·

— δεδομένα από τη μελέτη προσδιορισμού εύρους τιμών, εάν πραγματοποιήθηκε·

— αιτιολόγηση της επιλογής των επιπέδων δόσης·

— λεπτομέρειες για το παρασκεύασμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας·

— λεπτομέρειες σχετικά με τη χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας·

— αιτιολόγηση της επιλογής της οδού και της διάρκειας χορήγησης·

— μέθοδοι επαλήθευσης του ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία έφθασε στη γενική κυκλοφορία ή στον μυελό οστών·

— πραγματική δόση (mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα), υπολογιζόμενη από τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο σιτηρέσιο/πόσιμο νερό (ppm) και την κατανάλωση, εφόσον έχει υπολογιστεί·

— λεπτομέρειες σχετικά με την ποιότητα της τροφής και του νερού·

— μέθοδος ευθανασίας·

— μέθοδος αναλγησίας (εάν χρησιμοποιείται)·

— λεπτομερής περιγραφή των προγραμμάτων μεταχείρισης και δειγματοληψίας και αιτιολόγηση των επιλογών·

— μέθοδοι ετοιμασίας αντικειμενοφόρων πλακών·

— μέθοδοι μέτρησης της τοξικότητας·

— ταυτότητα και συγκέντρωση της χημικής ουσίας που χρησιμοποιήθηκε για τη διακοπή της μετάφασης, δόση και χρόνος χορήγησης πριν από τη δειγματοληψία·

— διαδικασίες απομόνωσης και διατήρησης των δειγμάτων·

— κριτήρια για την καταμέτρηση των εκτροπών·

— αριθμός μεταφασικών κυττάρων που αναλύθηκαν ανά ζώο και αριθμός κυττάρων που αναλύθηκαν για τον προσδιορισμό του μιτωτικού δείκτη·

— κριτήρια αποδοχής της μελέτης·

— κριτήρια χαρακτηρισμού των μελετών ως θετικών, αρνητικών ή ασαφών.

Αποτελέσματα:

— κατάσταση των ζώων πριν από την περίοδο δοκιμής και καθ' όλη τη διάρκειά της, συμπεριλαμβανομένων των σημείων τοξικότητας·

— μιτωτικός δείκτης, χωριστά για κάθε ζώο·

— τύπος και αριθμός εκτροπών και κυττάρων με εκτροπές, χωριστά για κάθε ζώο·

— ολικός αριθμός εκτροπών ανά ομάδα, με μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις·

— αριθμός κυττάρων με εκτροπές ανά ομάδα, με μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις·

— μεταβολές της πλοειδίας, εφόσον παρατηρήθηκαν, συμπεριλαμβανομένων των συχνοτήτων των κυττάρων με πολυπλοειδία και/ή ενδοαναδιπλασιασμό·

▼M7

— σχέση δόσης-απόκρισης, κατά το δυνατόν·

— στατιστικές αναλύσεις και εφαρμοσθείσες μέθοδοι·

— δεδομένα που τεκμηριώνουν την έκθεση του μυελού των οστών·

— δεδομένα για τους παράλληλους αρνητικούς και θετικούς μάρτυρες, με πεδία τιμών, μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις·

— ιστορικά δεδομένα για αρνητικούς και θετικούς μάρτυρες, με πεδία τιμών, μέσες τιμές, τυπικές αποκλίσεις και όρια ελέγχου σε επίπεδο 95 % για την κατανομή, καθώς και περίοδος που καλύπτουν και αριθμός παρατηρήσεων·

— κριτήρια που τηρήθηκαν για τη θετική ή αρνητική απόκριση.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Συμπέρασμα.

Παραπομπές.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(2) Adler, I.D. (1984), «Cytogenetic Tests in Mammals», in Mutagenicity Testing: A Practical Approach, Venittand, S., J.M. Parry (eds.), IRL Press, Washington, DC, pp. 275-306.

(3) Preston, R.J. et al. (1987), Mammalian *in vivo* cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells, Mutation Research, Vol. 189/2, pp. 157-165.

(4) Richold, M.et al. (1990), «In Vivo Cytogenetics Assays», in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.

(5) Tice, R.R. et al. (1994), Report from the working group on the *in vivo* mammalian bone marrow chromosomal aberration test, Mutation Research, Vol. 312/3, pp. 305-312.

(6) Adler, I.D. et al. (1998), Recommendations for statistical designs of *in vivo* mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 417/1, pp. 19-30.

(7) Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

(8) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 87-90.

(9) Hayashi, M. *et al.* (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, pp. 293-304.

(10) Fielder, R.J. et al. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, pp. 313-319.

▼**M7**

(11) OECD (2000), «Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, N°19, OECD Publishing, Paris.

(12) Pacchierotti, F., V. Stocchi (2013), Analysis of chromosome aberrations in somatic and germ cells of the mouse, Methods in Molecular Biology, Vol. 1044, pp. 147-163.

(13) Lovell, D.P. et al. (1989), «Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays», in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.

▼**M7**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ανευπλοειδία: κάθε απόκλιση από τον φυσιολογικό διπλοειδή (ή απλοειδή) χρωμοσωμικό αριθμό κατά ένα ή περισσότερα χρωμοσώματα, όχι όμως κατά πολλαπλάσια πλήρων σειρών χρωμοσωμάτων (πρβλ. πολυπλοειδία).

Κεντρομερίδιο: περιοχή του χρωμοσώματος, με την οποία συνδέονται τα νημάτια της ατράκτου κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης, με στόχο την οργανωμένη κίνηση των θυγατρικών χρωμοσωμάτων προς τους πόλους των θυγατρικών κυττάρων.

Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Εκτροπή χρωματιδικού τύπου: δομική χρωμοσωμική βλάβη που εκδηλώνεται ως ρήξη μεμονωμένων χρωματίδων ή ρήξη και επανένωση μεταξύ χρωματίδων.

Εκτροπή χρωμοσωμικού τύπου: δομική χρωμοσωμική βλάβη που εκδηλώνεται ως ρήξη ή ρήξη και επανένωση και των δύο χρωματίδων στην ίδια θέση.

Ενδοαναδιπλασιασμός: διεργασία κατά την οποία έπειτα από μια φάση S με αντιγραφή του DNA, ο πυρήνας δεν υφίσταται μίτωση αλλά αρχίζει μια νέα φάση S. Το αποτέλεσμα είναι χρωμοσώματα με 4, 4,8, 16... χρωματίδες.

Χάσμα: αχρωματική βλάβη μικρότερη από το πλάτος μιας χρωματίδας και με ελάχιστη αποστοίχιση των χρωματίδων.

Μιτωτικός δείκτης: ο λόγος του αριθμού των κυττάρων που βρίσκονται σε φάση μίτωσης προς τον συνολικό αριθμό κυττάρων σε έναν πληθυσμό, ο οποίος αποτελεί μέτρο της κατάστασης πολλαπλασιασμού του εν λόγω κυτταρικού πληθυσμού.

Αριθμητική εκτροπή: μεταβολή του αριθμού των χρωμοσωμάτων από τον φυσιολογικό χαρακτηριστικό αριθμό στα χρησιμοποιούμενα ζώα (ανευπλοειδία).

Πολυπλοειδία: αριθμητική χρωμοσωμική εκτροπή που συνεπάγεται μεταβολή του αριθμού της πλήρους σειράς χρωμοσωμάτων, σε αντίθεση με μια αριθμητική μεταβολή σε μέρος της σειράς χρωμοσωμάτων (πρβλ. ανευπλοειδία).

Δομική χρωμοσωμική εκτροπή: μεταβολή της δομής των χρωμοσωμάτων που μπορεί να ανιχνευθεί με μικροσκοπική εξέταση του σταδίου της μετάφασης της κυτταρικής διαίρεσης και γίνεται αντιληπτή με τη μορφή απαλείψεων και θραυσμάτων, ενδοανταλλαγών ή διανταλλαγών.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

▼M7

Προσάρτημα 2

ΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΦΥΛΩΝ ΣΤΗ ΔΟΚΙΜΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΩΝ ΕΚΤΡΟΠΩΝ IN VIVO

Ο παραγοντικός σχεδιασμός και η σχετική ανάλυση

Σύμφωνα με τον παρόντα σχεδιασμό, υποβάλλονται σε δοκιμή τουλάχιστον 5 αρσενικά και 5 θηλυκά άτομα σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης, με αποτέλεσμα τη χρήση τουλάχιστον 40 ζώων (20 αρσενικών και 20 θηλυκών, συν τους αντίστοιχους θετικούς μάρτυρες).

Πρόκειται για έναν από τους απλούστερους παραγοντικούς σχεδιασμούς, που ισοδυναμεί με αμφίδρομη ανάλυση διασποράς στην οποία ως κύριες επιδράσεις θεωρούνται το φύλο και το επίπεδο συγκέντρωσης. Τα δεδομένα μπορούν να αναλυθούν με πολλά τυποποιημένα στατιστικά πακέτα λογισμικού, όπως τα SPSS, SAS, STATA, Genstat, καθώς και με τη χρήση του συστήματος R.

Κατά την ανάλυση διαχωρίζεται η μεταβλητότητα του συνόλου δεδομένων σε μεταβλητότητα μεταξύ των φύλων, μεταβλητότητα μεταξύ των συγκεντρώσεων και μεταβλητότητα σχετιζόμενη με την αλληλεπίδραση μεταξύ των φύλων και των συγκεντρώσεων. Καθένας από τους όρους αυτούς συγκρίνεται με την εκτίμηση της μεταβλητότητας μεταξύ των ζώων επανάληψης (replicates) που απαρτίζουν τις ομάδες ζώων του ίδιου φύλου στις οποίες χορηγείται η ίδια συγκέντρωση. Περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με την υποκείμενη μεθοδολογία είναι διαθέσιμες σε πολλά κλασικά εγχειρίδια στατιστικής (βλ. βιβλιογραφία) και στις λειτουργίες βοήθειας (Help) που παρέχονται με τα στατιστικά πακέτα λογισμικού.

Στο επόμενο στάδιο της ανάλυσης εξετάζεται ο όρος αλληλεπίδρασης φύλο x συγκέντρωση σε πίνακα ANOVA ([1]). Ελλείψει σημαντικού όρου αλληλεπίδρασης, οι συνδυασμένες τιμές στα φύλα ή στα επίπεδα συγκέντρωσης τροφοδοτούν έγκυρους στατιστικούς ελέγχους μεταξύ των επιπέδων με βάση τη συγχωνευμένη ενδοομαδική μεταβλητότητα (pooled within-group variability), όρο που παρέχεται από την ANOVA.

Η ανάλυση συνεχίζεται με τον διαχωρισμό της εκτίμησης της μεταβλητότητας μεταξύ των συγκεντρώσεων σε αντιθέσεις που τροφοδοτούν έλεγχο για τις γραμμικές και τετραγωνικές αντιθέσεις των αποκρίσεων σε όλα τα επίπεδα συγκέντρωσης. Όταν υπάρχει σημαντική αλληλεπίδραση φύλου x συγκέντρωση, ο όρος αυτός μπορεί επίσης να διαχωριστεί σε αντιθέσεις γραμμικής x φύλο και τετραγωνικής x φύλο αλληλεπίδρασης. Οι εν λόγω όροι τροφοδοτούν ελέγχους με σκοπό να εξακριβωθεί αν οι αποκρίσεις στη συγκέντρωση είναι παράλληλες για τα δύο φύλα ή διαφοροποιούνται ανάλογα με το φύλο.

Η εκτίμηση της συγχωνευμένης ενδοομαδικής μεταβλητότητας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για κατά ζεύγη ελέγχους της διαφοράς μεταξύ των μέσων τιμών. Οι έλεγχοι αυτοί μπορούν να αφορούν συγκρίσεις μεταξύ των μέσων τιμών στα δύο φύλα και μεταξύ των μέσων τιμών στα διάφορα επίπεδα συγκέντρωσης, όπως π.χ. οι συγκρίσεις με τα επίπεδα των αρνητικών μαρτύρων. Στις περιπτώσεις σημαντικής αλληλεπίδρασης, μπορούν να γίνουν συγκρίσεις μεταξύ των μέσων τιμών των διαφόρων συγκεντρώσεων στο ίδιο φύλο ή μεταξύ των μέσων τιμών των φύλων στην ίδια συγκέντρωση.

Βιβλιογραφία

Υπάρχουν πολλά εγχειρίδια στατιστικής που πραγματεύονται τη θεωρία, τον σχεδιασμό, τη μεθοδολογία, την ανάλυση και την ερμηνεία παραγοντικών σχεδιασμών οι οποίοι εκτείνονται από τις απλούστερες αναλύσεις δύο παραγόντων έως τις πλέον περίπλοκες μορφές που χρησιμοποιούνται στη μεθοδολογία σχεδιασμού πειραμάτων. Ο κατάλογος που ακολουθεί δεν είναι πλήρης. Ορισμένα βιβλία παρέχουν πρακτικά παραδείγματα εφαρμογής συγκρίσιμων σχεδιασμών, συνοδευόμενα σε ορισμένες περιπτώσεις από κώδικα για τη διενέργεια των αναλύσεων με τη χρήση διαφόρων πακέτων λογισμικού.

([1]) Οι στατιστικολόγοι που υιοθετούν προσέγγιση μοντελοποίησης, όπως η χρήση γενικών γραμμικών μοντέλων (General Linear Models/GLM), μπορεί να προσεγγίζουν την ανάλυση με διαφορετικό αλλά συγκρίσιμο τρόπο, χωρίς ωστόσο να συνάγουν αναγκαστικά τον παραδοσιακό πίνακα ANOVA, που ανάγεται στις αλγοριθμικές προσεγγίσεις για τον υπολογισμό των στατιστικών στοιχείων οι οποίες αναπτύχθηκαν πριν από την εποχή των υπολογιστών.

▼**M7**

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼M7

Β.12. ΔΟΚΙΜΉ ΜΙΚΡΟΠΥΡΉΝΩΝ ΣΕ ΕΡΥΘΡΟΚΎΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 474 του ΟΟΣΑ (2016). Αποτελεί μέρος μιας σειράς μεθόδων δοκιμών γενετικής τοξικολογίας. Έχει συνταχθεί ένα έγγραφο του ΟΟΣΑ με συνοπτικές πληροφορίες για τις δοκιμές γενετικής τοξικολογίας και μια επισκόπηση των πρόσφατων αλλαγών που έγιναν σε αυτές τις κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών (1).

Η δοκιμή μικροπυρήνων in vivo σε θηλαστικά είναι ιδιαίτερα σημαντική για την αξιολόγηση της γονιδιοτοξικότητας, διότι οι παράγοντες των διεργασιών μεταβολισμού, φαρμακοκινητικής και επιδιόρθωσης του DNA in vivo, αν και μπορεί να διαφέρουν μεταξύ των ειδών, είναι ενεργοί και συμβάλλουν στις αποκρίσεις. Οι προσδιορισμοί in vivo είναι επίσης χρήσιμοι για την περαιτέρω διερεύνηση της γονιδιοτοξικότητας που ανιχνεύεται με σύστημα in vitro.

Η δοκιμή μικροπυρήνων in vivo σε θηλαστικά χρησιμοποιείται για την ανίχνευση βλαβών που επάγει η υπό δοκιμή χημική ουσία στα χρωμοσώματα ή στη μιτωτική άτρακτο των ερυθροβλαστών. Με τη δοκιμή αξιολογείται ο σχηματισμός μικροπυρήνων σε δείγματα ερυθροκυττάρων που λαμβάνονται από τον μυελό των οστών ή το περιφερικό αίμα ζώων, συνήθως τρωκτικών.

Σκοπός της δοκιμής μικροπυρήνων είναι ο εντοπισμός χημικών ουσιών που προκαλούν κυτταρογενετική βλάβη η οποία απολήγει στον σχηματισμό μικροπυρήνων που περιέχουν είτε καθυστερημένα (lagging) χρωμοσωμικά θραύσματα είτε ολόκληρα χρωμοσώματα.

Όταν οι ερυθροβλάστες του μυελού των οστών αναπτυχθούν σε άωρα ερυθροκύτταρα (γνωστά και ως πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα ή δικτυοερυθροκύτταρα), ο κύριος πυρήνας εκβάλλεται, ενώ οι μικροπυρήνες που έχουν σχηματιστεί μπορεί να παραμείνουν στο κυτταρόπλασμα. Η απεικόνιση ή ανίχνευση των μικροπυρήνων διευκολύνεται στα κύτταρα αυτά, επειδή δεν έχουν κύριο πυρήνα. Η αύξηση του ποσοστού των άωρων ερυθροκυττάρων με μικροπυρήνες στα ζώα που υποβάλλονται σε μεταχείριση αποτελεί ένδειξη επαγόμενων δομικών ή αριθμητικών χρωμοσωμικών εκτροπών.

Τα νεοσχηματισμένα ερυθροκύτταρα με μικροπυρήνες αναγνωρίζονται και ποσοτικοποιούνται με χρώση, την οποία ακολουθεί είτε οπτική καταμέτρηση με μικροσκόπιο είτε αυτόματη ανάλυση. Η καταμέτρηση επαρκούς πλήθους άωρων ερυθροκυττάρων στο περιφερικό αίμα ή στον μυελό των οστών ενήλικων ζώων διευκολύνεται σε μεγάλο βαθμό με τη χρήση συστήματος αυτόματης μέτρησης. Τα συστήματα αυτά είναι αποδεκτές εναλλακτικές επιλογές αντί της μη αυτόματης αξιολόγησης (2). Συγκριτικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι εν λόγω μέθοδοι, με τη χρήση κατάλληλων προτύπων διακρίβωσης, μπορούν να παρέχουν καλύτερη ενδοεργαστηριακή και διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα και ευαισθησία από τη μη αυτόματη μικροσκοπική μέτρηση (3) (4). Στα αυτόματα συστήματα με τα οποία είναι δυνατόν να μετρηθεί η συχνότητα ερυθροκυττάρων με μικροπυρήνες περιλαμβάνονται, μεταξύ άλλων, τα κυτταρόμετρα ροής (5), τα συστήματα ανάλυσης εικόνων (6) (7) και τα κυτταρόμετρα με σάρωση λέιζερ (8).

Τα χρωμοσωμικά θραύσματα μπορούν να διακριθούν από τα πλήρη χρωμοσώματα με βάση ορισμένα κριτήρια, αν και η διάκριση αυτή κατά κανόνα δεν αποτελεί μέρος της δοκιμής. Στα κριτήρια αυτά περιλαμβάνεται η διαπίστωση της παρουσίας ή απουσίας κινητοχώρου ή κεντρομεριδιακού DNA, στοιχείων που χαρακτηρίζουν τα ακέραια χρωμοσώματα. Η απουσία κινητοχώρου ή κεντρομεριδιακού DNA δείχνει ότι ο μικροπυρήνας περιέχει μόνο θραύσματα χρωμοσωμάτων, ενώ η παρουσία τους είναι ενδεικτική της απώλειας χρωμοσωμάτων.

Οι ορισμοί των χρησιμοποιούμενων όρων παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

▼M7

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

Ο ιστός-στόχος των γενετικών βλαβών στην παρούσα δοκιμή είναι ο μυελός των οστών νεαρών ενήλικων τρωκτικών, καθώς τα ερυθροκύτταρα παράγονται σε αυτόν τον ιστό. Η μέτρηση μικροπυρήνων σε άωρα ερυθροκύτταρα του περιφερικού αίματος είναι αποδεκτή σε άλλα είδη θηλαστικών, για τα οποία έχει καταδειχθεί επαρκής ευαισθησία για την ανίχνευση χημικών ουσιών που προκαλούν δομικές ή αριθμητικές χρωμοσωμικές εκτροπές στα κύτταρα αυτά (με επαγωγή μικροπυρήνων σε άωρα ερυθροκύτταρα) και υπό τον όρο ότι παρέχεται επιστημονική αιτιολόγηση. Η συχνότητα άωρων ερυθροκυττάρων με μικροπυρήνες είναι το κύριο τελικό σημείο. Η συχνότητα ώριμων ερυθροκυττάρων με μικροπυρήνες στο περιφερικό αίμα μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως τελικό σημείο σε είδη χωρίς ισχυρή σπληνική επιλογή κατά των κυττάρων με μικροπυρήνες και όταν τα ζώα υποβάλλονται σε μεταχείριση συνεχώς για περίοδο που υπερβαίνει τη διάρκεια ζωής των ερυθροκυττάρων στο χρησιμοποιούμενο είδος (π.χ. 4 εβδομάδες ή περισσότερο στους ποντικούς).

Εάν υπάρχουν ενδείξεις ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία ή οι μεταβολίτες της δεν θα φθάσουν στον στοχευόμενο ιστό, μπορεί να μην ενδείκνυται η χρήση της παρούσας δοκιμής.

Πριν από τη χρήση της μεθόδου δοκιμών σε μείγμα για την παραγωγή δεδομένων για συγκεκριμένο ρυθμιστικό σκοπό, θα πρέπει να εξετάζεται αν — και, εάν ναι, για ποιον λόγο — αυτή μπορεί να αποδώσει επαρκή αποτελέσματα για τον επιδιωκόμενο σκοπό. Οι εκτιμήσεις αυτές δεν είναι αναγκαίες όταν οι κανονιστικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τον έλεγχο του μείγματος.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Τα ζώα εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία μέσω κατάλληλης οδού. Εάν χρησιμοποιείται μυελός των οστών, τα ζώα θανατώνονται με ευθανασία σε κατάλληλο χρόνο μετά τη μεταχείριση, εξάγεται ο μυελός των οστών και ακολουθεί επίστρωση και χρώση παρασκευασμάτων (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Όταν χρησιμοποιείται περιφερικό αίμα, το αίμα συλλέγεται σε κατάλληλο χρόνο μετά τη μεταχείριση και ακολουθεί επίστρωση και χρώση παρασκευασμάτων (12) (16) (17) (18). Σε περίπτωση οξείας εκτέλεσης της μεταχείρισης, είναι σημαντικό να επιλέγονται χρόνοι λήψης μυελού των οστών ή αιμοληψιών κατά τους οποίους μπορεί να ανιχνευθεί η σχετιζόμενη με την αγωγή επαγωγή μικροπύρηνων στα άωρα ερυθροκύτταρα. Στην περίπτωση της λήψης περιφερικού αίματος, πρέπει επίσης να έχει παρέλθει αρκετός χρόνος, ώστε τα συμβάντα αυτά να εμφανιστούν στην κυκλοφορία του αίματος. Τα παρασκευάσματα εξετάζονται για να διαπιστωθεί η παρουσία μικροπυρήνων, με παρατήρηση με τη χρήση μικροσκοπίου, ανάλυση εικόνων, κυτταρομετρία ροής ή κυτταρομετρία με σάρωση λέιζερ.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

Έρευνες τεχνικής ικανότητας

Για να τεκμηριώσει πως διαθέτει επαρκή εμπειρία στη διεξαγωγή της δοκιμής πριν τη χρησιμοποιήσει για δοκιμές ρουτίνας, το εργαστήριο θα πρέπει να έχει αποδείξει την ικανότητα αναπαραγωγής των αναμενόμενων αποτελεσμάτων από δημοσιευμένα δεδομένα στις βιβλιογραφικές παραπομπές (17) (19) (20) (21) (22) για συχνότητες μικροπυρήνων, με τουλάχιστον δύο χημικές ουσίες που αποτελούν θετικούς μάρτυρες (συμπεριλαμβανομένων ασθενών αποκρίσεων που επάγονται από χαμηλές δόσεις θετικών μαρτύρων), όπως αυτές που απαριθμούνται στον πίνακα 1, καθώς και με συμβατούς μάρτυρες με φορέα/διαλύτη (βλ. παράγραφο 26). Στα πειράματα αυτά θα πρέπει να χρησιμοποιούνται δόσεις που επιφέρουν αναπαραγώγιμες και σχετιζόμενες με τη δόση αυξήσεις και να καταδεικνύονται η ευαισθησία και το δυναμικό εύρος του συστήματος δοκιμής στον στοχευόμενο ιστό (μυελός των οστών ή περιφερικό αίμα) και με τη χρήση της μεθόδου καταμέτρησης που πρόκειται να εφαρμοστεί στο εργαστήριο. Αυτή η απαίτηση δεν ισχύει για τα εργαστήρια που έχουν πείρα, δηλ. διαθέτουν βάση ιστορικών δεδομένων, όπως ορίζεται στις παραγράφους 14-18.

Ιστορικά δεδομένα μαρτύρων

Κατά τη διάρκεια των ερευνών τεχνικής ικανότητας, το εργαστήριο θα πρέπει να καθορίζει:

— εύρος τιμών και κατανομή ιστορικών δεδομένων για θετικούς μάρτυρες και

▼M7

— εύρος τιμών και κατανομή ιστορικών δεδομένων για αρνητικούς μάρτυρες.

Κατά την αρχική συγκέντρωση ιστορικών δεδομένων για κατανομή όσον αφορά τους αρνητικούς μάρτυρες, οι παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες θα πρέπει να συμφωνούν με τα δημοσιευμένα δεδομένα για μάρτυρες, εφόσον υπάρχουν. Καθώς θα προστίθενται περισσότερα πειραματικά δεδομένα στην κατανομή των ιστορικών δεδομένων μαρτύρων, οι παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες θα πρέπει, στην ιδανική περίπτωση, να βρίσκονται εντός των ορίων ελέγχου σε επίπεδο 95 % της εν λόγω κατανομής. Η βάση ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για αρνητικούς μάρτυρες θα πρέπει να είναι στατιστικά ανθεκτική για να διασφαλίζει την ικανότητα του εργαστηρίου να αξιολογεί την κατανομή των δεδομένων του που αφορούν τους αρνητικούς μάρτυρες. Από τη βιβλιογραφία συνάγεται ότι ενδέχεται να απαιτούνται τουλάχιστον 10 πειράματα, αν και είναι προτιμότερο η βάση δεδομένων να αποτελείται από τουλάχιστον 20 πειράματα που έχουν εκτελεστεί σε συγκρίσιμες πειραματικές συνθήκες. Τα εργαστήρια θα πρέπει να χρησιμοποιούν μεθόδους ποιοτικού ελέγχου, όπως διαγράμματα ελέγχου [π.χ. διαγράμματα C ή X-bar (23)], για να προσδιορίζουν τη μεταβλητότητα των δεδομένων τους και να αποδεικνύουν ότι έχουν «υπό έλεγχο» τη μεθοδολογία. Περαιτέρω συστάσεις για τον τρόπο δημιουργίας και χρήσης των ιστορικών δεδομένων (δηλ. κριτήρια προσθήκης στοιχείων στα ιστορικά δεδομένα και αποκλεισμού στοιχείων από αυτά, καθώς και κριτήρια αποδοχής συγκεκριμένου πειράματος) έχουν διατυπωθεί στη βιβλιογραφία (24).

Εάν το εργαστήριο δεν συμπληρώσει επαρκή αριθμό πειραμάτων για τον καθορισμό στατιστικά ανθεκτικής κατανομής αρνητικών μαρτύρων (βλ. παράγραφο 15) κατά τη διάρκεια των ερευνών τεχνικής ικανότητας (που περιγράφονται στην παράγραφο 13), είναι αποδεκτή η κατασκευή της κατανομής κατά τις πρώτες δοκιμές ρουτίνας. Κατά την εφαρμογή της προσέγγισης αυτής θα πρέπει να τηρούνται οι συστάσεις που έχουν διατυπωθεί στη βιβλιογραφία (24) και τα αποτελέσματα που προκύπτουν για τους αρνητικούς μάρτυρες στα σχετικά πειράματα θα πρέπει και πάλι να συμφωνούν με τα δημοσιευμένα δεδομένα για αρνητικούς μάρτυρες.

Κάθε αλλαγή του πειραματικού πρωτοκόλλου θα πρέπει να μελετάται υπό το πρίσμα της επίπτωσής της στη διατήρηση της συμφωνίας των δεδομένων που προκύπτουν προς την υφιστάμενη βάση ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για μάρτυρες. Μόνο σημαντικές ανακολουθίες θα πρέπει να έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία νέας βάσης ιστορικών δεδομένων για μάρτυρες, εφόσον οι ειδικοί κρίνουν ότι διαφέρει από την προηγούμενη κατανομή (βλ. παράγραφο 15). Για τη διεξαγωγή πραγματικής δοκιμής κατά την περίοδο της αντικατάστασης, ενδέχεται να μην είναι αναγκαία μια πλήρης βάση δεδομένων για αρνητικούς μάρτυρες, με την προϋπόθεση ότι το εργαστήριο μπορεί να αποδείξει ότι οι τιμές του για τους παράλληλους αρνητικούς μάρτυρες εξακολουθούν να συμφωνούν είτε με την προηγούμενη βάση δεδομένων του είτε με τα αντίστοιχα δημοσιευμένα δεδομένα.

Τα δεδομένα για αρνητικούς μάρτυρες θα πρέπει να είναι η επίπτωση άωρων ερυθροκυττάρων με μικροπυρήνες σε κάθε ζώο. Οι παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες θα πρέπει, στην ιδανική περίπτωση, να βρίσκονται εντός των ορίων ελέγχου σε επίπεδο 95 % της κατανομής της βάσης ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για αρνητικούς μάρτυρες. Όταν τα δεδομένα για παράλληλους αρνητικούς μάρτυρες δεν βρίσκονται εντός των ορίων ελέγχου σε επίπεδο 95 %, μπορεί να είναι αποδεκτή η προσθήκη τους στην κατανομή των ιστορικών δεδομένων μαρτύρων, εφόσον τα εν λόγω δεδομένα δεν είναι ακραίες έκτοπες τιμές και υπάρχουν στοιχεία που αποδεικνύουν ότι το σύστημα δοκιμής είναι «υπό έλεγχο» (βλ. παράγραφο 15) και ότι δεν πρόκειται για τεχνικό ή ανθρώπινο σφάλμα.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Προετοιμασίες

Επιλογή ζωικού είδους

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή νεαρά ενήλικα ζώα που ανήκουν σε συνήθεις εργαστηριακές φυλές. Επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται ποντικοί, επίμυες ή άλλο κατάλληλο είδος θηλαστικών. Όταν χρησιμοποιείται περιφερικό αίμα, πρέπει να είναι βέβαιο ότι η απομάκρυνση των μικροπύρηνων κυττάρων από την κυκλοφορία μέσω του σπλήνα δεν υπονομεύει την ανίχνευση επαγόμενων μικροπυρήνων στο επιλεγμένο ζωικό είδος. Αυτό έχει καταδειχθεί σαφώς για το περιφερικό αίμα ποντικών και επίμυων (2). Η επιστημονική αιτιολόγηση της χρήσης

▼M7

άλλων ειδών εκτός από επίμυες και ποντικούς θα πρέπει να περιλαμβάνεται στην έκθεση δοκιμής. Εάν χρησιμοποιούνται άλλα είδη εκτός των τρωκτικών, συνιστάται να ενσωματώνεται η μέτρηση των επαγόμενων μικροπυρήνων σε άλλη κατάλληλη δοκιμή τοξικότητας.

Συνθήκες στέγασης και σίτισης των ζώων

Για τα τρωκτικά, η θερμοκρασία στην αίθουσα των ζώων θα πρέπει να είναι 22 °C (± 3 °C). Η σχετική υγρασία, η ιδανική τιμή της οποίας είναι 50-60 %, θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 40 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού της αίθουσας. Ο φωτισμός θα πρέπει να είναι τεχνητός, με φωτοπερίοδο 12 ωρών. Για τη διατροφή των ζώων μπορούν να χρησιμοποιούνται τα κλασικά εργαστηριακά σιτηρέσια, με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού. Όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται με την τροφή, η ανάγκη επαρκούς πρόσμειξης της ουσίας είναι δυνατόν να επηρεάσει την επιλογή σιτηρεσίου. Τα τρωκτικά θα πρέπει να στεγάζονται σε μικρές ομάδες (όχι περισσότερα από πέντε ανά κλωβό) του ίδιου φύλου και της ίδιας μεταχείρισης, εφόσον δεν αναμένεται επιθετική συμπεριφορά, κατά προτίμηση σε κλωβούς με συμπαγές δάπεδο με κατάλληλο εμπλουτισμό του περιβάλλοντος. Η ατομική στέγαση των ζώων επιτρέπεται, μόνον εάν αιτιολογείται επιστημονικά.

Προετοιμασία των ζώων

Κατά κανόνα χρησιμοποιούνται υγιή νεαρά ενήλικα ζώα (για τα τρωκτικά, η ιδανική ηλικία είναι μεταξύ 6 και 10 εβδομάδων κατά την έναρξη της μεταχείρισης, αν και είναι επίσης αποδεκτά ζώα λίγο μεγαλύτερης ηλικίας), τα οποία κατανέμονται τυχαία στις ομάδες μαρτύρων και μεταχείρισης. Τα ζώα ταυτοποιούνται μοναδικά με χρήση ανώδυνης, ελάχιστα επεμβατικής μεθόδου (π.χ. δακτύλιοι, ετικέτες, μικροτσίπ ή βιομετρική ταυτοποίηση, αλλά όχι αποκοπή τμήματος αυτιού ή δακτύλου). Οι κλωβοί θα πρέπει να διατάσσονται με τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται οι πιθανές επιδράσεις της θέσης τους. Θα πρέπει να αποφεύγεται η διασταυρούμενη μόλυνση από τον θετικό μάρτυρα και την υπό δοκιμή χημική ουσία. Στην αρχή της δοκιμής, οι διαφορές βάρους των ζώων θα πρέπει να είναι ελάχιστες και να μην υπερβαίνουν το ± 20 % του μέσου βάρους κάθε φύλου.

Παρασκευή των δόσεων

Οι στερεές υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να διαλύονται ή να διασπείρονται (σχηματισμός εναιωρήματος) σε κατάλληλους διαλύτες ή φορείς ή να αναμειγνύονται με την τροφή ή το πόσιμο νερό, πριν χορηγηθούν στα ζώα. Οι υγρές υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορούν να χορηγούνται ως έχουν ή να αραιώνονται πριν από τη χορήγηση. Σε περίπτωση έκθεσης μέσω της εισπνοής, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορούν να χορηγούνται ως αέριο, ατμοί ή αερόλυμα στερεού/υγρού, ανάλογα με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσφατα παρασκευάσματα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εκτός αν τα στοιχεία σχετικά με τη σταθερότητά της καταδεικνύουν ότι είναι αποδεκτή η φύλαξή της και καθορίζουν τις κατάλληλες συνθήκες φύλαξης.

Συνθήκες δοκιμής

Διαλύτης/φορέας:

Ο διαλύτης/φορέας θα πρέπει να μην έχει τοξικές επιδράσεις στα χρησιμοποιούμενα επίπεδα δόσεων ούτε ικανότητα χημικής αντίδρασης με τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες. Εφόσον χρησιμοποιείται άλλος διαλύτης/φορέας εκτός των καθιερωμένων, η χρήση του θα πρέπει να τεκμηριώνεται με δεδομένα αναφοράς που αποδεικνύουν τη συμβατότητά του. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατό, να εξετάζεται πρώτα αν μπορεί να χρησιμοποιηθεί υδατικός διαλύτης/φορέας. Παραδείγματα ευρέως χρησιμοποιούμενων συμβατών διαλυτών/φορέων είναι, μεταξύ άλλων, το νερό, ο φυσιολογικός ορός (ισότονο αλατούχο διάλυμα), το διάλυμα μεθυλοκυτταρίνης, το διάλυμα άλατος της καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης με νάτριο, το ελαιόλαδο και το αραβοσιτέλαιο. Εάν δεν υπάρχουν ιστορικά ή δημοσιευμένα δεδομένα για μάρτυρες, που να αποδεικνύουν ότι ο επιλεγμένος ασυνήθης διαλύτης/φορέας δεν επάγει μικροπυρήνες ή άλλες επιβλαβείς επιδράσεις, θα πρέπει να διεξάγεται αρχική μελέτη για να διαπιστώνεται αν είναι αποδεκτός ο μάρτυρας με διαλύτη/φορέα.

▼M7

Μάρτυρες

Θετικοί μάρτυρες

Κάθε δοκιμή θα πρέπει κανονικά να περιλαμβάνει μια ομάδα ζώων που υποβάλλονται σε μεταχείριση με χημική ουσία η οποία χρησιμεύει ως θετικός μάρτυρας. Η εν λόγω ομάδα μπορεί να παραλείπεται, εάν το εργαστήριο δοκιμών έχει αποδείξει την τεχνική του ικανότητα διεξαγωγής της δοκιμής και έχει καθορίσει εύρος ιστορικών δεδομένων για θετικούς μάρτυρες. Εάν δεν συμπεριλαμβάνεται ομάδα παράλληλων θετικών μαρτύρων, κάθε πείραμα θα πρέπει να περιλαμβάνει μάρτυρες καταμέτρησης (μονιμοποιημένες αντικειμενοφόρες πλάκες χωρίς χρώση ή δείγματα κυτταρικών εναιωρημάτων, όπως ενδείκνυται για τη μέθοδο καταμέτρησης). Οι εν λόγω μάρτυρες μπορούν να ληφθούν με την προσθήκη κατάλληλων δειγμάτων αναφοράς κατά την καταμέτρηση στο πλαίσιο της μελέτης, τα οποία έχουν ληφθεί και φυλαχθεί από χωριστό πείραμα με θετικούς μάρτυρες που εκτελείται σε τακτά διαστήματα (π.χ. ανά 6 έως 18 μήνες), για παράδειγμα, κατά τον έλεγχο της τεχνικής ικανότητας και, στη συνέχεια, σε τακτική βάση, όποτε είναι αναγκαίο.

Οι χημικές ουσίες που χρησιμεύουν ως θετικοί μάρτυρες θα πρέπει να προκαλούν με αξιοπιστία ανιχνεύσιμη αύξηση της συχνότητας μικροπυρήνων σε σχέση με την αυθόρμητη συχνότητα. Όταν χρησιμοποιείται μη αυτόματη καταμέτρηση με μικροσκόπιο, οι δόσεις θετικών μαρτύρων θα πρέπει να επιλέγονται κατά τρόπο ώστε οι επιδράσεις να είναι σαφείς, αλλά να μην αποκαλύπτουν αμέσως την ταυτότητα των κωδικοποιημένων δειγμάτων στον εξεταστή. Είναι αποδεκτό να χορηγούνται οι θετικοί μάρτυρες και από οδό διαφορετική από εκείνη της χορήγησης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, με τη χρήση διαφορετικού προγράμματος αγωγής, και να διενεργείται η δειγματοληψία μόνο σε μία χρονική στιγμή. Επιπροσθέτως, μπορεί να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης θετικών μαρτύρων συγγενούς χημικής τάξης, κατά περίπτωση. Παραδείγματα χημικών ουσιών που αποτελούν θετικούς μάρτυρες περιλαμβάνονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1

Παραδείγματα χημικών ουσιών που αποτελούν θετικούς μάρτυρες

Χημικές ουσίες και αριθ. CAS (CASRN)
Μεθανοσουλφονικός αιθυλεστέρας [CASRN 62-50-0]
Μεθανοσουλφονικός μεθυλεστέρας [CASRN 66-27-3]
Αιθυλονιτροζουρία [CASRN 759-73-9]
Μιτομυκίνη C [CASRN 50-07-7]
Κυκλοφωσφαμίδιο (μονοένυδρο) [CASRN 50-18-0 (CASRN 6055-19-2)]
Τριαιθυλενομελαμίνη [CASRN 51-18-3]
Κολχικίνη [CASRN 64-86-8] ή βινβλαστίνη [CASRN 865-21-4] — ως ανευπλοειδογόνες ουσίες

Αρνητικοί μάρτυρες

Σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας θα πρέπει να περιλαμβάνεται ομάδα ζώων ως αρνητικός μάρτυρας, η οποία υφίσταται τους ίδιους χειρισμούς όπως οι ομάδες μεταχείρισης, με μόνη διαφορά το ότι δεν εκτίθεται στην υπό δοκιμή χημική ουσία. Εάν για τη χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας χρησιμοποιείται διαλύτης/φορέας, αυτός θα πρέπει να χορηγείται και στην ομάδα-μάρτυρα. Ωστόσο, εάν από ιστορικά δεδομένα του εργαστηρίου δοκιμών για αρνητικούς μάρτυρες προκύπτει σταθερή μεταβλητότητα και συχνότητα μικροπύρηνων κυττάρων μεταξύ των ζώων σε κάθε δειγματοληψία, μπορεί να απαιτείται μία μόνο δειγματοληψία για τον αρνητικό μάρτυρα. Σε περίπτωση μίας μόνο δειγματοληψίας για τους αρνητικούς μάρτυρες, αυτή θα πρέπει να διενεργείται κατά τον χρόνο της πρώτης δειγματοληψίας στο πλαίσιο της μελέτης.

▼M7

Εάν χρησιμοποιείται περιφερικό αίμα, τότε αντί του παράλληλου αρνητικού μάρτυρα στις βραχυχρόνιες μελέτες επιτρέπεται να χρησιμοποιηθεί δείγμα που λαμβάνεται πριν από τη μεταχείριση, όταν τα προκύπτοντα δεδομένα συμφωνούν με τη βάση ιστορικών δεδομένων για μάρτυρες του εργαστηρίου δοκιμών. Έχει αποδειχθεί στους επίμυες ότι η προ της μεταχείρισης δειγματοληψία μικρών ποσοτήτων (π.χ. κάτω των 100 μl/ημέρα) έχει ελάχιστο αντίκτυπο στη συχνότητα υποβάθρου των μικροπυρήνων (25).

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αριθμός και φύλο των ζώων

Σε γενικές γραμμές, η απόκριση μικροπυρήνων είναι παρόμοια μεταξύ των αρσενικών και θηλυκών ζώων και, ως εκ τούτου, οι περισσότερες μελέτες θα μπορούσαν να πραγματοποιούνται σε οποιοδήποτε φύλο (26). Δεδομένα που καταδεικνύουν σημαντικές διαφορές μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ζώων (π.χ. διαφορές συστημικής τοξικότητας, μεταβολισμού, βιοδιαθεσιμότητας, τοξικότητας για τον μυελό των οστών, κ.λπ., συμπεριλαμβανομένων, π.χ., δεδομένων από μελέτη προσδιορισμού εύρους τιμών) ενθαρρύνουν τη χρησιμοποίηση ζώων και των δύο φύλων. Στην περίπτωση αυτή, ίσως είναι σκόπιμο να διεξάγεται μελέτη και στα δύο φύλα, π.χ. στο πλαίσιο μελετών τοξικότητας με επαναλαμβανόμενες δόσεις. Σε περίπτωση χρήσης και των δύο φύλων, θα ήταν ενδεχομένως σκόπιμη η εφαρμογή παραγοντικού σχεδιασμού. Λεπτομέρειες σχετικά με τον τρόπο ανάλυσης των δεδομένων με τη χρήση αυτού του σχεδιασμού παρέχονται στο προσάρτημα 2.

Το μέγεθος των ομάδων κατά την έναρξη της μελέτης θα πρέπει να καθορίζεται με γνώμονα την εξασφάλιση, ανά ομάδα, 5 τουλάχιστον αναλύσιμων ζώων του ίδιου φύλου ή, εάν χρησιμοποιούνται ζώα και των δύο φύλων, από κάθε φύλο. Όταν η έκθεση του ανθρώπου σε μια χημική ουσία αφορά μόνο το ένα φύλο, όπως π.χ. στην περίπτωση ορισμένων φαρμακευτικών προϊόντων, η δοκιμή θα πρέπει να διεξάγεται σε ζώα του αντίστοιχου φύλου. Ενδεικτικά, όσον αφορά τις μέγιστες τυπικές απαιτήσεις για τα ζώα, για τη διεξαγωγή μελέτης σε μυελό των οστών σύμφωνα με τις παραμέτρους που καθορίζονται στην παράγραφο 37 με τρεις ομάδες δόσης και παράλληλους αρνητικούς και θετικούς μάρτυρες (κάθε ομάδα αποτελούμενη από πέντε ζώα του ίδιου φύλου) θα απαιτούνταν 25 έως 35 ζώα.

Επίπεδα δόσεων

Εάν χρειάζεται προκαταρκτική μελέτη προσδιορισμού εύρους τιμών επειδή δεν υπάρχουν ήδη κατάλληλα δεδομένα για να υποβοηθήσουν την επιλογή δόσεων, η εν λόγω μελέτη θα πρέπει να διεξάγεται στο ίδιο εργαστήριο, με τη χρήση του ίδιου είδους, φυλής, φύλου ζώων και σχήματος μεταχείρισης όπως στην κύρια μελέτη (27). Η μελέτη θα πρέπει να αποσκοπεί στον προσδιορισμό της μέγιστης ανεκτής δόσης (ΜΑΔ), η οποία ορίζεται ως η ανώτατη δόση που μπορεί να γίνει ανεκτή χωρίς εκδήλωση τοξικότητας η οποία θα περιόριζε τη μελέτη, σε σχέση με τη διάρκεια της μελέτης [π.χ. που προκαλεί μείωση του σωματικού βάρους ή κυτταροτοξικότητα στο αιμοποιητικό σύστημα, αλλά όχι θάνατο ή εκδήλωση πόνου, ταλαιπωρίας ή δυσφορίας που καθιστούν αναγκαία τη θανάτωση με ευθανασία (28)].

Ως ανώτατη δόση μπορεί επίσης να οριστεί η δόση που προκαλεί τοξικότητα στον μυελό των οστών (π.χ. μείωση του ποσοστού άωρων ερυθροκυττάρων επί του συνόλου των ερυθροκυττάρων στον μυελό των οστών ή στο περιφερικό αίμα κατά περισσότερο από 50 %, όχι όμως σε επίπεδα κάτω του 20 % της τιμής του μάρτυρα). Ωστόσο, κατά την ανάλυση των θετικών στον δείκτη CD71 κυττάρων στην περιφερειακή κυκλοφορία του αίματος (δηλ. με κυτταρομετρία ροής), αυτό το πολύ νεαρό κλάσμα άωρων ερυθροκυττάρων αποκρίνεται σε τοξικές προκλήσεις ταχύτερα από ό,τι η μεγαλύτερη κοόρτη άωρων ερυθροκυττάρων που είναι θετική για το RNA. Συνεπώς, ενδέχεται να εκδηλωθεί υψηλότερη φαινομενική τοξικότητα με πειραματικούς σχεδιασμούς οξείας έκθεσης, στους οποίους εξετάζεται το θετικό στον δείκτη CD71 κλάσμα άωρων ερυθροκυττάρων, σε σύγκριση με εκείνους στους οποίους τα άωρα ερυθροκύτταρα ταυτοποιούνται με βάση το RNA που περιέχουν. Για τον λόγο αυτό, όταν στα πειράματα προβλέπονται πέντε ή λιγότερες ημέρες μεταχείρισης, το ανώτατο επίπεδο δόσης για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες που προκαλούν τοξικότητα μπορεί να οριστεί ως η δόση που προκαλεί στατιστικά σημαντική μείωση του ποσοστού των θετικών στον δείκτη CD71 άωρων ερυθροκυττάρων επί του συνόλου των ερυθροκυττάρων, η οποία πάντως δεν φθάνει σε επίπεδα κάτω του 5 % της τιμής του μάρτυρα (29).

▼M7

Οι χημικές ουσίες που παρουσιάζουν κορεσμό τοξικοκινητικών ιδιοτήτων ή επάγουν διεργασίες αποτοξίνωσης που μπορεί να επιφέρουν μείωση της έκθεσης μετά από μακροχρόνια χορήγηση ίσως αποτελούν εξαιρέσεις από τα κριτήρια καθορισμού των δόσεων και θα πρέπει να αξιολογούνται κατά περίπτωση.

Για να ληφθούν πληροφορίες σχετικά με τη σχέση δόσης-απόκρισης, μια ολοκληρωμένη μελέτη θα πρέπει να περιλαμβάνει ομάδα αρνητικού μάρτυρα και τουλάχιστον τρία επίπεδα δόσεων, τα οποία κατά κανόνα διαφέρουν κατά έναν συντελεστή ίσο με το 2, αλλά πάντως όχι μεγαλύτερο του 4. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν προκαλεί τοξικότητα σε μελέτη προσδιορισμού εύρους τιμών ή με βάση τα υπάρχοντα δεδομένα, η ανώτατη δόση για περίοδο χορήγησης 14 ημερών και άνω θα πρέπει να είναι 1 000 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα ή, για περιόδους χορήγησης που δεν υπερβαίνουν τις 14 ημέρες, 2 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα. Ωστόσο, εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία προκαλεί τοξικότητα, η ΜΑΔ θα πρέπει να είναι η ανώτατη χορηγούμενη δόση και τα χρησιμοποιούμενα επίπεδα δόσεων θα πρέπει, κατά προτίμηση, να καλύπτουν το εύρος από τη μέγιστη δόση μέχρι τη δόση που προκαλεί ελάχιστη ή μηδενική τοξικότητα. Όταν παρατηρείται τοξικότητα στον στοχευόμενο ιστό (μυελό των οστών) σε όλα τα ελεγχόμενα επίπεδα δόσεων, συνιστάται η διεξαγωγή περαιτέρω μελέτης με μη τοξικές δόσεις. Οι μελέτες που αποσκοπούν στον πληρέστερο χαρακτηρισμό των ποσοτικών στοιχείων σχετικά με τη σχέση δόσης-απόκρισης ενδέχεται να απαιτούν πρόσθετες ομάδες δόσης. Για ορισμένα είδη υπό δοκιμή χημικών ουσιών (π.χ. φαρμακευτικά προϊόντα για τον άνθρωπο) που καλύπτονται από ειδικές απαιτήσεις, αυτά τα όρια μπορεί να διαφέρουν.

Οριακή δοκιμή

Εάν τα πειράματα προσδιορισμού εύρους δόσεων ή υφιστάμενα δεδομένα για συγγενείς φυλές ζώων δείχνουν ότι ένα σχήμα μεταχείρισης με τουλάχιστον την οριακή δόση (που περιγράφεται κατωτέρω) δεν επιφέρει παρατηρήσιμες τοξικές επιδράσεις (που περιλαμβάνουν την απουσία μείωσης του πολλαπλασιασμού του μυελού των οστών ή άλλης ένδειξης κυτταροτοξικότητας στον στοχευόμενο ιστό) και δεν αναμένεται γονιδιοτοξικότητα με βάση μελέτες γονιδιοτοξικότητας in vitro ή δεδομένα για χημικές ουσίες παρόμοιας δομής, μπορεί να κριθεί περιττή η διεξαγωγή πλήρους μελέτης με τρία επίπεδα δόσεων, υπό τον όρο ότι έχει αποδειχθεί ότι οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες φθάνουν στον στοχευόμενο ιστό (μυελός των οστών). Σε αυτές τις περιπτώσεις, ενδέχεται να αρκεί ένα μόνο επίπεδο δόσης, ίσο με την οριακή δόση. Για περιόδους χορήγησης 14 ημερών και άνω, η οριακή δόση είναι 1 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα. Για περιόδους χορήγησης που δεν υπερβαίνουν τις 14 ημέρες, η οριακή δόση είναι 2 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα.

Χορήγηση των δόσεων

Κατά τον σχεδιασμό της δοκιμής θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η προβλεπόμενη οδός έκθεσης του ανθρώπου. Επιτρέπεται επομένως η αιτιολογημένη επιλογή οδών έκθεσης όπως μέσω της τροφής ή του πόσιμου νερού, με τοπική εφαρμογή, υποδόρια ή ενδοφλέβια ένεση, από το στόμα (με στοματικό καθετήρα), μέσω της εισπνοής, η ενδοτραχειακή οδός ή η εμφύτευση. Σε κάθε περίπτωση, η οδός έκθεσης θα πρέπει να επιλέγεται κατά τρόπο ώστε να εξασφαλίζεται επαρκής έκθεση του ή των στοχευόμενων ιστών). Η ενδοπεριτοναϊκή ένεση δεν συνιστάται κατά κανόνα, διότι δεν αποτελεί σκοπούμενη οδό έκθεσης του ανθρώπου, και θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο με ειδική επιστημονική αιτιολόγηση. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία αναμειγνύεται με την τροφή ή το πόσιμο νερό, ιδίως στην περίπτωση των εφάπαξ δόσεων, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε το διάστημα μεταξύ της κατανάλωσης νερού και τροφής και της δειγματοληψίας να επαρκεί για την ανίχνευση των επιδράσεων (βλ. παράγραφο 37). Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί με στομαχικό καθετήρα ή ένεση κάθε φορά εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Ο όγκος δεν θα πρέπει κανονικά να υπερβαίνει το 1 ml/100 g σωματικού βάρους, εκτός από την περίπτωση των υδατικών διαλυμάτων, όπου επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται κατά μέγιστο όριο 2 ml/100 g σωματικού βάρους. Η χρήση μεγαλύτερων όγκων θα πρέπει να αιτιολογείται. Η μεταβλητότητα των όγκων δοκιμής θα πρέπει να ελαχιστοποιείται με ρύθμιση της συγκέντρωσης, ώστε να εξασφαλίζεται η χορήγηση σταθερού όγκου σε σχέση με το σωματικό βάρος σε όλα τα επίπεδα δόσεων, εκτός από την περίπτωση των ερεθιστικών ή διαβρωτικών χημικών ουσιών, των οποίων οι επιδράσεις κατά κανόνα επιδεινώνονται όταν αυξάνονται οι συγκεντρώσεις.

▼M7

Πρόγραμμα μεταχείρισης

Κατά προτίμηση, εκτελούνται 2 ή περισσότερες μεταχειρίσεις, με μεσοδιαστήματα 24 ωρών, ιδίως στις περιπτώσεις ενσωμάτωσης της παρούσας δοκιμής σε άλλες μελέτες τοξικότητας. Εναλλακτικά, μπορούν να πραγματοποιούνται εφάπαξ μεταχειρίσεις, εάν αυτό αιτιολογείται επιστημονικά (π.χ. υπό δοκιμή χημικές ουσίες που είναι γνωστό ότι παρεμποδίζουν τον κυτταρικό κύκλο). Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορούν επίσης να χορηγούνται σε διαιρεμένες δόσεις, δηλ. δύο ή περισσότερες δόσεις την ίδια ημέρα, με διαφορά μικρότερη από 2-3 ώρες, για να διευκολύνεται η χορήγηση μεγάλων όγκων. Υπό τις περιστάσεις αυτές ή κατά τη χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μέσω της εισπνοής, ο χρόνος δειγματοληψίας θα πρέπει να προγραμματίζεται με βάση τον χρόνο της τελευταίας χορήγησης ή το τέλος της έκθεσης.

Η δοκιμή μπορεί να διεξαχθεί σε ποντικούς ή επίμυες με τρεις τρόπους:

α. Τα ζώα υποβάλλονται σε εφάπαξ μεταχείριση με την υπό δοκιμή χημική ουσία. Λαμβάνονται δείγματα μυελού των οστών τουλάχιστον δύο φορές (από ανεξάρτητες ομάδες ζώων), το νωρίτερο 24 ώρες και το αργότερο 48 ώρες μετά τη μεταχείριση, με κατάλληλα διαστήματα μεταξύ των δειγματοληψιών, εκτός εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι γνωστό ότι έχει εξαιρετικά μακρό χρόνο υποδιπλασιασμού. Η λήψη δειγμάτων πριν από την παρέλευση 24 ωρών από τη μεταχείριση θα πρέπει να αιτιολογείται. Λαμβάνονται δείγματα περιφερικού αίματος τουλάχιστον δύο φορές (από την ίδια ομάδα ζώων), το νωρίτερο 36 ώρες και το αργότερο 72 ώρες μετά τη μεταχείριση, σε κατάλληλα διαστήματα μετά την πρώτη δειγματοληψία. Κατά τον χρόνο της πρώτης δειγματοληψίας, θα πρέπει να έχει χορηγηθεί δόση και να συλλεχθούν δείγματα για ανάλυση από όλες τις ομάδες δόσης· ωστόσο, κατά τους μεταγενέστερους χρόνους δειγματοληψίας, αρκεί να χορηγηθεί μόνο η ανώτατη δόση. Όταν ανιχνεύεται θετική απόκριση σε κάποιον από τους χρόνους δειγματοληψίας, δεν απαιτείται η λήψη άλλου δείγματος, εκτός εάν χρειάζονται ποσοτικά στοιχεία σχετικά με τη σχέση δόσης-απόκρισης. Οι περιγραφόμενοι χρόνοι συλλογής είναι συνέπεια της κινητικής της εμφάνισης και εξαφάνισης των μικροπυρήνων σε αυτά τα δύο ιστικά διαμερίσματα.

β. Εάν εφαρμόζονται δύο ημερήσιες μεταχειρίσεις (π.χ. δύο μεταχειρίσεις με μεσοδιαστήματα 24 ωρών), θα πρέπει να συλλέγονται δείγματα μία φορά, μετά την παρέλευση 18 έως 24 ωρών από την τελευταία μεταχείριση για τον μυελό των οστών ή 36 έως 48 ωρών από την τελική μεταχείριση για το περιφερικό αίμα (30). Οι περιγραφόμενοι χρόνοι συλλογής είναι συνέπεια της κινητικής της εμφάνισης και εξαφάνισης των μικροπυρήνων σε αυτά τα δύο ιστικά διαμερίσματα.

γ. Εάν εφαρμόζονται τρεις ή περισσότερες ημερήσιες μεταχειρίσεις (π.χ. τρεις ή περισσότερες μεταχειρίσεις με μεσοδιαστήματα περίπου 24 ωρών), τα δείγματα μυελού των οστών θα πρέπει να συλλέγονται το αργότερο 24 ώρες μετά την τελευταία μεταχείριση και τα δείγματα περιφερικού αίματος το αργότερο 40 ώρες μετά την τελευταία μεταχείριση (31). Αυτή η επιλογή μεταχείρισης εξυπηρετεί τον συνδυασμό της ανάλυσης Comet (π.χ. δειγματοληψία 2-6 ώρες μετά την τελευταία μεταχείριση) με τη δοκιμή μικροπυρήνων, καθώς και την ενσωμάτωση της δοκιμής μικροπυρήνων σε μελέτες τοξικότητας με επαναλαμβανόμενες δόσεις. Από τα δεδομένα που έχουν συσσωρευθεί συνάγεται ότι μπορεί να παρατηρηθεί επαγωγή μικροπυρήνων σε αυτές τις ευρύτερες χρονικές κλίμακες, μετά από 3 ή περισσότερες χορηγήσεις (15).

Επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται άλλα σχήματα δοσολογίας ή δειγματοληψίας, εφόσον έχουν σημασία και αιτιολογούνται επιστημονικά, καθώς και για να διευκολυνθεί η ενσωμάτωση σε άλλες τοξικολογικές δοκιμές.

Παρατηρήσεις

Τα πειραματόζωα θα πρέπει να υποβάλλονται σε γενική κλινική εξέταση και τα κλινικά σημεία να καταγράφονται τουλάχιστον μία φορά ημερησίως, κατά προτίμηση την ίδια ώρα και λαμβανομένου υπόψη του χρόνου κορύφωσης των αναμενόμενων επιδράσεων μετά τη χορήγηση της δόσης. Όλα τα ζώα θα πρέπει να εξετάζονται τουλάχιστον δύο φορές ημερησίως κατά την περίοδο της χορήγησης για τη διαπίστωση τυχόν νοσηρότητας και θνησιμότητας. Όλα τα ζώα θα πρέπει να ζυγίζονται κατά την έναρξη της μελέτης, τουλάχιστον μία φορά εβδομαδιαίως κατά τη διεξαγωγή μελετών επαναλαμβανόμενων δόσεων και κατά την ευθανασία. Σε μελέτες διάρκειας τουλάχιστον μίας εβδομάδας, η κατανάλωση

▼M7

τροφής θα πρέπει να μετράται τουλάχιστον εβδομαδιαίως. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται με το πόσιμο νερό, η κατανάλωση νερού θα πρέπει να μετράται σε κάθε αλλαγή νερού και τουλάχιστον εβδομαδιαίως. Τα ζώα που εμφανίζουν μη θανατηφόρους δείκτες υπερβολικής τοξικότητας θα πρέπει να υποβάλλονται σε ευθανασία πριν από τη λήξη της περιόδου δοκιμής (28). Υπό ορισμένες περιστάσεις, θα μπορούσε να παρακολουθείται η θερμοκρασία σώματος των ζώων, δεδομένου ότι η οφειλόμενη στη μεταχείριση υπερθερμία και υποθερμία έχει ενοχοποιηθεί για λανθασμένα αποτελέσματα (32) (33) (34).

Έκθεση του στοχευόμενου ιστού

Θα πρέπει να λαμβάνεται δείγμα αίματος σε κατάλληλους χρόνους για να είναι δυνατή η διερεύνηση των επιπέδων των υπό δοκιμή χημικών ουσιών στο πλάσμα, ώστε να αποδεικνύεται η έκθεση του μυελού των οστών, όταν αυτό δικαιολογείται και δεν υπάρχουν άλλα δεδομένα έκθεσης (βλ. παράγραφο 48).

Παρασκεύασμα μυελού των οστών/αίματος

Τα κύτταρα μυελού των οστών λαμβάνονται συνήθως από τα μηριαία ή τα κνημιαία οστά των ζώων αμέσως μετά τη θανάτωσή τους με ευθανασία. Τα κύτταρα συνήθως αφαιρούνται και ακολουθεί επίστρωση και χρώση παρασκευασμάτων με τη χρήση καθιερωμένων μεθόδων. Μπορούν να ληφθούν μικρές ποσότητες περιφερικού αίματος, σύμφωνα με τα κατάλληλα πρότυπα καλής μεταχείρισης των ζώων, είτε με τη χρήση μεθόδου που επιτρέπει την επιβίωση του πειραματόζωου, όπως η αιμοληψία από την ουραία φλέβα ή άλλο κατάλληλο αιμοφόρο αγγείο, είτε με καρδιακή παρακέντηση ή δειγματοληψία από μεγάλο αγγείο κατά την ευθανασία του ζώου. Τόσο για τα ερυθροκύτταρα μυελού των οστών όσο και για εκείνα που προέρχονται από περιφερικό αίμα, ανάλογα με την αναλυτική μέθοδο, είναι δυνατή η άμεση υπερζωτική χρώση (16) (17) (18), η παρασκευή επιχρισμάτων ακολουθούμενη από χρώση για μικροσκοπική εξέταση, ή η μονιμοποίηση και κατάλληλη χρώση για ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. Με τη χρήση ειδικής για το DNA χρώσης [π.χ. πορτοκαλί της ακριδίνης (35) ή Hoechst 33258 και πυρονίνη-Y (36)] είναι δυνατόν να εξαλειφθούν ορισμένα από τα τεχνητά αποτελέσματα που οφείλονται στη χρήση μη ειδικών για το DNA χρώσεων. Το πλεονέκτημα αυτό δεν αποκλείει τη χρήση συμβατικών χρώσεων (π.χ. Giemsa για μικροσκοπική ανάλυση). Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν πρόσθετα συστήματα [π.χ. στήλες κυτταρίνης για την απομάκρυνση εμπύρηνων κυττάρων (37) (38)], υπό την προϋπόθεση ότι τα συστήματα αυτά έχουν αποδειχθεί συμβατά με την προετοιμασία των δειγμάτων στο εργαστήριο.

Όταν εφαρμόζονται αυτές οι μέθοδοι, μπορούν να χρησιμοποιούνται αντισώματα κατά του κινητοχώρου (39), φθορίζουσα υβριδοποίηση in situ (Fluorescent In Situ Hybridization/FISH) με παγκεντρομεριδιακούς ανιχνευτές DNA (40) ή σήμανση in situ με ειδικούς για τα παγκεντρομερίδια εκκινητές, σε συνδυασμό με κατάλληλη αντίχρωση του DNA (41), με σκοπό την εξακρίβωση του είδους των μικροπυρήνων (χρωμόσωμα/χρωμοσωμικό θραύσμα), ώστε να διαπιστώνεται αν ο μηχανισμός επαγωγής μικροπυρήνων συνδέεται με κλαστογόνο και/ή ανευπλοειδογόνο δράση. Επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται και άλλες μέθοδοι διάκρισης μεταξύ κλαστογόνων και ανευπλοειδογόνων ουσιών, εάν έχει αποδειχθεί η αποτελεσματικότητά τους.

Ανάλυση (μη αυτόματη και αυτόματη)

Όλες οι αντικειμενοφόρες πλάκες ή τα δείγματα για ανάλυση, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που αντιστοιχούν στους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες, θα πρέπει να λαμβάνουν ανεξάρτητο κωδικό προτού γίνει οποιουδήποτε είδους ανάλυση και να τυχαιοποιούνται, έτσι ώστε ο μη αυτόματος εξεταστής να μη γνωρίζει τη συνθήκη μεταχείρισης· τέτοια κωδικοποίηση δεν είναι απαραίτητη όταν χρησιμοποιούνται αυτόματα συστήματα καταμέτρησης που δεν βασίζονται σε οπτική εξέταση και δεν μπορούν να επηρεαστούν από μεροληψία του χειριστή. Προσδιορίζεται για κάθε ζώο το ποσοστό άωρων ερυθροκυττάρων επί του συνόλου των ερυθροκυττάρων (άωρα + ώριμα), με καταμέτρηση τουλάχιστον 500 ερυθροκυττάρων, προκειμένου για μυελό των οστών, και 2 000 ερυθροκυττάρων στην περίπτωση του περιφερικού αίματος (42). Για τον προσδιορισμό της επίπτωσης (incidence) των άωρων ερυθροκυττάρων με μικροπυρήνες θα πρέπει να καταμετρώνται τουλάχιστον 4 000 άωρα ερυθροκύτταρα ανά ζώο (43). Εάν η βάση ιστορικών δεδομένων για αρνητικούς μάρτυρες δείχνει ότι η μέση συχνότητα υποβάθρου των άωρων ερυθροκυττάρων με μικροπυρήνες είναι < 0,1 % στο εργαστήριο δοκιμών, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο καταμέτρησης επιπλέον κυττάρων. Κατά την ανάλυση των δειγμάτων, το ποσοστό άωρων

▼M7

ερυθροκυττάρων επί του συνόλου των ερυθροκυττάρων στα ζώα που έχουν υποβληθεί σε μεταχείριση θα πρέπει να μην είναι μικρότερο από το 20 % της τιμής του μάρτυρα με φορέα/διαλύτη κατά την καταμέτρηση με μικροσκόπιο και όχι μικρότερο από το 5 % περίπου της τιμής του μάρτυρα με φορέα/διαλύτη κατά την καταμέτρηση θετικών στον δείκτη CD71 άωρων ερυθροκυττάρων με κυτταρομετρικές μεθόδους (βλ. παράγραφο 31) (29). Για παράδειγμα, στην περίπτωση της δοκιμής σε μυελό των οστών με καταμέτρηση με μικροσκοπία, αν η αναλογία άωρων ερυθροκυττάρων στον μυελό των οστών του μάρτυρα είναι 50 %, το ανώτατο όριο τοξικότητας θα είναι 10 % άωρων ερυθροκυττάρων.

Επειδή ο σπλήνας του επίμυος απομονώνει και καταστρέφει τα ερυθροκύτταρα με μικροπυρήνες, για τη διατήρηση υψηλής ευαισθησίας του προσδιορισμού κατά την ανάλυση περιφερικού αίματος επίμυος, είναι προτιμότερο να περιορίζεται στο νεαρότερο κλάσμα η ανάλυση των άωρων ερυθροκυττάρων με μικροπυρήνες. Κατά τη χρήση μεθόδων αυτόματης ανάλυσης, αυτά τα πλέον άωρα ερυθροκύτταρα μπορούν να ταυτοποιούνται με βάση την υψηλή τους περιεκτικότητα σε RNA ή το υψηλό επίπεδο υποδοχέων τρανσφερρίνης (θετικά στον δείκτη CD71) που εκφράζονται στην επιφάνειά τους (31). Ωστόσο, από την άμεση σύγκριση των διαφορετικών μεθόδων χρώσης προέκυψε ότι μπορούν να επιτευχθούν ικανοποιητικά αποτελέσματα με διάφορες μεθόδους, συμπεριλαμβανομένης της συμβατικής χρώσης με πορτοκαλί της ακριδίνης (3) (4).

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Τα δεδομένα για κάθε ζώο θα πρέπει να παρουσιάζονται σε μορφή πίνακα. Για κάθε εξεταζόμενο ζώο θα πρέπει να καταγράφεται χωριστά ο αριθμός καταμετρηθέντων άωρων ερυθροκυττάρων, ο αριθμός άωρων ερυθροκυττάρων με μικροπυρήνες και η αναλογία των άωρων στο σύνολο των ερυθροκυττάρων. Όταν ποντικοί υποβάλλονται σε μεταχείριση συνεχώς επί 4 εβδομάδες ή περισσότερο, θα πρέπει να παρέχονται και τα δεδομένα που αφορούν τον αριθμό και το ποσοστό των ώριμων ερυθροκυττάρων με μικροπυρήνες, εάν συλλέγονται. Θα πρέπει επίσης να αναφέρονται δεδομένα σχετικά με την τοξικότητα στα ζώα και με τα κλινικά σημεία.

Κριτήρια αποδοχής

Τα ακόλουθα κριτήρια καθορίζουν την αποδοχή της δοκιμής:

α. Θεωρείται αποδεκτή η προσθήκη των δεδομένων για παράλληλους αρνητικούς μάρτυρες στη βάση ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για μάρτυρες (βλ. παραγράφους 15-18).

β. Οι παράλληλοι θετικοί μάρτυρες ή μάρτυρες καταμέτρησης θα πρέπει να επάγουν αποκρίσεις συμβατές με εκείνες που υπάρχουν στη βάση ιστορικών δεδομένων για θετικούς μάρτυρες και να επιφέρουν στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα (βλ. παραγράφους 24-25).

γ. Αναλύεται ο κατάλληλος αριθμός δόσεων και κυττάρων.

δ. Τα κριτήρια επιλογής της ανώτατης δόσης είναι σύμφωνα με αυτά που περιγράφονται στις παραγράφους 30-33.

Αξιολόγηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται σαφώς θετική εάν:

α. τουλάχιστον μία από τις ομάδες αγωγής παρουσιάζει στατιστικά σημαντική αύξηση της συχνότητας των μικροπύρηνων άωρων ερυθροκυττάρων σε σχέση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα,

β. Η αύξηση αυτή σχετίζεται με τη δόση σε έναν τουλάχιστον χρόνο δειγματοληψίας, όταν αξιολογείται με κατάλληλη δοκιμασία τάσης, και

γ. κάποιο από τα αποτελέσματα βρίσκεται εκτός της κατανομής των δεδομένων για ιστορικούς αρνητικούς μάρτυρες (π.χ. όρια ελέγχου σε επίπεδο 95 % με βάση την κατανομή Poisson).

▼M7

Εάν εξετάζεται μόνο η ανώτατη δόση σε συγκεκριμένο χρόνο δειγματοληψίας, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται σαφώς θετική εάν προκύπτει στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα και τα αποτελέσματα βρίσκονται εκτός της κατανομής των ιστορικών δεδομένων για αρνητικούς μάρτυρες (π.χ. όρια ελέγχου σε επίπεδο 95 % με βάση την κατανομή Poisson). Συστάσεις για τις πλέον κατάλληλες στατιστικές μεθόδους έχουν διατυπωθεί στη βιβλιογραφία (44) (45) (46) (47). Όταν διενεργείται ανάλυση της σχέσης δόσης-απόκρισης, θα πρέπει να αναλύονται τουλάχιστον τρεις ομάδες που έλαβαν δόσεις. Στις στατιστικές δοκιμασίες θα πρέπει να χρησιμοποιείται το ζώο ως πειραματική μονάδα. Τα θετικά αποτελέσματα στη δοκιμή μικροπυρήνων δείχνουν ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία επάγει τον σχηματισμό μικροπυρήνων, που είναι αποτέλεσμα χρωμοσωμικής βλάβης ή βλάβης στη μιτωτική άτρακτο των ερυθροβλαστών του εξεταζόμενου ζωικού είδους. Σε περίπτωση διεξαγωγής δοκιμής για την ανίχνευση κεντρομεριδίων στο εσωτερικό μικροπυρήνων, η επαγωγή του σχηματισμού μικροπυρήνων που περιέχουν κεντρομερίδια (κεντρομεριδιακό DNA ή κινητοχώρο, ενδεικτικό απώλειας πλήρους χρωμοσώματος) από την υπό δοκιμή ουσία αποδεικνύει ότι αυτή είναι ανευπλοειδογόνο.

Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται σαφώς αρνητική εάν, σε όλες τις πειραματικές συνθήκες που εξετάστηκαν:

α. καμία από τις ομάδες μεταχείρισης δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική αύξηση της συχνότητας των άωρων ερυθροκυττάρων με μικροπυρήνες σε σύγκριση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα,

β. δεν υπάρχει σχετιζόμενη με τη δόση αύξηση σε κανέναν χρόνο δειγματοληψίας, όταν αξιολογείται με κατάλληλο έλεγχο τάσης,

γ. όλα τα αποτελέσματα βρίσκονται εντός της κατανομής των ιστορικών δεδομένων για αρνητικούς μάρτυρες (π.χ. όρια ελέγχου σε επίπεδο 95 % με βάση την κατανομή Poisson) και

δ. υπήρξε έκθεση του μυελού των οστών στις υπό δοκιμή χημικές ουσίες.

Συστάσεις για τις πλέον κατάλληλες στατιστικές μεθόδους έχουν διατυπωθεί στη βιβλιογραφία (44) (45) (46) (47). Τα αποδεικτικά στοιχεία έκθεσης του μυελού των οστών σε υπό δοκιμή χημική ουσία μπορεί να περιλαμβάνουν τη μείωση του λόγου των άωρων προς τα ώριμα ερυθροκύτταρα και τη μέτρηση των επιπέδων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο πλάσμα ή στο αίμα. Σε περίπτωση ενδοφλέβιας χορήγησης, δεν απαιτούνται αποδεικτικά στοιχεία έκθεσης. Εναλλακτικά, για να αποδειχθεί η έκθεση του μυελού των οστών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν δεδομένα ADME (απορρόφηση-κατανομή-μεταβολισμός-απέκκριση) που προκύπτουν από ανεξάρτητη μελέτη με τη χρησιμοποίηση της ίδιας οδού χορήγησης και του ίδιου ζωικού είδους. Τα αρνητικά αποτελέσματα δείχνουν ότι, υπό τις συνθήκες της δοκιμής, η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν επιφέρει τον σχηματισμό μικροπυρήνων στα άωρα ερυθροκύτταρα του εξεταζόμενου ζωικού είδους.

Δεν απαιτείται επαλήθευση των σαφώς θετικών ή σαφώς αρνητικών αποκρίσεων.

Σε περίπτωση που η απόκριση δεν είναι σαφώς θετική ούτε σαφώς αρνητική και για να διαπιστωθεί η βιολογική σημασία ενός αποτελέσματος (π.χ. ασθενής ή οριακή αύξηση), τα δεδομένα θα πρέπει να αξιολογούνται κατά την κρίση των ειδικών και/ή με περαιτέρω διερεύνηση των υφιστάμενων ολοκληρωμένων πειραμάτων. Σε ορισμένες περιπτώσεις, θα είναι ενδεχομένως χρήσιμη η ανάλυση περισσότερων κυττάρων ή η επανάληψη του πειράματος με τη χρήση τροποποιημένων πειραματικών συνθηκών.

Σε σπάνιες περιπτώσεις, ακόμη και μετά από περαιτέρω διερεύνηση, τα δεδομένα δεν επιτρέπουν την εξαγωγή συμπεράσματος για θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα με την υπό δοκιμή χημική ουσία και, κατά συνέπεια, η μελέτη κρίνεται διφορούμενη.

Έκθεση δοκιμής

Στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται τα ακόλουθα στοιχεία:

Συνοπτική παρουσίαση

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

— πηγή, αριθμός παρτίδας, καταληκτική ημερομηνία χρήσης, εφόσον υπάρχει·

▼M7

— σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εάν είναι γνωστή.

Μονοσυστατική ουσία:

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες·

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγματα:

— περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Παρασκεύασμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας:

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα·

— διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον διαλύτη/φορέα, εάν είναι γνωστές·

— σκευάσματα για χορήγηση μέσω της τροφής, του πόσιμου νερού ή της εισπνοής·

— αναλυτικοί προσδιορισμοί στα σκευάσματα (π.χ. σταθερότητα, ομοιογένεια, ονομαστικές συγκεντρώσεις), όταν έχουν διενεργηθεί.

Ζώα δοκιμής:

— είδος/φυλή που χρησιμοποιήθηκε και αιτιολόγηση της χρήσης του/της·

— αριθμός, ηλικία και φύλο των ζώων·

— προέλευση των ζώων, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσιο κ.λπ.·

— μέθοδος ατομικής ταυτοποίησης των ζώων·

— για βραχυχρόνιες μελέτες: βάρος κάθε ζώου κατά την έναρξη και τη λήξη της δοκιμής· για μελέτες διάρκειας μεγαλύτερης της μίας εβδομάδας: βάρος κάθε ζώου κατά τη διάρκεια της μελέτης και κατανάλωση τροφής. Θα πρέπει να περιλαμβάνονται το εύρος τιμών, η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση του σωματικού βάρους για κάθε ομάδα.

Συνθήκες δοκιμής:

— δεδομένα για τους θετικούς μάρτυρες και τους αρνητικούς μάρτυρες με φορέα/διαλύτη·

— δεδομένα από τη μελέτη προσδιορισμού εύρους τιμών, εάν πραγματοποιήθηκε·

— αιτιολόγηση της επιλογής των επιπέδων δόσης·

— λεπτομέρειες για το παρασκεύασμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας·

— λεπτομέρειες σχετικά με τη χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας·

— αιτιολόγηση της επιλογής της οδού και της διάρκειας χορήγησης·

— μέθοδοι επαλήθευσης του ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία έφθασε στη γενική κυκλοφορία ή στον στοχευόμενο ιστό·

▼M7

— πραγματική δόση (mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα), υπολογιζόμενη από τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο σιτηρέσιο/πόσιμο νερό (ppm) και την κατανάλωση, εφόσον έχει υπολογιστεί·

— λεπτομέρειες σχετικά με την ποιότητα της τροφής και του νερού·

— μέθοδος ευθανασίας·

— μέθοδος αναλγησίας (εάν χρησιμοποιείται)·

— λεπτομερής περιγραφή των προγραμμάτων μεταχείρισης και δειγματοληψίας και αιτιολόγηση των επιλογών·

— μέθοδοι ετοιμασίας αντικειμενοφόρων πλακών·

— διαδικασίες απομόνωσης και διατήρησης των δειγμάτων·

— μέθοδοι μέτρησης της τοξικότητας·

— κριτήρια καταμέτρησης των μικροπύρηνων άωρων ερυθροκυττάρων·

— αριθμός εξετασθέντων κυττάρων ανά ζώο για τον προσδιορισμό της συχνότητας των άωρων ερυθροκυττάρων με μικροπυρήνες και της αναλογίας άωρων προς ώριμα ερυθροκύτταρα·

— κριτήρια αποδοχής της μελέτης·

— μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν, π.χ. χρήση αντισωμάτων κατά του κινητοχώρου ή ειδικών για τα κεντρομερίδια ανιχνευτών DNA, για να διαπιστωθεί αν οι μικροπυρήνες περιείχαν πλήρη χρωμοσώματα ή χρωμοσωμικά θραύσματα, κατά περίπτωση.

Αποτελέσματα:

— κατάσταση των ζώων πριν από την περίοδο δοκιμής και καθ' όλη τη διάρκειά της, συμπεριλαμβανομένων των σημείων τοξικότητας·

— ποσοστό άωρων ερυθροκυττάρων επί του συνόλου των ερυθροκυττάρων·

— αριθμός άωρων ερυθροκυττάρων με μικροπυρήνες, χωριστά για κάθε ζώο·

— μέση τιμή ± τυπική απόκλιση των άωρων ερυθροκυττάρων με μικροπυρήνες ανά ομάδα·

— σχέση δόσης-απόκρισης, κατά το δυνατόν·

— στατιστικές αναλύσεις και εφαρμοσθείσες μέθοδοι·

— δεδομένα για τους παράλληλους αρνητικούς και θετικούς μάρτυρες, με πεδία τιμών, μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις·

— ιστορικά δεδομένα για αρνητικούς και θετικούς μάρτυρες, με πεδία τιμών, μέσες τιμές, τυπικές αποκλίσεις και όρια ελέγχου σε επίπεδο 95 % για την κατανομή, καθώς και την καλυπτόμενη περίοδο και το πλήθος των δεδομένων·

— δεδομένα που τεκμηριώνουν την έκθεση του μυελού των οστών·

— δεδομένα χαρακτηρισμού που δείχνουν αν οι μικροπυρήνες περιείχαν πλήρη χρωμοσώματα ή χρωμοσωμικά θραύσματα, κατά περίπτωση·

— κριτήρια θετικής ή αρνητικής απόκρισης που πληρούνται.

▼**M7**

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Συμπέρασμα.

Παραπομπές.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(2) Hayashi, M. *et al.* (2007), *in vivo* erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 627/1, pp. 10-30.

(3) MacGregor, J.T. et al. (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat, Toxicology Sciences, Vol. 94/1, pp. 92-107.

(4) Dertinger, S.D. et al. (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring, Toxicological Sciences, Vol. 94/1, pp. 83-91.

(5) Dertinger, S.D. et al. (2011), Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing *in vivo* cytogenetic damage, Mutagenesis, Vol. 26/1, pp. 139-145.

(6) Parton, J.W., W.P. Hoffman, M.L. Garriott (1996), Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system, Mutation Research, Vol. 370/1, pp. 65-73.

(7) Asano, N. et al. (1998), An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravitally stained peripheral blood cells, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 404/1-2, pp. 149-154.

(8) Styles, J.A. et al. (2001), Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry, Cytometry, Vol. 44/2, pp. 153-155.

(9) Heddle, J.A. (1973), A rapid *in vivo* test for chromosomal damage, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 18/2, pp. 187-190.

(10) Schmid, W. (1975), The micronucleus test, Mutation Research, Vol. 31/1, pp. 9-15.

(11) Heddle, J.A. et al. (1983), The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, Vol. 123/1, pp. 61-118.

(12) Mavournin, K.H. et al. (1990), The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, Vol. 239/1, pp. 29-80.

(13) MacGregor, J.T. et al. (1983), Micronuclei in circulating erythrocytes: a rapid screen for chromosomal damage during routine toxicity testing in mice, Developments in Toxicology Environmental Science, Vol. 11, pp. 555-558.

▼M7

(14) MacGregor, J.T. et al. (1987), Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes, Mutation Research/Genetic Toxicology, Vol. 189/2, pp. 103-112.

(15) MacGregor, J.T. et al. (1990), The *in vivo* erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies, Fundamental and Applied Toxicology, Vol. 14/3, pp. 513-522.

(16) Hayashi, M. *et al.* (1990), The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, Mutation Research/ Genetic Toxicology, Vol. 245/4, pp. 245-249.

(17) CSGMT/JEMS.MMS — The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992), Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study, Mutation Research/Genetic Toxicology, Vol. 278/2-3, pp. 83-98.

(18) CSGMT/JEMS.MMS — The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan (1995), Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) (CSGMT/JEMS.MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan), Mutagenesis, Vol. 10/3, pp. 153-159.

(19) Salamone, M.F., K.H. Mavournin (1994), Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 23/4, pp. 239-273.

(20) Krishna, G., G. Urda, J. Paulissen (2000), Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 453/1, pp. 45-50.

(21) Hayes, J. et al. (2009), The rat bone marrow micronucleus test–study design and statistical power, Mutagenesis, Vol. 24/5, pp. 419-424.

(22) Wakata, A. et al. (1998), Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenicity Study Group, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 32/1, pp. 84-100.

(23) Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

(24) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 87-90.

(25) Rothfuss, A. et al. (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 108-120.

(26) Hayashi, M. *et al.* (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, pp. 293-304.

(27) Fielder, R.J. et al. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, pp. 313-319.

▼M7

(28) OECD (2000), «Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.

(29) LeBaron, M.J. et al. (2013), Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 54/3, pp. 222-228.

(30) Higashikuni, N., S. Sutou (1995), An optimal, generalized sampling time of 30 +/- 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, Mutagenesis, Vol. 10/4, pp. 313-319.

(31) Hayashi, M. *et al.* (2000), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 35/3, pp. 234-252.

(32) Asanami, S., K. Shimono (1997), High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 390/1-2, pp. 79-83.

(33) Asanami, S., K. Shimono, S. Kaneda (1998), Transient hypothermia induces micronuclei in mice, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 413/1, pp. 7-14.

(34) Spencer, P.J. et al. (2007), Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia, Toxicological Sciences, Vol. 97/1, pp. 120-127.

(35) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983), An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, Mutation Research Letters, Vol. 120/4, pp. 241-247.

(36) MacGregor, J.T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983), A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y, Mutation Research, Vol. 120/4, pp. 269-275.

(37) Romagna, F., C.D. Staniforth (1989), The automated bone marrow micronucleus test, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 213/1, pp. 91-104.

(38) Sun, J.T., M.J. Armstrong, S.M. Galloway (1999), Rapid method for improving slide quality in the bone marrow micronucleus assay; an adapted cellulose column procedure, Mutation Research, Vol. 439/1, pp. 121-126.

(39) Miller, B.M., I.D. Adler (1990), Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced *in vivo*, Mutagenesis, Vol. 5/4, pp. 411-415.

(40) Miller, B.M. et al. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to in situ hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, Mutagenesis, Vol. 6/4, pp. 297-302.

(41) Russo, A. (2002), PRINS tandem labeling of satellite DNA in the study of chromosome damage, American Journal of Medical Genetics, Vol. 107/2, pp. 99-104.

(42) Gollapudi, B.B., L.G. McFadden (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, Mutation Research, Vol. 347/2, pp. 97-99.

(43) OECD (2014), «Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.

▼**M7**

(44) Richold, M.et al. (1990), «In Vivo Cytogenetics Assays», in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.

(45) Lovell, D.P. et al. (1989), «Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays», in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.

(46) Hayashi, M. et al. (1994), Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay, Environmental Health Perspectives, Vol. 102/Suppl 1, pp. 49-52.

(47) Kim, B.S., M. Cho, H.J. Kim (2000), Statistical analysis of *in vivo* rodent micronucleus assay, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 469/2, pp. 233-241.

▼**M7**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Κεντρομερίδιο: περιοχή του χρωμοσώματος, με την οποία συνδέονται τα νημάτια της ατράκτου κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης, με στόχο την οργανωμένη κίνηση των θυγατρικών χρωμοσωμάτων προς τους πόλους των θυγατρικών κυττάρων.

Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Ερυθροβλάστη: πρώιμο στάδιο ανάπτυξης των ερυθροκυττάρων, αμέσως πριν από το άωρο ερυθροκύτταρο, όταν το κύτταρο εξακολουθεί να περιέχει πυρήνα.

Κινητοχώρος: η πρωτεϊνική δομή που σχηματίζεται στα κεντρομερίδια των ευκαρυωτικών κυττάρων, συνδέει το χρωμόσωμα με τα πολυμερή των μικροσωληνίσκων που προέρχονται από τη μιτωτική άτρακτο κατά τη μίτωση και τη μείωση και ενεργεί κατά την κυτταρική διαίρεση για τον διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων.

Μικροπυρήνες: μικροί πυρήνες, που συνυπάρχουν και διακρίνονται από τους κύριους πυρήνες των κυττάρων και οι οποίοι παράγονται κατά την τελόφαση της μίτωσης (μείωσης) από καθυστερημένα χρωμοσωμικά θραύσματα ή ολόκληρα χρωμοσώματα.

Ορθοχρωμικό ή ώριμο ερυθροκύτταρο: πλήρως ώριμο ερυθροκύτταρο που έχει απολέσει το υπολειμματικό RNA, το οποίο απομένει μετά την εκπυρήνωση, και/ή έχει απολέσει άλλους βραχύβιους κυτταρικούς δείκτες που εξαφανίζονται χαρακτηριστικά μετά την εκπυρήνωση που ακολουθεί την τελική διαίρεση των ερυθροβλαστών.

Πολυχρωμικό ή άωρο ερυθροκύτταρο: νεοσχηματισμένο ερυθροκύτταρο σε ενδιάμεσο στάδιο ανάπτυξης, που χρωματίζεται τόσο από το κυανό όσο και από το κόκκινο συστατικό των κλασικών χρώσεων δειγμάτων αίματος, όπως η Giemsa του Wright, λόγω της παρουσίας υπολειμματικού RNA. Αυτά τα νεοσχηματισμένα κύτταρα σχεδόν ταυτίζονται με τα δικτυοερυθροκύτταρα, τα οποία καθίστανται ορατά με τη χρήση ζωτικής χρώσης που προκαλεί τον σχηματισμό δικτύου από το υπολειμματικό RNA. Για την ταυτοποίηση νεοσχηματισμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων χρησιμοποιούνται πλέον ευρέως και άλλες μέθοδοι, όπως η μονοχρωματική χρώση του RNA με φθορίζουσες χρωστικές ή σήμανση βραχύβιων επιφανειακών δεικτών, όπως ο CD71, με φθορίζοντα αντισώματα. Τα πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα, τα δικτυοερυθροκύτταρα και τα θετικά στον δείκτη CD71 ερυθροκύτταρα είναι όλα άωρα ερυθροκύτταρα, αν και το καθένα από αυτά έχει ελαφρώς διαφορετική ηλικιακή κατανομή.

Δικτυοερυθροκύτταρο: νεοσχηματισμένο ερυθροκύτταρο που χρωματίζεται με ζωτική χρώση, η οποία προκαλεί τον σχηματισμό χαρακτηριστικού δικτύου από το υπολειμματικό RNA. Τα δικτυοερυθροκύτταρα και τα πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα έχουν παρόμοια ηλικιακή κατανομή.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

▼M7

Προσάρτημα 2

ΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΦΥΛΩΝ ΣΤΗ ΔΟΚΙΜΗ ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΩΝ IN VIVO

Ο παραγοντικός σχεδιασμός και η σχετική ανάλυση

Σύμφωνα με τον παρόντα σχεδιασμό, υποβάλλονται σε δοκιμή τουλάχιστον 5 αρσενικά και 5 θηλυκά άτομα σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης, με αποτέλεσμα τη χρήση τουλάχιστον 40 ζώων (20 αρσενικών και 20 θηλυκών, συν τους αντίστοιχους θετικούς μάρτυρες).

Πρόκειται για έναν από τους απλούστερους παραγοντικούς σχεδιασμούς, που ισοδυναμεί με αμφίδρομη ανάλυση διασποράς στην οποία ως κύριες επιδράσεις θεωρούνται το φύλο και το επίπεδο συγκέντρωσης. Τα δεδομένα μπορούν να αναλυθούν με πολλά τυποποιημένα στατιστικά πακέτα λογισμικού, όπως τα SPSS, SAS, STATA, Genstat, καθώς και με τη χρήση του συστήματος R.

Κατά την ανάλυση διαχωρίζεται η μεταβλητότητα του συνόλου δεδομένων σε μεταβλητότητα μεταξύ των φύλων, μεταβλητότητα μεταξύ των συγκεντρώσεων και μεταβλητότητα σχετιζόμενη με την αλληλεπίδραση μεταξύ των φύλων και των συγκεντρώσεων. Καθένας από τους όρους αυτούς συγκρίνεται με την εκτίμηση της μεταβλητότητας μεταξύ των ζώων επανάληψης (replicates) που απαρτίζουν τις ομάδες ζώων του ίδιου φύλου στις οποίες χορηγείται η ίδια συγκέντρωση. Περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με την υποκείμενη μεθοδολογία είναι διαθέσιμες σε πολλά κλασικά εγχειρίδια στατιστικής (βλ. βιβλιογραφία) και στις λειτουργίες βοήθειας (Help) που παρέχονται με τα στατιστικά πακέτα λογισμικού.

Στο επόμενο στάδιο της ανάλυσης εξετάζεται ο όρος αλληλεπίδρασης φύλο x συγκέντρωση σε πίνακα ANOVA ([1]). Ελλείψει σημαντικού όρου αλληλεπίδρασης, οι συνδυασμένες τιμές στα φύλα ή στα επίπεδα συγκέντρωσης τροφοδοτούν έγκυρους στατιστικούς ελέγχους μεταξύ των επιπέδων με βάση τη συγχωνευμένη ενδοομαδική μεταβλητότητα (pooled within-group variability), όρο που παρέχεται από την ANOVA.

Η ανάλυση συνεχίζεται με τον διαχωρισμό της εκτίμησης της μεταβλητότητας μεταξύ των συγκεντρώσεων σε αντιθέσεις που τροφοδοτούν έλεγχο για τις γραμμικές και τετραγωνικές αντιθέσεις των αποκρίσεων σε όλα τα επίπεδα συγκέντρωσης. Όταν υπάρχει σημαντική αλληλεπίδραση φύλου x συγκέντρωση, ο όρος αυτός μπορεί επίσης να διαχωριστεί σε αντιθέσεις γραμμικής x φύλο και τετραγωνικής x φύλο αλληλεπίδρασης. Οι εν λόγω όροι τροφοδοτούν ελέγχους με σκοπό να εξακριβωθεί αν οι αποκρίσεις στη συγκέντρωση είναι παράλληλες για τα δύο φύλα ή διαφοροποιούνται ανάλογα με το φύλο.

Η εκτίμηση της συγχωνευμένης ενδοομαδικής μεταβλητότητας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για κατά ζεύγη ελέγχους της διαφοράς μεταξύ των μέσων τιμών. Οι έλεγχοι αυτοί μπορούν να αφορούν συγκρίσεις μεταξύ των μέσων τιμών στα δύο φύλα και μεταξύ των μέσων τιμών στα διάφορα επίπεδα συγκέντρωσης, όπως π.χ. οι συγκρίσεις με τα επίπεδα των αρνητικών μαρτύρων. Στις περιπτώσεις σημαντικής αλληλεπίδρασης, μπορούν να γίνουν συγκρίσεις μεταξύ των μέσων τιμών των διαφόρων συγκεντρώσεων στο ίδιο φύλο ή μεταξύ των μέσων τιμών των φύλων στην ίδια συγκέντρωση.

Βιβλιογραφία

Υπάρχουν πολλά εγχειρίδια στατιστικής που πραγματεύονται τη θεωρία, τον σχεδιασμό, τη μεθοδολογία, την ανάλυση και την ερμηνεία παραγοντικών σχεδιασμών οι οποίοι εκτείνονται από τις απλούστερες αναλύσεις δύο παραγόντων έως τις πλέον περίπλοκες μορφές που χρησιμοποιούνται στη μεθοδολογία σχεδιασμού πειραμάτων. Ο κατάλογος που ακολουθεί δεν είναι πλήρης. Ορισμένα βιβλία παρέχουν πρακτικά παραδείγματα εφαρμογής συγκρίσιμων σχεδιασμών, συνοδευόμενα σε ορισμένες περιπτώσεις από κώδικα για τη διενέργεια των αναλύσεων με τη χρήση διαφόρων πακέτων λογισμικού.

([1]) Οι στατιστικολόγοι που υιοθετούν προσέγγιση μοντελοποίησης, όπως η χρήση γενικών γραμμικών μοντέλων (General Linear Models/GLM), μπορεί να διενεργούν την ανάλυση με διαφορετικό αλλά συγκρίσιμο τρόπο, χωρίς ωστόσο να συνάγουν αναγκαστικά τον παραδοσιακό πίνακα ANOVA, που ανάγεται στις αλγοριθμικές προσεγγίσεις για τον υπολογισμό των στατιστικών στοιχείων οι οποίες αναπτύχθηκαν πριν από την εποχή των υπολογιστών.

▼**M7**

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼B

B.13/14. **ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ — ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΑΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

Η παρούσα μέθοδος αποτελεί αντιγραφή της OECD TG 471 Bacterial Reverse Mutation Test (1997).

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στη δοκιμή βακτηριακής ανάστροφης μετάλλαξης χρησιμοποιούνται στελέχη Salmonella typhimurium και Escherichia coli απαιτούντα αμινοξέα για τον εντοπισμό σημειακών μεταλλάξεων, που περιλαμβάνουν υποκατάσταση, προσθήκη ή απάλειψη ενός ή μερικών ζευγών βάσεων DNA (1) (2) (3). Η αρχή της δοκιμής αυτής της βακτηριακής ανάστροφης μετάλλαξης συνίσταται στο ότι ανιχνεύει μεταλλάξεις που αναστρέφουν μεταλλάξεις που υπάρχουν στα υπό δοκιμή στελέχη και αποκαθιστούν τη λειτουργική ικανότητα των βακτηρίων για σύνθεση ενός βασικού αμινοξέος. Τα αναστραφέντα βακτήρια ανιχνεύονται από την ικανότητά τους να αναπτύσσονται απουσία του αμινοξέος που απαιτείται από το γονικό υπό δοκιμή στέλεχος.

Οι σημειακές μεταλλάξεις είναι το αίτιο πολλών γενετικών ασθενειών στους ανθρώπους και υπάρχουν ουσιαστικές ενδείξεις ότι οι σημειακές μεταλλάξεις στα ογκογονίδια και στα ογκογενή αποκαταστατικά γονίδια σωματικών κυττάρων εμπλέκονται στη δημιουργία όγκων στους ανθρώπους και σε πειραματόζωα. Η δοκιμή βακτηριακής ανάστροφης μετάλλαξης είναι ταχεία, φθηνή και σχετικά εύκολη να γίνει. Πολλά από τα υπό δοκιμή στελέχη παρουσιάζουν ορισμένα χαρακτηριστικά που τα καθιστούν πιο ευαίσθητα για την ανίχνευση μεταλλάξεων και στα οποία περιλαμβάνονται αποκρινόμενες ακολουθίες DNA στις θέσεις αναστροφής, αυξημένη κυτταρική διαπερατότητα στα μεγάλα μόρια και εξάλειψη των συστημάτων επιδιόρθωσης DNA ή ενίσχυση των επιρρεπών σε σφάλματα διεργασιών επιδιόρθωσης DNA. Η εξειδίκευση των υπό δοκιμή στελεχών μπορεί να παράσχει ορισμένες χρήσιμες πληροφορίες για τους τύπους μεταλλάξεων που προκαλούνται από γονοτοξικούς παράγοντες. Για τις δοκιμές βακτηριακής ανάστροφης μετάλλαξης υπάρχει διαθέσιμη μία πολύ μεγάλη βάση δεδομένων με αποτελέσματα για μία μεγάλη ποικιλία δομών ενώ έχουν αναπτυχθεί αρκετές καθιερωμένες πλέον μεθοδολογίες για τον έλεγχο χημικών ουσιών με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένων και πτητικών ενώσεων.

Βλέπε επίσης γενική εισαγωγή μέρος Β.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Η δοκιμή ανάστροφης μετάλλαξης στη Salmonella typhimurium ή στα Escherichia coli ανιχνεύει μετάλλαξη σε απαιτούν αμινοξύ στέλεχος (ιστιδίνη ή τρυπτοφάνη, αντίστοιχα) για την παραγωγή στελέχους που δεν εξαρτάται από την έξωθεν παροχή αμινοξέος.

Μεταλλαξογόνα υποκατάστασης ζευγών βάσεων είναι παράγοντες που προκαλούν αλλαγή βάσεων στο DNA. Στη δοκιμή αναστροφής η αλλαγή αυτή μπορεί να συμβεί στη θέση της αρχικής μετάλλαξης ή σε μία άλλη θέση του βακτηριακού γονιδιώματος.

Μεταλλαξογόνα αλλαγής πλαισίου είναι παράγοντες που προκαλούν την προσθήκη ή απάλειψη ενός ή περισσοτέρων ζευγών βάσεων στο DNA, μεταβάλλοντας έτσι το αναγνωστικό πλαίσιο στο RNA.

▼B

1.3. ΑΡΧΙΚΕΣ ΘΕΩΡΗΣΕΙΣ

Στη δοκιμή βακτηριακής ανάστροφης μετάλλαξης χρησιμοποιούνται προκαρυωτικά κύτταρα τα οποία διαφέρουν από τα κύτταρα των θηλαστικών σε ορισμένα σημεία όπως η πρόσληψη, ο μεταβολισμός, η χρωμοσωμική δομή και οι διεργασίες επιδιόρθωσης DNA. Οι δοκιμές που πραγματοποιούνται *in vitro* απαιτούν εν γένει τη χρήση εξωγενούς πηγής μεταβολικής ενεργοποίησης. Τα *in vitro* συστήματα μεταβολικής ενεργοποίησης δεν μπορούν να μιμηθούν πλήρως τις *in vivo* συνθήκες στα θηλαστικά. Συνεπώς, η δοκιμή δεν παρέχει άμεσες πληροφορίες για τη μεταλλαξιγόνο και καρκινογόνο δυνατότητα μιας ουσίας στα θηλαστικά.

Η δοκιμή βακτηριακής ανάστροφης μετάλλαξης χρησιμοποιείται συνήθως ως μία αρχική δοκιμή προσανατολισμού για τη γονοτοξική δραστικότητα και, ιδιαίτερα, την επάγουσα σημειακές μεταλλάξεις. Από πολυάριθμα συλλεγμένα στοιχεία καταδεικνύεται ότι πολλά χημικά που είναι θετικά στη δοκιμή αυτή εμφανίζουν μεταλλαξιγόνο δράση και σε άλλες δοκιμές. Υπάρχουν παραδείγματα μεταλλαξιγόνων παραγόντων που δεν ανιχνεύονται με τη δοκιμή αυτή. Οι ατέλειες αυτές μπορούν να αποδοθούν στην ειδική φύση του ανιχνευόμενου τελικού σημείου, στις διαφορές στη μεταβολική ενεργοποίηση ή στις διαφορές στη βιοδιιθεσιμότητα. Από την άλλη μεριά, παράγοντες που ενισχύουν την ευαισθησία της δοκιμής βακτηριακής ανάστροφης μετάλλαξης μπορούν να οδηγήσουν σε υπερεκτίμηση της μεταλλαξιγόνου δραστικότητας.

Η δοκιμή βακτηριακής ανάστροφης μετάλλαξης μπορεί να μη προσφέρεται για την αξιολόγηση ορισμένων τάξεων χημικών ουσιών όπως, π.χ., για ισχυρά βακτηριοκτόνες ενώσεις (π.χ. ορισμένα αντιβιωτικά) και ενώσεις που θεωρείται (ή είναι γνωστό) ότι παρεμβαίνουν ειδικά στο σύστημα κυτταρικής αντιγραφής των θηλαστικών (π.χ. ορισμένοι αναστολείς της τοποϊσομεράσης και ορισμένα νουκλεοτιδικά ανάλογα). Για τις περιπτώσεις αυτές, μπορεί να προσφέρονται περισσότερο οι δοκιμές μετάλλαξης στα θηλαστικά.

Αν και πολλές ενώσεις που είναι θετικές στη δοκιμή αυτή είναι καρκινογόνες στα θηλαστικά, ο συσχετισμός αυτός δεν είναι απόλυτος. Εξαρτάται από την τάξη της χημικής ένωσης και υπάρχουν καρκινογόνα που δεν ανιχνεύονται με τη δοκιμή αυτή επειδή δρουν μέσω άλλων, μη γονοτοξικών, μηχανισμών ή μηχανισμών που δεν υφίστανται στα βακτηριακά κύτταρα.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Εναιωρήματα βακτηριακών κυττάρων εκτίθενται στην υπό δοκιμή ουσία παρουσία και απουσία εξωγενούς συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης. Στη μέθοδο προσθήκης σε τρυβλίο, τα εναιωρήματα αυτά αναμειγνύονται με άγαρ επικάλυψης και επιστρώνονται αμέσως σε ελάχιστη ποσότητα θρεπτικού μέσου. Στη μέθοδο προεπωάσεως, το μίγμα κατεργασίας επωάζεται και κατόπιν αναμειγνύεται με άγαρ επιστρώσεως πριν επιστρωθεί σε ελάχιστη ποσότητα μέσου. Και στις δύο τεχνικές, έπειτα από δύο ή τρεις ημέρες επωάσεως, μετρώνται οι ανάστροφες αποικίες και ο αριθμός τους συγκρίνεται με τον αριθμό των αυθόρμητων ανάστροφων αποικιών σε τρυβλία-μάρτυρες με διαλύτη.

Έχουν περιγραφεί διάφορες διαδικασίες για την εκτέλεση της δοκιμής βακτηριακής ανάστροφης μετάλλαξης. Μεταξύ εκείνων που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι η μέθοδος προσθήκης σε τρυβλίο (1) (2) (3) (4), η μέθοδος προεπωάσεως (2) (3) (5) (6) (7) (8), η μέθοδος διακύμανσης (9) (10) και η μέθοδος εναιωρήματος (11). Έχουν περιγραφεί επίσης και τροποποιήσεις για τη δοκιμασία αερίων η ατμών (12).

▼B

Οι διαδικασίες που περιγράφονται στη μέθοδο σχετίζονται κυρίως με τις μεθόδους προσθήκης σε τρυβλίο και προεπωάσεως. Και οι δύο είναι αποδεκτές για την πραγματοποίηση πειραμάτων και με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση. Ορισμένες ουσίες μπορούν να ανιχνευθούν αποτελεσματικότερα με τη μέθοδο προεπωάσεως. Οι ουσίες αυτές ανήκουν σε μία σειρά χημικών τάξεων στην οποία περιλαμβάνονται οι αλειφατικές νιτροζαμίνες με βραχεία αλυσίδα, τα δισθενή μέταλλα, αλδεΰδες, αζωχρώματα και διαζωενώσεις, πυρολλιζιδινικά αλκαλοειδή, αλλυλοενώσεις και νιτροενώσεις (3). Αναγνωρίζεται επίσης ότι ορισμένες τάξεις μεταλλαξιγόνων δεν ανιχνεύονται πάντοτε με τις τυποποιημένες διαδικασίες όπως με τη μέθοδο προσθήκης σε τρυβλίο ή με τη μέθοδο προεπωάσεως. Αυτές θα πρέπει να θεωρούνται ως «ειδικές περιπτώσεις» και συνιστάται ιδιαίτερα να χρησιμοποιούνται για την ανίχνευσή τους εναλλακτικές διαδικασίες. Ως «ειδικές περιπτώσεις» μπορούν να αναφερθούν οι ακόλουθες (μαζί με παραδείγματα διαδικασιών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευσή τους): αζωχρώματα και διαζωενώσεις (3) (5) (6) (13), αέρια και πτητικές ουσίες (12) (14) (15) (16) και γλυκοζίτες (17) (18). Τυχόν παρέκκλιση από την τυποποιημένη διαδικασία πρέπει να αιτιολογείται επιστημονικώς.

1.5. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.5.1. **Προετοιμασίες**

1.5.1.1. *Βακτήρια*

Πρόσφατες καλλιέργειες βακτηρίων θα πρέπει να αφήνονται να αναπτυχθούν μέχρι το τελευταίο στάδιο της εκθετικής ή το πρώιμο στάδιο της στατικής φάσης αναπτύξεως (περίπου 10^9 κύτταρα ανά ml). Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται καλλιέργειες που βρίσκονται στο τελευταίο στάδιο της στατικής φάσης. Παίζει σημαντικό ρόλο οι χρησιμοποιούμενες καλλιέργειες να εμφανίζουν υψηλό τίτλο βιώσιμων βακτηρίων. Ο τίτλος μπορεί να βρεθεί είτε από προϋπάρχοντα στοιχεία για τις καμπύλες αύξησης, είτε σε κάθε δοκιμή με τον προσδιορισμό του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων με δοκιμή σε τρυβλίο.

Η συνιστώμενη θερμοκρασία επωάσεως είναι 37 °C.

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πέντε τουλάχιστον στελέχη βακτηρίων. Σε αυτά θα πρέπει να περιλαμβάνονται τέσσερα στελέχη .8. typhimurium (TA 1535, TA 1537 ή TA97a ή TA97, TA98 και TA100) που έχει αποδειχθεί ότι είναι αξιόπιστα και παρέχουν αναπαραγώγιμες αποκρίσεις μεταξύ εργαστηρίων. Τα τέσσερα αυτά στελέχη S. typhimurium έχουν GC ζεύγη βάσεων στην πρωταρχική θέση αναστροφής και είναι γνωστό ότι δεν μπορούν να εντοπίσουν ορισμένα οξειδωτικά μεταλλαξιγόνα, παράγοντες σταυροειδούς σύνδεσης και υδραζίνες. Οι ουσίες αυτές μπορούν να ανιχνευθούν με στελέχη E. coli WP2 ή S. typhimurium TA102 (19) που έχουν ένα ζεύγος βάσεων AT στην πρωταρχική θέση αναστροφής. Συνεπώς, ο συνιστώμενος συνδυασμός στελεχών είναι:

— S. typhimurium TA153 5 και

— S. typhimurium TA1537 ή TA97 ή TA97a και

— S. typhimurium TA98 και

— S. typhimurium TA100 και

— E. coli WP2 uvrA ή E. coli WP2 uvrA (pKM 101) ή S. typhimurium TA102.

Για να ανιχνευθούν μεταλλαξιγόνα σταυροειδούς σύνδεσης μπορεί να είναι σκόπιμο να περιληφθεί TA102 ή να προστεθεί ένα ειδικό για την επιδιόρθωση DNA στέλεχος E. coli [π.χ. E. coli YVP2 ή E. coli WP2 (pKM101)].

▼B

Για την παρασκευή έτοιμων καλλιεργειών, την επαλήθευση ιχνηθετών και την αποθήκευση θα πρέπει να χρησιμοποιούνται καθιερωμένες διαδικασίες. Για κάθε κατεψυγμένο παρασκεύασμα έτοιμης καλλιέργειας θα πρέπει να καταδεικνύεται ότι απαιτεί αμινοξύ για να αναπτυχθεί (ιστιδΐνη για στελέχη S. typhimurium και θρυπτοφάνη για στελέχη E. coli). Θα πρέπει ομοίως να ελέγχονται προς επιβεβαίωση και άλλα ψαινοτυπικά χαρακτηριστικά, συγκεκριμένα: η παρουσία ή απουσία πλασμιδίων R-παράγοντα όπου χρειάζεται [δηλαδή αντίσταση αμπικιλλίνης σε στελέχη TA98, TA 100 και TA97a ή TA97, VVP2 uvrA και WP2 uvrA (pKM101), και αντίσταση αμπικιλλίνης + τετρακυκλίνης σε στέλεχος TA 102], η παρουσία χαρακτηριστικών μεταλλάξεων (δηλαδή rfa μετάλλαξη σε S. typhimurium μέσω της ευαισθησίας σε κρυσταλλικό ιώδες και uvrAμετάλλαξη σε E. coli ή uvrB μετάλλαξη σε S. typhimurium μέσω της ευαισθησίας σε υπεριώδες φως} (2} (3}. Τα στελέχη θα πρέπει επίσης να δίνουν έναν αριθμό αυθόρμητων ανάστροφων αποικιών σε τρυβλίο που να πέφτει μέσα στις περιοχές συχνοτήτων που αναμένονται από τα προϋπάρχοντα εργαστηριακά δεδομένα, και κατά προτίμηση, μέσα στην περιοχή που αναφέρεται στη βιβλιογραφία.

1.5.1.2. *Θρεπτικό μέσο*

Χρησιμοποιείται κατάλληλο ελάχιστο άγαρ (π.χ. άγαρ που περιέχει ελάχιστο μέσο E Vogel-Bonner και γλυκόζη) και άγαρ επίστρωσης που περιέχει ιστιδίνη και βιοτίνη ή τρυπτοφάνη για να μπορούν να γίνουν μερικές κυτταρικές διαιρέσεις (1) (2) (9).

1.5.1.3. *Μεταβολική ενεργοποίηση*

Τα βακτήρια θα πρέπει να εκτίθενται στην υπό δοκιμή ουσία παρουσία και απουσία κατάλληλου συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης. Το συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο σύστημα είναι ένα μεταμιτοχονδριακό κλάσμα εμπλουτισμένο με συμπαράγοντα (S9) που παρασκευάζεται από το ήπαρ τρωκτικών που έχει υποβληθεί σε κατεργασία με ενζυμοεπαγωγικούς παράγοντες όπως το Aroclor 1254 (1) (2) ή μείγμα φαινοβαρβιτόνης και β-ναφθοφλαβόνης (18) (20) (21). Το μεταμιτοχονδριακό κλάσμα χρησιμοποιείται συνήθως σε συγκεντρώσεις της τάξεως του 5 έως 30 % v/v στο S9—μείγμα. Η επιλογή και κατάσταση ενός συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης μπορεί να εξαρτάται από την τάξη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να χρειάζεται να χρησιμοποιηθούν περισσότερες από μία συγκεντρώσεις μεταμιτοχονδριακού κλάσματος. Στην περίπτωση των αζωχρωμάτων και των αζωενώσεων, μπορεί να είναι καλύτερα να χρησιμοποιηθεί αναγωγικό σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης (6) (13).

1.5.1.4. *Υπό δοκιμή ουσία/προετοιμασία*

Οι στερεές υπό δοκιμή ουσίες πρέπει να διαλύονται ή να τίθενται υπό μορφή εναιωρήματος σε κατάλληλους διαλύτες ή φορείς και να αραιώνονται εφόσον απαιτείται πριν από την κατεργασία των βακτηρίων. Οι υγρές ουσίες μπορούν να προστίθενται απευθείας στα συστήματα δοκιμής ή/και να αραιώνονται πριν από την κατεργασία. Πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσφατα παρασκευάσματα της υπό δοκιμή ουσίας εκτός κι αν τα σχετικά με τη σταθερότητα της ουσίας στοιχεία επιτρέπουν τη χρήση έτοιμων παρασκευασμάτων.

Δεν πρέπει να υπάρχουν υπόνοιες για πιθανή χημική αντίδραση του διαλύτη/φορέα με την υπό δοκιμή ουσία ενώ θα πρέπει να είναι συμβατός με την επιβίωση των βακτηρίων και τη δραστικότητα S9 (22). Εφόσον ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης/φορέας δεν ανήκει στους γνωστούς, η χρήση του θα πρέπει να στηρίζεται στην ύπαρξη στοιχείων που αποδεικνύουν τη συμβατότητά του. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατέ), να εξετάζεται πρώτα η χρήση ενός υδατικού διαλύτη/φορέα. Όταν εξετάζονται ουσίες που δεν είναι σταθερές στο νερό, οι χρησιμοποιούμενοι οργανικοί διαλύτες θα πρέπει να είναι απαλλαγμένοι ύδατος.

▼B

1.5.2. **Συνθήκες δοκιμής**

1.5.2.1. *Υπό δοκιμή στελέχη (βλέπε σημείο 1.5.1.1)*

1.5.2.2. *Συγκέντρωση εκθέσεως*

Μεταξύ των κριτηρίων που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη για τον καθορισμό της μέγιστης για χρήση ποσότητας υπό δοκιμή ουσίας είναι η κυτταροτοξικότητα και η διαλυτότητα στο τελικό μίγμα κατεργασίας.

Μπορεί να είναι σκόπιμο να προσδιοριστεί η τοξικότητα και η δυσδιαλυτότητα με μία προκαταρκτική δοκιμή. Η κυτ-ταροτοξικότητα μπορεί να βρεθεί από τη μείωση του αριθμού των ανάστροφων αποικιών, το μηδενισμό ή την ελάττωση του υποστρώματος ή το βαθμό επιβίωσης των εξεταζομένων καλλιεργειών. Η κυτταροτοξικότητα μιας ουσίας μπορεί να μεταβληθεί παρουσία συστημάτων μεταβολικής ενεργοποίησης. Η δυσδιαλυτότητα θα πρέπει να εκτιμάται με βάση την πτώση ιζήματος στο τελικό μίγμα υπό τις πραγματικές συνθήκες δοκιμής που είναι εμφανής με γυμνό οφθαλμό.

Η συνιστώμενη μέγιστη συγκέντρωση δοκιμής για διαλυτές μη κυτταροτοξικές ουσίες είναι 5 mg/τρυβλίο ή 5 ml/τρυβλίο. Για μη κυτταροτοξικές ουσίες που δεν είναι διαλυτές σε επίπεδα συγκεντρώσεως 5 mg/τρυβλίο ή 5 ml/τρυβλίο, μία ή περισσότερες από τις χρησιμοποιούμενες στη δοκιμή συγκεντρώσεις θα πρέπει να καθιστούν την ουσία αδιάλυτη στο τελικό μίγμα κατεργασίας. Οι υπό δοκιμή ουσίες που είναι κυτταροτοξικές ήδη από επίπεδα συγκεντρώσεως κάτω των 5 mg/τρυβλίο ή 5 ml/τρυβλίο θα πρέπει να υποβάλλονται στη δοκιμή μέχρι του επιπέδου της κυτταροτοξικής συγκέντρωσης. Το ίζημα δεν θα πρέπει να παρεμβαίνει στην εκτίμηση.

Στα αρχικά πειράματα θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον πέντε διαφορετικές αναλώσιμες συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας με ημιλογαριθμικά περίπου διαστήματα (δηλαδή 10) μεταξύ των σημείων δοκιμής. Όταν διερευνάται η σχέση συγκέντρωσης/απόκρισης, μπορεί να είναι σκόπιμο να χρησιμοποιηθούν μικρότερα διαστήματα. Όταν αξιολογούνται ουσίες που περιέχουν σημαντικές ποσότητες δυνητικά μεταλλαξιγόνων προσμείξεων, μπορεί να εξεταστεί και η διενέργεια δοκιμής σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από τα 5 mg/τρυβλίο ή 5 ml/τρυβλίο.

1.5.2.3. *Αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες*

Σε κάθε δοκιμή θα πρέπει να περιλαμβάνονται παράλληλα και καλλιέργειες με εξειδικευμένους για το στέλεχος θετικούς και αρνητικούς (διαλύτης ή φορέας) μάρτυρες. Θα πρέπει να επιλέγονται συγκεντρώσεις θετικών μαρτύρων που αποδεικνύουν την αποτελεσματικότητα κάθε δοκιμής.

Σε δοκιμές στις οποίες χρησιμοποιείται σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης, ο ή οι θετικοί μάρτυρες αναφοράς θα πρέπει να επιλέγονται με βάση το είδος των χρησιμοποιουμένων βακτηριακών στελεχών.

Παραδείγματα κατάλληλων θετικών μαρτύρων για δοκιμές με μεταβολική ενεργοποίηση αποτελούν οι παρακάτω ουσίες:

Ουσια	Αριθ. CAS	Αριθ. EINECS
9,10-διμεθυλανθρακένιο	781-43-1	212-308-4
7,12-διμεθυλοβενζ[α]ανθρακένιο	57-97-6	200-359-5
βενζο[α]πυρένιο	50-32-8	200-028-5
2-αμινοανθρακένιο	613-13-8	210-330-9

▼B

Ουσια	Αριθ. CAS	Αριθ. EINECS
Κυκλοφωσφαμίδιο	50-18-0	200-015-4
Μονοένυδρο κυκλοφωσφαμίδιο	6055-19-2	

Η ακόλουθη ουσία είναι ένας κατάλληλος Οπτικός μάρτυρας για τη μέθοδο αναγωγικής μεταβολικής ενεργοποίησης:

Ουσία	Αριθ. CAS	Αριθ. EINECS
Ερυθρό του Κονγκό	573-58-0	209-358-4

Το 2-αμινοανθρακένιο δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως αποκλειστικός δείκτης της αποτελεσματικότητας του S9-Μείγματος. Εάν χρησιμοποιηθεί 2-αμινοανθρακένιο, κάθε παρτίδα S9 θα πρέπει να χαρακτηρίζεται και με ένα μεταλλαξιγόνο που απαιτεί μεταβολική ενεργοποίηση από μικροσωμικά ένζυμα, π.χ. βενζο[α]πυρένιο, διμεθυλοβενζανθρακένιο.

Οι ουσίες που ακολουθούν αποτελούν παραδείγματα εξειδικευμένων κατά στέλεχος θετικών μαρτύρων για δοκιμές που εκτελούνται χωρίς εξωγενές σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης:

Ουσία	Αριθ. CAS	Αριθ. EINECS	Στέλεχος
Αζίδιο του νατρίου	26628-22-8	247-852-1	TA 1535 και TA 100
2-νιτροφθορένιο	607-57-8	210-138-5	TA 98
9-αμινοακριδίνη	90-45-9	201-995-6	TA 1537, TA 97 και TA 97a
ICR 191	17070-45-0	241-129-4	TA 1537, TA 97 και TA 97a
Υδροπεροξείδιο του κουμενίου	80-15-9	201-254-7	TA 102
Μιτομυκίνη C	50-07-7	200-008-6	WP2 uvrA και TA 102
N-αιθυλο-N-νιτρο-N-νιτροζο-γουανιδίνη	70-25-7	200-730-1	YVP2, \VP2uvrA και WP2uvrA(pKM101)
4-νιτροκινολιν-1 -οξείδιο	56-57-5	200-281-1	WP2, WP2uvrA και WP2uvrA(pKM101)
Φουρυλοφουραμίδιο (AF2)	3688-53-7		Στελέχη περιέχονται πλασμίδιο

Ως θετικοί μάρτυρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες κατάλληλες ουσίες αναφοράς. Εφόσον υπάρχουν, θα πρέπει να εξετάζεται η δυνατότητα χρήσης ως θετικών μαρτύρων ουσιών σχετικής χημικής τάξης.

Θα πρέπει να περιλαμβάνονται και αρνητικοί μάρτυρες, αποτελούμενοι από μόνο τον διαλύτη ή φορέα στο μέσο, χωρίς την υπό δοκιμή ουσία, και υποβαλλόμενοι στην ίδια κατεργασία με εκείνη των υπό δοκιμή καλλιεργειών, Επιπλέον, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται και μη υποβληθέντες σε κατεργασία μάρτυρες εκτός αν υπάρχουν πρότερα στοιχεία που αποδεικνύουν ότι ο επιλεγείς διαλύτης δεν επιφέρει επιβλαβή ή μεταλλαξιγόνα αποτελέσματα.

▼B

1.3.3. **Διαδικασία**

Στη μέθοδο της προσθήκης σε τρυβλίο (1) (2) (3) (4), χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση, αναμειγνύονται συνήθως 0,05 ml ή 0,1 ml των διαλυμάτων δοκιμής, 0,1 ml πρόσφατης βακτηριακής καλλιέργειας (που περιέχει περίπου 10^8 βιώσιμα κύτταρα) και 0,5 ml στείρου ρυθμιστικού διαλύματος με 2,0 ml άγαρ επιστρώσεως. Στη δοκιμή με μεταβολική ενεργοποίηση, αναμειγνύονται συνήθως 0,5 ml μίγματος μεταβολικής ενεργοποίησης που περιέχει κατάλληλη ποσότητα μεταμιτοχονδριακού κλάσματος (της τάξεως του 5 έως 30 % ν/ν στο μείγμα μεταβολικής ενεργοποίησης) με το άγαρ επιστρώσεως (2,0 ml), μαζί με τα βακτήρια και την ουσία δοκιμής/διάλυμα δοκιμής. Το περιεχόμενο κάθε σωλήνα ανακατεύεται και φέρεται στην επιφάνεια τρυβλίου με ελάχιστο άγαρ. Το άγαρ επιστρώσεως αφήνεται να στερεοποιηθεί πριν από την επώαση.

Στη μέθοδο της προεπωάσεως (2) (3) (5) (6), η ουσία δοκιμής/διάλυμα δοκιμής προεπωάζεται με το υπό δοκιμή στέλεχος (που περιέχει περίπου 10^8 βιώσιμα κύτταρα) και στείρο ρυθμιστικό διάλυμα ή το σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης (0,5 ml) συνήθως για 20 λεπτά ή και περισσότερο στους 30-37 °C πριν να αναμειχθεί με το άγαρ επιστρώσεως και να επιστρωθεί στην επιφάνεια τρυβλίου με ελάχιστο άγαρ. Συνήθως, 0,05 ή 0,1 ml της υπό δοκιμή ουσίας/διαλύματος δοκιμής, 0,1 ml βακτηρίων και 0,5 ml S9-μείγματος ή στείρου ρυθμιστικού αναμειγνύονται με 2,0 ml άγαρ επιστρώσεως. Οι σωλήνες, κατά τη διάρκεια της προεπώασης, θα πρέπει να αερίζονται με τη χρήση αναταρακτη.

Για τη σωστή εκτίμηση της διακύμανσης, σε κάθε επίπεδο δύσεως θα πρέπει να χρησιμοποιείται τριπλή επίστρωση. Εφόσον αιτιολογείται επιστημονικώς, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και διπλή επίστρωση. Τυχαία απώλεια τρυβλίου δεν καθιστά κατ' ανάγκη άκυρη τη δοκιμή.

Αέριες ή πτητικές ουσίες θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή με κατάλληλες μεθόδους, όπως π.χ. σε σφραγισμένα δοχεία (12) (14) (15) (16).

1.5.4. **Επώαση**

Όλα τα τρυβλία σε μία δεδομένη δοκιμή 9α πρέπει να επωάζονται στους 37 °C για 48-72 ώρες. Μετά την περίοδο επώασης, μετράται ο αριθμός των ανάστροφων αποικιών ανά τρυβλίο.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα δεδομένα θα πρέπει να παρουσιάζονται ως ο αριθμός των ανάστροφων αποικιών ανά τρυβλίο. Θα πρέπει επίσης να δίνεται και ο αριθμός των ανάστροφων αποικιών στα τρυβλία που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικός (διαλύτης-μάρτυρας και μη υποβληθείς σε κατεργασία μάρτυρας, εφόσον χρησιμοποιείται) και θετικός μάρτυρας. Για την υπό δοκιμή ουσία καθώς και για το θετικό και αρνητικό (μη κατεργασθείς ή/και διαλύτης) μάρτυρα θα πρέπει να δίνονται στοιχεία με τους επιμέρους κατά τρυβλίο αριθμούς, το μέσο αριθμό των ανάστροφων αποικιών ανά τρυβλίο και την τυπική απόκλιση.

Δεν απαιτείται επαλήθευση των σαφών θετικών αποκρίσεων. Τυχόν διφορούμενα αποτελέσματα θα πρέπει να αποσαφηνίζονται με περαιτέρω δοκιμές τροποποιώντας κατά προτίμηση τις πειραματικές συνθήκες. Τα αρνητικά αποτελέσματα πρέπει να επιβεβαιώνονται κατά περίπτωση. Στις περιπτώσεις όπου δεν θεωρείται αναγκαία η επιβεβαίωση των αρνητικών αποτελεσμάτων, θα πρέπει να παρέχεται σχετική αιτιολόγηση. Στα επαναληπτικά πειράματα θα πρέπει να εξετάζεται η τροποποίηση των παραμέτρων της δοκιμής ώστε να καλύπτουν όλη την έκταση των εκτιμώμενων συνθηκών. Στις παραμέτρους που μπορούν να τροποποιηθούν περιλαμβάνεται το εύρος της συγκέντρωσης, η μέθοδος κατεργασίας (προσθήκη σε τρυβλίο ή προεπώαση σε υγρό περιβάλλον) και οι συνθήκες μεταβολικής ενεργοποίησης.

▼B

2.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Για να θεωρηθεί ένα αποτέλεσμα ως θετικό εφαρμόζονται διάφορα κριτήρια όπως η σχετιζόμενη με την συγκέντρωση αύξηση στην περιοχή δοκιμής ή/και μία αναπαραγώγιμη αύξηση υπό μία ή περισσότερες συγκεντρώσεις στον αριθμό των ανάστροφων αποικιών ανά τρυβλίο σε ένα τουλάχιστον στέλεχος με ή χωρίς σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης (23). Θα πρέπει να εξετάζεται πρώτα η βιολογική σχετικότητα των αποτελεσμάτων. Ως βοήθημα στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των δοκιμών μπορούν να χρησιμοποιούνται και στατιστικές μέθοδοι (24). Εντούτοις, σε μία θετική απόκριση δεν θα πρέπει ως μοναδικός αποφασιστικός παράγοντας να λαμβάνεται η στατιστική σημαντικότητα.

Εφόσον τα αποτελέσματα για μία υπό δοκιμή ουσία δεν πληρούν τα ανωτέρω κριτήρια, η ουσία αυτή θεωρείται ως μη μεταλλαξιγόνος στο σύστημα αυτό.

Αν και τα περισσότερα πειράματα θα δίνουν σαφώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα, σε σπάνιες περιπτώσεις τα δεδομένα ενδέχεται να μην επιτρέπουν την εξαγωγή οριστικού συμπεράσματος σχετικά με τη δραστικότητα της υπό δοκιμή ουσίας. Τα αποτελέσματα μπορεί να παραμένουν διφορούμενα ή αμφισβητήσιμα άσχετα με το πόσες φορές θα επαναληφθεί το πείραμα.

Θετικά αποτελέσματα από τη δοκιμή βακτηριακής ανάστροφης μετάλλαξης δείχνουν ότι η υπό δοκιμή ουσία επάγει σημειακές μεταλλάξεις με υποκαταστάσεις βάσεων ή αλλαγές πλαισίου στο γονιδίωμα της Salmonella typhimurium ή/και Escherichia coli. Αρνητικά αποτελέσματα δείχνουν ότι, υπό τις συνθήκες της δοκιμής, η υπό δοκιμή ουσία δεν είναι μεταλλαξιγόνος στο εξεταζόμενο είδος.

3. **ΕΚΘΕΣΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ**

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Διαλύτης/φορέας:

— αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη/φορέα,

— διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας στο διαλύτη/φορέα, εφόσον είναι γνωστές.

Στελέχη:

— χρησιμοποιηθέντα στελέχη,

— αριθμός κυττάρων ανά καλλιέργεια,

— χαρακτηριστικά των στελεχών.

Συνθήκες δοκιμής:

— ποσότητα της υπό δοκιμή ουσίας ανά τρυβλίο (mg/τρυβλίο ή μl/τρυβλίο) με αιτιολόγηση της επιλογής της δόσεως και του αριθμού των τρυβλίων ανά συγκέντρωση,

— χρησιμοποιηθέν θρεπτικό μέσο,

— τύπος και σύσταση του συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης, συμπεριλαμβανομένων και των κριτηρίων αποδοχής,

— διαδικασίες κατεργασίας.

Αποτελέσματα:

— σημάδια τοξικότητας.

— σημάδια καθίζησης,

— επιμέρους κατά τρυβλίο αποτελέσματα μετρήσεων,

▼B

— μέσος αριθμός των ανάστροφων άποικων ανά τρυβλίο και τυπική απόκλιση,

— σχέση δόσης-απόκρισης, όπου είναι δυνατό,

— στατιστικές αναλύσεις, εφόσον υπάρχουν,

— παράλληλα στοιχεία για τους αρνητικούς (διαλύτης/φορέας) και θετικούς μάρτυρες, με ευρη, μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις,

— Προϋπάρχοντα στοιχεία για τους αρνητικούς (διαλύτης/φορέας) και θετικούς μάρτυρες, με εύρη, μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις.

Εξέταση των αποτελεσμάτων.

Συμπεράσματα.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) Ames, B. N., McCann,]. and Yamasaki E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/ Mammalian-Microsomc Mutagenicity Test, Mutation Res., 31, pp. 347-364.

(2) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res*., 113, pp. 173-215.

(3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L, Matsushima, T., Melcion, C, Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, Mutation Res., 312, pp. 217-233.

(4) Kier, L. D., Brusick, D.)., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M., Simmon, V. F., Dunkel, V., McCann,]., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T. K. and Ray V. (1986), The Salmonella typhimurium/Mam-malian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Res.. 168, pp. 69-240.

(5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer Letters.* 1. pp. 91-96.

(6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, in: Short-term Test *Systems for Detecting Carcinogens,* ed. Nor-poth K. H. and Garner, R. C., Springer. Bertin-Heidclberg-Ncw York, pp. 273-285.

(7) Gatehouse. D. G., Rowland, 1. R., Wilcox, P., Callender, R. D. and Foster R. (1980), Bacterial Mutation Assays, in: *Basic* Mutageniciry Tests: UKEMS *Part 1 Revised, e*d. D.). Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13-61.

(8) Aeschacher, H. U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987), Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods, J. Food *Safety, 8.* pp. 167-1 7 7.

(9) Green, M. H. L., Muriel, W. J. and Bridges, B. A. (1976), Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, *Mutations* Res., *38,* pp. 33-42.

(10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L, Gatehouse, D. and J. W. Bridges (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: *Handbook of Mutagenicity* Test *Procedures*, 2nd Edition, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141-161.

▼B

(11) Thompson, E. D. and Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of Salmonella *typhimurium, Environmental Mutagenesis,* 3, pp. 453-465.

(12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and T. Matsushima (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, Mutation Res., 307, pp. 335-344.

(13) Prival, M.)., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D. and Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay, Mutation Res., 136, pp. 33-47.

(14) Zeiger, E., Anderson B. E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992), Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.,* 19, pp. 2-141.

(15) Simmon, V., Kauhanen K. and Tardiff, R. G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in *Progress in Genetic* Toxicology, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249-258.

(16) Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, 1. G. and Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay, *Environmental Mutagenesis. 9,* pp. 421-441.

(17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M. and Sugimura T. (1979), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salomonella typhimurium. Cancer Res.,* 39, pp. 3780-3782.

(18) Tamura, G., Gold, C, Ferro-Luzzi, A. and Ames, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77,* pp. 4961-4965.

(19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D.). and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains, Mutagenesis, 5, pp. 285-291.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, in: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis *Testing,* eds. F. J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85-88.

(21) Elliot. B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Tatehouse, D, G., Gibson, G. G., Mackay,). M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, Mutagenesis, 7, pp. 175-177.

(22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test, Mutation Res., 88, pp. 343-350.

(23) Claxton. L. D., Allen J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987), Guide for the Salmonella typhimurium/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, Mutation Res., 189, pp. 83-91.

▼B

(24) Mahon, G. A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W. D. and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Part II. Statistical* Evaluation *of* Mutagenicity *Test Data,* ed. Kirkland, D.)., Cambridge University Press, pp. 28-65.

▼M7

———————

———————

▼M8

Β.17. *IN VITRO* ΔΟΚΙΜΕΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ HPRT ΚΑΙ XPRT

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 476 του ΟΟΣΑ (2016). Οι μέθοδοι δοκιμών επανεξετάζονται κατά περιόδους υπό το φως των επιστημονικών εξελίξεων, των μεταβαλλόμενων κανονιστικών αναγκών και της καλής μεταχείρισης των ζώων. Η παρούσα αναθεωρημένη έκδοση της μεθόδου δοκιμών Β.17 αντικατοπτρίζει σχεδόν τριάντα χρόνια εμπειρίας με τη συγκεκριμένη δοκιμή και, επίσης, είναι το αποτέλεσμα της ανάπτυξης μιας χωριστής μεθόδου δοκιμών που αφορά τις *in vitro* δοκιμές γονιδιακής μετάλλαξης σε κύτταρα θηλαστικών με χρήση του γονιδίου της θυμιδινοκινάσης. Η μέθοδος δοκιμών Β.17 αποτελεί μέρος μιας σειράς μεθόδων δοκιμών γενετικής τοξικολογίας. Ο ΟΟΣΑ έχει συντάξει ένα έγγραφο με συνοπτικές πληροφορίες για τις δοκιμές γενετικής τοξικολογίας και μια επισκόπηση των πρόσφατων αλλαγών που έγιναν στις κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών του ΟΟΣΑ για τη γενετική τοξικολογία (1).

2. Ο σκοπός της *in vitro* δοκιμής γονιδιακής μετάλλαξης σε κύτταρα θηλαστικών είναι η ανίχνευση γονιδιακών μεταλλάξεων που προκαλούνται από χημικές ουσίες. Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται στις δοκιμές αυτές μετρούν τις εξελικτικές μεταλλάξεις σε γονίδια αναφοράς, συγκεκριμένα στο ενδογενές γονίδιο της φωσφοριβοζυλοτρανσφεράσης υποξανθίνης–γουανίνης (Hprt σε κύτταρα τρωκτικών, HPRT σε ανθρώπινα κύτταρα· αποκαλούμενα συλλογικά «γονίδιο Hprt» και «δοκιμή HPRT» στην παρούσα μέθοδο δοκιμών), και στο διαγονίδιο φωσφοριβοζυλοτρανσφεράσης ξανθίνης–γουανίνης (gpt) (αποκαλούμενη «δοκιμή XPRT»). Οι δοκιμές μετάλλαξης HPRT και XPRT ανιχνεύουν διαφορετικά φάσματα γενετικών συμβάντων. Πέραν των συμβάντων μετάλλαξης που ανιχνεύονται από τη δοκιμή HPRT (π.χ. υποκαταστάσεις ζευγών βάσεων, μετατοπίσεις αναγνωστικού πλαισίου, μικρές απαλείψεις και ενθέσεις), το γεγονός ότι το διαγονίδιο gpt βρίσκεται σε αυτοσώματα μπορεί να επιτρέψει την ανίχνευση μεταλλάξεων που οφείλονται σε μεγάλες απαλείψεις και πιθανώς μιτωτικό ανασυνδυασμό που δεν ανιχνεύονται από τη δοκιμή HPRT, διότι το γονίδιο Hprt βρίσκεται στο χρωμόσωμα X (2) (3) (4) (5) (6) (7). Η χρήση της δοκιμής XPRT για κανονιστικούς σκοπούς είναι επί του παρόντος λιγότερο διαδεδομένη σε σύγκριση με τη δοκιμή HPRT.

3. Οι χρησιμοποιούμενοι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

4. Στις δοκιμές που διεξάγονται *in vitro* απαιτείται εν γένει η χρήση εξωγενούς πηγής μεταβολικής ενεργοποίησης. Το εξωγενές σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης δεν μιμείται απόλυτα τις συνθήκες που επικρατούν *in vivo*.

5. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγονται συνθήκες που μπορούν να οδηγήσουν σε τεχνητά θετικά αποτελέσματα, δηλ. πιθανή αλληλεπίδραση με το σύστημα δοκιμής, που δεν προκύπτουν από την άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και του γενετικού υλικού του κυττάρου· στις συνθήκες αυτές περιλαμβάνονται οι μεταβολές του pH ή της ωσμωμοριακότητας (8) (9) (10), η αλληλεπίδραση με τα συστατικά του θρεπτικού μέσου (11) (12), ή τα υπέρμετρα επίπεδα κυτταροτοξικότητας (13). Η κυτταροτοξικότητα που υπερβαίνει τα συνιστώμενα μέγιστα επίπεδα κυτταροτοξικότητας, όπως ορίζονται στην παράγραφο 19, θεωρείται υπέρμετρη για τη δοκιμή HPRT.

▼**M8**

6. Πριν από τη χρήση της μεθόδου δοκιμών σε μείγμα για την παραγωγή δεδομένων για συγκεκριμένο ρυθμιστικό σκοπό, θα πρέπει να εξετάζεται αν –και, εάν ναι, για ποιον λόγο– μπορεί να αποδώσει επαρκή αποτελέσματα για τον επιδιωκόμενο σκοπό. Οι εκτιμήσεις αυτές δεν είναι αναγκαίες όταν οι κανονιστικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τον έλεγχο του μείγματος.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

7. Τα μεταλλαγμένα κύτταρα που παρουσιάζουν έλλειψη δραστηριότητας του ενζύμου Hprt στη δοκιμή HPRT ή δραστηριότητας του ενζύμου xprt στη δοκιμή XPRT παρουσιάζουν αντοχή στα κυτταροστατικά αποτελέσματα της 6-θειογουανίνης (TG), ενός αναλόγου πουρίνης. Τα κύτταρα με δραστηριότητα Hprt (στη δοκιμή HPRT) ή gpt (στη δοκιμή XPRT) είναι ευαίσθητα στην TG, η οποία αναστέλλει τον κυτταρικό μεταβολισμό και σταματά την περαιτέρω κυτταρική διαίρεση. Έτσι, τα μεταλλαγμένα κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιάζονται παρουσία TG, ενώ τα φυσιολογικά κύτταρα, τα οποία περιέχουν το ένζυμο Hprt (στη δοκιμή HPRT) ή gpt (στη δοκιμή XPRT), δεν μπορούν.

8. Τα υπό μορφή εναιωρήματος ή μονοστρωματικής καλλιέργειας κύτταρα εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία, με και χωρίς εξωγενή πηγή μεταβολικής ενεργοποίησης (βλ. παράγραφο 14), για κατάλληλο χρονικό διάστημα (3-6 ώρες) και κατόπιν ανακαλλιεργούνται για να προσδιοριστεί η κυτταροτοξικότητα και για να επιτραπεί η φαινοτυπική έκφραση πριν από την επιλογή των προϊόντων μετάλλαξης (14) (15) (16) (17). Η κυτταροτοξικότητα προσδιορίζεται βάσει της σχετικής επιβίωσης (RS), δηλαδή της απόδοσης της κλωνοποίησης μετρούμενης αμέσως μετά την αγωγή και διορθωμένης ως προς τυχόν απώλεια κυττάρων κατά την αγωγή σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα (παράγραφος 18 και προσάρτημα 2). Οι καλλιέργειες υπό αγωγή διατηρούνται σε θρεπτικό μέσο για ικανό χρονικό διάστημα που είναι χαρακτηριστικό για κάθε κυτταρικό τύπο, ώστε να μπορέσει να επιτευχθεί η βέλτιστη δυνατή φαινοτυπική έκφραση των προκληθεισών μεταλλάξεων (συνήθως 7-9 ημέρες τουλάχιστον). Μετά τη φαινοτυπική έκφραση προσδιορίζεται η συχνότητα των προϊόντων μετάλλαξης με ανακαλλιέργεια γνωστού αριθμού κυττάρων σε θρεπτικό μέσο που περιέχει τον παράγοντα επιλογής για την ανίχνευση αποικιών μεταλλαγμένων κυττάρων και σε θρεπτικό μέσο χωρίς παράγοντα επιλογής για τον προσδιορισμό της απόδοσης της κλωνοποίησης (βιωσιμότητα). Έπειτα από κατάλληλο χρόνο επώασης, μετρούνται οι αποικίες. Η συχνότητα των προϊόντων μετάλλαξης υπολογίζεται βάσει του αριθμού μεταλλαγμένων αποικιών, διορθωμένου ως προς την απόδοση κλωνοποίησης κατά τη χρονική στιγμή της επιλογής των προϊόντων μετάλλαξης.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Προπαρασκευή

Κύτταρα

9. Οι κυτταρικοί τύποι που χρησιμοποιούνται για τις δοκιμές HPRT και XPRT θα πρέπει να έχουν αποδεδειγμένη ευαισθησία σε χημικά μεταλλαξιγόνα, υψηλή απόδοση κλωνοποίησης, σταθερό καρυότυπο και σταθερή συχνότητα προϊόντων αυθόρμητης μετάλλαξης. Μεταξύ των κυττάρων που χρησιμοποιούνται συνηθέστερα για τη δοκιμή HPRT περιλαμβάνονται οι κυτταρικές σειρές κινεζικού κρικητού CHO, CHL και V79, τα λεμφωματικά κύτταρα ποντικού L5178Y και τα ανθρώπινα λεμφοβλαστοειδή κύτταρα TK6 (18) (19). Για τη δοκιμή XPRT χρησιμοποιούνται κύτταρα AS52 προερχόμενα από CHO που περιέχουν το διαγονίδιο gpt (και με απαλειφθέν το γονίδιο Hprt) (20) (21)· η δοκιμή HPRT δεν μπορεί να διεξαχθεί σε κύτταρα AS52, διότι το γονίδιο hprt έχει απαλειφθεί. Η χρήση άλλων κυτταρικών σειρών θα πρέπει να αιτιολογείται και να επικυρώνεται.

10. Θα πρέπει να ελέγχονται τακτικά στις κυτταρικές σειρές η σταθερότητα του χαρακτηριστικού χρωμοσωμικού αριθμού και η απουσία μόλυνσης από μυκόπλασμα (22) (23) και τα κύτταρα δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται εάν έχουν μολυνθεί ή εάν έχει μεταβληθεί ο χαρακτηριστικός χρωμοσωμικός αριθμός. Η φυσιολογική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου που χρησιμοποιείται στο εργαστήριο δοκιμών θα πρέπει να καθορίζεται και να είναι συνεπής

▼M8

με τα δημοσιευμένα χαρακτηριστικά των κυττάρων. Η συχνότητα προϊόντων αυθόρμητης μετάλλαξης στο κύριο απόθεμα κυττάρων θα πρέπει επίσης να ελέγχεται, και το απόθεμα δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται σε περίπτωση που η συχνότητα προϊόντων μετάλλαξης δεν είναι αποδεκτή.

11. Πριν χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή αυτή, οι καλλιέργειες ενδέχεται να χρειάζεται να καθαριστούν από προϋπάρχοντα μεταλλαγμένα κύτταρα, π.χ. μέσω καλλιέργειας σε θρεπτικό μέσο HAT για τη δοκιμή HPRT και MPA για τη δοκιμή XPRT (5) (24) (βλ. προσάρτημα 1). Τα καθαρισμένα κύτταρα μπορούν να κρυοσυντηρούνται και, στη συνέχεια, να αποψύχονται για χρήση ως καλλιέργειες εργασίας. Η πρόσφατα αποψυχθείσα καλλιέργεια εργασίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη δοκιμή αφού επιτευχθούν οι φυσιολογικοί χρόνοι διπλασιασμού. Κατά τη διεξαγωγή της δοκιμής XPRT, για τη συνήθη καλλιέργεια κυττάρων AS52 θα πρέπει να χρησιμοποιούνται συνθήκες που διασφαλίζουν τη διατήρηση του διαγονιδίου gpt (20).

Θρεπτικά μέσα και συνθήκες καλλιέργειας

12. Για τη διατήρηση των καλλιεργειών θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλο θρεπτικό μέσο και κατάλληλες συνθήκες επώασης (δοχεία καλλιέργειας, ατμόσφαιρα με ύγρανση και 5 % CO_2, θερμοκρασία επώασης 37 °C). Οι κυτταρικές καλλιέργειες θα πρέπει πάντοτε να διατηρούνται υπό συνθήκες που διασφαλίζουν ότι αναπτύσσονται κατά τη λογαριθμική φάση. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι να επιλέγεται το θρεπτικό μέσο και οι συνθήκες καλλιέργειας έτσι ώστε να διασφαλίζεται η βέλτιστη ανάπτυξη των κυττάρων κατά τη διάρκεια της περιόδου έκφρασης και η βέλτιστη απόδοση κλωνοποίησης μεταλλαγμένων και μη κυττάρων.

Ετοιμασία των καλλιεργειών

13. Οι κυτταρικές σειρές πολλαπλασιάζονται από αποθεματικές καλλιέργειες εμβολιαζόμενες σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας σε πυκνότητα τέτοια ώστε τα υπό μορφή εναιωρήματος ή μονοστιβάδας κύτταρα να εξακολουθούν να αναπτύσσονται εκθετικά κατά τις περιόδους αγωγής και έκφρασης (π.χ. θα πρέπει να αποφεύγεται η συρροή κυττάρων που αναπτύσσονται σε μονοστιβάδες).

Μεταβολική ενεργοποίηση

14. Όταν χρησιμοποιούνται κύτταρα με ανεπαρκή ενδογενή μεταβολική ικανότητα, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται εξωγενή συστήματα μεταβολισμού. Το πιο κοινό σύστημα, που συνιστάται ως προεπιλογή, εκτός αντίθετης αιτιολόγησης, είναι ένα μεταμιτοχονδριακό κλάσμα εμπλουτισμένο με συμπαράγοντα (S9), που παρασκευάζεται από ήπαρ τρωκτικών (κατά κανόνα επιμύων) και το οποίο έχει υποβληθεί σε κατεργασία με ενζυμοεπαγωγικούς παράγοντες όπως το Aroclor 1254 (25) (26) (27) (28) ή ο συνδυασμός φαινοβαρβιτάλης και β-ναφθοφλαβόνης (29) (30) (31) (32). Ο συνδυασμός αυτός δεν αντιβαίνει στη Σύμβαση της Στοκχόλμης για τους έμμονους οργανικούς ρύπους (33) και έχει αποδειχθεί εξίσου αποτελεσματικός με το Aroclor 1254 στην επαγωγή οξειδασών μεικτής λειτουργίας (29) (31). Το κλάσμα S9 χρησιμοποιείται συνήθως σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 1 έως 2 % (κ.ό.), αλλά οι οποίες επιτρέπεται να αυξηθούν σε 10 % (κ.ό.) στο τελικό θρεπτικό μέσο της δοκιμής. Η επιλογή του τύπου και της συγκέντρωσης του χρησιμοποιούμενου εξωγενούς συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης ή μεταβολικού επαγωγέα μπορεί να επηρεαστεί από την κατηγορία των υπό δοκιμή ουσιών (34) (35) (36).

Προπαρασκευή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας

15. Οι στερεές υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να παρασκευάζονται σε κατάλληλους διαλύτες και να αραιώνονται, εφόσον απαιτείται, πριν από την αγωγή των κυττάρων (βλ. παράγραφο 16). Οι υγρές υπό δοκιμή χημικές ουσίες επιτρέπεται να προστίθενται κατευθείαν στο σύστημα δοκιμής και/ή να αραιώνονται πριν από την αγωγή του συστήματος δοκιμής. Οι αέριες ή πτητικές υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να υποβάλλονται στη δοκιμή με κατάλληλες τροποποιήσεις των τυποποιημένων πρωτοκόλλων, π.χ. αγωγή σε σφραγισμένα δοχεία καλλιέργειας (37) (38). Τα σκευάσματα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να ετοιμάζονται ακριβώς πριν από την αγωγή, εκτός αν τα στοιχεία σχετικά με τη σταθερότητα της ουσίας αποδεικνύουν ότι είναι αποδεκτή η φύλαξη.

▼M8

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Διαλύτες

16. Θα πρέπει να επιλέγεται διαλύτης που να προσφέρει τη μεγαλύτερη διαλυτότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, χωρίς να επηρεάζει δυσμενώς τη διεξαγωγή της δοκιμής, π.χ. μεταβάλλοντας την ανάπτυξη των κυττάρων, αλλοιώνοντας την υπό δοκιμή χημική ουσία, αντιδρώντας με τα δοχεία καλλιέργειας ή αποδυναμώνοντας το σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης. Συνιστάται να εξετάζεται πρώτα, στο μέτρο του δυνατού, αν μπορεί να χρησιμοποιηθεί υδατικός διαλύτης (ή θρεπτικό μέσο καλλιέργειας). Καθιερωμένοι διαλύτες είναι, για παράδειγμα, το νερό και το διμεθυλοσουλφοξείδιο. Η συγκέντρωση του διαλύτη στο τελικό θρεπτικό μέσο αγωγής δεν θα πρέπει να υπερβαίνει γενικά το 1 % κ.ό., προκειμένου για οργανικούς διαλύτες, και το 10 % κ.ό. στην περίπτωση των υδατικών διαλυτών (αλατούχο διάλυμα ή νερό). Εάν χρησιμοποιούνται άλλοι πλην των καθιερωμένων διαλυτών (π.χ. αιθανόλη ή ακετόνη), η χρήση τους θα πρέπει να τεκμηριώνεται με στοιχεία που αποδεικνύουν τη συμβατότητά τους με τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες και με το σύστημα δοκιμών, καθώς και την απουσία γενετικής τοξικότητας στη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση. Εάν δεν υπάρχουν αυτά τα στοιχεία, είναι σημαντικό να προστίθενται μάρτυρες που δεν υποβάλλονται σε αγωγή (βλ. προσάρτημα 1) για να αποδεικνύεται ότι ο επιλεγμένος διαλύτης δεν επάγει επιβλαβείς ή μεταλλαξιγόνες επιδράσεις.

Μέτρηση της κυτταροτοξικότητας και επιλογή συγκεντρώσεων έκθεσης

17. Κατά τον καθορισμό της υψηλότερης συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να αποφεύγονται οι συγκεντρώσεις που μπορούν να οδηγήσουν σε τεχνητά θετικές αποκρίσεις, όπως εκείνες που προκαλούν υπέρμετρη κυτταροτοξικότητα (βλ. παράγραφο 20), καθίζηση στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (βλ. παράγραφο 21) ή έντονες μεταβολές του pH ή της ωσμωμοριακότητας (βλ. παράγραφο 5). Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία προκαλεί έντονη μεταβολή του pH του θρεπτικού μέσου κατά την προσθήκη της, το pH μπορεί να ρυθμίζεται με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος στο τελικό θρεπτικό μέσο αγωγής, με σκοπό να αποφεύγονται τα τεχνητά θετικά αποτελέσματα και να διατηρούνται κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας.

18. Η επιλογή συγκεντρώσεων βασίζεται στην κυτταροτοξικότητα και άλλες παραμέτρους (βλ. παραγράφους 20-22). Μολονότι η αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας σε αρχική προκαταρκτική δοκιμή μπορεί να είναι χρήσιμη για τον ακριβέστερο καθορισμό των συγκεντρώσεων που θα χρησιμοποιηθούν στο κύριο πείραμα, δεν είναι υποχρεωτική η διεξαγωγή αρχικής δοκιμής. Ακόμη και εάν διενεργηθεί αρχική αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας, εξακολουθεί να απαιτείται η μέτρηση της κυτταροτοξικότητας για κάθε καλλιέργεια στο κύριο πείραμα. Η κυτταροτοξικότητα θα πρέπει να αξιολογείται με χρήση της RS, δηλαδή της απόδοσης κλωνοποίησης (CE) κυττάρων επιστρωμένων αμέσως μετά την αγωγή, προσαρμοσμένης ως προς τυχόν απώλεια κυττάρων κατά τη διάρκεια της αγωγής, βάσει του καταμετρούμενου αριθμού κυττάρων, σε σύγκριση με την προσαρμοσμένη απόδοση κλωνοποίησης στους αρνητικούς μάρτυρες (στους οποίους έχει αποδοθεί επιβίωση 100 %) (βλ. προσάρτημα 2 για τον τύπο).

19. Θα πρέπει να αξιολογούνται τουλάχιστον τέσσερις συγκεντρώσεις δοκιμής (χωρίς τον διαλύτη και τους θετικούς μάρτυρες) που πληρούν τα κριτήρια αποδοχής (ενδεδειγμένη κυτταροτοξικότητα, αριθμός κυττάρων κ.λπ.). Αν και συνιστάται η χρήση διπλών καλλιεργειών, μπορούν να χρησιμοποιούνται σε κάθε συγκέντρωση δοκιμής είτε πολλαπλές πανομοιότυπες καλλιέργειες (επαναλήψεις) είτε μοναδικές καλλιέργειες. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις ανεξάρτητες πανομοιότυπες καλλιέργειες σε δεδομένη συγκέντρωση θα πρέπει να αναφέρονται χωριστά αλλά μπορούν να συνενώνονται για την ανάλυση δεδομένων (17). Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες με ελάχιστη ή μηδενική κυτταροτοξικότητα, κατάλληλες είναι συνήθως οι συγκεντρώσεις που απέχουν μεταξύ τους κατά συντελεστή ίσο με 2 ή 3 περίπου. Σε περίπτωση κυτταροτοξικότητας, οι επιλεγόμενες συγκεντρώσεις δοκιμής θα πρέπει να καλύπτουν ένα πεδίο τιμών που ξεκινά από τη συγκέντρωση που προκαλεί την κυτταροτοξικότητα και φθάνει μέχρι τις συγκεντρώσεις στις οποίες παρατηρείται μέτρια και ελάχιστη ή μηδενική κυτταροτοξικότητα. Πολλές υπό δοκιμή χημικές ουσίες παρουσιάζουν καμπύλες

▼M8

συγκέντρωσης-απόκρισης με μεγάλη κλίση και, για να καλυφθεί το συνολικό φάσμα κυτταροτοξικότητας ή για να μελετηθεί λεπτομερώς η σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης, μπορεί να είναι αναγκαία η χρήση συγκεντρώσεων με μικρότερα διαστήματα μεταξύ τους και περισσότερων από τέσσερις συγκεντρώσεις, ιδίως σε περιπτώσεις όπου απαιτείται επανάληψη του πειράματος (βλ. παράγραφο 43). Η χρήση περισσότερων από 4 συγκεντρώσεις μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντική όταν χρησιμοποιούνται μονές καλλιέργειες.

20. Εάν η μέγιστη συγκέντρωση βασίζεται στην κυτταροτοξικότητα, η υψηλότερη συγκέντρωση θα πρέπει να αποσκοπεί στην επίτευξη μεταξύ 20 και 10 % RS. Τα θετικά αποτελέσματα που προκύπτουν μόνο σε 10 % RS ή χαμηλότερο θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή (παράγραφος 43).

21. Για δυσδιάλυτες υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν είναι κυτταροτοξικές σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από τη συγκέντρωση μέγιστης διαλυτότητας, η αναλυόμενη μέγιστη συγκέντρωση θα πρέπει να παράγει θολερότητα ή ίζημα ορατό με γυμνό οφθαλμό ή με τη βοήθεια ανεστραμμένου μικροσκοπίου στο τέλος της αγωγής με την υπό δοκιμή χημική ουσία. Ακόμη και αν εμφανίζεται κυτταροτοξικότητα σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από τη συγκέντρωση μέγιστης διαλυτότητας, συνιστάται να διεξάγεται η δοκιμή σε μία μόνο συγκέντρωση που παράγει θολερότητα ή ορατό ίζημα, διότι μπορεί να προκύψουν τεχνητές επιδράσεις από το ίζημα. Στη συγκέντρωση που παράγει ίζημα, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να διασφαλίζεται ότι αυτό δεν παρεμποδίζει τη διεξαγωγή της δοκιμής. Ο προσδιορισμός της διαλυτότητας στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας πριν από το πείραμα μπορεί να είναι χρήσιμος.

22. Εάν δεν παρατηρηθεί ίζημα ούτε περιοριστική κυτταροτοξικότητα, η ανώτατη συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να αντιστοιχεί στη μικρότερη από τις τιμές 10 mM, 2 mg/ml ή 2 μl/ml (39) (40). Όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν έχει καθορισμένη σύνθεση, π.χ. ουσία άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, προϊόντα πολύπλοκων αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά [δηλ. χημικές ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης (UVCB)] (41), εκχυλίσματα από το περιβάλλον κ.λπ., η ανώτατη συγκέντρωση θα πρέπει ενδεχομένως να είναι υψηλότερη (π.χ. 5 mg/ml), ελλείψει επαρκούς κυτταροτοξικότητας, προκειμένου να αυξηθεί η συγκέντρωση του κάθε συστατικού. Επισημαίνεται, ωστόσο, ότι οι απαιτήσεις αυτές μπορεί να διαφέρουν για τα φαρμακευτικά προϊόντα για τον άνθρωπο (42).

Μάρτυρες

23. Για κάθε συνθήκη του πειράματος, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες (βλ. παράγραφο 16), αποτελούμενοι μόνο από τον διαλύτη στο θρεπτικό μέσο της αγωγής και υποβαλλόμενοι στην ίδια μεταχείριση όπως και οι καλλιέργειες.

24. Απαιτούνται παράλληλοι θετικοί μάρτυρες για να αποδεικνύεται αφενός η ικανότητα του εργαστηρίου να αναγνωρίζει τα μεταλλαξιγόνα υπό τις συνθήκες του χρησιμοποιούμενου πρωτοκόλλου δοκιμής και, αφετέρου, η αποτελεσματικότητα του εξωγενούς συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης, κατά περίπτωση. Παραδείγματα θετικών μαρτύρων παρέχονται κατωτέρω στον πίνακα 1. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικές ουσίες-θετικοί μάρτυρες, εφόσον η χρήση τους αιτιολογείται. Επειδή οι δοκιμές *in vitro* γενετικής τοξικότητας σε κύτταρα θηλαστικών είναι επαρκώς τυποποιημένες, επιτρέπεται η διεξαγωγή δοκιμών με χρήση αγωγών με και χωρίς εξωγενή μεταβολική ενεργοποίηση με χρήση ενός μόνο θετικού μάρτυρα για τον οποίο απαιτείται μεταβολική ενεργοποίηση. Στην περίπτωση αυτή, η εν λόγω μοναδική απόκριση στον θετικό μάρτυρα θα καταδείξει τόσο τη δραστηριότητα του συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης όσο και την αποκρισιμότητα του συστήματος δοκιμών. Κάθε θετικός μάρτυρας θα πρέπει να χρησιμοποιείται σε μία ή περισσότερες συγκεντρώσεις που αναμένεται να έχουν ως αποτέλεσμα αναπαραγώγιμη και ανιχνεύσιμη αύξηση σε σχέση με την τιμή υποβάθρου, για να καταδεικνύεται η ευαισθησία του συστήματος δοκιμής, και η απόκριση δεν θα πρέπει να διακυβεύεται εξαιτίας κυτταροτοξικότητας που υπερβαίνει τα όρια που προβλέπονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών (βλ. παράγραφο 20).

▼**M8**

Πίνακας 1

Συνιστώμενες ουσίες αναφοράς για την αξιολόγηση της τεχνικής ικανότητας του εργαστηρίου και την επιλογή θετικών μαρτύρων

Συνθήκη μεταβολικής ενεργοποίησης	Γενετικός τόπος	Ουσία και αριθ. CAS
Απουσία εξωγενούς μεταβολικής ενεργοποίησης	*Hprt*	Μεθανοσουλφονικός αιθυλεστέρας [αριθ. CAS 62-50-0] Αιθυλονιτροζουρία [αριθ. CAS 759-73-9] 4-Νιτροκινολιν-Ν-οξείδιο [αριθ. CAS 56-57-5]
	xprt	Στρεπτονιγρίνη [αριθ. CAS 3930-19-6] Μιτομυκίνη C [αριθ. CAS 50-07-7]
Παρουσία εξωγενούς μεταβολικής ενεργοποίησης	*Hprt*	3-Μεθυλοχολανθρένιο [αριθ. CAS 56-49-5] 7,12-Διμεθυλοβενζανθρακένιο [αριθ. CAS 57-97-6] Βενζο[a]πυρένιο [αριθ. CAS 50-32-8]
	xprt	Βενζο[a]πυρένιο [αριθ. CAS 50-32-8]

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία

25. Πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα υποβάλλονται σε αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία με και χωρίς σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης. Η έκθεση θα πρέπει να διαρκεί για κατάλληλο χρονικό διάστημα (συνήθως 3 έως 6 ώρες αρκούν).

26. Ο ελάχιστος αριθμός χρησιμοποιούμενων κυττάρων για κάθε καλλιέργεια (μάρτυρα και αγωγής) δοκιμής σε κάθε στάδιο της δοκιμής θα πρέπει να βασίζεται στην αυθόρμητη συχνότητα προϊόντων μετάλλαξης. Μια γενική κατεύθυνση είναι η αγωγή και ανακαλλιέργεια επαρκούς αριθμού κυττάρων ώστε να διατηρούνται 10 προϊόντα αυθόρμητης μετάλλαξης σε κάθε καλλιέργεια, σε όλες τις φάσεις της δοκιμής (17). Η συχνότητα προϊόντων αυθόρμητης μετάλλαξης κυμαίνεται γενικά μεταξύ 5 και 20×10^{-6}. Για συχνότητα προϊόντων αυθόρμητης μετάλλαξης 5×10^{-6} και για τη διατήρηση επαρκούς αριθμού προϊόντων αυθόρμητης μετάλλαξης (10 ή περισσότερα) ακόμη και για καλλιέργειες που υποβάλλονται σε αγωγή σε συγκεντρώσεις που προκαλούν 90 % κυτταροτοξικότητα στη διάρκεια της αγωγής (10 % RS), θα χρειαστεί να υποβληθούν σε αγωγή τουλάχιστον 20×10^{6} κύτταρα. Επιπλέον, επαρκής αριθμός κυττάρων (ποτέ λιγότερα από 2 εκατομμύρια) πρέπει να καλλιεργείται κατά την περίοδο έκφρασης και να επιστρώνεται για επιλογή προϊόντων μετάλλαξης (17).

Χρόνος φαινοτυπικής έκφρασης και μέτρηση της συχνότητας προϊόντων μετάλλαξης

27. Μετά την περίοδο αγωγής, τα κύτταρα καλλιεργούνται με σκοπό να καταστεί δυνατή η έκφραση του μεταλλαγμένου φαινοτύπου. Γενικά, ένα ελάχιστο χρονικό διάστημα 7 έως 9 ημερών αρκεί ώστε να επιτευχθεί σχεδόν βέλτιστη φαινοτυπική έκφραση των νέων προκληθεισών μεταλλάξεων Hprt και xprt (43) (44). Στη διάρκεια της περιόδου αυτής, τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται τακτικά ώστε να αναπτύσσονται συνεχώς με εκθετικούς ρυθμούς. Μετά τη φαινοτυπική έκφραση, τα κύτταρα επιστρώνονται εκ νέου σε θρεπτικό μέσο με και χωρίς παράγοντα επιλογής (6-θειογουανίνη) με σκοπό τον προσδιορισμό του αριθμού των προϊόντων μετάλλαξης και της απόδοσης κλωνοποίησης, αντίστοιχα, κατά τη χρονική στιγμή της επιλογής. Η εν λόγω επίστρωση μπορεί να πραγματοποιείται με τρυβλία για καλλιέργειες μονοστιβάδας ή τρυβλία μικροτιτλοδότησης για κύτταρα υπό μορφή εναιωρήματος. Για την επιλογή προϊόντων μετάλλαξης, τα κύτταρα θα πρέπει να επιστρώνονται σε πυκνότητα τέτοια ώστε να διασφαλίζεται η βέλτιστη ανάκτηση των προϊόντων μετάλλαξης (δηλ. να αποφεύγεται η μεταβολική συνεργασία) (17). Τα τρυβλία επωάζονται για κατάλληλο χρονικό διάστημα με σκοπό τη βέλτιστη ανάπτυξη αποικιών (π.χ. 7-12 ημέρες) και καταμετράται ο αριθμός των αποικιών. Η συχνότητα των προϊόντων μετάλλαξης υπολογίζεται βάσει του αριθμού μεταλλαγμένων αποικιών, διορθωμένου ως προς την απόδοση κλωνοποίησης κατά τη χρονική στιγμή της επιλογής των προϊόντων μετάλλαξης (βλ. προσάρτημα 2 για τους τύπους).

▼M8

Τεχνική ικανότητα του εργαστηρίου

28. Για να εξασφαλίσει επαρκή εμπειρία στη διεξαγωγή της δοκιμής πριν την εντάξει στην τρέχουσα πρακτική του, το εργαστήριο θα πρέπει να έχει πραγματοποιήσει σειρά πειραμάτων με θετικές χημικές ουσίες αναφοράς που ενεργούν μέσω διαφόρων μηχανισμών (τουλάχιστον μία που ενεργεί με και μία που ενεργεί χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση, επιλεγμένες μεταξύ των χημικών ουσιών που απαριθμούνται στον πίνακα 1) και διάφορους αρνητικούς μάρτυρες (περιλαμβανομένων διαφόρων διαλυτών/φορέων). Οι αποκρίσεις των εν λόγω θετικών και αρνητικών μαρτύρων θα πρέπει να συμφωνούν με τη βιβλιογραφία. Αυτό δεν ισχύει για τα εργαστήρια που έχουν πείρα, δηλ. διαθέτουν βάση ιστορικών δεδομένων, όπως ορίζεται στις παραγράφους 30 έως 33.

29. Θα πρέπει να διερευνάται ένα σύνολο επιλεγμένων χημικών ουσιών (βλ. πίνακα 1 στην παράγραφο 25) απουσία και παρουσία μεταβολικής ενεργοποίησης, προκειμένου να καταδεικνύεται η τεχνική ικανότητα ανίχνευσης μεταλλαξιγόνων χημικών ουσιών, να διαπιστώνεται η αποτελεσματικότητα του συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης και να καταδεικνύεται η καταλληλότητα των συνθηκών ανάπτυξης κυττάρων στη διάρκεια της αγωγής, της φαινοτυπικής έκφρασης και της επιλογής προϊόντων μετάλλαξης, καθώς και των διαδικασιών καταμέτρησης. Θα πρέπει να επιλέγεται ένα εύρος συγκεντρώσεων των επιλεγμένων χημικών ουσιών που να επιφέρουν αναπαραγώγιμες και σχετιζόμενες με τη συγκέντρωση αυξήσεις σε σχέση με τις τιμές υποβάθρου, για να αποδεικνύονται η ευαισθησία και το δυναμικό εύρος του συστήματος δοκιμής.

Ιστορικά δεδομένα για μάρτυρες

30. Το εργαστήριο θα πρέπει να καθορίζει:

— εύρος και κατανομή ιστορικών δεδομένων για θετικούς μάρτυρες,

— εύρος και κατανομή ιστορικών δεδομένων για αρνητικούς μάρτυρες (χωρίς αγωγή, με διαλύτη).

31. Κατά την αρχική συγκέντρωση δεδομένων για ιστορική κατανομή όσον αφορά τους αρνητικούς μάρτυρες, οι παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες θα πρέπει να συμφωνούν με τα δημοσιευμένα δεδομένα για μάρτυρες (22). Καθώς θα προστίθενται περισσότερα πειραματικά δεδομένα στην κατανομή των μαρτύρων, οι παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες θα πρέπει, στην ιδανική περίπτωση, να βρίσκονται εντός των ορίων ελέγχου σε επίπεδο 95 % της εν λόγω κατανομής (17) (45) (46).

32. Η βάση ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για αρνητικούς μάρτυρες θα πρέπει αρχικά να δημιουργείται με δεδομένα από τουλάχιστον 10 πειράματα, αν και είναι προτιμότερο να αποτελείται από τουλάχιστον 20 πειράματα που έχουν εκτελεστεί σε συγκρίσιμες πειραματικές συνθήκες. Τα εργαστήρια θα πρέπει να χρησιμοποιούν μεθόδους ποιοτικού ελέγχου, όπως διαγράμματα ελέγχου [π.χ. διαγράμματα C ή X-bar (47)], για να προσδιορίζουν τη μεταβλητότητα των δεδομένων τους που αφορούν τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες και να αποδεικνύουν ότι έχουν τη μεθοδολογία υπό έλεγχο (46). Περαιτέρω συστάσεις για τον τρόπο δημιουργίας και χρήσης των ιστορικών δεδομένων (δηλ. κριτήρια προσθήκης στοιχείων στα ιστορικά δεδομένα και αποκλεισμού στοιχείων από αυτά, καθώς και κριτήρια αποδοχής συγκεκριμένου πειράματος) έχουν διατυπωθεί στη βιβλιογραφία (45).

33. Τα δεδομένα για αρνητικούς μάρτυρες θα πρέπει να αποτελούνται από τις συχνότητες προϊόντων μετάλλαξης από μονές καλλιέργειες ή, κατά προτίμηση, από πανομοιότυπες καλλιέργειες, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 23. Οι παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες θα πρέπει, στην ιδανική περίπτωση, να βρίσκονται εντός των ορίων ελέγχου σε επίπεδο 95 % της κατανομής της βάσης ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για αρνητικούς μάρτυρες (17) (45) (46). Όταν τα δεδομένα για παράλληλους αρνητικούς μάρτυρες δεν βρίσκονται εντός του ορίου ελέγχου σε επίπεδο 95 %, μπορεί να είναι αποδεκτή η προσθήκη τους στην ιστορική κατανομή μαρτύρων, εφόσον τα εν λόγω δεδομένα δεν είναι ακραίες έκτοπες τιμές και υπάρχουν στοιχεία που αποδεικνύουν ότι το σύστημα δοκιμής είναι υπό έλεγχο (βλ. ανωτέρω) και ότι δεν πρόκειται για τεχνικό ή ανθρώπινο σφάλμα.

▼M8

34. Κάθε αλλαγή του πειραματικού πρωτοκόλλου θα πρέπει να μελετάται υπό το πρίσμα της συμφωνίας της με τις υφιστάμενες βάσεις ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για μάρτυρες. Τυχόν σημαντικές ανακολουθίες θα πρέπει να έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία νέας βάσης ιστορικών δεδομένων για μάρτυρες.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Παρουσίαση των αποτελεσμάτων

35. Στην παρουσίαση των αποτελεσμάτων θα πρέπει να περιλαμβάνονται όλα τα δεδομένα που είναι απαραίτητα για τον υπολογισμό της κυτταροτοξικότητας (εκφραζόμενης ως RS). Στα δεδομένα, τόσο για τις καλλιέργειες αγωγής όσο και για τις καλλιέργειες-μάρτυρες, θα πρέπει να περιλαμβάνεται ο αριθμός των κυττάρων στο τέλος της αγωγής, ο αριθμός των κυττάρων που επιστρώθηκαν αμέσως μετά την αγωγή και οι καταμετρηθείσες αποικίες (ή ο αριθμός των κοιλοτήτων χωρίς αποικίες για τη μέθοδο μικροτιτλοδότησης). Η RS για κάθε καλλιέργεια θα πρέπει να εκφράζεται ως ποσοστό επί του παράλληλου μάρτυρα με διαλύτη (για ορισμούς, ανατρέξτε στο προσάρτημα 1).

36. Στην παρουσίαση των αποτελεσμάτων θα πρέπει να περιλαμβάνονται επίσης όλα τα δεδομένα που είναι απαραίτητα για τον υπολογισμό της συχνότητας των προϊόντων μετάλλαξης. Στα δεδομένα για τις καλλιέργειες αγωγής και τις καλλιέργειες μάρτυρες θα πρέπει να περιλαμβάνονται: 1) ο αριθμός των κυττάρων που επιστρώνονται με και χωρίς παράγοντα επιλογής (κατά τη χρονική στιγμή που επιστρώνονται τα κύτταρα για επιλογή των προϊόντων μετάλλαξης) και 2) ο αριθμός των καταμετρούμενων αποικιών (ή ο αριθμός των κοιλοτήτων χωρίς αποικίες για τη μέθοδο μικροτιτλοδότησης) από τα τρυβλία με και χωρίς παράγοντα επιλογής. Η συχνότητα των προϊόντων μετάλλαξης υπολογίζεται βάσει του αριθμού μεταλλαγμένων αποικιών (στα τρυβλία με τον παράγοντα επιλογής), διορθωμένου ως προς την απόδοση κλωνοποίησης (από τα τρυβλία χωρίς παράγοντα επιλογής). Η συχνότητα προϊόντων μετάλλαξης θα πρέπει να εκφράζεται ως ο αριθμός των μεταλλαγμένων κυττάρων ανά εκατομμύριο βιώσιμων κυττάρων (για ορισμούς, ανατρέξτε στο προσάρτημα 1).

37. Θα πρέπει να παρέχονται δεδομένα για κάθε καλλιέργεια. Επιπλέον, όλα τα δεδομένα θα πρέπει να συγκεφαλαιώνονται σε μορφή πίνακα.

Κριτήρια αποδοχής

38. Η αποδοχή μιας δοκιμής βασίζεται στα ακόλουθα κριτήρια:

— Ο παράλληλος αρνητικός μάρτυρας θεωρείται αποδεκτός για προσθήκη στη βάση ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για αρνητικούς μάρτυρες, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 33.

— Οι παράλληλοι θετικοί μάρτυρες (βλ. παράγραφο 24) θα πρέπει να επάγουν αποκρίσεις συμβατές με εκείνες που έχουν καταχωριστεί στη βάση ιστορικών δεδομένων για θετικούς μάρτυρες και να επιφέρουν στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα.

— Διεξήχθησαν δοκιμές και στις δύο πειραματικές συνθήκες (με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση), εκτός εάν σε μία από αυτές τα αποτελέσματα ήταν θετικά (βλ. παράγραφο 25).

— Επαρκής αριθμός κυττάρων και συγκεντρώσεων είναι αναλύσιμος (παράγραφοι 25, 26 και 19).

— Τα κριτήρια επιλογής της ανώτατης συγκέντρωσης είναι σύμφωνα με αυτά που περιγράφονται στις παραγράφους 20, 21 και 22.

Αξιολόγηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

39. Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται σαφώς θετική εάν, σε οποιαδήποτε από τις πειραματικές συνθήκες που εξετάστηκαν:

▼M8

— τουλάχιστον σε μία από τις συγκεντρώσεις δοκιμής εμφανίζεται στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα,

— η αύξηση σχετίζεται με τη συγκέντρωση, όταν αξιολογείται με κατάλληλο έλεγχο τάσης,

— κάποιο από τα αποτελέσματα βρίσκεται εκτός της κατανομής των ιστορικών δεδομένων για αρνητικούς μάρτυρες (π.χ. όριο ελέγχου σε επίπεδο 95 % με βάση την κατανομή Poisson· βλ. παράγραφο 33).

Όταν πληρούνται όλα αυτά τα κριτήρια, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται ικανή να επάγει γονιδιακές μεταλλάξεις σε καλλιεργημένα κύτταρα θηλαστικών σε αυτό το σύστημα δοκιμής. Συστάσεις για τις πλέον κατάλληλες στατιστικές μεθόδους έχουν διατυπωθεί στη βιβλιογραφία (46) (48).

40. Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται σαφώς αρνητική εάν, σε όλες τις πειραματικές συνθήκες που εξετάστηκαν:

— σε καμία από τις συγκεντρώσεις δοκιμής δεν εμφανίζεται στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα,

— δεν παρατηρείται αύξηση σχετιζόμενη με τη συγκέντρωση, όταν αξιολογείται με κατάλληλο έλεγχο τάσης,

— όλα τα αποτελέσματα βρίσκονται εντός της κατανομής των ιστορικών δεδομένων για αρνητικούς μάρτυρες (π.χ. όριο ελέγχου σε επίπεδο 95 % με βάση την κατανομή Poisson· βλ. παράγραφο 33).

Θεωρείται τότε ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν είναι ικανή να επάγει γονιδιακές μεταλλάξεις σε καλλιεργημένα κύτταρα θηλαστικών σε αυτό το σύστημα δοκιμής.

41. Δεν απαιτείται επαλήθευση των σαφώς θετικών ή αρνητικών αποκρίσεων.

42. Όταν η απόκριση δεν είναι ούτε σαφώς αρνητική ούτε σαφώς θετική, όπως περιγράφεται ανωτέρω, ή για να διαπιστωθεί η βιολογική σημασία ενός αποτελέσματος, τα δεδομένα θα πρέπει να αξιολογούνται με βάση την κρίση ειδικών και/ή περαιτέρω διερεύνηση. Η επανάληψη του πειράματος, ενδεχομένως με τη χρήση διαφορετικών πειραματικών συνθηκών [π.χ. διαστήματα μεταξύ των συγκεντρώσεων, άλλες συνθήκες μεταβολικής ενεργοποίησης (δηλ. συγκέντρωση ή προέλευση του S9)] θα μπορούσε να είναι χρήσιμη.

43. Σε σπάνιες περιπτώσεις, ακόμη και μετά από περαιτέρω διερεύνηση, το σύνολο δεδομένων δεν επιτρέπει να συναχθούν θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα. Κατά συνέπεια, η απόκριση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να κρίνεται αμφίβολη (να ερμηνεύεται ως εξίσου δυνάμενη να είναι είτε θετική είτε αρνητική).

Έκθεση δοκιμής

44. Στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

— πηγή, αριθμός παρτίδας, καταληκτική ημερομηνία χρήσης, εφόσον υπάρχει,

— σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εάν είναι γνωστή,

— διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον διαλύτη, εάν είναι γνωστές,

— μέτρηση του pH, της ωσμωμοριακότητας και του ιζήματος του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας στο οποίο προστέθηκε η υπό δοκιμή χημική ουσία, κατά περίπτωση.

▼**M8**

Μονοσυστατική ουσία:

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμίξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγματα:

— περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Διαλύτης:

— αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη,

— εκατοστιαία αναλογία του διαλύτη στο τελικό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας.

Κύτταρα:

Για κύριες εργαστηριακές καλλιέργειες:

— τύπος, προέλευση κυτταρικών σειρών,

— αριθμός ανακαλλιεργειών, εάν υπάρχει, και ιστορικό στο εργαστήριο,

— χαρακτηριστικά καρυότυπου και/ή χαρακτηριστικός αριθμός χρωμοσωμάτων,

— μέθοδοι διατήρησης των κυτταροκαλλιεργειών,

— απουσία μυκοπλάσματος,

— χρόνοι διπλασιασμού των κυττάρων.

Συνθήκες δοκιμής:

— αιτιολογία για την επιλογή των συγκεντρώσεων και του αριθμού καλλιεργειών, συμπεριλαμβανομένων π.χ. δεδομένων κυτταροτοξικότητας και περιορισμών από πλευράς διαλυτότητας,

— σύνθεση των θρεπτικών μέσων, συγκέντρωση CO_2, επίπεδο υγρασίας,

— συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εκφραζόμενη ως τελική συγκέντρωση στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (π.χ. μg ή mg/mL ή mM θρεπτικού μέσου καλλιέργειας),

— συγκέντρωση (και/ή όγκος) του διαλύτη και της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που προστέθηκαν στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας,

— θερμοκρασία επώασης,

— χρόνος επώασης,

— διάρκεια της αγωγής,

— πυκνότητα των κυττάρων κατά την αγωγή,

— τύπος και σύσταση του συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης (πηγή του S9, μέθοδος παρασκευής του μείγματος S9, συγκέντρωση ή όγκος του μείγματος S9 και του S9 στο τελικό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, ποιοτικοί έλεγχοι του S9),

— χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες, τελικές συγκεντρώσεις για κάθε συνθήκη αγωγής,

▼**M8**

— διάρκεια της περιόδου έκφρασης (συμπεριλαμβανομένου του αριθμού των ανακαλλιεργηθέντων κυττάρων και των χρονοδιαγραμμάτων ανακαλλιέργειας και τροφοδοσίας, κατά περίπτωση),

— ταυτότητα του παράγοντα επιλογής και συγκέντρωσή του,

— κριτήρια αποδοχής των δοκιμών,

— μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την καταγραφή του αριθμού των βιώσιμων και των μεταλλαγμένων κυττάρων,

— μέθοδοι μέτρησης της κυτταροτοξικότητας,

— τυχόν συμπληρωματικές πληροφορίες που αφορούν την κυτταροτοξικότητα και τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε,

— διάρκεια των χρόνων επώασης μετά την επίστρωση,

— κριτήρια χαρακτηρισμού των μελετών ως θετικών, αρνητικών ή αμφίβολων,

— μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό του pH, της ωσμωμοριακότητας και της καθίζησης.

Αποτελέσματα:

— αριθμός κυττάρων που υποβλήθηκαν σε αγωγή και αριθμός κυττάρων ανακαλλιέργειας για κάθε καλλιέργεια,

— μετρήσεις κυτταροτοξικότητας, και άλλες παρατηρήσεις, εφόσον υπάρχουν,

— σημεία καθίζησης και χρόνος προσδιορισμού,

— αριθμός κυττάρων που επιστρώθηκαν σε επιλεκτικό και μη επιλεκτικό μέσο,

— αριθμός αποικιών σε μη επιλεκτικό μέσο και αριθμός ανθεκτικών αποικιών σε επιλεκτικό μέσο, και αντίστοιχες συχνότητες προϊόντων μετάλλαξης,

— σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης, όπου είναι δυνατόν,

— δεδομένα για παράλληλους αρνητικούς μάρτυρες (με διαλύτη) και θετικούς μάρτυρες (συγκεντρώσεις και διαλύτες),

— ιστορικά δεδομένα για τους αρνητικούς (με διαλύτη) και θετικούς μάρτυρες, με πεδία τιμών, μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις και διάστημα εμπιστοσύνης (π.χ. 95 %) καθώς και το πλήθος των δεδομένων,

— στατιστικές αναλύσεις (για μεμονωμένες καλλιέργειες και συγκεντρωτικές πανομοιότυπες καλλιέργειες, ανάλογα με την περίπτωση), και τιμές p, εάν υπάρχουν.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

Συμπέρασμα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.

(2) Moore M.M., DeMarini D.M., DeSerres F.J. and Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, New York.

▼**M8**

(3) Chu E.H.Y. and Malling H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro* , Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61, 1306-1312.

(4) Moore M.M., Harrington-Brock K., Doerr C.L. and Dearfield K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. Mutagen. Res., 4, 394-403.

(5) Aaron C.S. and Stankowski Jr. L.F. (1989). Comparison of the AS52/ XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. Mutation Res., 223, 121-128.

(6) Aaron C.S., Bolcsfoldi G., Glatt H.R., Moore M., Nishi Y., Stankowski L., Theiss J. and Thompson E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res., 312, 235-239.

(7) Li A.P., Gupta R.S., Heflich R.H. and Wasson J. S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox Program.Mutation Res., 196, 17-36.

(8) Scott D., Galloway S.M., Marshall R.R., Ishidate M., Brusick D., Ashby J. and Myhr B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A Report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, 147-204.

(9) Morita T., Nagaki T., Fukuda I. and Okumura K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268, 297-305.

(10) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion concentrations, Environ. Mutagen., 8, 789-886.

(11) Nesslany F., Simar-Meintieres S., Watzinger M., Talahari I. and Marzin D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutation Res., 49, 439-452.

(12) Long L.H., Kirkland D., Whitwell J. and Halliwell B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634, 177-183.

(13) Kirkland D., Aardema M., Henderson L., and Müller L. (2005). Evaluation of the Ability of a Battery of Three *In Vitro* Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens. I: Sensitivity, Specificity and Relative Predictivity. Mutation Res., 5841-256.

(14) Li A.P., Carver J.H., Choy W.N., Hsie A.W., Gupta R.S., Loveday K.S., O'Neill J.P., Riddle J.C., Stankowski L.F. Jr. and Yang L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. Mutation Res., 189, 135-141.

(15) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells· Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. Mutation Res., 216, 9-17.

(16) Stankowski L.F. Jr., Tindall K.R. and Hsie A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. Mutation Res., 160, 133-147.

▼**M8**

(17) Arlett C.F., Smith D.M., Clarke G.M., Green M.H.L., Cole J., McGregor D.B. and Asquith J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. Στο: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Eds.), CambridgeUniversity Press, pp. 66-101.

(18) Hsie A.W., Casciano D.A., Couch D.B., Krahn D.F., O'Neill J.P., and Whitfield B.L. (1981). The Use of Chinese Hamster Ovary Cells to Quantify Specific Locus Mutation and to Determine Mutagenicity of Chemicals; a Report of the Gene-Tox Program, Mutation Res., 86, 193-214.

(19) Li A.P. (1981). Simplification of the CHO/HGPRT Mutation Assay Through the Growth of Chinese Hamster Ovary Cells as Unattached Cultures, Mutation Res., 85, 165-175.

(20) Tindall K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff R., and Hsie A.W. (1984). Detection of Deletion Mutations in pSV2*gpt*-Transformed Cells, Mol. Cell. Biol., 4, 1411-1415.

(21) Hsie A. W., Recio L., Katz D. S., Lee C. Q., Wagner M., and Schenley R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. Proc Natl Acad Sci., 83(24): 9616–9620.

(22) Lorge E., Moore M., Clements J., Donovan M. O., Honma M., Kohara A., Van Benthem J., Galloway S., Armstrong M.J., Thybaud V., Gollapudi B., Aardema M., Kim J., Sutter A., Kirkland D.J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Χειρόγραφο υπό επεξεργασία).

(23) Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.W., Price A., Schechtman L., Stacey G. and Stokes W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, ATLA, 33, 261-287.

(24) Rosen M.P., San R.H.C. and Stich H.F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures, Can. Lett. 8, 299-305.

(25) Natarajan A.T., Tates A.D, Van Buul P.P.W., Meijers M. and de Vogel N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37, 83-90.

(26) Abbondandolo A., Bonatti S., Corti G., Fiorio R., Loprieno N. and Mazzaccaro A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, 365-373.

(27) Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, 347-364.

(28) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, 173, 215.

(29) Elliott B.M., Combes R.D., Elcombe C.R., Gatehouse D.G., Gibson G.G., Mackay J.M. and Wolf R.C. (1992) Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen. 7, 175-177.

(30) Matsushima T., Sawamura M., Hara K. and Sugimura T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. Στο: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R. and Philpot R.M. (Eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

▼**M8**

(31) Ong T.-m., Mukhtar M., Wolf C.R. and Zeiger E. (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. Pathol. *Toxicol*., 4, 55-65.

(32) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28, 51-59.

(33) UNEP. (2001). Σύμβαση της Στοκχόλμης για τους έμμονους οργανικούς ρύπους, Πρόγραμμα των Ηνωμένων Εθνών για το Περιβάλλον (UNEP). Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: [http://www.pops.int.html].

(34) Tan E.-L. and Hsie A.W. (1981). Effect of Calcium Phosphate and Alumina Cγ Gels on the Mutagenicity and Cytotoxicity of Dimethylnitrosamine as Studied in the CHO/HGPRT System. Mutation Res., 84, 147-156.

(35) O'Neill J.P., Machanoff R., San Sebastian J.R., Hsie A.W. (1982). Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Cammalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. Environ. Mol. Mutation., 4, 7-18.

(36) Li, A.P. (1984). Use of Aroclor 1254-Induced Rat Liver Homogenate in the Assaying of Promutagens in Chinese Hamster Ovary Cells. Environ. Mol. Mutation, 4, 7-18.

(37) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. Στο: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds.) Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, pp. 91-103.

(38) Zamora P.O., Benson J.M., Li A.P. and Brooks A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen.,5, 795-801.

(39) OECD (2014). Έγγραφο που τεκμηριώνει την απόφαση WNT για την εφαρμογή αναθεωρημένων κριτηρίων για την επιλογή της μέγιστης συγκέντρωσης στις *in vitro* δοκιμές γονιδιοτοξικότητας σε κύτταρα θηλαστικών (κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών 473, 476 και 487). Διατίθεται κατόπιν αιτήσεως από τον Οργανισμό για την Οικονομική Συνεργασία και την Ανάπτυξη.

(40) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay, Environ. Mol. Mutation, 54, 36-43.

(41) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances,

(42) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: [https://federalregister.gov/a/2012-13774].

(43) O'Neill J.P. and Hsie A.W. (1979). Phenotypic Expression Time of Mutagen-Induced 6-thioguranine resistance in Chinese hamster ovary cells (CHO/HGPRT system), Mutation, Res., 59, 109-118.

(44) Chiewchanwit T., Ma H., El Zein R., Hallberg L., and Au W.W. (1995). Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells. Mutation, Res., 1335(2):121-8.

▼**M8**

(45) Hayashi M., Dearfield K., Kasper P., Lovell D., Martus H.J., and Thybaud V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation Res., 723, 87-90.

(46) OECD (2014). Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety, Series on testing and assessment (No 199), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(47) Richardson C., Williams D.A., Allen J.A., Amphlett G., Chanter D.O., and Phillips B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. Στο: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (Ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(48) Fleiss J. L., Levin B., and Paik M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

▼**M8**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Μεταλλαξιγόνα υποκατάστασης ζευγών βάσεων: χημικές ουσίες που προκαλούν υποκατάσταση ζευγών βάσεων στο DNA.

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Απόδοση κλωνοποίησης: Το ποσοστό των κυττάρων που επιστρώνονται σε χαμηλή πυκνότητα και μπορούν να αναπτυχθούν σε καταμετρήσιμη αποικία.

Συγκεντρώσεις: τελικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας.

Κυτταροτοξικότητα: για τις δοκιμές που καλύπτονται από την παρούσα μέθοδο δοκιμών, η κυτταροτοξικότητα ορίζεται ως μείωση της σχετικής επιβίωσης των κυττάρων υπό αγωγή σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα (βλ. τη σχετική παράγραφο).

Εξελικτική μετάλλαξη: γονιδιακή μετάλλαξη από τον γονικό τύπο προς το προϊόν μετάλλαξης, που προκαλεί τροποποίηση ή απώλεια της ενζυμικής δραστηριότητας ή της λειτουργίας της κωδικοποιούμενης πρωτεΐνης.

Μεταλλαξιγόνα μετατόπισης αναγνωστικού πλαισίου: χημικές ουσίες που προκαλούν προσθήκη ή απάλειψη ενός ή πολλών ζευγών βάσεων στο μόριο DNA.

Γονιδιοτοξικός: γενικός όρος που καλύπτει όλα τα είδη βλαβών του DNA ή των χρωμοσωμάτων, μεταξύ των οποίων τις ρήξεις, τις προσθήκες, τις αναδιατάξεις, τις μεταλλάξεις, τις χρωμοσωμικές εκτροπές και την ανευπλοειδία. Δεν προκαλούν όλα τα είδη γονιδιοτοξικών επιδράσεων μεταλλάξεις ή μόνιμη χρωμοσωμική βλάβη.

Θρεπτικό μέσο HAT: θρεπτικό μέσο που περιέχει υποξανθίνη, αμινοπτερίνη και θυμιδίνη, και το οποίο χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό των προϊόντων μετάλλαξης Hprt.

Μιτωτικός ανασυνδυασμός: στη διάρκεια της μίτωσης, ο ανασυνδυασμός μεταξύ ομολόγων χρωματίδων που ενδεχομένως προκαλεί επαγωγή δίκλωνων ρήξεων του DNA ή απώλεια ετεροζυγωτικότητας.

Θρεπτικό μέσο MPA: θρεπτικό μέσο που περιέχει ξανθίνη, αδενίνη, θυμιδίνη, αμινοπτερίνη και μυκοφαινολικό οξύ, το οποίο χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό των προϊόντων μετάλλαξης Xprt.

Μεταλλαξιγόνο: παράγοντας που προκαλεί κληρονομήσιμη μεταβολή μίας ή περισσότερων αλληλουχιών ζευγών βάσεων του DNA σε γονίδια ή της δομής των χρωμοσωμάτων (χρωμοσωμικές εκτροπές).

Συχνότητα προϊόντων μετάλλαξης (mutant frequency, MF): ο αριθμός των παρατηρούμενων μεταλλαγμένων αποικιών διά του αριθμού των κυττάρων που επιστρώνονται στο επιλεκτικό θρεπτικό μέσο, διορθωμένος ως προς την απόδοση κλωνοποίησης (ή βιωσιμότητα) κατά τη χρονική στιγμή της επιλογής.

Χρόνος φαινοτυπικής έκφρασης: περίοδος μετά την αγωγή κατά την οποία η γενετική αλλοίωση εγκαθίσταται στο γονιδίωμα και τυχόν προϋπάρχοντα γονιδιακά προϊόντα μειώνονται σε βαθμό τέτοιο ώστε να αλλοιώνεται το φαινοτυπικό χαρακτηριστικό.

Σχετική επιβίωση (relative survival, RS): η RS χρησιμοποιείται ως το μέτρο της σχετιζόμενης με την αγωγή κυτταροτοξικότητας. Η RS είναι η απόδοση κλωνοποίησης (CE) κυττάρων επιστρωμένων αμέσως μετά την αγωγή, προσαρμοσμένη ως προς τυχόν απώλεια κυττάρων κατά τη διάρκεια της αγωγής, σε σύγκριση με την απόδοση κλωνοποίησης στους αρνητικούς μάρτυρες (στους οποίους έχει αποδοθεί επιβίωση 100 %).

Ηπατικά κλάσματα S9: υπερκείμενο υγρό ομογενοποιήματος ήπατος μετά από φυγοκέντρηση σε 9 000 g, δηλ. ανεπεξέργαστο εκχύλισμα ήπατος.

▼**M8**

Μείγμα S9: μείγμα του ηπατικού κλάσματος S9 με συμπαράγοντες αναγκαίους για τη δράση των μεταβολικών ενζύμων.

Μάρτυρας με διαλύτη: γενικός όρος για τον προσδιορισμό των καλλιεργειών μαρτύρων που λαμβάνουν μόνο τον διαλύτη ο οποίος χρησιμοποιείται για τη διάλυση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Μάρτυρες που δεν υποβάλλονται σε αγωγή: καλλιέργειες που δεν υφίστανται καμία αγωγή (ούτε με την υπό δοκιμή χημική ουσία ούτε με διαλύτη), αλλά ετοιμάζονται ταυτόχρονα με τις καλλιέργειες που λαμβάνουν την υπό δοκιμή χημική ουσία και με τον ίδιο τρόπο.

UVCB: ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, προϊόντα πολύπλοκων αντιδράσεων και βιολογικά υλικά.

▼**M8**

Προσάρτημα 2

ΤΥΠΟΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ

Η κυτταροτοξικότητα αξιολογείται βάσει της σχετικής επιβίωσης, δηλαδή της απόδοσης κλωνοποίησης (CE) κυττάρων επιστρωμένων αμέσως μετά την αγωγή, προσαρμοσμένης ως προς τυχόν απώλεια κυττάρων κατά τη διάρκεια της αγωγής, σε σύγκριση με την απόδοση κλωνοποίησης στους αρνητικούς μάρτυρες (στους οποίους έχει αποδοθεί επιβίωση 100 %) (βλ. τύπο RS κατωτέρω).

Η προσαρμοσμένη CE για καλλιέργεια υπό αγωγή με χημική ουσία υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{προσαρμοσμΧνη CE} = \frac{\text{αριθμός κυττΦρων στο τΧλος της ανωγψς}}{\text{αριαμος κυττΦρων στην αρχψ της αγωγψς}}$$

Η RS για καλλιέργεια υπό αγωγή με χημική ουσία υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{RS} = \frac{\text{προσαρμιοσμΧνη CE στην καλλιΧέργεια ανωγψς}}{\text{προσαρμιοσμΧνη CE στον μΦρτυρα με διαλύτη}} \times 100$$

Η συχνότητα προϊόντων μετάλλαξης είναι η απόδοση κλωνοποίησης μεταλλαγμένων αποικιών σε επιλεκτικό θρεπτικό μέσο διά της απόδοσης κλωνοποίησης σε μη επιλεκτικό μέσο μετρούμενης για την ίδια καλλιέργεια κατά τη χρονική στιγμή της επιλογής.

$$\text{συχνότητα προϊόντων μετΦλλαξης} = \frac{\text{CE στις μεταλλογμΧνες αποικΩες σε επιλεκτικό μΧσο}}{\text{CE σε μη επιλεκτικό μΧσο}}$$

Σε περίπτωση χρήσης τρυβλίων για την απόδοση κλωνοποίησης:

CE = αριθμός αποικιών / αριθμός επιστρωμένων κυττάρων

Σε περίπτωση χρήσης τρυβλίων μικροτιτλοδότησης για την απόδοση κλωνοποίησης:

Ο αριθμός των αποικιών ανά κοιλότητα στα τρυβλία μικροτιτλοδότησης ακολουθεί κατανομή Poisson.

απόδοση κλωνοποίησης = -LnP(0) / αριθμός επιστρωμένων κυττάρων ανά κοιλότητα

Όπου -LnP(0) είναι ο πιθανός αριθμός κενών κοιλοτήτων μεταξύ των κοιλοτήτων ανακαλλιέργειας, ο οποίος περιγράφεται βάσει του ακόλουθου τύπου

LnP(0) = -Ln (αριθμός κενών κοιλοτήτων / αριθμός επιστρωμένων κοιλοτήτων)

▼**M7**

_____

_____

_____

▼B

B.21 **ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ *IN VITRO***

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Καμία.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Συστήματα καλλιέργειας κυττάρων θηλαστικών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση φαινοτυπικών μεταβολών *in vitro* που προκαλούνται από χημικές ουσίες που σχετίζονται με κακοήθη μετασχηματισμό *in vivo*. Ευρύτερα χρησιμοποιούμενα κύτταρα είναι τα C3H10T 1/2, 3T3, SHE, αρουραίου Fisher και τα πειράματα βασίζονται στις μεταβολές της μορφολογίας των κυττάρων, στο σχηματισμό εστιών ή στις μεταβολές στην εξάρτηση στήριξης σε ημιστέρεη αγάρ αγάρ. Υπάρχουν και λιγότερο χρησιμοποιούμενα συστήματα, τα οποία ανιχνεύουν άλλες φυσιολογικές ή μορφολογικές μεταβολές στα κύτταρα μετά από έκθεση σε καρκινογόνες χημικές ουσίες. Κανένα από τα τελικά σημεία του πειράματος *in vitro* δεν έχει αποδεδειγμένη μηχανιστική σχέση με τον καρκίνο. Μερικά από τα πειραματικά συστήματα μπορούν να ανιχνεύουν προαγωγείς όγκων. Η κυτταροτοξικότητα μπορεί να καθοριστεί με τη μέτρηση της επίδρασης του υλικού της δοκιμασίας σε αποικία η οποία διαμορφώνει ικανότητες (κλωνική επάρκεια) ή ρυθμούς ανάπτυξης των καλλιεργειών. Η μέτρηση της κυτταροτοξικότητας γίνεται για να αποδειχθεί ότι η έκθεση στη δοκιμαζόμενη χημική ουσία ήταν τοξικολογικά σχετική αλλά ότι δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της συχνότητας μετασχηματισμού σε όλες τις δοκιμασίες λόγω του ότι μερικές μπορούν να αφορούν μακρόχρονη επώαση ή/και ανακαλλιέργεια σε τριβλίο.

1.5. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Κανένα.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Προετοιμασία

Κύτταρα

Υπάρχει μια ποικιλία σειρών κυττάρων ή αρχέτυπων κυττάρων, ανάλογα με την εκτελούμενη δοκιμασία μετασχηματισμού. Ο ερευνητής πρέπει να βεβαιωθεί ότι τα κύτταρα στην εκτελούμενη δοκιμασία παρουσιάζουν την κατάλληλη φαινοτυπική μεταβολή μετά από έκθεση σε γνωστά καρκινογόνα και ότι η δοκιμασία, στο εργαστήριό του, είναι αποδεδειγμένης και τεκμηριωμένης αξίας και αξιοπιστίας.

Μέσον καλλιέργειας

Πρέπει να χρησιμοποιούνται προσφυές μέσον και κατάλληλες πειραματικές συνθήκες για την εκτέλεση της δοκιμασίας μετασχηματισμού.

▼B

Δοκιμαζόμενη ουσία

Οι δοκιμαζόμενες ουσίες μπορούν να προστεθούν σε υλικά καλλιέργειας ή να διαλυθούν ή να εναιωρηθούν σε κατάλληλα έκδοχα πριν από την αγωγή των κυττάρων. Η τελική συγκέντρωση του εκδόχου στο σύστημα καλλιέργειας δεν πρέπει να επηρεάζει τη βιωσιμότητα του κυττάρου ή το ρυθμό ανάπτυξης ή τη συχνότητα εμφάνισης μετασχηματισμών.

Μεταβολική ενεργοποίηση

Τα κύτταρα πρέπει να εκτίθενται στη δοκιμαζόμενη ουσία τόσο με όσο και χωρίς κατάλληλο σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης. Εναλλακτικά, όταν χρησιμοποιούνται κυτταρικοί τύποι, οι οποίοι διαθέτουν εγγενή μεταβολική δραστηριότητα, η φύση της δραστηριότητας πρέπει να είναι γνωστό ότι είναι κατάλληλη στη δοκιμαζόμενη χημική κατηγορία.

Συνθήκες δοκιμασίας

Χρήση θετικών και αρνητικών ελέγχων (μάρτυρες)

Σε κάθε πείραμα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται και θετικοί έλεγχοι, με τη χρήση μιας ένωσης άμεσης ενέργειας και μιας ένωσης που απαιτεί μεταβολική ενεργοποίηση. Πρέπει επίσης να χρησιμοποιείται ένας αρνητικός έλεγχος (με έκδοχο).

Τα παρακάτω είναι παραδείγματα ουσιών που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σαν θετικοί μάρτυρες:

— χημικές ουσίες άμεσης ενέργειας:

  — αιθυλοσουλφονικό μεθύλιο,

  — β-προπιολακτόνη·

— ενώσεις που απαιτούν μεταβολική ενεργοποίηση;

  — 2-ακετυλαμινοφλουορένιο,

  — 4-διμεθυλαμινοβενζόλιο,

  — 7,12-διμεθυλοβενζανθρακένιο.

Όπου χρειάζεται, πρέπει να συμπεριλαμβάνεται ένας πρόσθετος θετικός έλεγχος με ουσία της ίδιας χημικής κατηγορίας όπου ανήκει η δοκιμαζόμενη ένωση.

Συγκεντρώσεις έκθεσης

Χρησιμοποιούνται διάφορες συγκεντρώσεις της δοκιμαζόμενης ουσίας. Οι συγκεντρώσεις αυτές πρέπει να δημιουργούν μια τοξική επίδραση ανάλογη με τη συγκέντρωση, και η υψηλότερη συγκέντρωση πρέπει να παράγει χαμηλό επίπεδο επιβίωσης, ενώ η επιβίωση στη χαμηλότερη συγκέντρωση πρέπει να είναι κατά προσέγγιση η ίδια όπως και η επιβίωση στον αρνητικά μάρτυρα.

Οι σχετικά μη υδατοδιαλυτές ουσίες πρέπει να δοκιμάζονται μέχρι το όριο διαλυτότητάς τους με τη χρήση κατάλληλων διαδικασιών. Για εξαιρετικά υδατοδιαλυτές μη τοξικές ουσίες, η ανώτερη συγκέντρωση της ουσίας πρέπει να καθορίζεται κατά περίπτωση.

▼B

Διαδικασία

Τα κύτταρα πρέπει να εκτίθενται για κατάλληλη χρονική περίοδο, ανάλογα με το πειραματικό σύστημα που χρησιμοποιείται, το οποίο μπορεί να περιλαμβάνει ανανέωση των δόσεων με αλλαγή και του μέσου (και αν είναι αναγκαίο, νέο μείγμα μεταβολικής ενεργοποίησης) στην περίπτωση παράτασης της έκθεσης. Τα κύτταρα που δεν διαθέτουν επαρκή εγγενή μεταβολική δραστηριότητα πρέπει να εκτίθενται στη δοκιμαζόμενη ουσία με και χωρίς κατάλληλο σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης. Κατά το τέλος της περιόδου έκθεσης τα κύτταρα πλένονται για να απομακρυνθεί η δοκιμαζόμενη ουσία και καλλιεργούνται υπό συνθήκες κατάλληλες για την εμφάνιση του παρακολουθούμενου μετασχηματισμένου φαινοτύπου και για τον καθορισμό της συχνότητας εμφάνισης μετασχηματισμών. Όλα τα αποτελέσματα επιβεβαιώνονται με ανεξάρτητο πείραμα.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα πρέπει να παρίστανται με μορφή πίνακα και να μπορούν να παίρνουν μια ποικιλία μορφών ανάλογα με το εκτελούμενο πείραμα (π.χ. μέτρηση καλλιεργειών μέσα σε αγάρ αγάρ, θετικές καλλιέργειες ή αριθμός μετασχηματισμένων κυττάρων).Όπου χρειάζεται, η επιβίωση πρέπει να εκφράζεται σαν ποσοστό των επιπέδων ουσίας ελέγχου και η συχνότητα μετασχηματισμού να εκφράζεται σαν αριθμός των μετασχηματισμένων ανά αριθμό επιβιωσάντων.

Τα δεδομένα πρέπει να αξιολογούνται με τη χρήση κατάλληλης στατιστικής μεθόδου.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Στην έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνονται οι παρακάτω πληροφορίες:

— κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν, αριθμός καλλιεργειών κυττάρων, μέθοδοι συντήρησης της καλλιέργειας κυττάρων,

— συνθήκες διαδικασίας: συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας, έκδοχο που χρησιμοποιήθηκε, χρόνος επώασης, διάρκεια και συχνότητα αγωγής, πυκνότητα κυττάρων κατά τη διάρκεια της αγωγής, τύπος χρησιμοποιούμενου συστήματος εξωγενούς μεταβολικής ενεργοποίησης, θετικοί και αρνητικοί έλεγχοι, προδιαγραφές του παρακολουθούμενου φαινοτύπου, επιλεγμένο σύστημα που χρησιμοποιείται (εάν χρειάζεται), αιτιολόγηση της επιλογής δόσεων.

— method used to enumerate viable and transformed cells,

— statistical evaluation,

— discussion of results,

— interpretation of results.

3.2. EVALUATION AND INTERPRETATION

See General introduction Part B.

4. **REFERENCES**

See General introduction Part B.

▼**M8**

Β.22. ΔΟΚΙΜΗ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΥ ΕΠΙΚΡΑΤΟΥΝΤΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΑ ΣΕ ΤΡΩΚΤΙΚΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 478 του ΟΟΣΑ (2016). Οι μέθοδοι δοκιμών επανεξετάζονται κατά περιόδους υπό το φως των επιστημονικών εξελίξεων, των μεταβαλλόμενων κανονιστικών αναγκών και παραμέτρων που αφορούν την καλή μεταχείριση των ζώων. Η παρούσα τροποποιημένη έκδοση της μεθόδου δοκιμών αντικατοπτρίζει πάνω από τριάντα έτη εμπειρίας με τη συγκεκριμένη δοκιμή και παρέχει τη δυνατότητα ενσωμάτωσης ή συνδυασμού αυτής της δοκιμής με άλλες δοκιμές τοξικότητας, όπως μελέτες ανάπτυξης, τοξικότητας στην αναπαραγωγή ή γονιδιοτοξικότητας· εντούτοις, λόγω των περιορισμών της και της χρήσης μεγάλου αριθμού ζώων, η παρούσα δοκιμή δεν προορίζεται για χρήση ως κύρια μέθοδος, αλλά μάλλον ως συμπληρωματική μέθοδος δοκιμών, που μπορεί να χρησιμοποιείται μόνο εφόσον δεν υπάρχει εναλλακτική λύση σε σχέση με τις κανονιστικές απαιτήσεις. Ο συνδυασμός δοκιμών τοξικότητας παρέχει τη δυνατότητα σημαντικής μείωσης του αριθμού των ζώων που χρησιμοποιούνται σε αυτές. Ο ΟΟΣΑ έχει συντάξει ένα έγγραφο με συνοπτικές πληροφορίες για τις δοκιμές γενετικής τοξικολογίας και μια επισκόπηση των πρόσφατων αλλαγών που έγιναν στις κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών γενετικής τοξικότητας του ΟΟΣΑ (1).

2. Σκοπός της δοκιμής θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρα (DL) είναι να διερευνήσει το κατά πόσον οι χημικές ουσίες προκαλούν μεταλλάξεις οφειλόμενες σε χρωμοσωμικές εκτροπές σε γεννητικά κύτταρα. Επιπλέον, η δοκιμή θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρα είναι σημαντική για την αξιολόγηση της γονιδιοτοξικότητας, διότι οι παράγοντες των διεργασιών μεταβολισμού, φαρμακοκινητικής και επιδιόρθωσης του DNA *in vivo*, αν και μπορεί να διαφέρουν μεταξύ των ειδών, είναι ενεργοί και συμβάλλουν στην απόκριση. Επαγωγή μετάλλαξης DL μετά από έκθεση σε υπό δοκιμή χημική ουσία δείχνει ότι η χημική ουσία επηρέασε γεννητικούς ιστούς του πειραματόζωου.

3. Οι μεταλλάξεις DL προκαλούν θάνατο κατά το πρώιμο ή όψιμο εμβρυϊκό στάδιο. Επαγωγή μετάλλαξης DL μετά από έκθεση σε υπό δοκιμή χημική ουσία δείχνει ότι η χημική ουσία επηρέασε τα γεννητικά κύτταρα του πειραματόζωου.

4. Μια δοκιμή DL είναι χρήσιμη για την επιβεβαίωση των θετικών αποτελεσμάτων δοκιμών που χρησιμοποιούν σωματικές παραμέτρους *in vivo* και αποτελεί χρήσιμη παράμετρο για την πρόβλεψη της επικινδυνότητας για τον άνθρωπο και του κινδύνου γενετικών ασθενειών που μεταδίδονται μέσω της σειράς γεννητικών κυττάρων. Ωστόσο, η εν λόγω δοκιμή απαιτεί μεγάλο αριθμό ζώων και εντατική εργασία· ως εκ τούτου, είναι ιδιαίτερα δαπανηρή και χρονοβόρος. Δεδομένου ότι η αυθόρμητη συχνότητα μεταλλάξεων θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρα είναι αρκετά υψηλή, η ευαισθησία της δοκιμασίας ως προς την ανίχνευση μικρών αυξήσεων της συχνότητας μεταλλάξεων είναι σε γενικές γραμμές περιορισμένη.

5. Οι ορισμοί των βασικών όρων παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

6. Η δοκιμή διεξάγεται συνήθως σε ποντικούς (2) (3) (4), χωρίς να αποκλείεται, σε ορισμένες περιπτώσεις και εφόσον είναι επιστημονικά τεκμηριωμένο, να είναι κατάλληλα άλλα είδη, όπως οι επίμυες (5) (6) (7) (8). Παρότι οι μεταλλάξεις DL είναι, γενικά, αποτέλεσμα αδρών χρωμοσωμικών εκτροπών (δομικών και αριθμητικών ανωμαλιών) (9) (10) (11), δεν μπορούν να

▼M8

αποκλειστούν οι γονιδιακές μεταλλάξεις. Μια μετάλλαξη DL είναι μετάλλαξη που εμφανίζεται στο ίδιο το γεννητικό κύτταρο ή εγκαθίσταται μετά τη γονιμοποίηση στο πρώιμο έμβρυο, η οποία δεν προκαλεί δυσλειτουργία του γαμέτη αλλά είναι θανατηφόρα για το γονιμοποιημένο ωάριο ή το αναπτυσσόμενο έμβρυο.

7. Μεμονωμένα αρσενικά ζευγαρώνονται αλληλοδιάδοχα με παρθένα θηλυκά ανά κατάλληλα χρονικά διαστήματα. Ο αριθμός των ζευγαρωμάτων μετά την αγωγή εξαρτάται από τον τελικό σκοπό της μελέτης DL (παράγραφος 23) και θα πρέπει να είναι τέτοιος ώστε να διασφαλίζεται η αξιολόγηση όλων των φάσεων της ωρίμανσης των αρσενικών γεννητικών κυττάρων για DL (12).

8. Εάν υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία, ή ο/οι μεταβολίτης/-ες της, δεν θα φθάσει στους όρχεις, δεν είναι κατάλληλη για χρήση στην παρούσα δοκιμή.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

9. Γενικά, τα αρσενικά ζώα εκτίθενται σε υπό δοκιμή χημική ουσία μέσω της κατάλληλης οδού έκθεσης και ζευγαρώνονται με παρθένα θηλυκά που δεν έχουν υποστεί αγωγή. Μπορούν να υποβληθούν σε δοκιμή διάφορα είδη γεννητικών κυττάρων με χρήση αλληλοδιάδοχων διαστημάτων ζευγαρώματος. Μετά το ζευγάρωμα, τα θηλυκά θανατώνονται με ευθανασία μετά από κατάλληλο χρονικό διάστημα και οι μήτρες τους εξετάζονται για να διαπιστωθεί ο αριθμός των εμφυτευμένων, των ζωντανών και των νεκρών εμβρύων. Η επίδραση θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρα μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας προσδιορίζεται μέσω σύγκρισης των ζωντανών εμφυτευμένων εμβρύων ανά θηλυκό της ομάδας αγωγής με τα ζωντανά εμφυτευμένα έμβρυα ανά θηλυκό της ομάδας μαρτύρων με φορέα/διαλύτη. Η αύξηση των νεκρών εμφυτευμένων εμβρύων ανά θηλυκό στην ομάδα αγωγής σε σύγκριση με τα νεκρά εμφυτευμένα έμβρυα ανά θηλυκό στην ομάδα μαρτύρων αντανακλά την επαχθείσα από την υπό δοκιμή χημική ουσία μετεμφυτευματική απώλεια. Η μετεμφυτευματική απώλεια υπολογίζεται με βάση την αναλογία νεκρών εμφυτευμένων εμβρύων προς τα συνολικά εμφυτευμένα έμβρυα στην ομάδα αγωγής, συγκρινόμενη με την αναλογία νεκρών προς συνολικά εμφυτευμένα έμβρυα στην ομάδα μαρτύρων. Η προεμφυτευματική απώλεια μπορεί να εκτιμηθεί με σύγκριση των αριθμών των ωχρών σωματίων μείον τα συνολικά εμφυτευμένα έμβρυα, ή των συνολικών εμφυτευμένων εμβρύων ανά θηλυκό ζώο στην ομάδα αγωγής και στην ομάδα μαρτύρων.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

10. Για να διαπιστωθεί η τεχνική ικανότητα διεξαγωγής της παρούσας δοκιμής, πρέπει να καταδεικνύεται η ικανότητα αναπαραγωγής των συχνοτήτων θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρα των δημοσιευμένων δεδομένων [π.χ. (13) (14) (15) (16) (17) (18)] με ουσίες που χρησιμεύουν ως θετικοί μάρτυρες (συμπεριλαμβανομένων των ασθενών αποκρίσεων), όπως οι ουσίες που απαριθμούνται στον πίνακα 1, και με μάρτυρες με φορέα, και των συχνοτήτων αρνητικών μαρτύρων που συμφωνούν με τα αποδεκτά πεδία τιμών δεδομένων (βλ. παραπομπές ανωτέρω) ή με την κατανομή ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για τους μάρτυρες, εφόσον υπάρχουν.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Προετοιμασίες

Επιλογή ζωικού είδους

11. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή, σεξουαλικώς ώριμα ζώα που ανήκουν σε συνήθεις εργαστηριακές φυλές. Συνήθως χρησιμοποιούνται ποντικοί, αλλά μπορεί να είναι κατάλληλοι και οι επίμυες. Η χρήση άλλων κατάλληλων ειδών θηλαστικών επιτρέπεται, εφόσον αιτιολογείται επιστημονικά στην έκθεση.

▼M8

Συνθήκες στέγασης και σίτισης των ζώων

12. Για τα τρωκτικά, η θερμοκρασία στον θάλαμο των ζώων θα πρέπει να είναι 22 °C (±3 °C). Η σχετική υγρασία, η ιδανική τιμή της οποίας είναι 50-60 %, θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 40 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου. Ο φωτισμός θα πρέπει να είναι τεχνητός, με φωτοπερίοδο 12 ωρών. Για τη διατροφή των ζώων μπορούν να χρησιμοποιούνται τα συνήθη εργαστηριακά σιτηρέσια, με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού. Όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται με την τροφή, η ανάγκη επαρκούς ανάμειξης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας είναι δυνατόν να επηρεάσει την επιλογή σιτηρεσίου. Πριν από την αγωγή ή το ζευγάρωμα, τα τρωκτικά θα πρέπει να στεγάζονται σε μικρές ομάδες (όχι περισσότερα από πέντε) του ίδιου φύλου, εφόσον δεν αναμένεται ούτε παρατηρείται επιθετική συμπεριφορά, κατά προτίμηση σε κλωβούς με συμπαγές δάπεδο με κατάλληλο εμπλουτισμό του περιβάλλοντος. Εάν αιτιολογείται επιστημονικά, τα ζώα μπορούν να στεγάζονται ατομικά.

Προετοιμασία των ζώων

13. Χρησιμοποιούνται υγιή και σεξουαλικώς ώριμα αρσενικά και θηλυκά ενήλικα ζώα τα οποία κατανέμονται τυχαία στις ομάδες μαρτύρων και αγωγής. Τα ζώα ταυτοποιούνται μοναδικά με χρήση ανώδυνης, ελάχιστα επεμβατικής μεθόδου (π.χ. δακτύλιοι, ετικέτες, μικροτσίπ ή βιομετρική ταυτοποίηση, αλλά όχι αποκοπή τμήματος αυτιού ή δακτύλου) και εγκλιματίζονται στις συνθήκες του εργαστηρίου για τουλάχιστον πέντε ημέρες. Οι κλωβοί θα πρέπει να διατάσσονται με τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται οι πιθανές επιδράσεις της θέσης τους. Θα πρέπει να αποφεύγεται η διασταυρούμενη μόλυνση από τον θετικό μάρτυρα και την υπό δοκιμή χημική ουσία. Στην αρχή της δοκιμής, οι διαφορές βάρους των ζώων θα πρέπει να είναι ελάχιστες και να μην υπερβαίνουν το ± 20 % του μέσου βάρους κάθε φύλου.

Παρασκευή των δόσεων

14. Οι στερεές υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να διαλύονται ή να εναιωρούνται σε κατάλληλους διαλύτες ή φορείς ή να αναμειγνύονται με την τροφή ή το πόσιμο νερό, πριν χορηγηθούν στα ζώα. Οι υγρές υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορούν να χορηγούνται ως έχουν ή να αραιώνονται πριν από τη χορήγηση. Σε περίπτωση έκθεσης μέσω της εισπνοής, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορούν να χορηγούνται ως αέριο, ατμοί ή αερόλυμα στερεού/υγρού, ανάλογα με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσφατα σκευάσματα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εκτός αν τα στοιχεία σχετικά με τη σταθερότητά της καταδεικνύουν ότι είναι αποδεκτή η φύλαξή της και καθορίζουν τις κατάλληλες συνθήκες φύλαξης.

Συνθήκες δοκιμής

Διαλύτης/φορέας

15. Ο διαλύτης/φορέας θα πρέπει να μην έχει τοξικές επιδράσεις στους χρησιμοποιούμενους όγκους δόσεων, ούτε να υπάρχουν υπόνοιες για πιθανή χημική αντίδρασή του με την υπό δοκιμή χημική ουσία. Εφόσον χρησιμοποιείται άλλος διαλύτης/φορέας εκτός των καθιερωμένων, η χρήση του θα πρέπει να τεκμηριώνεται με δεδομένα αναφοράς που αποδεικνύουν τη συμβατότητά του. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατό, να εξετάζεται πρώτα αν μπορεί να χρησιμοποιηθεί υδατικός διαλύτης/φορέας. Παραδείγματα ευρέως χρησιμοποιούμενων συμβατών διαλυτών/φορέων είναι, μεταξύ άλλων, το νερό, ο φυσιολογικός ορός (ισότονο αλατούχο διάλυμα), το διάλυμα μεθυλοκυτταρίνης, το διάλυμα άλατος της καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης με νάτριο, το ελαιόλαδο και το αραβοσιτέλαιο.

Θετικοί μάρτυρες

16. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ζώα που χρησιμεύουν ως παράλληλοι θετικοί μάρτυρες, εκτός εάν το εργαστήριο δοκιμών έχει αποδείξει την τεχνική ικανότητα διεξαγωγής της δοκιμής και χρησιμοποιεί τη δοκιμή σε τακτική βάση κατά το πρόσφατο παρελθόν (π.χ. τουλάχιστον κατά τα τελευταία 5 έτη). Ωστόσο, δεν είναι απαραίτητη η αγωγή των ζώων θετικών μαρτύρων διά της ίδιας οδού με αυτήν που χρησιμοποιείται για τα ζώα που λαμβάνουν την υπό δοκιμή χημική ουσία, ούτε είναι απαραίτητη η δειγματοληψία σε

▼M8

όλα τα διαστήματα ζευγαρώματος. Οι ουσίες που χρησιμεύουν ως θετικοί μάρτυρες θα πρέπει να προκαλούν εξακριβωμένα DL στις συνθήκες που χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή. Με εξαίρεση την αγωγή, τα ζώα των ομάδων μαρτύρων πρέπει να υφίστανται την ίδια ακριβώς μεταχείριση με τα ζώα των ομάδων αγωγής.

17. Οι δόσεις των ουσιών που χρησιμεύουν ως θετικοί μάρτυρες θα πρέπει να επιλέγονται κατά τρόπο ώστε να προκαλούν ασθενείς ή μέτριες επιδράσεις μέσω των οποίων κρίνονται ορθά οι επιδόσεις και η ευαισθησία της δοκιμής, αλλά θα πρέπει και να προκαλούν σταθερά θετικές επιδράσεις θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρα. Παραδείγματα χημικών ουσιών που χρησιμεύουν ως θετικοί μάρτυρες, και οι κατάλληλες δόσεις, περιλαμβάνονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1

Παραδείγματα χημικών ουσιών που χρησιμεύουν ως θετικοί μάρτυρες

Ουσία [αριθ. CAS] (αριθ. αναφοράς)	Κλίμακα αποτελεσματικών δόσεων (mg/kg) (είδη τρωκτικών)	Χρόνος χορήγησης (ημέρες)
Τριαιθυλενομελαμίνη [51-18-3] (15)	0,25 (ποντικοί)	1
Κυκλοφωσφαμίδιο [50-18-0] (19)	50-150 (ποντικοί)	5
Κυκλοφωσφαμίδιο [50-18-0] (5)	25-100 (επίμυες)	1
Μεθανοσουλφονικός αιθυλεστέρας [62-50-0] (13)	100-300 (ποντικοί)	5
Μονομερές ακρυλαμίδιο [79-06-1] (17)	50 (ποντικοί)	5
Χλωραμβουκίλη [305-03-3] (14)	25 (ποντικοί)	1

Αρνητικοί μάρτυρες

18. Για κάθε χρόνο δειγματοληψίας θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται και ζώα που χρησιμοποιούνται ως αρνητικοί μάρτυρες, στα οποία χορηγείται μόνο ο διαλύτης ή ο φορέας και τα οποία, κατά τα άλλα, υφίστανται την ίδια μεταχείριση όπως οι ομάδες αγωγής (20). Εάν δεν υπάρχουν ιστορικά ή δημοσιευμένα δεδομένα για μάρτυρες από τα οποία προκύπτει ότι ο επιλεγμένος διαλύτης/φορέας δεν επάγει επιδράσεις DL ή άλλες επιβλαβείς επιδράσεις, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται επίσης, για κάθε χρόνο δειγματοληψίας, ζώα που χρησιμεύουν ως μάρτυρες που δεν υποβάλλονται σε αγωγή ώστε να διαπιστώνεται η δυνατότητα αποδοχής των μαρτύρων με τον φορέα.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αριθμός ζώων

19. Μεμονωμένα αρσενικά ζευγαρώνονται αλληλοδιάδοχα σε κατάλληλα προκαθορισμένα διαστήματα (π.χ. εβδομαδιαία διαστήματα, παράγραφοι 21 & 23), κατά προτίμηση με ένα παρθένο θηλυκό ζώο. Ο αριθμός των αρσενικών ανά ομάδα θα πρέπει να καθορίζεται εκ των προτέρων (σε συνδυασμό με τον αριθμό των ζευγαρωμένων θηλυκών σε κάθε διάστημα ζευγαρώματος) κατά τρόπο ώστε να μπορεί να παράσχει τη στατιστική ισχύ που είναι απαραίτητη για τη διαπίστωση τουλάχιστον ενός διπλασιασμού της συχνότητας DL (παράγραφος 44).

20. Ο αριθμός των θηλυκών ανά διάστημα ζευγαρώματος θα πρέπει επίσης να καθορίζεται εκ των προτέρων βάσει υπολογισμών της στατιστικής ισχύος ώστε να επιτρέπει τη διαπίστωση τουλάχιστον του διπλασιασμού της συχνότητας DL (δηλ. επαρκής αριθμός εγκύων θηλυκών ώστε να παρέχονται τουλάχιστον 400 συνολικά εμφυτευμένα έμβρυα) (20) (21) (22) (23) και προκειμένου να αναμένεται τουλάχιστον ένα νεκρό εμφυτευμένο έμβρυο ανά μονάδα ανάλυσης (δηλ. ομάδα ζευγαρώματος ανά δόση) (24).

▼M8

Περίοδος χορήγησης και διαστήματα ζευγαρώματος

21. Ο αριθμός των διαστημάτων ζευγαρώματος μετά την αγωγή καθορίζεται βάσει του χρονοδιαγράμματος αγωγής και θα πρέπει να είναι τέτοιος ώστε να διασφαλίζεται η αξιολόγηση της επαγωγής DL σε όλες τις φάσεις ωρίμανσης των αρσενικών γεννητικών κυττάρων (12) (25). Για μοναδική αγωγή έως πέντε ημερήσιων χορηγήσεων δόσης, θα πρέπει να πραγματοποιούνται 8 ζευγαρώματα (ποντικών) ή 10 (επιμύων) σε εβδομαδιαία διαστήματα μετά την τελευταία αγωγή. Για πολλαπλές χορηγήσεις δόσης, ο αριθμός των διαστημάτων ζευγαρώματος μπορεί να μειωθεί κατ' αναλογία προς τον αυξημένο χρόνο της περιόδου χορήγησης, αλλά διατηρώντας τον στόχο της αξιολόγησης όλων των φάσεων της σπερματογένεσης (π.χ. μετά από έκθεση 28 ημερών, 4 μόνο εβδομαδιαία ζευγαρώματα αρκούν για την αξιολόγηση όλων των φάσεων σπερματογένεσης στον ποντικό). Όλα τα χρονοδιαγράμματα αγωγής και ζευγαρώματος θα πρέπει να αιτιολογούνται επιστημονικά.

22. Τα θηλυκά θα πρέπει να παραμένουν με τα αρσενικά τουλάχιστον για το χρονικό διάστημα ενός κύκλου οίστρου (π.χ. μια εβδομάδα καλύπτει έναν κύκλο οίστρου στους ποντικούς και τους επίμυες). Τα θηλυκά που δεν ζευγάρωσαν στη διάρκεια χρονικού διαστήματος μιας εβδομάδας μπορούν να χρησιμοποιούνται σε επακόλουθο διάστημα ζευγαρώματος ή, εναλλακτικά, μέχρι να πραγματοποιηθεί ζευγάρωμα, όπως αυτό διαπιστώνεται από την παρουσία σπέρματος στον κόλπο ή την παρουσία κολπικού βύσματος.

23. Το χρησιμοποιούμενο σχήμα έκθεσης και ζευγαρώματος εξαρτάται από τον απώτερο σκοπό της μελέτης DL. Εάν ο σκοπός είναι να διαπιστωθεί κατά πόσον μια συγκεκριμένη χημική ουσία επάγει μεταλλάξεις DL, τότε η αποδεκτή μέθοδος θα είναι η έκθεση ενός ολόκληρου κύκλου σπερματογένεσης (π.χ. 7 εβδομάδες στον ποντικό, 5-7 αγωγές ανά εβδομάδα) και ένα ζευγάρωμα στο τέλος. Ωστόσο, εάν ο σκοπός είναι η ταυτοποίηση του ευαίσθητου τύπου γεννητικού κυττάρου ως προς την επαγωγή DL, τότε προτιμάται μία μοναδική έκθεση ή έκθεση 5 ημερών, ακολουθούμενη από εβδομαδιαίο ζευγάρωμα.

Επίπεδα δόσης

24. Εάν χρειάζεται προκαταρκτική μελέτη προσδιορισμού εύρους τιμών επειδή δεν υπάρχουν ήδη κατάλληλα δεδομένα για να υποβοηθήσουν την επιλογή δόσεων, η εν λόγω μελέτη θα πρέπει να διεξάγεται στο ίδιο εργαστήριο, με τη χρήση του ίδιου είδους, φυλής, φύλου ζώων και σχήματος αγωγής όπως στην κύρια μελέτη (26). Η μελέτη θα πρέπει να αποσκοπεί στον προσδιορισμό της μέγιστης ανεκτής δόσης (ΜΑΔ), η οποία ορίζεται ως η ανώτατη δόση που μπορεί να γίνει ανεκτή χωρίς εκδήλωση τοξικότητας η οποία θα περιόριζε τη μελέτη, σε σχέση με τη διάρκεια της μελέτης (π.χ. ασυνήθη συμπεριφορά ή ασυνήθεις αντιδράσεις, μικρή μείωση του σωματικού βάρους ή κυτταροτοξικότητα στο αιμοποιητικό σύστημα), αλλά όχι θάνατο ή εκδήλωση πόνου, οδύνης ή αγωνίας που καθιστούν αναγκαία τη θανάτωση με ευθανασία (27).

25. Επίσης, η ΜΑΔ δεν πρέπει να επηρεάζει δυσμενώς το επιτυχές ζευγάρωμα (21).

26. Υπό δοκιμή χημικές ουσίες με ειδική βιολογική δράση σε χαμηλές, μη τοξικές δόσεις (όπως οι ορμόνες και τα μιτογόνα), καθώς και χημικές ουσίες που παρουσιάζουν κορεσμό των τοξικοκινητικών ιδιοτήτων, μπορεί να αποτελούν εξαιρέσεις των κριτηρίων καθορισμού των δόσεων και θα πρέπει να αξιολογούνται κατά περίπτωση.

27. Για να ληφθούν πληροφορίες σχετικά με τη σχέση δόσης-απόκρισης, μια ολοκληρωμένη μελέτη θα πρέπει να περιλαμβάνει ομάδα αρνητικών μαρτύρων και τουλάχιστον τρία επίπεδα δόσεων, τα οποία κατά κανόνα διαφέρουν κατά έναν συντελεστή ίσο με το 2, αλλά πάντως όχι μεγαλύτερο του 4. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν προκαλεί τοξικότητα σε μελέτη προσδιορισμού εύρους τιμών ή με βάση τα υπάρχοντα δεδομένα, η ανώτατη δόση για εφάπαξ χορήγηση θα πρέπει να είναι 2 000 mg/kg σωματικού βάρους.

▼M8

Ωστόσο, εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία προκαλεί τοξικότητα, η ΜΑΔ θα πρέπει να είναι η ανώτατη χορηγούμενη δόση και τα χρησιμοποιούμενα επίπεδα δόσεων θα πρέπει, κατά προτίμηση, να καλύπτουν το φάσμα από τη μέγιστη δόση μέχρι τη δόση που προκαλεί ελάχιστη ή μηδενική τοξικότητα. Όσον αφορά μη τοξικές χημικές ουσίες, η οριακή δόση για περίοδο χορήγησης 14 ημερών και άνω είναι 1 000 mg/kg σωματικού βάρος/ημέρα, ενώ για περιόδους χορήγησης κάτω των 14 ημερών, η οριακή δόση είναι 2 000 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα.

Χορήγηση των δόσεων

28. Κατά τον σχεδιασμό της δοκιμής θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η προβλεπόμενη οδός έκθεσης του ανθρώπου. Επιτρέπεται επομένως η αιτιολογημένη επιλογή οδών έκθεσης όπως μέσω της τροφής ή του πόσιμου νερού, με υποδόρια ή ενδοφλέβια ένεση, με τοπική εφαρμογή, μέσω της εισπνοής, από το στόμα (με στομαχικό καθετήρα) ή η εμφύτευση. Σε κάθε περίπτωση, η οδός έκθεσης θα πρέπει να επιλέγεται κατά τρόπο ώστε να εξασφαλίζεται επαρκής έκθεση του ή των στοχευόμενων ιστών. Η ενδοπεριτοναϊκή ένεση δεν συνιστάται κατά κανόνα, διότι δεν αποτελεί σκοπούμενη οδό έκθεσης του ανθρώπου, και θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο με ειδική επιστημονική αιτιολόγηση. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία αναμειγνύεται με την τροφή ή το πόσιμο νερό, ιδίως στην περίπτωση των εφάπαξ δόσεων, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε το διάστημα μεταξύ της κατανάλωσης νερού και τροφής και του ζευγαρώματος να επαρκεί για την ανίχνευση των επιδράσεων (παράγραφος 31). Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί με στομαχικό καθετήρα ή ένεση κάθε φορά εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Ο όγκος δεν θα πρέπει κανονικά να υπερβαίνει το 1 ml/100 g σωματικού βάρους, εκτός από την περίπτωση των υδατικών διαλυμάτων, όπου επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται κατά μέγιστο όριο 2 ml/100 g σωματικού βάρους. Η χρήση μεγαλύτερου όγκου (εφόσον το επιτρέπει η νομοθεσία για την καλή μεταχείριση των ζώων) θα πρέπει να αιτιολογείται. Η μεταβλητότητα των όγκων δοκιμής θα πρέπει να ελαχιστοποιείται με ρύθμιση της συγκέντρωσης, ώστε να εξασφαλίζεται η χορήγηση σταθερού όγκου σε σχέση με το σωματικό βάρος σε όλα τα επίπεδα δόσεων.

Παρατηρήσεις

29. Τα πειραματόζωα θα πρέπει να υποβάλλονται σε γενική κλινική εξέταση και τα κλινικά σημεία να καταγράφονται τουλάχιστον μία φορά ημερησίως, κατά προτίμηση την ίδια ώρα/-ες και λαμβανομένου υπόψη του χρόνου κορύφωσης των αναμενόμενων επιδράσεων μετά τη χορήγηση της δόσης. Όλα τα ζώα θα πρέπει να εξετάζονται τουλάχιστον δύο φορές ημερησίως κατά την περίοδο της χορήγησης για τη διαπίστωση τυχόν νοσηρότητας και θνησιμότητας. Όλα τα ζώα θα πρέπει να ζυγίζονται κατά την έναρξη της μελέτης, τουλάχιστον μία φορά εβδομαδιαίως κατά τη διεξαγωγή μελετών επαναλαμβανόμενων δόσεων, και κατά τη χρονική στιγμή της ευθανασίας. Η κατανάλωση τροφής θα πρέπει να μετράται τουλάχιστον εβδομαδιαίως. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται με το πόσιμο νερό, η κατανάλωση νερού θα πρέπει να μετράται σε κάθε αλλαγή νερού και τουλάχιστον εβδομαδιαίως. Τα ζώα που εμφανίζουν μη θανατηφόρους δείκτες υπερβολικής τοξικότητας θα πρέπει να υποβάλλονται σε ευθανασία πριν από τη λήξη της περιόδου δοκιμής (27).

Συλλογή και επεξεργασία ιστών

30. Τα θηλυκά υποβάλλονται σε ευθανασία κατά το δεύτερο ήμισυ της εγκυμοσύνης, τη 13η ημέρα κύησης στον ποντικό και τη 14η-15η ημέρα κύησης στον επίμυ. Οι μήτρες εξετάζονται για επιδράσεις θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρα προκειμένου να προσδιοριστεί ο αριθμός των εμφυτευμένων, των ζωντανών και των νεκρών εμβρύων, καθώς και των ωχρών σωματίων.

31. Τα κέρατα της μήτρας και οι ωοθήκες αποκαλύπτονται με σκοπό την καταμέτρηση των ωχρών σωματίων, και τα διαμορφωμένα έμβρυα αφαιρούνται, καταμετρώνται και ζυγίζονται. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε οι μήτρες να εξετάζονται για επαναπορροφηθέντα έμβρυα που είναι δυσδιάκριτα λόγω ζωντανών εμβρύων και να εξασφαλίζεται η καταμέτρηση όλων των επαναπορροφηθέντων εμβρύων. Καταγράφεται η θνησιμότητα των διαμορφωμένων εμβρύων. Καταγράφεται επίσης ο αριθμός των γονιμοποιημένων θηλυκών και ο αριθμός των συνολικών εμφυτευμένων εμβρύων,

▼M8

οι προεμφυτευματικές απώλειες και η μετεμφυτευματική θνησιμότητα (περιλαμβάνονται τα επαναπορροφηθέντα πρώιμα και όψιμα έμβρυα). Επιπλέον, τα ορατά διαμορφωμένα έμβρυα μπορούν να διατηρηθούν σε μονιμοποιητικό διάλυμα Bouin για τουλάχιστον 2 εβδομάδες, και, στη συνέχεια, να υποβληθούν σε εξέταση για σοβαρές εξωτερικές δυσπλασίες (28) για την εξαγωγή πρόσθετων πληροφοριών σχετικά με τις επιδράσεις της υπό δοκιμή ουσίας στην αναπαραγωγή και την ανάπτυξη.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

32. Τα δεδομένα πρέπει να παρουσιάζονται με μορφή πίνακα για να δείχνουν τον αριθμό των ζευγαρωμένων αρσενικών, τον αριθμό των εγκύων θηλυκών και τον αριθμό των μη εγκύων θηλυκών ζώων. Τα αποτελέσματα κάθε ζευγαρώματος, συμπεριλαμβανομένης της ταυτότητας κάθε αρσενικού και θηλυκού, πρέπει να εκτίθενται χωριστά. Πρέπει να αναφέρεται το διάστημα ζευγαρώματος, το επίπεδο δόσης για τα αρσενικά, και οι αριθμοί των ζωντανών και νεκρών εμφυτευμένων εμβρύων για τα θηλυκά.

33. Η μετεμφυτευματική απώλεια υπολογίζεται με βάση την αναλογία νεκρών εμφυτευμένων εμβρύων προς τα συνολικά εμφυτευμένα έμβρυα από την ομάδα αγωγής, συγκρινόμενη με την αναλογία νεκρών προς συνολικά εμφυτευμένα έμβρυα από την ομάδα μαρτύρων με φορέα/διαλύτη.

34. Η προεμφυτευματική απώλεια υπολογίζεται ως η διαφορά μεταξύ του αριθμού των ωχρών σωματίων και του αριθμού των εμφυτευμένων εμβρύων, ή ως η μείωση του μέσου αριθμού των εμφυτευμένων εμβρύων ανά θηλυκό σε σύγκριση με τα ζευγαρώματα μαρτύρων. Πρέπει να αναφερθεί, εφόσον έχει εκτιμηθεί, η προεμφυτευματική απώλεια.

35. Ο συντελεστής θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρα εκτιμάται ως εξής: (μετεμφυτευματικοί θάνατοι/συνολικές εμφυτεύσεις ανά θηλυκό) × 100.

36. Θα πρέπει να αναφέρονται δεδομένα για την τοξικότητα και τα κλινικά σημεία (σύμφωνα με την παράγραφο 29).

Κριτήρια αποδοχής

37. Τα ακόλουθα κριτήρια καθορίζουν την αποδοχή μιας δοκιμής.

— Ο παράλληλος αρνητικός μάρτυρας συμφωνεί με τα δημοσιευμένα πρότυπα για τα ιστορικά δεδομένα για τους αρνητικούς μάρτυρες, καθώς και με τα ιστορικά δεδομένα του εργαστηρίου για τους μάρτυρες, εφόσον υπάρχουν (βλ. παραγράφους 10 και 18).

— Οι παράλληλοι θετικοί μάρτυρες επάγουν αποκρίσεις που συμφωνούν με τα δημοσιευμένα πρότυπα για τα ιστορικά δεδομένα για θετικούς μάρτυρες ή με τη βάση ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για θετικούς μάρτυρες, εφόσον υπάρχει, και προκαλούν στατιστικά σημαντική αύξηση σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα (βλ. παραγράφους 17 και 18).

— Αναλύεται επαρκής αριθμός συνολικών εμφυτευμένων εμβρύων και δόσεων (παράγραφος 20).

— Τα κριτήρια επιλογής της ανώτατης δόσης είναι σύμφωνα με αυτά που περιγράφονται στις παραγράφους 24 και 27.

Αξιολόγηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

38. Προκειμένου να συγκεντρωθούν επαρκή δεδομένα για ανάλυση της σχέσης δόσης–απόκρισης, θα πρέπει να αναλύονται τουλάχιστον τρεις ομάδες στις οποίες χορηγήθηκαν δόσεις.

▼**M8**

39. Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται σαφώς θετική εάν:

— τουλάχιστον σε μία από τις δόσεις δοκιμής εμφανίζεται στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα,

— η αύξηση σχετίζεται με τις δόσεις σε τουλάχιστον μία πειραματική συνθήκη (π.χ. εβδομαδιαίο διάστημα ζευγαρώματος) όταν εκτιμάται με κατάλληλο στατιστικό έλεγχο, και

— κάποιο από τα αποτελέσματα βρίσκεται εκτός του αποδεκτού πεδίου τιμών των δεδομένων αρνητικού μάρτυρα, ή της κατανομής των ιστορικών δεδομένων για αρνητικούς μάρτυρες του εργαστηρίου (π.χ. όριο ελέγχου σε επίπεδο 95 % με βάση την κατανομή Poisson), εφόσον υπάρχουν.

Θεωρείται τότε ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι ικανή να επάγει μεταλλάξεις θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρα σε γεννητικά κύτταρα των πειραματόζωων. Συστάσεις για τις προσφορότερες στατιστικές μεθόδους παρατίθενται στην παράγραφο 44, ενώ άλλες συνιστώμενες στατιστικές προσεγγίσεις έχουν επίσης διατυπωθεί στη βιβλιογραφία (20) (21) (22) (24) (29). Η πειραματική μονάδα στους χρησιμοποιούμενους στατιστικούς ελέγχους θα πρέπει να είναι το ζώο.

40. Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται σαφώς αρνητική εάν:

— σε καμία από τις δόσεις δοκιμής δεν εμφανίζεται στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα,

— δεν υφίσταται αύξηση που σχετίζεται με τις δόσεις σε καμία πειραματική συνθήκη, και

— όλα τα αποτελέσματα εμπίπτουν εντός του αποδεκτού πεδίου τιμών των δεδομένων αρνητικού μάρτυρα, ή των ιστορικών δεδομένων για αρνητικούς μάρτυρες του εργαστηρίου (π.χ. όριο ελέγχου σε επίπεδο 95 % με βάση την κατανομή Poisson), εφόσον υπάρχουν.

Θεωρείται τότε ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν είναι ικανή να επάγει μεταλλάξεις θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρα σε γεννητικά κύτταρα των πειραματόζωων.

41. Δεν απαιτείται επαλήθευση των σαφώς θετικών ή σαφώς αρνητικών αποκρίσεων.

42. Όταν η απόκριση δεν είναι ούτε σαφώς αρνητική ούτε σαφώς θετική, και προκειμένου να διαπιστωθεί η βιολογική σημασία ενός αποτελέσματος (π.χ. ασθενής ή οριακή αύξηση), τα δεδομένα θα πρέπει να αξιολογούνται με βάση την κρίση ειδικών και/ή περαιτέρω διερεύνηση με χρήση των υπαρχόντων πειραματικών δεδομένων, όπως το κατά πόσον το θετικό αποτέλεσμα είναι εκτός του αποδεκτού πεδίου τιμών των δεδομένων αρνητικού μάρτυρα, ή των ιστορικών δεδομένων αρνητικού μάρτυρα του εργαστηρίου (30).

43. Σε σπάνιες περιπτώσεις, ακόμη και μετά από περαιτέρω διερεύνηση, το σύνολο δεδομένων δεν επιτρέπει την εξαγωγή συμπεράσματος για θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα και, κατά συνέπεια, η έκβαση κρίνεται αμφίβολη.

44. Η πειραματική μονάδα στους χρησιμοποιούμενους στατιστικούς ελέγχους θα πρέπει να είναι το αρσενικό ζώο. Παρότι τα αριθμητικά δεδομένα (π.χ. ο αριθμός εμφυτευμένων εμβρύων ανά θηλυκό) μπορεί να παρουσιάζουν κατανομή Poisson και/ή οι αναλογίες (π.χ. αναλογία νεκρών εμφυτευμένων εμβρύων) μπορεί να παρουσιάζουν διωνυμική κατανομή, συχνά τα δεδομένα αυτά παρουσιάζουν υπερδιασπορά (31). Επομένως, κατά τη στατιστική ανάλυση θα πρέπει πρώτα να χρησιμοποιείται έλεγχος για υπερδιασπορά και υποδιασπορά με χρήση ελέγχων διασποράς όπως ο έλεγχος διωνυμικής διασποράς Cochran (32) ή ο έλεγχος διωνυμικής υπερδιασποράς Tarone C(α) (31) (33). Εάν δεν διαπιστωθεί απόκλιση από τη διωνυμική διασπορά, μπορούν να ελεγχθούν οι τάσεις των αναλογιών στα επίπεδα δόσεων με χρήση

▼M8

του ελέγχου τάσεων Cochran-Armitage (34), και μπορούν να ελεγχθούν συγκρίσεις κατά ζεύγη με την ομάδα μάρτυρα με χρήση του ακριβούς ελέγχου του Fisher (35). Παρομοίως, εάν δεν διαπιστωθεί απόκλιση από τη διασπορά Poisson, μπορούν να ελεγχθούν οι τάσεις στις καταμετρήσεις με χρήση της παλινδρόμησης Poisson (36) και μπορούν να ελεγχθούν συγκρίσεις κατά ζεύγη με την ομάδα μάρτυρα στο πλαίσιο του μοντέλου Poisson, με χρήση αντιθέσεων κατά ζεύγη (36). Εάν διαπιστωθεί σημαντική υπερδιασπορά ή υποδιασπορά, συνιστάται η χρήση μη παραμετρικών μεθόδων (23) (31). Τέτοιες μέθοδοι είναι οι έλεγχοι τάξεων μεγέθους, όπως ο έλεγχος Jonckheere-Terpstra για τάση (37) και οι έλεγχοι Mann-Whitney (38) για συγκρίσεις κατά ζεύγη με την ομάδα μαρτύρων φορέα/διαλύτη, καθώς και οι έλεγχοι αντιμετάθεσης, επαναδειγματοληψίας ή bootstrap για τάση και οι συγκρίσεις κατά ζεύγη με την ομάδα μαρτύρων (31) (39).

45. Η θετική δοκιμασία DL παρέχει αποδεικτικά στοιχεία για τη γονιδιοτοξικότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στα γεννητικά κύτταρα των αρσενικών του δοκιμαζόμενου ζωικού είδους μετά από αγωγή.

46. Αν εξεταστεί το κατά πόσον οι παρατηρούμενες τιμές περικλείονται στο ιστορικό πεδίο τιμών για τους μάρτυρες, είναι δυνατόν να προκύψουν ενδείξεις για την αξιολόγηση της βιολογικής σημασίας της απόκρισης (40).

Έκθεση δοκιμής

47. Στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται τα ακόλουθα στοιχεία.

Συνοπτική παρουσίαση

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

— πηγή, αριθμός παρτίδας, καταληκτική ημερομηνία χρήσης, εφόσον υπάρχει,

— σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εάν είναι γνωστή,

— διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον διαλύτη, εάν είναι γνωστές,

— μέτρηση του pH, της ωσμωμοριακότητας και του ιζήματος του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας στο οποίο προστέθηκε η υπό δοκιμή χημική ουσία, κατά περίπτωση.

Μονοσυστατική ουσία:

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμίξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγματα:

— περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Παρασκεύασμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας:

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα,

— διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον διαλύτη/φορέα, εάν είναι γνωστές,

▼**M8**

— παρασκευή σκευασμάτων για χορήγηση μέσω της τροφής, του πόσιμου νερού ή της εισπνοής,

— αναλυτικοί προσδιορισμοί στα σκευάσματα (π.χ. σταθερότητα, ομοιογένεια, ονομαστικές συγκεντρώσεις), όταν έχουν διενεργηθεί.

Πειραματόζωα:

— είδος/φυλή που χρησιμοποιήθηκε και αιτιολόγηση της επιλογής του,

— αριθμός, ηλικία και φύλο των ζώων,

— προέλευση των ζώων, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσιο κ.λπ.,

— μέθοδος ατομικής ταυτοποίησης των ζώων,

— για βραχυπρόθεσμες μελέτες: βάρος κάθε αρσενικού ζώου κατά την έναρξη και τη λήξη της δοκιμής, για μελέτες διάρκειας μεγαλύτερης της μίας εβδομάδας: βάρος κάθε ζώου κατά τη διάρκεια της μελέτης και κατανάλωση τροφής. Θα πρέπει να περιλαμβάνονται το εύρος τιμών, η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση του σωματικού βάρους για κάθε ομάδα.

Συνθήκες δοκιμής:

— δεδομένα για τους θετικούς μάρτυρες και τους αρνητικούς μάρτυρες με φορέα/διαλύτη,

— δεδομένα από τη μελέτη καθορισμού εύρους,

— αιτιολόγηση της επιλογής των επιπέδων δόσης,

— λεπτομέρειες για το παρασκεύασμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας,

— λεπτομέρειες σχετικά με τη χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας,

— αιτιολόγηση της επιλογής της οδού χορήγησης,

— μέθοδοι μέτρησης της τοξικότητας στα ζώα, συμπεριλαμβανομένων, εάν είναι διαθέσιμες, ιστοπαθολογικών ή αιματολογικών αναλύσεων και της συχνότητας με την οποία πραγματοποιήθηκαν παρατηρήσεις ή μετρήθηκε το σωματικό βάρος των ζώων,

— μέθοδοι με τις οποίες εξακριβώθηκε ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία έφτασε στον στοχευόμενο ιστό ή εισήλθε στη γενική κυκλοφορία του αίματος, εάν τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά,

— πραγματική δόση (mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα), υπολογιζόμενη από τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο σιτηρέσιο/στο πόσιμο νερό (ppm) και την κατανάλωση, κατά περίπτωση,

— λεπτομέρειες σχετικά με την ποιότητα της τροφής και του νερού,

— λεπτομέρειες σχετικά με τον εμπλουτισμό του περιβάλλοντος του κλωβού,

— λεπτομερής περιγραφή των χρονοδιαγραμμάτων αγωγής και δειγματοληψίας και αιτιολόγηση των επιλογών,

— μέθοδος αναλγησίας,

— μέθοδος ευθανασίας,

▼**M8**

— διαδικασίες απομόνωσης και διατήρησης των ιστών,

— προέλευση και αριθμοί παρτίδας όλων των έτοιμων αντιδραστηρίων (κιτ) και των αντιδραστηρίων (κατά περίπτωση),

— μέθοδοι αρίθμησης των DL,

— χρονοδιάγραμμα ζευγαρώματος,

— μέθοδοι για την διαπίστωση του ζευγαρώματος,

— χρόνος ευθανασίας,

— κριτήρια βαθμολόγησης των επιδράσεων DL, περιλαμβανομένων των ωχρών σωματίων, των εμφυτευμένων εμβρύων, των επαναπορροφημένων εμβρύων και των μετεμφυτευματικών απωλειών, των ζωντανών και των νεκρών εμφυτευμένων εμβρύων.

Αποτελέσματα:

— κατάσταση των ζώων πριν από την περίοδο δοκιμής και καθ' όλη τη διάρκειά της, συμπεριλαμβανομένων των σημείων τοξικότητας,

— σωματικό βάρος των αρσενικών κατά τη διάρκεια των περιόδων αγωγής και ζευγαρώματος,

— αριθμός ζευγαρωμένων θηλυκών,

— σχέση δόσης-απόκρισης, κατά το δυνατόν,

— δεδομένα για τους παράλληλους και τους ιστορικούς αρνητικούς μάρτυρες, με πεδία τιμών, μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις,

— δεδομένα για τους παράλληλους θετικούς μάρτυρες,

— στοιχεία με μορφή πινάκων για κάθε μητέρα: αριθμός ωχρών σωματίων ανά μητέρα, αριθμός εμφυτευμένων εμβρύων ανά μητέρα, αριθμός επαναπορροφημένων εμβρύων και προεμφυτευματικών απωλειών ανά μητέρα, αριθμός ζωντανών εμφυτευμένων εμβρύων ανά μητέρα, αριθμός νεκρών εμφυτευμένων εμβρύων ανά μητέρα, βάρη διαμορφωμένων εμβρύων,

— τα ανωτέρω στοιχεία εν συνόψει για κάθε περίοδο ζευγαρώματος και δόση, με συχνότητες θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρα,

— στατιστικές αναλύσεις και εφαρμοσθείσες μέθοδοι.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

Συμπέρασμα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.

(2) Bateman, A.J. (1977). The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse, in Handbook of Mutagenicity Test Procedures B.J. Kilbey *et. al.* (Eds.) pp. 235-334, Elsevier, Amsterdam

(3) Ehling U.H., Ehling, U.H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Frohberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Pheh, J., Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M., and Wiemann, H. (1978). Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice. Set up by the Work Group «Dominant» lethal mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics, Arch. *Toxicol., 39*, 173-185

▼**M8**

(4) Shelby M.D. (1996). Selecting Chemicals and Assays for Assessing Mammalian Germ Cell Mutagenicity. Mutation Res,. 352:159-167.

(5) Knudsen I., Knudsen, I., Hansen, E.V., Meyer, O.A. and Poulsen, E. (1977). A proposed Method for the Simultaneous Detection of Germ-Cell Mutations Leading to Fetal Death (Dominant Lethality) and of Malformations (Male Teratogenicity) in Mammals. Mutation Res., 48:267-270.

(6) Anderson D., Hughes, J.A., Edwards, A.J. and Brinkworth, M.H. (1998). A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3-Butadiene. Mutation Res., 397:77-74.

(7) Shively C.A., C.A., White, D.M., Blauch, J.L. and Tarka, S.M. Jr. (1984). Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats. *Toxicol.* Lett. 20:325-329.

(8) Rao K.S., Cobel-Geard, S.R., Young, J.T., Hanley, T.R. Jr., Hayes, W.C., John, J.A. and Miller, R.R. (1983). Ethyl Glycol Monomethyl Ether II. Reproductive and dominant Lethal Studies in Rats. Fundam. Appl. *Toxicol*., 3:80-85.

(9) Brewen J.G., Payne, H.S., Jones, K.P., and Preston, R.J. (1975). Studies on Chemically Induced Dominant Lethality. I. The Cytogenetic Basis of MMS-Induced Dominant Lethality in Post-Meiotic Male Germ Cells, Mutation Res., 33, 239-249.

(10) Marchetti F., Bishop, J.B., Cosentino, L., Moore II, D. and Wyrobek, A.J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. Biol. Reprod., 70:616-624.

(11) Marchetti F. and Wyrobek, A.J. (2005). Mechanisms and Consequences of Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations. Birth Defects Res., C 75:112-129.

(12) Adler I.D. (1996). Comparison of the Duration of Spermatogenesis Between Rodents and Humans. Mutation Res., 352:169-172.

(13) Favor J., and Crenshaw J.W. (1978). EMS-Induced Dominant Lethal Dose Response Curve in DBA/1J Male Mice, Mutation Res., 53: 21–27.

(14) Generoso W.M., Witt, K.L., Cain, K.T., Hughes, L. Cacheiro, N.L.A, Lockhart, A.M.C. and Shelby, M.D. (1995). Dominant Lethal and Heritable Translocation Test with Chlorambucil and Melphalan. Mutation Res., 345:167-180.

(15) Hastings S.E., Huffman K.W. and Gallo M.A. (1976). The dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine, Mutation Res., 40:371-378.

(16) James D.A. and Smith D.M. (1982). Analysis of Results from a Collaborative Study of the Dominant Lethal Assay, Mutation Res., 99:303-314.

(17) Shelby M.D., Cain, K.T., Hughes, L.A., Braden, P.W. and Generoso, W.M. (1986). Dominant Lethal Effects of Acrylamide in Male Mice. Mutation Res., 173:35-40.

▼**M8**

(18) Sudman P.D., Rutledge, J.C., Bishop, J.B. and Generoso W.M. (1992). Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice, Mutation Res., 296: 143-156.

(19) Holstrom L.M., Palmer A.K. and Favor, J. (1993). The Rodent Dominant Lethal Assay. In Supplementary Mutagenicity Tests. Kirkland D.J. and Fox M. (Eds.), Cambridge University Press, pp. 129-156.

(20) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417:19–30.

(21) Adler I.D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312:313-318.

(22) Generoso W.M. and Piegorsch W.W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. Methods, *Toxicol*., 3A:124-141.

(23) Haseman J.K. and Soares E.R. (1976).The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects. Mutation. Res., 41: 277-288.

(24) Whorton E.B. Jr. (1981). Parametric Statistical Methods and Sample Size Considerations for Dominant Lethal Experiments. The Use of Clustering to Achieve Approximate Normality, Teratogen. Carcinogen. *Mutagen*., 1:353 – 360.

(25) Anderson D., Anderson, D., Hodge, M.C.E., Palmer, S., and Purchase, I.F.H. (1981). Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies. Mutation. Res., 85:417-429.

(26) Fielder R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagen., 7:313-319.

(27) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.19.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(28) Barrow M.V., Taylor W.J and Morphol J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses, 127, 291–306.

(29) Kirkland D.J., (Ed.)(1989). Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Cambridge University Press.

(30) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper P., Lovell D., Martus H.-J. and Thybaud V. (2011). «Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data», Mutation. Res., 723:87-90.

(31) Lockhart A.C., Piegorsch W.W. and Bishop J.B. (1992). Assessing Over Dispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay. Mutation. Res., 272:35-58.

(32) Cochran W.G. (1954). Some Methods for Strengthening the Common χ^2 Tests. Biometrics, 10: 417-451.

▼**M8**

(33) Tarone R.E. (1979). Testing the Goodness of Fit of the Binomial Distribution. *Biometrika*, 66: 585-590.

(34) Margolin B.H. (1988). Test for Trend in Proportions. In *Encyclopedia of* Statistical Sciences, Volume 9, Kotz S. and Johnson N. L. (Eds.), pp. 334-336. John Wiley and Sons, New York.

(35) Cox D.R., Analysis of Binary Data. Chapman and Hall, London (1970).

(36) Neter J.M., Kutner, H.C., Nachtsheim, J. and Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models, Fourth Edition, Chapters 14 and 17. McGraw-Hill, Boston

(37) Jonckheere R. (1954). A Distribution-Free K-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika*, 41:133-145.

(38) Conover W.J. (1971). Practical Nonparametric Statistics. John Wiley and Sons, New York

(39) Efron, B. (1982). The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA.

(40) Fleiss J. (1973). Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley and Sons, New York.

▼**M8**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα

Ωχρό σωμάτιο: η δομή που σχηματίζεται στην ωοθήκη, στο σημείο ενός ωοθυλακίου που έχει απελευθερώσει ωάριο, και η οποία εκκρίνει ορμόνες. Ο αριθμός των ωχρών σωματίων στις ωοθήκες αντιστοιχεί στον αριθμό των ωαρίων που παρήχθησαν κατά την ωορρηξία.

Επικρατούσα θανατηφόρα μετάλλαξη: μετάλλαξη που εμφανίζεται σε γεννητικό κύτταρο, ή εγκαθίσταται μετά τη γονιμοποίηση, και η οποία προκαλεί θάνατο πρώιμου ή όψιμου εμβρύου.

Ποσοστό γονιμότητας: ο αριθμός των ζευγαρωμένων εγκύων θηλυκών προς τον αριθμό των ζευγαρωμένων θηλυκών.

Διάστημα ζευγαρώματος: το χρονικό διάστημα μεταξύ του τέλους της έκθεσης και του ζευγαρώματος των αρσενικών αγωγής. Με κατάλληλη ρύθμιση του διαστήματος αυτού μπορούν να αξιολογηθούν οι χημικές επιδράσεις στους διάφορους τύπους γεννητικών κυττάρων. Στον ποντικό, το ζευγάρωμα κατά την 1η, 2η, 3η, 4η, 5η, 6η, 7η και 8η εβδομάδα μετά το τέλος της έκθεσης εξετάζει τις επιδράσεις στα σπερματοζωάρια, στις συμπυκνωμένες σπερματίδες, τις στρογγυλές σπερματίδες, τα παχυταινικά σπερματοκύτταρα, τα πρώιμα σπερματοκύτταρα, τα διαφοροποιημένα σπερματογόνια, τα διαφοροποιούμενα σπερματογόνια και τα βλαστοκυτταρικά σπερματογόνια.

Προεμφυτευματική απώλεια: η διαφορά μεταξύ του αριθμού των εμφυτευμένων εμβρύων και του αριθμού ωχρών σωματίων. Μπορεί να υπολογιστεί και με σύγκριση των συνολικών εμφυτευμένων εμβρύων ανά θηλυκό στις ομάδες αγωγής και μαρτύρων.

Μετεμφυτευματική απώλεια: η αναλογία νεκρών εμφυτευμένων εμβρύων στην ομάδα αγωγής σε σύγκριση με την αναλογία νεκρών προς συνολικά εμφυτευμένα έμβρυα στην ομάδα μαρτύρων.

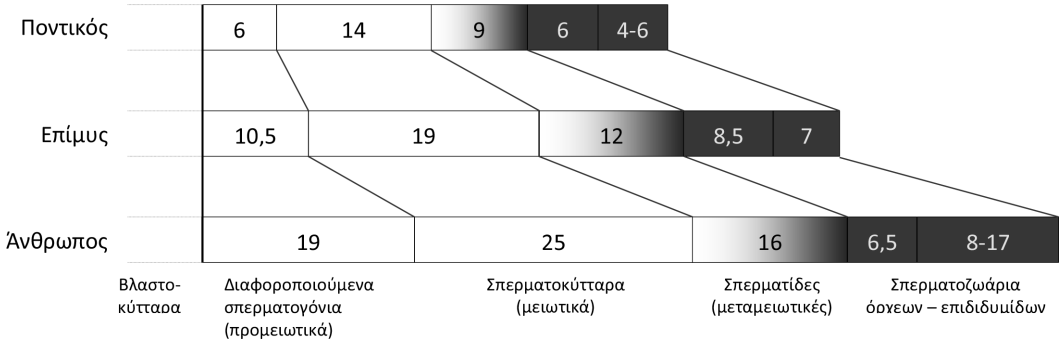
Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

UVCB: ουσία άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, προϊόντα πολύπλοκων αντιδράσεων και βιολογικά υλικά.

▼**M8**

Προσάρτημα 2

ΧΡΟΝΟΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΕ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ



Σχ. 1: Σύγκριση της διάρκειας (ημέρες) της ανάπτυξης των γεννητικών κυττάρων σε αρσενικούς ποντικούς, επίμυες και ανθρώπους. Στη διάρκεια των περιόδων που είναι σκιασμένες δεν πραγματοποιείται επιδιόρθωση DNA.

Παραπάνω παρουσιάζεται σχηματικό διάγραμμα της σπερματογένεσης στον ποντικό, τον επίμυ και τον άνθρωπο (Adler, 1996). Μεταξύ των μη διαφοροποιημένων σπερματογονίων περιλαμβάνονται: μονά (A-single)· ζευγαρωτά (A-paired)· και στοιχισμένα (A-aligned) σπερματογόνια (Hess and de Franca, 2008). Τα μονά (A-single) θεωρούνται τα καθαυτό βλαστοκύτταρα· ως εκ τούτου, προκειμένου να αξιολογηθούν οι επιδράσεις στα βλαστοκύτταρα πρέπει να παρέλθουν τουλάχιστον 49 ημέρες (στον ποντικό) μεταξύ της τελευταίας ένεσης με την υπό δοκιμή χημική ουσία και του ζευγαρώματος.

Παραπομπές

Adler, ID (1996). Comparison of the duration of spermatogenesis between rodents and humans. Mutat Res, 352:169-172.

Hess, RA, De Franca LR (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. Στο: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, C. Yan Cheng (Ed), Landes Biosciences and Springer Science&Business Media:1-15.

▼**M8**

Β.23. ΔΟΚΙΜΗ ΣΠΕΡΜΟΓΟΝΙΑΚΗΣ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗΣ ΕΚΤΡΟΠΗΣ ΣΕ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 483 του ΟΟΣΑ (2016). Οι μέθοδοι δοκιμών επανεξετάζονται κατά περιόδους υπό το φως των επιστημονικών εξελίξεων, των μεταβαλλόμενων κανονιστικών αναγκών και παραμέτρων που αφορούν την καλή μεταχείριση των ζώων. Η παρούσα τροποποιημένη έκδοση της μεθόδου δοκιμών αντικατοπτρίζει πολλά έτη εμπειρίας με τη συγκεκριμένη δοκιμή και παρέχει τη δυνατότητα ενσωμάτωσης ή συνδυασμού της εν λόγω δοκιμής με άλλες δοκιμές τοξικότητας ή γονιδιοτοξικότητας. Ο συνδυασμός μελετών τοξικότητας παρέχει τη δυνατότητα σημαντικής μείωσης του αριθμού των ζώων που χρησιμοποιούνται στις δοκιμές τοξικότητας. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών αποτελεί μέρος μιας σειράς μεθόδων δοκιμών γενετικής τοξικολογίας. Ο ΟΟΣΑ έχει συντάξει ένα έγγραφο με συνοπτικές πληροφορίες για τις δοκιμές γενετικής τοξικολογίας και μια επισκόπηση των πρόσφατων αλλαγών που έγιναν στις κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών γενετικής τοξικότητας του ΟΟΣΑ (1).

2. Σκοπός της *in vivo* δοκιμής σπερμογονιακής χρωμοσωμικής εκτροπής σε θηλαστικά είναι ο εντοπισμός εκείνων των χημικών ουσιών που προκαλούν δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές σε σπερμογονιακά κύτταρα θηλαστικών (2) (3) (4). Επιπλέον, η παρούσα δοκιμή είναι σημαντική για την αξιολόγηση της γονιδιοτοξικότητας, διότι οι παράγοντες των διεργασιών μεταβολισμού, φαρμακοκινητικής και επιδιόρθωσης του DNA *in vivo*, αν και μπορεί να διαφέρουν μεταξύ των ειδών, είναι ενεργοί και συμβάλλουν στην απόκριση. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν έχει σχεδιαστεί για μέτρηση των αριθμητικών ανωμαλιών· η δοκιμασία δεν χρησιμοποιείται συνήθως για αυτόν τον σκοπό.

3. Η παρούσα δοκιμή μετρά τις δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές (τόσο χρωμοσωμικού όσο και χρωματιδικού τύπου) σε διαιρούμενα σπερμογονιακά γεννητικά κύτταρα και, ως εκ τούτου, αναμένεται να μπορεί να προβλέπει την επαγωγή κληρονομήσιμων μεταλλάξεων στα εν λόγω γεννητικά κύτταρα.

4. Οι ορισμοί των βασικών όρων παρατίθενται στο προσάρτημα.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

5. Στην παρούσα δοκιμή χρησιμοποιούνται συνήθως τρωκτικά, αλλά μπορεί, σε ορισμένες περιπτώσεις, να είναι κατάλληλα και άλλα είδη, εφόσον αυτό αιτιολογείται επιστημονικά. Τα τυποποιημένα κυτταρογενετικά σκευάσματα όρχεων τρωκτικών παράγουν μιτωτικές (σπερματογόνια) και μειωτικές (σπερματοκύτταρο) μεταφάσεις. Οι μιτωτικές και μειωτικές μεταφάσεις προσδιορίζονται βάσει της μορφολογίας των χρωμοσωμάτων (4). Λυτή η *in vivo* κυτταρογενετική δοκιμή ανιχνεύει δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές σε σπερμογονιακές μιτώσεις. Άλλα κύτταρα στόχοι δεν αποτελούν αντικείμενο της μεθόδου αυτής.

6. Για την ανίχνευση εκτροπών χρωματιδικού τύπου σε σπερμογονιακά κύτταρα, θα πρέπει να εξετάζεται η πρώτη μιτωτική κυτταρική διαίρεση μετά την αγωγή, προτού οι εν λόγω εκτροπές μετατραπούν σε εκτροπές χρωμοσωμικού τύπου σε επακόλουθες κυτταρικές διαιρέσεις. Πρόσθετες πληροφορίες από τα σπερματοκύτταρα μπορούν να ληφθούν μέσω ανάλυσης μειωτικών κυττάρων για χρωμοσωμικές δομικές εκτροπές κατά τη διακίνηση-μετάφαση Ι και τη μετάφαση ΙΙ.

▼**M8**

7. Στους όρχεις υπάρχει σειρά γενεών σπερματογονίων (5), και οι εν λόγω διαφορετικοί τύποι γεννητικών κυττάρων ενδέχεται να παρουσιάζουν ένα φάσμα ευαισθησίας στην αγωγή με χημικές ουσίες. Ως εκ τούτου, οι ανιχνευόμενες εκτροπές αντιπροσωπεύουν συνολική απόκριση των πληθυσμών σπερμογονιακών κυττάρων αγωγής. Η πλειονότητα των μιτωτικών κυττάρων σε σκευάσματα όρχεων είναι σπερματογόνια Β, με κυτταρικό κύκλο περίπου 26 ωρών (3).

8. Εάν υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία, ή ο μεταβολίτης/-ες της, δεν θα φθάσει στους όρχεις, τότε αυτή δεν είναι κατάλληλη για χρήση στην παρούσα δοκιμή.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

9. Γενικά, τα ζώα εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία από κατάλληλη οδό έκθεσης και θανατώνονται με ευθανασία σε εύθετο χρόνο μετά την αγωγή. Πριν από την ευθανασία, τα ζώα υποβάλλονται σε αγωγή με παράγοντα διακοπής της μετάφασης (π.χ. κολχικίνη ή Colcemid®). Στη συνέχεια, παρασκευάζονται και χρωματίζονται χρωμοσώματα από γεννητικά κύτταρα και τα μεταφασικά κύτταρα εξετάζονται προς εντοπισμό τυχόν χρωμοσωμικών εκτροπών.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

10. Για να διαπιστωθεί η τεχνική ικανότητα διεξαγωγής της παρούσας δοκιμής, πρέπει να καταδεικνύεται η ικανότητα αναπαραγωγής των αναμενόμενων αποτελεσμάτων για τις συχνότητες δομικής χρωμοσωμικής εκτροπής στα σπερματογόνια με ουσίες που χρησιμεύουν ως θετικοί μάρτυρες (περιλαμβανομένων των ασθενών αποκρίσεων) όπως οι ουσίες που απαριθμούνται στον πίνακα 1, και να λαμβάνονται συχνότητες αρνητικών μαρτύρων που συμφωνούν με το αποδεκτό πεδίο τιμών των δεδομένων για μάρτυρες στη δημοσιευμένη βιβλιογραφία [π.χ. (2)(3)(6)(7)(8)(9)(10)] ή με την ιστορική κατανομή για τους μάρτυρες του εργαστηρίου, εάν υπάρχει.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Προετοιμασίες

Επιλογή ζωικού είδους

11. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή νεαρά ενήλικα ζώα που ανήκουν σε συνήθεις εργαστηριακές φυλές. Συνήθως χρησιμοποιούνται αρσενικοί ποντικοί· ωστόσο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν αρσενικά άλλων κατάλληλων ειδών θηλαστικών, εφόσον αυτό αιτιολογείται επιστημονικά και προκειμένου να είναι εφικτή η διεξαγωγή της παρούσας δοκιμής σε συνδυασμό με άλλη μέθοδο δοκιμών. Η επιστημονική αιτιολόγηση της χρήσης άλλων ειδών εκτός από τρωκτικά θα πρέπει να περιλαμβάνεται στην έκθεση δοκιμής.

Συνθήκες στέγασης και σίτισης των ζώων

12. Για τα τρωκτικά, η θερμοκρασία στον θάλαμο των ζώων θα πρέπει να είναι 22 °C (±3 °C). Η σχετική υγρασία, η ιδανική τιμή της οποίας είναι 50-60 %, θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 40 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου. Ο φωτισμός θα πρέπει να είναι τεχνητός, με φωτοπερίοδο 12 ωρών. Για τη διατροφή των ζώων μπορούν να χρησιμοποιούνται τα συνήθη εργαστηριακά σιτηρέσια, με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού. Όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται με την τροφή, η ανάγκη επαρκούς ανάμειξης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας είναι δυνατόν να επηρεάσει την επιλογή σιτηρεσίου. Τα τρωκτικά θα πρέπει να στεγάζονται σε μικρές ομάδες (όχι περισσότερα από πέντε ανά κλωβό), εφόσον δεν αναμένεται επιθετική συμπεριφορά, κατά προτίμηση σε κλωβούς με συμπαγές δάπεδο με κατάλληλο εμπλουτισμό του περιβάλλοντος. Εάν αιτιολογείται επιστημονικά, τα ζώα μπορούν να στεγάζονται ατομικά.

▼**M8**

Προετοιμασία των ζώων

13. Συνήθως χρησιμοποιούνται υγιή, νεαρά, ενήλικα αρσενικά ζώα (ηλικίας 8-12 εβδομάδων κατά την έναρξη της αγωγής), τα οποία κατανέμονται τυχαία στις ομάδες μαρτύρων και αγωγής. Τα ζώα ταυτοποιούνται μοναδικά με χρήση ανώδυνης, ελάχιστα επεμβατικής μεθόδου (π.χ. δακτύλιοι, ετικέτες, μικροτσίπ ή βιομετρική ταυτοποίηση, αλλά όχι αποκοπή τμήματος αυτιού ή δακτύλου) και εγκλιματίζονται στις συνθήκες του εργαστηρίου για τουλάχιστον πέντε ημέρες. Οι κλωβοί θα πρέπει να διατάσσονται με τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται οι πιθανές επιδράσεις της θέσης τους. Θα πρέπει να αποφεύγεται η διασταυρούμενη μόλυνση από τον θετικό μάρτυρα και την υπό δοκιμή χημική ουσία. Στην αρχή της δοκιμής, οι διαφορές βάρους μεταξύ των μεμονωμένων ζώων θα πρέπει να είναι ελάχιστες και να μην υπερβαίνουν το ± 20 %.

Παρασκευή των δόσεων

14. Οι στερεές υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να διαλύονται ή να εναιωρούνται σε κατάλληλους διαλύτες ή φορείς ή να αναμειγνύονται με την τροφή ή το πόσιμο νερό, πριν χορηγηθούν στα ζώα. Οι υγρές υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορούν να χορηγούνται ως έχουν ή να αραιώνονται πριν από τη χορήγηση. Σε περίπτωση έκθεσης μέσω της εισπνοής, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορούν να χορηγούνται ως αέριο, ατμοί ή αερόλυμα στερεού/υγρού, ανάλογα με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσφατα σκευάσματα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εκτός αν τα στοιχεία σχετικά με τη σταθερότητά της καταδεικνύουν ότι είναι αποδεκτή η φύλαξή της και καθορίζουν τις κατάλληλες συνθήκες φύλαξης.

Συνθήκες της δοκιμής - Διαλύτης/φορέας

15. Ο διαλύτης/φορέας θα πρέπει να μην έχει τοξικές επιδράσεις στα χρησιμοποιούμενα επίπεδα δόσεων ούτε ικανότητα χημικής αντίδρασης με τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες. Εφόσον χρησιμοποιείται άλλος διαλύτης/φορέας εκτός των καθιερωμένων, η χρήση του θα πρέπει να τεκμηριώνεται με δεδομένα αναφοράς που αποδεικνύουν τη συμβατότητά του. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατόν, να εξετάζεται πρώτα η δυνατότητα χρήσης υδατικού διαλύτη/φορέα. Παραδείγματα ευρέως χρησιμοποιούμενων συμβατών διαλυτών/φορέων είναι, μεταξύ άλλων, το νερό, ο φυσιολογικός ορός (ισότονο αλατούχο διάλυμα), το διάλυμα μεθυλοκυτταρίνης, το διάλυμα άλατος της καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης με νάτριο, το ελαιόλαδο και το αραβοσιτέλαιο. Εάν δεν υπάρχουν ιστορικά ή δημοσιευμένα δεδομένα για μάρτυρες που να αποδεικνύουν ότι ένας άτυπος διαλύτης/φορέας δεν επάγει δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές και άλλες επιβλαβείς επιδράσεις, θα πρέπει να διενεργείται μια αρχική μελέτη για να διαπιστωθεί η δυνατότητα αποδοχής των μαρτύρων με διαλύτη/φορέα.

Θετικοί μάρτυρες

16. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ζώα που χρησιμεύουν ως παράλληλοι θετικοί μάρτυρες, εκτός εάν το εργαστήριο δοκιμών έχει αποδείξει την τεχνική ικανότητα διεξαγωγής της δοκιμής και χρησιμοποιεί τη δοκιμή σε τακτική βάση κατά το πρόσφατο παρελθόν (π.χ. τουλάχιστον κατά τα τελευταία 5 έτη). Εάν δεν συμπεριλαμβάνεται ομάδα παράλληλων θετικών μαρτύρων, κάθε πείραμα θα πρέπει να περιλαμβάνει μάρτυρες καταμέτρησης (μονιμοποιημένες αντικειμενοφόρες πλάκες χωρίς χρώση). Αυτοί μπορούν να ληφθούν με την προσθήκη κατάλληλων δειγμάτων αναφοράς κατά την καταμέτρηση στο πλαίσιο της μελέτης, τα οποία έχουν ληφθεί και φυλαχθεί από χωριστό πείραμα με θετικούς μάρτυρες που εκτελείται σε τακτά διαστήματα (π.χ. ανά 6 έως 18 μήνες) στο εργαστήριο διεξαγωγής της δοκιμής· για παράδειγμα, κατά τον έλεγχο της τεχνικής ικανότητας και, στη συνέχεια, σε τακτική βάση, όποτε είναι αναγκαίο.

17. Οι ουσίες που χρησιμεύουν ως θετικοί μάρτυρες θα πρέπει να επιφέρουν με αξιοπιστία ανιχνεύσιμη αύξηση της συχνότητας των κυττάρων με δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές σε σχέση με τα αυθόρμητα επίπεδα. Οι δόσεις των θετικών μαρτύρων θα πρέπει να επιλέγονται έτσι ώστε οι επιδράσεις να είναι σαφείς αλλά να μην αποκαλύπτουν αμέσως την ταυτότητα των κωδικοποιημένων δειγμάτων στον εξεταστή. Παραδείγματα ουσιών που αποτελούν θετικούς μάρτυρες περιλαμβάνονται στον πίνακα 1.

▼M8

Πίνακας 1

Παραδείγματα χημικών ουσιών που αποτελούν θετικούς μάρτυρες

Ουσίες [αριθ. CAS] (αρ. αναφοράς)
Κυκλοφωσφαμίδιο (μονοένυδρο) [αριθ. CAS 50-18-0 (αριθ. CAS 6055-19-2)] (9)
Κυκλοεξυλαμίνη [αριθ. CAS 108-91-8] (7)
Μιτομυκίνη C [αριθ. CAS 50-07-7] (6)
Μονομερές ακρυλαμίδιο [CAS 79-06-1] (10)
Τριαιθυλενομελαμίνη [CAS 51-18-3] (8)

Αρνητικοί μάρτυρες

18. Για κάθε χρόνο δειγματοληψίας θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται και ζώα που χρησιμοποιούνται ως αρνητικοί μάρτυρες, στα οποία χορηγείται μόνο ο διαλύτης ή ο φορέας και τα οποία, κατά τα άλλα, υφίστανται την ίδια μεταχείριση όπως οι ομάδες αγωγής. Εάν δεν υπάρχουν ιστορικά ή δημοσιευμένα δεδομένα για μάρτυρες από τα οποία προκύπτει ότι ο επιλεγμένος διαλύτης/φορέας δεν επάγει χρωμοσωμικές εκτροπές ή άλλες επιβλαβείς επιδράσεις, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται επίσης, για κάθε χρόνο δειγματοληψίας, ζώα που χρησιμεύουν ως μάρτυρες που δεν υποβάλλονται σε αγωγή ώστε να διαπιστώνεται η δυνατότητα αποδοχής των μαρτύρων με τον φορέα.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αριθμός ζώων

19. Κατά την έναρξη της μελέτης θα πρέπει να προσδιορίζονται τα μεγέθη των ομάδων κατά τρόπο ώστε κάθε ομάδα να περιλαμβάνει τουλάχιστον 5 αρσενικά ζώα. Αυτός ο αριθμός ζώων ανά ομάδα θεωρείται επαρκής ώστε να εξασφαλίζεται ικανοποιητική στατιστική ισχύς (επιτρέπει δηλαδή, κατά κανόνα, την ανίχνευση τουλάχιστον ενός διπλασιασμού της συχνότητας χρωμοσωμικών εκτροπών όταν το επίπεδο αρνητικών μαρτύρων είναι 1,0 % και άνω, με πιθανότητα 80 % σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05) (3) (11). Ενδεικτικά, όσον αφορά τις τυπικές απαιτήσεις για τον μέγιστο αριθμό ζώων, για μια μελέτη με δύο χρόνους δειγματοληψίας, τρεις ομάδες δόσης και μια ομάδα παράλληλων αρνητικών μαρτύρων, συν μια ομάδα θετικών μαρτύρων (κάθε ομάδα αποτελούμενη από πέντε ζώα), θα απαιτούνταν 45 ζώα.

Χρονοδιάγραμμα αγωγής

20. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες χορηγούνται συνήθως εφάπαξ (δηλ. ως εφάπαξ αγωγή)· μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα δοσολογικά σχήματα, εφόσον αυτό δικαιολογείται επιστημονικά.

21. Στην ομάδα στην οποία δίνεται η υψηλότερη δόση, γίνονται δύο δειγματοληψίες μετά την αγωγή. Επειδή ο απαιτούμενος χρόνος για την πρόσληψη και τον μεταβολισμό των υπό δοκιμή ουσιών, καθώς και η επίδρασή τους στην κινητική του κυτταρικού κύκλου, μπορούν να επηρεάσουν τον βέλτιστο χρόνο για την ανίχνευση χρωμοσωμικών εκτροπών, πραγματοποιείται μια πρώτη δειγματοληψία και μια δεύτερη δειγματοληψία αργότερα, κατά προσέγγιση 24 και 48 ώρες μετά την αγωγή. Για τις υπόλοιπες δόσεις εκτός από την υψηλότερη, θα πρέπει να πραγματοποιείται μια πρώτη δειγματοληψία 24 ώρες μετά την αγωγή (χρόνος μικρότερος ή ίσος προς τον χρόνο κυτταρικού κύκλου των σπερματογονίων Β, ο οποίος, ως εκ τούτου, βελτιστοποιεί την πιθανότητα καταμέτρησης των πρώτων μεταφάσεων μετά την αγωγή), εκτός εάν είναι γνωστό ότι υπάρχει άλλος καταλληλότερος και αιτιολογημένος χρόνος δειγματοληψίας.

22. Μπορούν να πραγματοποιηθούν δειγματοληψίες και σε άλλες χρονικές στιγμές. Για παράδειγμα, στην περίπτωση χημικών ουσιών που ασκούν επιδράσεις ανεξάρτητες της φάσης S, ίσως είναι καλό να γίνει νωρίτερα η δειγματοληψία (δηλ. σε λιγότερες από 24 ώρες).

▼M8

23. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σχήμα αγωγής επανειλημμένων δόσεων, όπως π.χ. σε συνδυασμό με δοκιμή σχετικά με άλλη παράμετρο στο πλαίσιο της οποίας χρησιμοποιείται περίοδος χορήγησης 28 ημερών (π.χ. μέθοδος δοκιμών B.58)· ωστόσο, για την πραγματοποίηση δειγματοληψιών σε διαφορετικούς χρόνους θα απαιτηθεί η χρήση πρόσθετων ομάδων ζώων. Επομένως, η καταλληλότητα ενός τέτοιου χρονοδιαγράμματος πρέπει να αιτιολογείται επιστημονικά κατά περίπτωση.

24. Πριν από την ευθανασία, στα ζώα εγχέεται ενδοπεριτοναϊκώς κατάλληλη δόση χημικής ουσίας αναστολής μετάφασης (π.χ. Colcemid® ή κολχικίνη). Σε κατάλληλη χρονική στιγμή πραγματοποιείται δειγματοληψία στα ζώα. Για τους ποντικούς και τους επίμυες το εν λόγω διάστημα είναι περίπου 3–5 ώρες.

Επίπεδα δόσεων

25. Εάν χρειάζεται προκαταρκτική μελέτη προσδιορισμού εύρους τιμών επειδή δεν υπάρχουν ήδη κατάλληλα δεδομένα για να υποβοηθήσουν την επιλογή δόσεων, η εν λόγω μελέτη θα πρέπει να διεξάγεται στο ίδιο εργαστήριο, με χρήση του ίδιου είδους, φυλής και σχήματος αγωγής όπως στην κύρια μελέτη, σύμφωνα με τις συστάσεις για τη διεξαγωγή μελετών προσδιορισμού εύρους δόσεων (12). Η μελέτη θα πρέπει να αποσκοπεί στον προσδιορισμό της μέγιστης ανεκτής δόσης (ΜΑΔ), η οποία ορίζεται ως η δόση που επάγει ελαφρές τοξικές επιδράσεις σε σχέση με τη διάρκεια της μελέτης (π.χ. ασυνήθης συμπεριφορά ή ασυνήθεις αντιδράσεις, μικρή μείωση του σωματικού βάρους ή κυτταροτοξικότητα στο αιμοποιητικό σύστημα), αλλά όχι θάνατο ή εκδήλωση πόνου, οδύνης ή αγωνίας που καθιστούν αναγκαία τη θανάτωση των ζώων με ευθανασία (13).

26. Η μέγιστη δόση μπορεί επίσης να οριστεί και ως η δόση που παράγει ενδείξεις τοξικότητας στα σπερμογονιακά κύτταρα (π.χ. ελάττωση του λόγου των σπερμογονιακών μιτώσεων προς την πρώτη και δεύτερη μειωτική μετάφαση). Η ελάττωση αυτή δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 50 %.

27. Υπό δοκιμή χημικές ουσίες με ειδική βιολογική δράση σε χαμηλές, μη τοξικές δόσεις (όπως οι ορμόνες και τα μιτογόνα), καθώς και χημικές ουσίες που παρουσιάζουν κορεσμό των τοξικοκινητικών ιδιοτήτων, μπορεί να αποτελούν εξαιρέσεις των κριτηρίων καθορισμού των δόσεων και θα πρέπει να αξιολογούνται κατά περίπτωση.

28. Για να ληφθούν πληροφορίες σχετικά με τη σχέση δόσης-απόκρισης, μια ολοκληρωμένη μελέτη θα πρέπει να περιλαμβάνει ομάδα αρνητικών μαρτύρων (παράγραφος 18) και τουλάχιστον τρία επίπεδα δόσεων, τα οποία κατά κανόνα διαφέρουν κατά έναν συντελεστή ίσο με το 2, αλλά πάντως όχι μεγαλύτερο του 4. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν προκαλεί τοξικότητα σε μελέτη προσδιορισμού εύρους τιμών ή με βάση τα υπάρχοντα δεδομένα, η υψηλότερη δόση για εφάπαξ χορήγηση θα πρέπει να είναι 2 000 mg/kg σωματικού βάρους. Ωστόσο, εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία προκαλεί τοξικότητα, η ΜΑΔ θα πρέπει να είναι η υψηλότερη χορηγούμενη δόση και τα χρησιμοποιούμενα επίπεδα δόσεων θα πρέπει, κατά προτίμηση, να καλύπτουν το φάσμα από τη μέγιστη δόση μέχρι τη δόση που προκαλεί ελάχιστη ή μηδενική τοξικότητα. Όταν παρατηρείται τοξικότητα στον στοχευόμενο ιστό (δηλ. όρχεις) σε όλα τα ελεγχόμενα επίπεδα δόσεων, συνιστάται η διεξαγωγή περαιτέρω μελέτης με μη τοξικές δόσεις. Οι μελέτες που αποσκοπούν στον πληρέστερο χαρακτηρισμό των ποσοτικών στοιχείων σχετικά με τη σχέση δόσης-απόκρισης ενδέχεται να απαιτούν πρόσθετες ομάδες δόσης. Για ορισμένα είδη υπό δοκιμή χημικών ουσιών (π.χ. φαρμακευτικά προϊόντα για τον άνθρωπο) που καλύπτονται από ειδικές απαιτήσεις, αυτά τα όρια μπορεί να διαφέρουν. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία προκαλεί τοξικότητα, θα πρέπει να επιλέγεται η οριακή δόση συν δύο χαμηλότερες δόσεις (όπως περιγράφεται ανωτέρω). Η οριακή δόση για περίοδο χορήγησης 14 ημερών και άνω είναι 1 000 mg/kg σωματικού βάρος/ημέρα, ενώ για περιόδους χορήγησης κάτω των 14 ημερών, η οριακή δόση είναι 2 000 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα.

▼M8

Χορήγηση των δόσεων

29. Κατά τον σχεδιασμό της δοκιμής θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η προβλεπόμενη οδός έκθεσης του ανθρώπου. Επιτρέπεται επομένως η αιτιολογημένη επιλογή οδών έκθεσης όπως μέσω της τροφής ή του πόσιμου νερού, με τοπική εφαρμογή, με υποδόρια ή ενδοφλέβια ένεση, από το στόμα (με στομαχικό καθετήρα), μέσω της εισπνοής, ή η εμφύτευση. Σε κάθε περίπτωση, η οδός έκθεσης θα πρέπει να επιλέγεται κατά τρόπο ώστε να εξασφαλίζεται επαρκής έκθεση του στοχευόμενου ιστού. Η ενδοπεριτοναϊκή ένεση δεν συνιστάται κατά κανόνα, εκτός εάν είναι επιστημονικά αιτιολογημένη, διότι συνήθως δεν αποτελεί σημαντική οδό έκθεσης του ανθρώπου από απόψεως φυσιολογίας. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία αναμειγνύεται με την τροφή ή το πόσιμο νερό, ιδίως στην περίπτωση των εφάπαξ δόσεων, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε το διάστημα μεταξύ της κατανάλωσης νερού και τροφής και της δειγματοληψίας να επαρκεί για την ανίχνευση των επιδράσεων (βλ. παράγραφο 33). Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί με στομαχικό καθετήρα ή ένεση κάθε φορά εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Ο όγκος δεν θα πρέπει κανονικά να υπερβαίνει το 1 ml/100 g σωματικού βάρους, εκτός από την περίπτωση των υδατικών διαλυμάτων όπου επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται κατά μέγιστο όριο 2 ml/100 g σωματικού βάρους. Η χρήση μεγαλύτερου όγκου (εφόσον το επιτρέπει η νομοθεσία για την καλή μεταχείριση των ζώων) θα πρέπει να αιτιολογείται. Η μεταβλητότητα των όγκων δοκιμής θα πρέπει να ελαχιστοποιείται με ρύθμιση της συγκέντρωσης, ώστε να εξασφαλίζεται η χορήγηση σταθερού όγκου σε σχέση με το σωματικό βάρος σε όλα τα επίπεδα δόσεων.

Παρατηρήσεις

30. Τα πειραματόζωα θα πρέπει να υποβάλλονται σε γενική κλινική εξέταση και τα κλινικά σημεία να καταγράφονται τουλάχιστον μία φορά ημερησίως, κατά προτίμηση τις ίδιες ώρες και λαμβανομένου υπόψη του χρόνου κορύφωσης των αναμενόμενων επιδράσεων μετά τη χορήγηση της δόσης. Όλα τα ζώα θα πρέπει να εξετάζονται τουλάχιστον δύο φορές ημερησίως για τη διαπίστωση νοσηρότητας και θνησιμότητας. Όλα τα ζώα πρέπει να ζυγίζονται κατά την έναρξη της μελέτης, τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα κατά τη διάρκεια των μελετών επαναλαμβανόμενων δόσεων, και κατά τη θανάτωση. Σε μελέτες διάρκειας τουλάχιστον μίας εβδομάδας, η κατανάλωση τροφής θα πρέπει να μετράται τουλάχιστον εβδομαδιαίως. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται με το πόσιμο νερό, η κατανάλωσή νερού θα πρέπει να μετράται σε κάθε αλλαγή νερού και, τουλάχιστον, εβδομαδιαίως. Τα ζώα που εμφανίζουν μη θανατηφόρους δείκτες υπερβολικής τοξικότητας θα πρέπει να υποβάλλονται σε ευθανασία πριν από τη λήξη της περιόδου δοκιμής (13).

Παρασκευάσματα χρωμοσωμάτων

31. Αμέσως μετά την ευθανασία, λαμβάνονται από τον ένα ή και τους δύο όρχεις εναιωρήματα κυττάρων που εκτίθενται σε υποτονικό διάλυμα και μονιμοποιούνται σύμφωνα με τα καθιερωμένα πρωτόκολλα [π.χ. (2) (14) (15)]. Κατόπιν, τα κύτταρα επιστρώνονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες και χρωματίζονται (16) (17). Όλες οι αντικειμενοφόροι θα πρέπει να λαμβάνουν έναν κωδικό ώστε η ταυτότητά τους να μην αποκαλύπτεται στον εξεταστή.

Ανάλυση

32. Για κάθε ζώο θα πρέπει να εξετάζονται τουλάχιστον 200 καλά επιστρωμένες μεταφάσεις (3) (11). Εάν η ιστορική συχνότητα αρνητικών μαρτύρων είναι < 1 %, θα πρέπει να εξετάζονται πάνω από 200 κύτταρα/ζώο ώστε να αυξάνεται η στατιστική ισχύς (3). Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μέθοδοι χρώσης που επιτρέπουν τον εντοπισμό του κεντρομεριδίου.

33. Οι χρωμοσωμικού και χρωματιδικού τύπου εκτροπές θα πρέπει να καταγράφονται χωριστά και να ταξινομούνται σε υποκατηγορίες (ρήξεις, ανταλλαγές). Τα χάσματα θα πρέπει να καταγράφονται αλλά να μη λαμβάνονται υπόψη στον προσδιορισμό τυχόν σημαντικής αύξησης της επίπτωσης των κυττάρων με χρωμοσωμικές εκτροπές. Οι διαδικασίες που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο θα πρέπει να διασφαλίζουν τη διενέργεια της ανάλυσης

▼M8

χρωμοσωμικών εκτροπών από επαρκώς καταρτισμένους εξεταστές. Επειδή αναγνωρίζεται ότι οι διαδικασίες ετοιμασίας των αντικειμενοφόρων πλακών προκαλούν συχνά θραύση ενός ποσοστού μεταφασικών κυττάρων με συνακόλουθη απώλεια χρωμοσωμάτων, τα εξεταζόμενα κύτταρα θα πρέπει να περιέχουν αριθμό κεντρομεριδίων τουλάχιστον ίσο με $2n \pm 2$, όπου n είναι ο απλοειδής αριθμός χρωμοσωμάτων για το εξεταζόμενο ζωικό είδος.

34. Παρότι σκοπός της δοκιμής είναι η ανίχνευση δομικών χρωμοσωμικών εκτροπών, είναι σημαντικό να καταγράφονται οι συχνότητες των πολυπλοειδών κυττάρων και των κυττάρων με ενδοαναδιπλασιασμένα χρωμοσώματα όταν παρατηρούνται τέτοια συμβάντα (βλ. παράγραφο 44).

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Επεξεργασία αποτελεσμάτων

35. Τα δεδομένα για κάθε ζώο θα πρέπει να παρουσιάζονται σε μορφή πίνακα. Για κάθε ζώο θα πρέπει να εξετάζεται ο αριθμός των κυττάρων με δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές και ο αριθμός των χρωμοσωμικών εκτροπών ανά κύτταρο. Οι χρωματιδικού και οι χρωμοσωμικού τύπου εκτροπές, ταξινομημένες σε υποκατηγορίες (ρήξεις, ανταλλαγές), θα πρέπει να καταγράφονται χωριστά, με τον αριθμό και τη συχνότητα με τα οποία εμφανίζονται στις πειραματικές ομάδες και στις ομάδες μαρτύρων. Τα χάσματα καταγράφονται χωριστά. Η συχνότητα των χασμάτων αναφέρεται αλλά συνήθως δεν περιλαμβάνεται στην ανάλυση της συχνότητας των συνολικών δομικών χρωμοσωμικών εκτροπών. Αναφέρεται το ποσοστό πολυπλοειδίας και κυττάρων με ενδοαναδιπλασιασμένα χρωμοσώματα, εφόσον παρατηρούνται.

36. Θα πρέπει να αναφέρονται δεδομένα για την τοξικότητα και τα κλινικά σημεία (σύμφωνα με την παράγραφο 30).

Κριτήρια αποδοχής

37. Τα ακόλουθα κριτήρια καθορίζουν την αποδοχή μιας δοκιμής.

— Ο παράλληλος αρνητικός μάρτυρας συμφωνεί με τα δημοσιευμένα πρότυπα για τα ιστορικά δεδομένα για αρνητικούς μάρτυρες, τα οποία αναμένεται γενικά να είναι > 0 % και $\leq 1{,}5$ % κύτταρα με χρωμοσωμικές εκτροπές, καθώς και με τα ιστορικά δεδομένα του εργαστηρίου για τους μάρτυρες, εφόσον υπάρχουν (βλ. παραγράφους 10 και 18).

— Οι παράλληλοι θετικοί μάρτυρες επάγουν αποκρίσεις που συμφωνούν με τα δημοσιευμένα πρότυπα για τα ιστορικά δεδομένα για θετικούς μάρτυρες ή με τη βάση ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για θετικούς μάρτυρες, εφόσον υπάρχει, και προκαλούν στατιστικά σημαντική αύξηση σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα (βλ. παραγράφους 17, 18).

— Αναλύεται επαρκής αριθμός κυττάρων και δόσεων (βλ. παραγράφους 28 και 32).

— Τα κριτήρια επιλογής της ανώτατης δόσης είναι σύμφωνα με αυτά που περιγράφονται στις παραγράφους 25 και 26.

38. Εάν παρατηρηθεί τόσο μίτωση όσο και μείωση, θα πρέπει να προσδιορίζεται ο λόγος των σπερμογονιακών μιτώσεων προς την πρώτη και τη δεύτερη μειωτική μετάφαση ως μέτρο της κυτταροτοξικότητας για όλα τα ζώα αγωγής και αρνητικού μάρτυρα σε συνολικό δείγμα 100 διαιρούμενων κυττάρων ανά ζώο. Εφόσον παρατηρείται μόνο μίτωση, θα πρέπει να προσδιορίζεται ο μιτωτικός δείκτης σε 1 000 τουλάχιστον κύτταρα για κάθε ζώο.

Αξιολόγηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

39. Προκειμένου να συγκεντρωθούν επαρκή δεδομένα για ανάλυση της σχέσης δόσης-απόκρισης, θα πρέπει να αναλύονται τουλάχιστον τρεις ομάδες στις οποίες χορηγήθηκαν δόσεις.

▼**M8**

40. Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται σαφώς θετική εάν:

— τουλάχιστον σε μία από τις δόσεις δοκιμής εμφανίζεται στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα,

— η αύξηση σχετίζεται με τη δόση σε τουλάχιστον έναν χρόνο δειγματοληψίας, και

— κάποιο από τα αποτελέσματα βρίσκεται εκτός του αποδεκτού πεδίου τιμών των δεδομένων αρνητικού μάρτυρα, ή της κατανομής των ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για αρνητικούς μάρτυρες (π.χ. όριο ελέγχου σε επίπεδο 95 % με βάση την κατανομή Poisson), εφόσον υπάρχουν.

Θεωρείται τότε ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι ικανή να επάγει χρωμοσωμικές εκτροπές σε σπερμογονιακά κύτταρα των πειραματόζωων. Συστάσεις για τις πλέον κατάλληλες στατιστικές μεθόδους έχουν επίσης διατυπωθεί στη βιβλιογραφία (11) (18). Η πειραματική μονάδα στις χρησιμοποιούμενες στατιστικές δοκιμασίες θα πρέπει να είναι το ζώο.

41. Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται σαφώς αρνητική εάν:

— σε καμία από τις δόσεις δοκιμής δεν εμφανίζεται στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα,

— δεν υφίσταται αύξηση που σχετίζεται με τις δόσεις σε καμία πειραματική συνθήκη, και

— όλα τα αποτελέσματα εμπίπτουν στο αποδεκτό πεδίο τιμών των δεδομένων αρνητικού μάρτυρα, ή των ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για αρνητικούς μάρτυρες (π.χ. όριο ελέγχου σε επίπεδο 95 % με βάση την κατανομή Poisson), εφόσον υπάρχουν.

Θεωρείται τότε ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν είναι ικανή να επάγει χρωμοσωμικές εκτροπές στα σπερμογονιακά κύτταρα των πειραματόζωων. Συστάσεις για τις πλέον κατάλληλες στατιστικές μεθόδους έχουν επίσης διατυπωθεί στη βιβλιογραφία (11) (18). Ένα αρνητικό αποτέλεσμα δεν αποκλείει το ενδεχόμενο η χημική ουσία να επάγει χρωμοσωμικές εκτροπές σε μεταγενέστερες φάσεις ανάπτυξης που δεν έχουν μελετηθεί, να επάγει ή γονιδιακές μεταλλάξεις.

42. Δεν απαιτείται επαλήθευση των σαφώς θετικών ή σαφώς αρνητικών αποκρίσεων.

43. Όταν η απόκριση δεν είναι ούτε σαφώς αρνητική ούτε σαφώς θετική, και προκειμένου να διαπιστωθεί η βιολογική σημασία ενός αποτελέσματος (π.χ. ασθενής ή οριακή αύξηση), τα δεδομένα θα πρέπει να αξιολογούνται με βάση την κρίση ειδικών και/ή με περαιτέρω διερεύνηση με χρήση των υπαρχόντων πειραματικών δεδομένων, όπως το κατά πόσον το θετικό αποτέλεσμα είναι εκτός του αποδεκτού πεδίου τιμών των δεδομένων αρνητικού μάρτυρα, ή των ιστορικών δεδομένων αρνητικού μάρτυρα του εργαστηρίου (19).

44. Σε σπάνιες περιπτώσεις, ακόμη και μετά από περαιτέρω διερεύνηση, το σύνολο δεδομένων δεν επιτρέπει την εξαγωγή συμπεράσματος για θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα και, κατά συνέπεια, η έκβαση κρίνεται αμφίβολη.

45. Η αύξηση του αριθμού πολυπλοειδών κυττάρων μπορεί να σημαίνει ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι ικανή να αναστέλλει τις μιτωτικές διεργασίες και να επάγει αριθμητικές χρωμοσωμικές εκτροπές (20). Η αύξηση του αριθμού των κυττάρων με ενδοαναδιπλασιασμένα χρωμοσώματα ενδέχεται να σημαίνει ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία μπορεί να αναστέλλει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου (21) (22), δηλαδή να δρα μέσω ενός μηχανισμού επαγωγής αριθμητικών χρωμοσωμικών αλλαγών διαφορετικού από την αναστολή των μιτωτικών διεργασιών (βλ. παράγραφο 2). Επομένως, η επίπτωση των πολυπλοειδών κυττάρων και των κυττάρων με ενδοαναδιπλασιασμένα χρωμοσώματα θα πρέπει να καταγράφεται χωριστά.

▼**M8**

Έκθεση δοκιμής

46. Στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται τα ακόλουθα στοιχεία:

Συνοπτική παρουσίαση.

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

— πηγή, αριθμός παρτίδας, καταληκτική ημερομηνία χρήσης, εφόσον υπάρχει,

— σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εάν είναι γνωστή,

— διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον διαλύτη, εάν είναι γνωστές·

— μέτρηση του pH, της ωσμωμοριακότητας και του ιζήματος του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας στο οποίο προστέθηκε η υπό δοκιμή χημική ουσία, κατά περίπτωση.

Μονοσυστατική ουσία:

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμίξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγματα:

— περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Παρασκεύασμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας:

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα·

— διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον διαλύτη/φορέα.

— σκευάσματα για χορήγηση μέσω της τροφής, του πόσιμου νερού ή της εισπνοής,

— αναλυτικοί προσδιορισμοί στα σκευάσματα (π.χ. σταθερότητα, ομοιογένεια, ονομαστικές συγκεντρώσεις), όταν έχουν διενεργηθεί.

Πειραματόζωα:

— είδος/φυλή που χρησιμοποιήθηκε και αιτιολόγηση της χρήσης του/της,

— αριθμός και ηλικία των ζώων,

— προέλευση των ζώων, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσιο κ.λπ.,

— μέθοδος ατομικής ταυτοποίησης των ζώων,

— για βραχυπρόθεσμες μελέτες: βάρος κάθε ζώου κατά την έναρξη και τη λήξη της δοκιμής, για μελέτες διάρκειας μεγαλύτερης της μίας εβδομάδας: βάρος κάθε ζώου κατά τη διάρκεια της μελέτης και κατανάλωση τροφής. Θα πρέπει να περιλαμβάνονται το εύρος τιμών, η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση του σωματικού βάρους για κάθε ομάδα.

Συνθήκες δοκιμής:

— δεδομένα για τους θετικούς μάρτυρες και τους αρνητικούς μάρτυρες με φορέα/διαλύτη,

▼**M8**

— δεδομένα από τη μελέτη προσδιορισμού εύρους τιμών, εάν πραγματοποιήθηκε,

— αιτιολόγηση της επιλογής των επιπέδων δόσης,

— αιτιολόγηση της επιλογής της οδού χορήγησης,

— λεπτομέρειες για το παρασκεύασμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας,

— λεπτομέρειες σχετικά με τη χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας,

— αιτιολογία του χρονικού σημείου της θανάτωσης,

— μέθοδοι μέτρησης της τοξικότητας στα ζώα, συμπεριλαμβανομένων, εάν είναι διαθέσιμες, ιστοπαθολογικών ή αιματολογικών αναλύσεων και της συχνότητας με την οποία πραγματοποιήθηκαν παρατηρήσεις ή μετρήθηκε το σωματικό βάρος των ζώων,

— μέθοδοι με τις οποίες εξακριβώθηκε ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία έφτασε στον στοχευόμενο ιστό ή εισήλθε στη γενική κυκλοφορία του αίματος, εάν τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά,

— πραγματική δόση (mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα), υπολογιζόμενη από τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο σιτηρέσιο/στο πόσιμο νερό (ppm) και την κατανάλωση, κατά περίπτωση,

— λεπτομέρειες σχετικά με την ποιότητα της τροφής και του νερού,

— λεπτομερής περιγραφή των χρονοδιαγραμμάτων αγωγής και δειγματοληψίας και αιτιολόγηση των επιλογών,

— μέθοδος ευθανασίας,

— μέθοδος αναλγησίας (εάν χρησιμοποιείται),

— διαδικασίες απομόνωσης ιστών,

— ταυτότητα της χημικής ουσίας αναστολής της μετάφασης, συγκέντρωση αυτής και διάρκεια της αγωγής,

— μέθοδοι ετοιμασίας αντικειμενοφόρων πλακών,

— κριτήρια για την καταμέτρηση των εκτροπών,

— αριθμός εξετασθέντων κυττάρων ανά ζώο,

— κριτήρια κατάταξης της δοκιμής ως θετικής, αρνητικής ή αμφίβολης.

Αποτελέσματα:

— κατάσταση των ζώων πριν από την περίοδο δοκιμής και καθ' όλη τη διάρκειά της, συμπεριλαμβανομένων των σημείων τοξικότητας,

— βάρη σώματος και οργάνων κατά τη θανάτωση (σε περίπτωση εφαρμογής πολλαπλών αγωγών, τα βάρη σώματος που μετρήθηκαν στη διάρκεια του σχήματος αγωγής),

— σημεία τοξικότητας,

— μιτωτικός δείκτης,

— λόγος σπερμογονιακών κυττάρων μιτώσεων προς την πρώτη και δεύτερη μειωτική μετάφαση, ή άλλα αποδεικτικά στοιχεία έκθεσης στον στοχευόμενο ιστό,

— τύπος και αριθμός εκτροπών, χωριστά για κάθε ζώο,

— ολικός αριθμός εκτροπών ανά ομάδα, με μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις,

▼**M8**

— αριθμός κυττάρων με εκτροπές ανά ομάδα, με μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις,

— σχέση δόσης-απόκρισης, κατά το δυνατόν,

— στατιστικές αναλύσεις και εφαρμοσθείσες μέθοδοι,

— δεδομένα για τους παράλληλους αρνητικούς μάρτυρες,

— ιστορικά δεδομένα για αρνητικούς μάρτυρες, με πεδία τιμών, μέσες τιμές, τυπικές αποκλίσεις και διάστημα εμπιστοσύνης σε επίπεδο 95 % (εφόσον υπάρχουν) ή δημοσιευμένα ιστορικά δεδομένα για αρνητικούς μάρτυρες που χρησιμοποιούνται για τη δυνατότητα αποδοχής των αποτελεσμάτων της δοκιμής,

— δεδομένα για τους παράλληλους θετικούς μάρτυρες,

— μεταβολές της πλοειδίας, εφόσον παρατηρήθηκαν, συμπεριλαμβανομένων των συχνοτήτων των κυττάρων με πολυπλοειδία και/ή ενδοαναδιπλασιασμό.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

Συμπέρασμα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris

(2) Adler, I.-D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. Στο: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J. M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.

(3) Adler I.-D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313-318.

(4) Russo, A. (2000). *In Vivo* Cytogenetics: Mammalian Germ Cells. Mutation Res., 455, 167-189.

(5) Hess, R.A. and de Franca L.R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. Στο: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Cheng C.Y. (Ed.) Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, pp. 1-15.

(6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C, Mutation. Res., 23(3): 368-379.Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. Στο: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel C., Lambert B. and Magnusson J. (Eds.) Liss, New York, pp. 477-484.

(7) Cattanach, B.M., and Pollard C.E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse, Mutation Res., 12, 472-474.

(8) Cattanach, B.M., and Williams, C.E. (1971). A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens, Mutation Res., 13, 371-375.

(9) Rathenburg, R. (1975). Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia, Humangenetik 29, 135-140.

▼**M8**

(10) Shiraishi, Y. (1978). Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice, Mutation Res., 57(3): 313–324.

(11) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417, 19–30.

(12) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, 313-319.

(13) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, (No 19.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(14) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. Mutation Res., 52, 207-209.

(15) Hsu, T.C., Elder, F. and Pathak, S. (1979). Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations. Environ. Mutagen., 1, 291-294.

(16) Evans, E.P., Breckon, G., and Ford, C.E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, 289-294.

(17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays, In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(18) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G.and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

(19) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. Mutation Res., 723, 87-90.

(20) Warr T.J., Parry E.M. and Parry J.M. (1993). A Comparison of Two *In Vitro* Mammalian Cell Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy Using 10 Known or Suspected Aneugens, Mutation Res., 287, 29-46.

(21) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells. Cancer Res., 43, 1362-1364.

(22) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha-Radiation Induced G2 Arrest. Mutation Res., 119, 403-413.

▼M8

Προσάρτημα

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ανευπλοειδία: κάθε απόκλιση από τον φυσιολογικό διπλοειδή (ή απλοειδή) αριθμό χρωμοσωμάτων κατά ένα ή περισσότερα χρωμοσώματα, όχι όμως κατά πλήρεις σειρές χρωμοσωμάτων (πολυπλοειδία).

Κεντρομερίδιο: περιοχή του χρωμοσώματος με την οποία συνδέονται τα νημάτια της ατράκτου κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης, με στόχο την οργανωμένη κίνηση των θυγατρικών χρωμοσωμάτων προς τους πόλους των θυγατρικών κυττάρων.

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα

Πολυμορφία των χρωμοσωμάτων: η πολυμορφία των σχημάτων (π.χ. μετακεντρικά, ακροκεντρικά κ.λπ.) και των μεγεθών των χρωμοσωμάτων.

Εκτροπή χρωματιδικού τύπου: δομική χρωμοσωμική βλάβη που εκδηλώνεται ως ρήξη μεμονωμένων χρωματίδων ή ρήξη και επανένωση μεταξύ χρωματίδων.

Εκτροπή χρωμοσωμικού τύπου: δομική χρωμοσωμική βλάβη που εκδηλώνεται ως ρήξη ή ρήξη και επανένωση και των δύο χρωματίδων στην ίδια θέση.

Κλαστογόνο: κάθε χημική ουσία που προκαλεί δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές σε πληθυσμούς κυττάρων ή οργανισμών.

Χάσμα: αχρωματική βλάβη μικρότερη από το πλάτος μιας χρωματίδας και με ελάχιστη αποστοίχιση των χρωματιδών.

Γονιδιοτοξικός: γενικός όρος που καλύπτει τους παράγοντες που προκαλούν κάθε είδους βλάβη του DNA ή του χρωμοσώματος, μεταξύ των οποίων τις ρήξεις, τις απαλείψεις, τις χημικές προσθήκες, τις τροποποιήσεις και συνδέσεις νουκλεοτιδίων, τις αναδιατάξεις, τις μεταλλάξεις, τις χρωμοσωμικές εκτροπές και την ανευπλοειδία. Δεν προκαλούν όλα τα είδη γονιδιοτοξικών επιδράσεων μεταλλάξεις ή μόνιμη χρωμοσωμική βλάβη.

Μιτωτικός δείκτης (Mitotic index/MI): ο λόγος του αριθμού κυττάρων που βρίσκονται σε μετάφαση προς τον συνολικό αριθμό κυττάρων που παρατηρούνται σε έναν κυτταρικό πληθυσμό· αποτελεί ένδειξη του βαθμού πολλαπλασιασμού του εν λόγω πληθυσμού.

Μίτωση: διαίρεση του κυτταρικού πυρήνα, η οποία συνήθως χωρίζεται σε πρόφαση, προμετάφαση, μετάφαση, ανάφαση και τελόφαση.

Μεταλλαξιογόνο: παράγοντας που προκαλεί κληρονομήσιμη μεταβολή μίας ή περισσότερων αλληλουχιών ζευγών βάσεων του DNA σε γονίδια ή της δομής των χρωμοσωμάτων (χρωμοσωμικές εκτροπές).

Αριθμητική ανωμαλία: μεταβολή του αριθμού των χρωμοσωμάτων από τον κανονικό χαρακτηριστικό αριθμό των χρησιμοποιουμένων ζώων.

Πολυπλοειδία: πολλαπλάσιο του απλοειδούς χρωμοσωμικού αριθμού (n) πέραν του διπλοειδούς αριθμού (δηλαδή $3n$, $4n$ κ.ο.κ.).

Δομική εκτροπή: μεταβολή της δομής των χρωμοσωμάτων που μπορεί να ανιχνευθεί με μικροσκοπική εξέταση του σταδίου της μετάφασης της κυτταρικής διαίρεσης και γίνεται αντιληπτή με τη μορφή απαλείψεων και θραυσμάτων, ανταλλαγών.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

UVCB: ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, προϊόντα πολύπλοκων αντιδράσεων και βιολογικά υλικά

▼M7

▼B

B.25 **ΚΛΗΡΟΝΟΜΗΣΙΜΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΠΟΝΤΙΚΟΥΣ**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Καμία.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Η δοκιμασία κληρονομήσιμης μετατόπισης γονιδίων σε ποντικούς ανιχνεύει τις δομικές και αριθμητικές μεταβολές χρωμοσωμάτων σε γεννητικά κύτταρα θηλαστικών που ανακαλύπτονται στους απογόνους της πρώτης γενεάς. Οι τύποι των μεταβολών χρωμοσωμάτων είναι αντίστοιχες μετατοπίσεις και, στην περίπτωση που συμπεριλαμβάνονται θηλυκοί απόγονοι, απώλεια Χ-χρωμοσωμάτων. Οι φορείς των μετατοπίσεων και ΧΟ-θηλυκά δείχνουν μειωμένη γονιμότητα και συνηθίζεται να επιλέγονται οι απόγονοι F_1 για κυτταρογενετική ανάλυση. Πλήρης στειρότητα προκαλείται από ορισμένους τύπους μετατοπίσεων (τύπου Χ-αυτοσωματικό και c-t). Οι μετατοπίσεις παρατηρούνται κυτταρογενετικά στα μειωτικά κύτταρα στη διακίνηση-μετάφαση Ι των αρσενικών ατόμων, είτε στα αρσενικά της ομάδας F_i είτε στους υιούς των θηλυκών της ομάδας F_1, Τα θηλυκά ΧΟ διαπιστώνονται κυτταρογενετικά από την παρουσία 39 μόνο χρωμοσωμάτων στις μιτώσεις του μυελού οστών.

1.5. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Κανένα.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Προετοιμασία

Οι δοκιμαζόμενες χημικές ουσίες διαλύονται σε ισότονο διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Εάν είναι αδιάλυτες, τότε διαλύονται ή εναιωρούνται σε κατάλληλα έκδοχα. Χρησιμοποιούνται πρόσφατα διαλύματα της δοκιμαζόμενης ουσίας. Εάν χρησιμοποιείται έκδοχο για τη διευκόλυνση της λήψης, δεν πρέπει να αντιδρά με την δοκιμαζόμενη ουσία ή να προκαλεί τοξικές επιδράσεις.

Οδός χορήγησης

Σαν οδοί χορήγησης συνήθως χρησιμοποιούνται ο καθετηριασμός από το στόμα ή η ενδοπεριτονιακή ένεση. Και άλλες οδοί χορήγησης μπορεί να είναι κατάλληλες.

Πειραματόζωα

Για τη διευκόλυνση της αναπαραγωγής και της κυτταρολογικής επαλήθευσης, τα πειράματα αυτά εκτελούνται με ποντικούς. Δεν απαιτείται ιδιαίτερο στέλεχος ποντικών. Ωστόσο ο μέσος αριθμός εμβρύων από την έγκυο μητέρα της ποικιλίας που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι μεγαλύτερος από οκτώ και θα πρέπει να είναι σχετικά σταθερός. Χρησιμοποιούνται υγιή, σεξουαλικά ώριμα ζώα.

▼B

Αριθμός ζώων

Ο αριθμός των αναγκαίων ζώων εξαρτάται από τη συχνότητα αυθόρμητης μετατόπισης και από τον ελάχιστο ρυθμό επαγωγής που απαιτείται για την επίτευξη θετικού αποτελέσματος.

Το πείραμα εκτελείται συνήθως με ανάλυση των αρσενικών απογόνων της ομάδας F_1, 500 τουλάχιστον αρσενικοί απόγονοι της ομάδας F_1 πρέπει να περιληφθούν σε κάθε ομάδα δόσης. Εάν συμπεριλαμβάνονται θηλυκοί απόγονοι της ομάδας F_1, απαιτούνται 300 αρσενικά και 300 θηλυκά.

Χρήση αρνητικών και θετικών μαρτύρων

Πρέπει να υπάρχουν επαρκή δεδομένα μαρτύρων, εξαγόμενα τόσο από τη δοκιμασία όσο και από ιστορικά στοιχεία. Όταν υπάρχουν αποδεκτά αποτελέσματα θετικών μαρτύρων από πρόσφατα πειράματα στο ίδιο εργαστήριο, τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να αντικαταστήσουν τη σύγχρονη χρήση θετικών μαρτύρων.

Επίπεδο δόσεων

Χρησιμοποιείται ένα επίπεδο δόσης, συνηθέστερα η υψηλότερη δόση που συνδέεται με την παραγωγή ελάχιστων τοξικών επιδράσεων αλλά χωρίς να επηρεάζει την αναπαραγωγική συμπεριφορά ή την επιβίωση. Για τον καθορισμό της σχέσης δόσης/αποτελέσματος απαιτούνται δύο πρόσθετες χαμηλότερες δόσεις. Για μη τοξικές χημικές ουσίες πρέπει να χρησιμοποιηθεί η έκθεση στην ανώτατη δυνατή δόση,

Διαδικασία

Αγωγή και ζευγάρωμα

Δύο προγράμματα αγωγής υπάρχουν. Η εφάπαξ χορήγηση της δοκιμαζόμενης ουσίας χρησιμοποιείται ευρύτερα. Η χορήγηση της δοκιμαζόμενης ουσίας επί 35 ημέρες με βάση την εβδομάδα επτά ημερών μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί. Ο αριθμός των ζευγαρωμάτων μετά την αγωγή διέπεται από το πρόγραμμα αγωγής και πρέπει να εξασφαλίζει τη λήψη δειγμάτων από όλες τις φάσεις των γεννητικών κυττάρων που υφίστανται την αγωγή. Κατά το τέλος της περιόδου του ζευγαρώματος, τα θηλυκά τοποθετούνται σε κλωβούς χωριστά. Όταν τα θηλυκά γεννήσουν, καταγράφεται η ημερομηνία, ο αριθμός των νεογνών και το φύλο τους. Όλοι σι αρσενικοί απόγονοι απογαλακτίζονται ενώ οι θηλυκές απόγονοι απορρίπτονται, εκτός εάν συμπεριλαμβάνονται στο πείραμα.

Δοκιμασία για ετεροζυγωτικότητα μετατόπισης

Χρησιμοποιείται μία από τις δύο δυνατές μεθόδους:

— Δοκιμασία γονιμότητας των απογόνων της ομάδας F_1 και μετέπειτα επαλήθευση των πιθανών φορέων μετατόπισης με κυτταρογενετική ανάλυση.

— Κυτταρογενετική ανάλυση όλων των αρσενικών απογόνων της ομάδας F_i χωρίς προηγούμενη επιλογή με τεστ γονιμότητας.

α) Δοκιμασία γονιμότητας

Η μειωμένη γονιμότητα ενός ζώου της ομάδας F_1 μπορεί να προσδιοριστεί με την παρατήρηση του αριθμού των νεογνών ή/και την ανάλυση του περιεχομένου της μήτρας των θηλυκών που έχουν ζευγαρώσει.

Τα κριτήρια προσδιορισμού της κανονικής και μειωμένης γονιμότητας καθορίζονται για το στέλεχος ποντικών που χρησιμοποιείται.

▼B

Παρατήρηση του αριθμού των νεογνών από την ίδια μητέρα: Τα αρσενικά της ομάδας F_1 που θα χρησιμοποιηθούν στη δοκιμασία τοποθετούνται χωριστά σε κλωβούς με θηλυκά είτε από το ίδιο πείραμα είτε από την αποικία. Οι κλωβοί επιθεωρούνται καθημερινά, αρχίζοντας 18 ημέρες μετά το ζευγάρωμα. Ο αριθμός των νεογνών από την ίδια μητέρα και το φύλο των απογόνων της ομάδας F_2 καταγράφονται κατά τη γέννηση και εν συνεχεία τα νεογνά απορρίπτονται. Εάν εξετάζονται οι θηλυκοί απόγονοι της ομάδας F_l,οι απόγονοι F_2 των μικρών νεογνών διατηρούνται για παραπέρα δοκιμασία. Οι θηλυκοί φορείς μετατόπισης επαληθεύονται με κυτταρογενετική ανάλυση μετατόπισης σε οποιονδήποτε από τους αρσενικούς απογόνους τους. Τα θηλυκά ΧΟ αναγνωρίζονται από τη μεταβολή στην αναλογία φύλου μεταξύ των απογόνων τους από 1:1 έως 1:2 αρσενικά προς θηλυκά. Σε μία αλληλοδιάδοχη διαδικασία, τα κανονικά ζώα F_1 απομακρύνονται από παραπέρα δοκιμασία εάν η πρώτη ομάδα νεογνών από την ίδια μητέρα F_2 φθάσει ή υπερβεί την προκαθορισμένη κανονική τιμή, αλλιώς παρατηρείται μία δεύτερη ή τρίτη ομάδα νεογνών F_2 από την ίδια μητέρα.

Τα ζώα της ομάδας F_1 που δεν μπορούν να χαρακτηριστούν κανονικά μετά από παρατήρηση μέχρι τριών ομάδων νεογνών F_2, δοκιμάζονται παραπέρα με ανάλυση του περιεχομένου της μήτρας των θηλυκών που υπέστησαν αγωγή ή με απευθείας υποβολή σε κυτταρογενετική ανάλυση,

Ανάλυση του περιεχομένου της μήτρας: Η μείωση στον αριθμό νεογνών των φορέων μετατόπισης οφείλεται σε εμβρυϊκό θάνατο έτσι ώστε ένας υψηλός αριθμός νεκρών εμφυτευμάτων είναι ενδεικτικός για την παρουσία μετατόπισης στο δοκιμαζόμενο ζώο. Τα αρσενικά της ομάδας δοκιμής F_l, ζευγαρώνονται με δύο έως τρία θηλυκά το καθένα. Η σύλληψη προσδιορίζεται με καθημερινή επιθεώρηση για την εύρεση πηγμένου σπέρματος μέσα στον κόλπο το πρωί. Τα θηλυκά θανατώνονται μετά από 14 έως 16 ημέρες και καταγράφονται τα ζωντανά και νεκρά εμφυτεύματα μέσα στη μήτρα τους.

β) Κυτταρογενετική ανάλυση

Ετοιμάζονται παρασκευάσματα όρχεων με τη μέθοδο αφυδάτωσης, με τη βοήθεια του αέρα. Οι φορείς μετατόπισης τακτοποιούνται από την παρουσία πολυσθενών διατάξεων στη διακίνηση-μετάφαση Ι στα αρχέτυπα σπερματοκύτταρα. Η παρατήρηση δύο τουλάχιστον κυττάρων με πολυαθενή σύνδεσμο συνιστά την απαιτούμενη απόδειξη ότι το δοκιμασθέν ζώο είναι φορέας μετατόπισης.

Εάν δεν έχει γίνει επιλογή ζευγαρώματος όλα τα αρσενικά της ομάδας F_1 επιθεωρούνται κυτταρογενετικά. Πρέπει να καταγραφεί μικροσκοπικά ένας ελάχιστος αριθμός 25 διακινήσεων-μεταφάσεων Ι ανά αρσενικό. Η εξέταση των μιτωτικών μεταφάσεων, της σπερματογονίας ή του μυελού οστών απαιτείται για τα αρσενικά της ομάδας F_1 με μικρούς όρχεις και μειωτικό διαχωρισμό πριν τη διακίνηση ή από θηλυκά ΧΟ της ομάδας F_1 για τα οποία υπάρχει σχετική υποψία. Η παρουσία ασυνήθιστα μακρού ή/και βραχέως χρωμοσώματος σε κάθε ένα από τα δέκα κύτταρα αποτελεί απόδειξη ιδιαίτερης στειρωτικής μετατόπισης αρσενικού (c-t type). Μερικές μετατοπίσεις Χ-αυτοσωμικών που προκαλούν στειρότητα αρσενικών μπορεί να προσδιοριστούν μόνο με τη μέθοδο ζωνώσεως (banding) με μελέτη των μιτωτικών χρωμοσωμάτων. Η παρουσία 39 χρωμοσωμάτων και στις δέκα μιτώσεις αποτελεί απόδειξη της κατάστασης ΧΟ σε ένα θηλυκό.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα παρίστανται με μορφή πίνακα.

Ο μέσος αριθμός της ομάδας νεογνών από την ίδια μητέρα και η σχέση φύλου από μητρικά ζευγαρώματα κατά τη γέννηση και κατά τον απογαλακτισμό αναφέρονται για κάθε χρονικό διάστημα ζευγαρώματος.

▼B

Για την εκτίμηση της γονιμότητας των ζώων της ομάδας F_1 δίνονται ο μέσος αριθμός της ομάδας νεογνών από την ίδια μητέρα όλων των κανονικών ζευγαρωμάτων και οι αριθμοί χωριστά των ομάδων νεογνών F_1 από την ίδια μητέρα των φορέων μετατόπισης. Για την ανάλυση του περιεχομένου της μήτρας δίνεται ο μέσος αριθμός των ζωντανών και νεκρών εμφυτευμάτων των κανονικών ζευγαρωμάτων και οι αριθμοί χωριστά των ζωντανών και νεκρών εμφυτευμάτων για κάθε ζευγάρωμα των φορέων μετατόπισης της ομάδας F_1.

Για την κυτταρογενετική ανάλυση της διακίνησης-μετάφασης I καταγράφονται οι αριθμοί των τύπων των πολυσθενών διατάξεων και ο συνολικός αριθμός κυττάρων για κάθε φορέα μετατόπισης.

Για τα στείρα ζώα της ομάδας F_1 αναγράφεται ο συνολικός αριθμός των ζευγαρωμάτων και η διάρκεια της περιόδου ζευγαρώματος.

Δίνονται τα βάρη των όρχεων και οι λεπτομέρειες της κυτταρογενετικής ανάλυσης.

Για τα θηλυκά της ομάδας XO, αναφέρεται ο μέσος αριθμός νεογνών από την ίδια μητέρα, η αναλογία φύλου των απογόνων της ομάδας F_2 και τα αποτελέσματα της κυτταρογενετικής ανάλυσης.

Εάν οι πιθανοί φορείς μετατόπισης της ομάδας F_1 προεπιλέγονται με δοκιμασίες γονιμότητας, οι πίνακες πρέπει να περιλαμβάνουν πληροφορίες για τον αριθμό εκείνων που επιβεβαιώθηκαν ότι είναι ετεροζυγώτες μετατόπισης. Τα δεδομένα από πειράματα αρνητικών ελέγχων και θετικών ελέγχων με μάρτυρες αναφέρονται κατά τον ίδιο τρόπο.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Στην έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνονται οι παρακάτω πληροφορίες:

— στελέχη των ποντικών, ηλικία των ζώων, βάρη των ζώων που υπέστησαν την αγωγή,

— αριθμοί των μητρικών ζώων κάθε φύλου της ομάδας δοκιμασίας και της ομάδας μάρτυρα,

— συνθήκες της δοκιμασίας, λεπτομερής περιγραφή της αγωγής, επίπεδα δόσεων, διαλύτες, πρόγραμμα ζευγαρώματος,

— αριθμός και φύλο των απογόνων ανά θηλυκό ζώο, αριθμός και φύλο των απογόνων που αναπτύχθηκαν για ανάλυση μετατόπισης,

— χρόνος και κριτήρια ανάλυσης μετατόπισης,

— αριθμός και λεπτομερής περιγραφή των φορέων μετατόπισης, συμπεριλαμβανομένων δεδομένων διατροφής και δεδομένων περιεχομένου μήτρας, εάν είναι δυνατόν,

— κυτταρογενετικές διαδικασίες και λεπτομέρειες μικροσκοπικής ανάλυσης, κατά προτίμηση με εικόνες,

— στατιστική αξιολόγηση,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

▼B

3.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β,

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

▼B

B.26. **ΔΟΚΙΜΗ ΥΠΟΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ 90 ΗΜΕΡΩΝ ΜΕ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΔΟΣΗ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

Η παρούσα μέθοδος μελέτης της υποχρόνιας τοξικότητας ουσιών λαμβανόμενων από το στόμα αποτελεί Επανάληψη της μεθόδου TG 408 (1998) του ΟΟΣΑ.

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Για την αξιολόγηση των τοξικών χαρακτηριστικών μιας χημικής ουσίας, είναι δυνατόν να προσδιοριστεί η υποχρόνια τοξικότητα της ουσίας λαμβανόμενης από το στόμα με επαναλαμβανόμενες δόσεις αφού πρώτα έχουν ληφθεί αρχικές πληροφορίες όσον αφορά την τοξικότητα της ουσίας με δοκιμασίες οξείας τοξικότητας ή τοξικότητας επαναλαμβανόμενης δόσης 28 ημερών. Με τη μελέτη 90 ημερών λαμβάνονται πληροφορίες για πιθανούς κινδύνους για την υγεία οι οποίοι ενδεχομένως προκύψουν λόγω επαναλαμβανόμενης έκθεσης επί παρατεταμένο χρονικό διάστημα το οποίο καλύπτει την περίοδο από την ωρίμαση μετά την αποκοπή μέχρι την ανάπτυξη έως την πλήρη ενηλικίωση. Από τη μελέτη θα προκύψουν στοιχεία για τις κύριες τοξικές επιπτώσεις καθώς και ενδείξεις για τα όργανα-στόχους και για την πιθανότητα συσσώρευσης· μπορεί επίσης να προκύψει εκτίμηση για ένα επίπεδο έκθεσης στο οποίο δεν παρατηρείται τοξική επίπτωση (no observed adverse effect level} και το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επιλογή των δόσεων για χρόνιες μελέτες και για τη θέσπιση κριτηρίων ασφαλείας για την έκθεση του ανθρώπου.

Στη μέθοδο δίνεται επιπλέον έμφαση στα σημεία των νευρικών απολήξεων και από αυτήν συνάγονται ενδείξεις για τις επιπτώσεις στο ανοσοποιητικό και στο αναπαραγωγικό σύστημα. Υπογραμμίζεται επίσης η ανάγκη για προσεκτική κλινική παρατήρηση των ζώων, προκειμένου να ληφθεί ο μεγαλύτερος δυνατός αριθμός πληροφοριών. Η μελέτη πρέπει να επιτρέπει τον προσδιορισμό των χημικών ουσιών που διαθέτουν το δυναμικό πρόκλησης νευροτοξικών ή ανοσολογικών επιπτώσεων ή επιπτώσεων στα αναπαραγωγικά όργανα οι οποίες ενδεχομένως απαιτούν περαιτέρω σε βάθος διερεύνηση.

Βλέπε επίσης γενική εισαγωγή μέρος Β

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Δόση: είναι η χορηγούμενη ποσότητα της υπό δοκιμή ουσίας. Η δόση εκφράζεται σε βάρος (g, mg) ή σε βάρος δοκιμαζόμενης ουσίας ανά μονάδα βάρους πειραματόζωου (π.χ.mg/kg), ή σε σταθερές συγκεντρώσεις στην τροφή (ppm).

Δοσολογία: είναι ένας γενικός όρος που περιλαμβάνει τη δόση, τη συχνότητα και τη διάρκεια χορήγησης της.

NOAEL: πρόκειται για συντομογραφία του «no observed adverse effect level» και είναι η υψηλότερη δόση με την οποία δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιπτώσεις σχετιζόμενες με την αγωγή.

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται από το στόμα ημερησίως σε σταδιακά αυξανόμενες δόσεις σε αρκετές ομάδες πειραματόζωων, μία δόση ανά ομάδα για χρονικό διάστημα 90 ημερών. Κατά την περίοδο χορήγησης της αγωγής, τα ζώα παρατηρούνται καθημερινά για την ανίχνευση σημείων τοξικότητας. Τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας υποβάλλονται σε νεκροψία και, στο τέλος της δοκιμασίας, τα επιζήσαντα ζώα θανατώνονται και επίσης υποβάλλονται σε νεκροψία.

▼B

1.4. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.4.1. **Προετοιμασία των ζώων**

Χρησιμοποιούνται υγιή ζώα. τα οποία έχουν εγκλιματισθεί στις εργαστηριακές συνθήκες για πέντε τουλάχιστον ημέρες και δεν έχουν υποβληθεί σε προηγούμενους πειραματικούς χειρισμούς. Τα πειραματόζωα χαρακτηρίζονται με βάση το είδος, την ποικιλία, την προέλευση, το φύλο, το βάρος ή/και την ηλικία. Τα πειραματόζωα κατανέμονται με τυχαία επιλογή σε ομάδες αγωγής και ομάδες μαρτύρων. Οι κλωβοί τοποθετούνται με τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται τυχόν επιδράσεις οφειλόμενες στον τρόπο τοποθέτησης. Σε κάθε ζώο αποδίδεται ένας μοναδικός αναγνωριστικός αριθμός.

1.4.2. **Παρασκευή των δόσεων**

Η υπό δοκιμή ουσία μπορεί να χορηγείται με καθετήρα στομάχου ή στην τροφή ή στο πόσιμο νερό. Η μέθοδος χορήγησης από το στόμα εξαρτάται από το σκοπό της μελέτης και τις φυσικοχημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή ουσίας.

Όταν χρειάζεται, δημιουργείται διάλυμα ή εναιώρημα της δοκιμαζόμενης ουσίας σε κατάλληλο έκδοχο. Συνιστάται, όταν είναι εφικτό, να εξετάζεται πρώτα η δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί υδατικό διάλυμα/εναιώρημα, κατόπιν διάλυμα/γαλάκτωμα σε έλαιο (π.χ. αραβοσιτέλαιο) και τέλος η διάλυση σε άλλα έκδοχα. Πρέπει να είναι γνωστά τα τοξικά χαρακτηριστικά των άλλων (πλήν του ύδατος) εκδόχων. Πρέπει να καθορίζεται η σταθερότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας υπό τις συνθήκες χορήγησης.

1.4.3. **Συνθήκες δοκιμασίας**

1.4.3.1. *Πειραματόζωα*

Το προτιμώμενο είδος είναι ο επίμυς (αρουραίος), παρόλο που μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη τρωκτικών, π.χ. μύες. Χρησιμοποιούνται ποικιλίες νεαρών υγιών ενήλικων ζώων από αυτές που συνήθως χρησιμοποιούνται σε εργαστήρια. Τα θηλυκά ζώα πρέπει να μην εγκυμονούν και να μην έχουν εγκυμονήσει στο παρελθόν. Η χορήγηση των δόσεων ξεκινά αμέσως μετά τον απογαλακτισμό και, οπωσδήποτε, πριν τα ζώα φθάσουν σε ηλικία εννέα εβδομάδων. Στην αρχή της μελέτης, η διαφορά βάρους ανάμεσα στα χρησιμοποιούμενα ζώα δεν πρέπει να υπερβαίνει το ± 20 % του μέσου βάρους κάθε φύλου. Όταν η μελέτη διενεργείται ως προκαταρκτική μελέτη για μακρόχρονη μελέτη χρόνιας τοξικότητας, πρέπει και στις δύο μελέτες να χρησιμοποιηθούν ζώα ίδιας ποικιλίας και προέλευσης.

1.4.3.2. *Αριθμός και φύλο*

Για κάθε δόση (επίπεδο) χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 20 ζώα (δέκα θηλυκά και δέκα αρσενικά). Εάν σχεδιάζονται θανατώσεις κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, ο αριθμός αυξάνεται ανάλογα με τον αριθμό των ζώων που πρόκειται να θανατωθούν πριν την ολοκλήρωση της μελέτης. Με βάση όσα είναι ήδη γνωστά για τη χημική ουσία ή άλλη ουσία που εμφανίζει σημαντικές με αυτήν αναλογίες, εξετάζεται η περίπτωση να περιληφθεί πρόσθετη δορυφορική ομάδα δέκα ζώων (πέντε ανά ψύλο), στην ομάδα των μαρτύρων και στην ομάδα της υψηλότερης δόσης για να διαπιστωθεί κατά πόσον οι τοξικές επιπτώσεις εμμένουν ή αναστρέφονται μετά την περίοδο της αγωγής. Η διάρκεια της μετά την αγωγή περιόδου καθορίζεται με κατάλληλο τρόπο, ανάλογα με τις επιπτώσεις που θα παρατηρηθούν.

▼B

1.4.3.3. *Δόσεις*

Χρησιμοποιούνται τρεις τουλάχιστον διαφορετικές δόσεις και ένας μάρτυρας, πλην των περιπτώσεων όπου εκτελείται οριακή δοκιμή (βλέπε 1.4.3.4). Η επιλογή των δόσεων μπορεί να βασιστεί στα αποτελέσματα μελετών επαναλαμβανόμενης δόσης ή εντοπισμού εύρους τιμών και πρέπει να λαμβάνει υπόψη τα διαθέσιμα τοξικολογικά και τοξικοκινητικά δεδομένα που αφορούν τη δοκιμαζόμενη ουσία ή συναφείς ουσίες. Εκτός από τις περιπτώσεις όπου οι φυσικοχημικές ιδιότητες ή οι βιολογικές επιπτώσεις της δοκιμαζόμενης ουσίας δεν το επιτρέπουν, η υψηλότερη δόση επιλέγεται με σκοπό να επιφέρει τοξικότητα αλλά όχι τον θάνατο ή έντονη οδύνη. Επιλέγεται σειρά ελαττούμενων δόσεων έτσι ώστε αφενός να καταδειχθεί η σχέση της απόκρισης με τη δόση και αφετέρου η χαμηλότερη δόση να αποτελεί επίπεδο έκθεσης χωρίς τοξική επίδραση (NOAEL). Συχνά, η καλύτερη επιλογή για τον καθορισμό των ελαττούμενων δόσεων είναι τα υποδιπλάσια ή υποτετραπλάσια διαστήματα μεταξύ δόσεων και πολλές φορές είναι προτιμότερο να προστεθεί μια τέταρτη ομάδα δοκιμασίας παρά να είναι τα διαστήματα μεταξύ των δόσεων εξαιρετικά μεγάλα (π.χ. με συντελεστή μεγαλύτερο από 6 έως 10).

Οι μάρτυρες είναι ομάδα μη υποβαλλόμενη σε αγωγή ή ομάδα προοριζόμενη για τον έλεγχο του εκδόχου, εφόσον χρησιμοποιείται έκδοχο για τη χορήγηση της δοκιμαζόμενης ουσίας. Εκτός από το ότι δεν τους χορηγείται η υπό δοκιμή ουσία, κατά τα άλλα οι μάρτυρες υπόκεινται στους ίδιους ακριβώς χειρισμούς με τα ζώα των ομάδων αγωγής. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται έκδοχο, ο όγκος εκδόχου που χορηγείται στους μάρτυρες είναι ο μεγαλύτερος που χρησιμοποιείται στις ομάδες αγωγής. Όταν η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται μέσα στην τροφή, και προκαλεί μείωση της πρόσληψης τροφής, τότε ίσως είναι χρήσιμη μια επιπλέον ομάδα μαρτύρων υποβαλλόμενη στην ίδια δίαιτα προκειμένου να γίνει διαχωρισμός μεταξύ της μείωσης για γευστικούς λόγους και της μείωσης λόγω τοξικολογικής επίδρασης στο δοκιμαστικό μοντέλο.

Εξετάζονται τα ακόλουθα χαρακτηριστικά του εκδόχου και άλλων προσθέτων, όπου χρησιμοποιούνται: επιπτώσεις στην απορρόφηση, στην κατανομή, στο μεταβολισμό ή στην κατακράτηση της υπό δοκιμή ουσίας, επιπτώσεις στις χημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή ουσίας οι οποίες μπορούν να μεταβάλουν τα τοξικά χαρακτηριστικά της και επιπτώσεις στην κατανάλωση τροφής ή ύδατος ή στη διατροφική κατάσταση των ζώων.

1.4.3.4. *Οριακή δοκιμή*

Εάν δοκιμή με δόση ισοδύναμη τουλάχιστον με 1 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα, με τη διαδικασία που περιγράφεται στη συνέχεια, δεν προκαλέσει εμφανείς τοξικές επιπτώσεις, και εφόσον δεν αναμένεται η εμφάνιση τοξικότητας με βάση στοιχεία για ουσίες παρόμοιας δομής, τότε μπορεί να κριθεί ως μη αναγκαία η εκτέλεση πλήρους μελέτης με τρεις διαφορετικές δόσεις. Η οριακή δοκιμή δεν' εφαρμόζεται σε περιπτώσεις κατά τις οποίες δεδομένα που αφορούν την έκθεση του ανθρώπου δείχνουν ότι είναι αναγκαίο να χρησιμοποιηθεί υψηλότερη δόση.

1.5. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.5.1. **Χορήγηση των δόσεων**

Στα ζώα χορηγείται η υπό δοκιμή ουσία καθημερινά, εφτά ημέρες την εβδομάδα επί 90 ημέρες. Κάθε άλλο καθεστώς χορήγησης, π.χ. πέντε ημέρες την εβδομάδα, πρέπει να αιτιολογείται. Όταν η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται στα ζώα με καθετήρα, χορηγείται σε εφάπαξ δόση με στομαχικό σωλήνα ή με άλλη κατάλληλη διασωλήνωση. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Ο όγκος δεν υπερβαίνει το 1 ml/100 g βάρους σώματος, εκτός από τις περιπτώσεις υδατικών διαλυμάτων όπου μπορούν να χρησιμοποιηθούν 2 ml/100 g βάρους σώματος. Με εξαίρεση τις ερεθιστικές ή διαβρωτικές ουσίες οι οποίες κανονικά εμφανίζουν εντονότερες επιπτώσεις σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, οι διαφοροποιήσεις στον όγκο πρέπει να ελαχιστοποιούνται με προσαρμογή της συγκέντρωσης ώστε να διασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλες τις δόσεις.

▼B

Για τις ουσίες που χορηγούνται μέσω της τροφής ή του πόσιμου ύδατος, μεριμνάται ώστε οι απαιτούμενες ποσότητες της υπό δοκιμή ουσίας να μην επηρεάζουν την κανονική διατροφική ή υδατική ισορροπία. Όταν η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται με την τροφή, χρησιμοποιείται είτε η σταθερή συγκέντρωση στην τροφή (ppm) είτε η σταθερή δόση εκφρασμένη επί του βάρους του σώματος του ζώου. Άλλος εναλλακτικός τρόπος, εάν χρησιμοποιηθεί, ορίζεται με λεπτομέρειες. Για ουσίες που χορηγούνται με καθετηρίαση, η χορήγηση γίνεται τις ίδιες περίπου ώρες κάθε ημέρα και οι δόσεις προσαρμόζονται ώστε η δόση σε αναλογία με το βάρος σώματος του ζώου να διατηρείται σταθερή. Όταν η μελέτη 90 ημερών διενεργείται ως προκαταρκτική μελέτη για μακρόχρονη μελέτη χρόνιας τοξικότητας, χρησιμοποιείται και στις δύο μελέτες παρόμοια δίαιτα.

1.5.2. **Παρατηρήσεις**

Η ελάχιστη περίοδος παρατήρησης είναι 90 ημέρες. Τα ζώα των δορυφορικών ομάδων που έχουν προβλεφθεί για μετέπειτα παρατήρηση κρατούνται για ορισμένο χρόνο χωρίς αγωγή για να διαπιστωθεί κατά πόσον οι τοξικές επιπτώσεις παραμένουν ή έχουν εκλείψει.

Τα ζώα υποβάλλονται σε γενική κλινική παρατήρηση τουλάχιστον μία φορά την ημέρα, κατά προτίμηση την ίδια ώρα, με συνεκτίμηση του σημείου αιχμής των επιπτώσεων που αναμένονται μετά τη χορήγηση της δόσης. Καταγράφεται η κλινική κατάσταση των ζώων. Τουλάχιστον δύο φορές την ημέρα, συνήθως στην αρχή και στο τέλος κάθε ημέρας, όλα τα ζώα εξετάζονται για σημεία νοσηρότητας και θνησιμότητας.

Τουλάχιστον μία φορά πριν την πρώτη έκθεση (ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση κάθε πειραματόζωου με την προ της δοκιμής κατάστασή του}, και μία φορά την εβδομάδα στη συνέχεια, εκτελείται λεπτομερής κλινική παρατήρηση όλων των ζώων. Οι παρατηρήσεις γίνονται εκτός των κλωβών, κατά προτίμηση στο ίδιο πάντα μέρος και την ίδια περίπου ώρα κάθε φορά. Καταγράφονται προσεκτικά, κατά προτίμηση με βάση κάποιο σύστημα βαθμολόγησης, που έχει οριστεί από το εργαστήριο. Καταβάλλεται προσπάθεια ώστε να είναι ελάχιστες οι διαφορές στις συνθήκες παρατήρησης. Τα συμπτώματα που καταγράφονται περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, μεταβολές στο δέρμα και στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους υμένες, εμφάνιση εκκρίσεων και απεκκρίσεων και αυτόνομης δραστηριότητας (π.χ. δακρύρροια, όρθωση τριχών, μέγεθος οφθαλμικής κόρης, ασυνήθης αναπνοή). Τυχόν μεταβολές στο βάδισμα, στη στάση του σώματος ή στην ανταπόκριση στο χειρισμό καθώς και εμφάνιση κλονικών ή τονικών κινήσεων, στερεοτυπίας (π.χ. υπερβολική αυτοπεριποίηση, επαναλαμβανόμενη κυκλική βάδιση) ή παράξενης συμπεριφοράς (π.χ. αυτοακρωτηριασμός, οπισθοβάδιση) καταγράφονται επίσης (1).

Η οφθαλμολογική εξέταση, με χρήση οφθαλμοσκοπίου ή ισοδύναμου κατάλληλου εξοπλισμού, διενεργείται πριν από τη χορήγηση της υπο δοκίμή ουσίας και στο τέλος της μελέτης, κστά προτίμηση σε όλα τα ζώα, τουλάχιστον όμως στις ομάδες υψηλής δόσης και στις ομάδες των μαρτύρων. Γάν διαπιστωθούν μεταβολές στους οφθαλμούς, εξετάζονται όλα τα ζώα.

Κατά το τέλος της περιόδου έκθεσης και οπωσδήποτε όχι πριν την 11η εβδομάδα, εκτελείται αξιολόγηση της αισθητηριακής ανταπόκρισης σε διαφορετικών ειδών ερεθίσματα (1) (π.χ. ακουστικά, οπτικά και ιδιοδεκτικά ερεθίσματα) (2), (3), (4), αξιολόγηση της δύναμης λαβής (5) και αξιολόγηση της μυϊκής δραστηριότητας (6). Λεπτομερέστερη περιγραφή των διαδικασιών που μπορούν να ακολουθηθούν δίνονται στις αντίστοιχες βιβλιογραφικές παραπομπές. Εναλλακτικές διαδικασίες, διαφορετικές από τις περιγραφόμενες στις βιβλιογραφικές παραπομπές, μπορούν να χρησιμοποιηθούν επίσης.

Είναι δυνατόν να παραλειφθούν οι παρατηρήσεις για λειτουργικές διαταραχές, οι οποίες εκτελούνται κατά το τέλος της μελέτης όταν υπάρχουν διαθέσιμα σχετικά δεδομένα από άλλες μελέτες και δεν έχουν διαπιστωθεί λειτουργικές ανωμαλίες κατά τις καθημερινές κλινικές παρατηρήσεις.

▼B

Κατ' εξαίρεση, τέτοιες παρατηρήσεις μπορούν επίσης να παραλειφθούν για τις ομάδες οι οποίες εμφανίζουν σημεία τοξικότητας τέτοιας έντασης ώστε να επηρεάζεται σημαντικά η εκτέλεση της λειτουργικής δοκιμασίας.

1.5.2.1. *Βάρος σώματος και κατανάλωση τροφής/ύδατος*

Τα ζώα ζυγίζονται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα. Η κατανάλωση τροφής μετρείται σε εβδομαδιαία τουλάχιστον βάση. Εάν η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται στο πόσιμο νερό, η κατανάλωση ύδατος επίσης μετρείται σε εβδομαδιαία τουλάχιστον βάση. Η κατανάλωση ύδατος πρέπει επίσης να λαμβάνεται υπόψη στις μελέτες με χορήγηση της ουσίας στην τροφή ή με καθετηρίαση κατά τις οποίες η δραστηριότητα πόσης μπορεί να μεταβληθεί.

1.5.2.2. *Αιματολογικές εξετάσεις και κλινική βιοχημεία*

Τα δείγματα αίματος λαμβάνονται από ένα συγκεκριμένο σημείο και αποθηκεύονται, κατά περίπτωση, υπό κατάλληλες συνθήκες. Στο τέλος της περιόδου δοκιμής, τα δείγματα συλλέγονται αμέσως πριν τη διαδικασία θανάτωσης των ζώων ή στο πλαίσιο της διαδικασίας αυτής.

Στο τέλος της περιόδου δοκιμής και αφού έχουν συλλεχθεί τυχόν ενδιάμεσα δείγματα αίματος εκτελούνται οι εξής αιματολογικές εξετάσεις: μέτρηση αιματοκρίτη, συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης, αριθμού ερυθρών αιμοσφαιρίων, λευκών αιμοσφαιρίων και διαφορικού λευκοκυτταρικού τύπου, αριθμού αιμοπεταλίων και μέτρηση του χρόνου/δυναμικού πήξης του αίματος.

Κλινικός βιοχημικός προσδιορισμός για τη διερεύνηση κύριων τοξικών επιπτώσεων στους ιστούς και ειδικότερα για επιπτώσεις στο νεφρό και στο ήπαρ εκτελείται στα δείγματα αίματος που λαμβάνονται από κάθε ζώο ακριβώς πριν τη διαδικασία θανάτωσης ή στο πλαίσιο της διαδικασίας αυτής (εξαιρούνται τα ετοιμοθάνατα ζώα ή/και όσα έχουν στο μεταξύ πεθάνει). Όπως και για τις αιματολογικές εξετάσεις, για τις κλινικές βιοχημικές δοκιμές εκτελούνται ενδιάμεσες αιμοληψίες. Συνιστάται να παραμένουν νηστικά τα ζώα τη νύχτα που προηγείται της αιμοληψίας ([1]). Στο πλάσμα ή στον ορό προσδιορίζονται οπωσδήποτε τα εξής: νάτριο, κάλιο, γλυκόζη, συνολική χοληστερίνη, ουρία, άζωτο ουρίας του αίματος, κρεατινίνη, συνολική πρωτεΐνη και αλβουμίνη και περισσότερα από δύο ένζυμα ενδεικτικά των ηπατοκυτταμικών επιπτώσεων (όπως η αμινοτρανσφεράση της αλανίνης, η αμινοτρανσφεράση του ασπαρτικού οξέος, η αλκαλική φωσφατάση, η γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάση και η δεσυδρογονάση της σερβιτόλης). Μετρήσεις πρόσθετων ενζύμων (ηπατικής ή άλλης προέλευσης) και οξέων της χολής, οι οποίες μπορούν να παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες υπό ορισμένες συνθήκες, είναι δυνατό να συμπεριληφθούν.

Προαιρετικά, κατά την τελευταία εβδομάδα της μελέτης, μπορούν να εκτελεστούν οι ακόλουθες αναλύσεις ούρων σε δείγματα τα οποία συλλέγονται σε προκαθορισμένο χρόνο: εμφάνιση, όγκος, οσμωτική ικανότητα ή ειδικό βάρος, pH, πρωτεΐνη, γλυκόζη και αίμα/αιματοκύτταρα.

Επιπλέον, εξετάζεται κατά πόσο είναι σκόπιμο να μελετηθούν οι ορολογικοί δείκτες για τις γενικής φύσεως βλάβες που έχουν υποστεί οι ιστοί. Άλλοι προσδιορισμοί που εκτελούνται εάν οι γνωστές ιδιότητες της υπό δοκιμή ουσίας μπορούν να επηρεάσουν ή υπάρχει η υποψία ότι επηρεάζουν σχετικά μεταβολικά προφίλ περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό ασβεστίου, φωσφόρου, τριγλυκεριδίων μετά από νηστεία, ειδικών ορμονών, μεθαιμοσφαιρίνης και χολινεστεράσης. Λυτοί οι προσδιορισμοί εκτελούνται για χημικές ουσίες ορισμένων κατηγοριών ή κατά περίπτωση.

([1]) Για πολλές μετρήσεις στον ορό και στο πλάσμα, ιδίως για τη γλυκόζη, προτιμάται η ολονύκτια νηστεία. Κυριότερες λόγοι, γι' αυτό είναι ότι η αυξημένη διακύμανση των τιμών, αναπόφευκτη αν τα *ζώα* δεν υποβληθούν σε νηστεία, θα τείνει να καλύψει λεπτότερες επιπτώσεις και να δυσχεράνει την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Η ολονύκτια όμως νηστεία μπορεί να επηρεάσει τον γενικό μεταβολισμό των ζώων και, ιδίως στις μελέτες όπου η ουσία χορηγείται στη δίαιτα, μπορεί να διαταράζει την ημερήσια έκθεση στη δοκιμαζόμενη ουσία. Όταν επιλέγεται ολονύκτια νηστεία, ο κλινικός βιοχημικός προσδιορισμός τρέπει να εκτελείται μετά τη διεξαγωγή των λειτουργικών παρατηρήσεων.

▼B

Γενικά, απαιτείται ευέλικτη προσέγγιση, εξαρτώμενη από τα είδη και την παρατηρούμενη ή/και αναμενόμενη επίπτωση μιας δεδομένης ουσίας.

Εάν τα ιστορικά στοιχεία αναφοράς δεν είναι κατάλληλα, εξετάζεται κατά πόσο χρειάζεται να προσδιοριστούν οι αιματολογικές και κλινικές βιοχημικές μεταβλητές πριν αρχίσει η χορήγηση της ουσίας. Κατά κανόνα, δεν συνιστάται προσδιορισμός αυτών των δεδομένων πριν τη χορήγηση της αγωγής (7).

1.5.2.3. *Μακροσκοπική νεκροψία*

Όλα τα ζώα της μελέτης υποβάλλονται σε πλήρη μακροσκοπική νεκροψία που περιλαμβάνει προσεκτική εξέταση της εξωτερικής επιφάνειας του σώματος, όλων των φυσικών στομίων του σώματος καθώς επίσης και της κρανιακής, θωρακικής και κοιλιακής κοιλότητας και του περιεχομένου αυτών. Το ήπαρ, οι νεφροί, τα επινεφρίδια, οι όρχεις, οι επιδιδυμίδες, η μήτρα, οι ωοθήκες, ο θύμος, η σπλήνα, ο εγκέφαλος και η καρδιά όλων των ζώων (εξαιρούνται τα ετοιμοθάνατα ή/και όσα έχουν στο μεταξύ πεθάνει) καθαρίζονται από τυχόν άλλους προσκολλημένους ιστούς, όπως ενδείκνυται, και ζυγίζονται υγρά αμέσως μετά την ανατομή ώστε να αποφεύγεται η ξήρανση.

Οι ακόλουθοι ιστοί διατηρούνται σε στερεωτικό μέσο κατάλληλο και για τον τύπο ιστού και για το είδος ιστοπαθολογικής εξέτασης στο οποίο ενδεχομένως υποβληθεί ο εν λόγω ιστός στο μέλλον: όλες οι μακροσκοπικές βλάβες, ο εγκέφαλος (αντιπροσωπευτικές περιοχές στις οποίες περιλαμβάνονται το άνω τμήμα του εγκεφάλου, η παρεγκεφαλίδα και ο μυελός/γέφυρα), ο νωτιαίος μυελός (σε τρία επίπεδα: αυχενικός, μεσοθωρακικός και οσφυϊκός), η υπόφυση, ο θυρεοειδής, ο παραθυρεοειδής, ο θύμος, ο οισοφάγος, οι σιελογόνοι αδένες, ο στόμαχος, το λεπτό και το παχύ έντερο (συμπεριλαμβανομένων των κηλίδων του Peyer), το ήπαρ, το πάγκρεας, οι νεφροί, τα επινεφρίδια, η σπλήνα, η καρδιά, η τραχεία και οι πνεύμονες (για να διατηρηθούν καταρχάς διογκώνονται με το στερεωτικό και κατόπιν βυθίζονται σε αυτό), η αορτή, οι γονάδες, η μήτρα, τα βοηθητικά γεννητικά όργανα, ο μαστικός αδένας θήλεος, ο προστάτης, η ουροδόχος κύστη, η χοληδόχος κύστη, οι λεμφαδένες (κατά προτίμηση ένας λεμφαδένας που καλύπτει την οδό χορήγησης και ένας άλλος, απομακρυσμένος ως προς την οδό χορήγησης, ο οποίος καλύπτει τις επιπτώσεις στη συστηματική κυκλοφορία), το περιφερειακό νεύρο (ισχιακό ή κνημιαίο) κατά προτίμηση κοντά στο μυ, τμήμα του μυελού οστού (ή/και νωπός μυελός οστού λαμβανόμενος με αναρρόφηση), δέρμα και οφθαλμοί (εάν έχουν παρατηρηθεί αλλαγές κατά τις οφθαλμολογικές εξετάσεις). Κλινικά και άλλα ευρήματα ενδεχομένως υποδεικνύουν ότι 9α πρέπει να εξεταστούν και άλλοι πρόσθετοι ιστοί. Διατηρούνται επίσης και όλα τα όργανα τα οποία, με βάση τις ήδη γνωστές ιδιότητες της δοκιμαζόμενης ουσίας, ενδέχεται να αποτελούν όργανα στόχους.

1.5.2.4. *Ιστοπαθολογία*

Διεξάγεται πλήρης ιστοπαθολογική εξέταση στα διατηρημένα όργανα και στους ιστούς όλων των ζώων που ανήκουν στις ομάδες των μαρτύρων και στις ομάδες υψηλής δόσης. Οι εν λόγω εξετάσεις επεκτείνονται στα ζώα των ομάδων όλων των άλλων δόσεων εάν στην ομάδα υψηλής δόσης έχουν παρατηρηθεί αλλαγές σχετιζόμενες με την αγωγή.

Εξετάζονται όλες οι μακροσκοπικές βλάβες.

Όταν χρησιμοποιείται δορυφορική ομάδα, εκτελείται ιστοπαθολογική εξέταση στους ιστούς και στα όργανα τα οποία έχει διαπιστωθεί ότι εμφανίζουν επιπτώσεις στις ομάδες που υποβάλλονται σε αγωγή.

▼B

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΕΙΣ**

2.1. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Για κάθε ζώο παρέχονται αναλυτικά στοιχεία. Επιπλέον, όλα τα δεδομένα καταγράφονται συνοπτικά σε πίνακες, όπου εμφαίνονται, για κάθε ομάδα δοκιμής ο αριθμός των ζώων στην αρχή της δοκιμασίας, ο αριθμός των ζώων που βρέθηκαν νεκρά κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας ή θανατώθηκαν για ανθρωπιστικούς λόγους και ο χρόνος θανάτου ή θανάτωσης, ο αριθμός αυτών που εμφάνισαν τοξικότητα, περιγραφή των συμπτωμάτων τοξικότητας (χρόνος εμφάνισης, διάρκεια και σοβαρότητα των τοξικών επιπτώσεων), αριθμός ζώων που εμφανίζουν βλάβες, τι είδους βλάβες και ποσοστό ζώων που εμφανίζουν κάθε είδους βλάβη.

Τα αριθμητικά αποτελέσματα αξιολογούνται με κατάλληλη και γενικώς αποδεκτέ] στατιστική μέθοδο. Οι στατιστικές μέθοδοι και τα προς ανάλυση δεδομένα επιλέγονται κατά το σχεδιασμό της μελέτης.

2.2. ΕΚΘΕΣΗ

Η έκθεση με τα αποτελέσματα της δοκιμασίας πρέπει να περιέχει τις ακόλουθες πληροφορίες:

2.2.1. **Υπό δοκιμή ουσία:**

— φυσική μομφή, καθαρότητα και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά,

— αναγνωριστικά στοιχεία,

— έκδοχο (όπου απαιτείται): αιτιολόγηση της επιλογής του εκδόχου, όταν δεν είναι το νερό.

2.2.2. **Είδος πειραματόζωου:**

— χρησιμοποιηθέν είδος/φυλή,

— αριθμό, ηλικία και φύλο των ζώων,

— προέλευση, συνθήκες στέγασης, δίαιτα κ.λπ.,

— βάρος κάθε ζώου στην αρχή της δοκιμασίας.

2.2.3. **Συνθήκες δοκιμής:**

— σκεπτικό επιλογής των δόσεων,

— λεπτομέρειες σχηματισμού της υπό δοκιμή ουσίας/της προετοιμασίας της τροφής, επιτευχθείσα συγκέντρωση, σταθερότητα και ομογένεια του παρασκευάσματος,

— λεπτομέρειες για τη χορήγηση της υπό δοκιμή ουσίας,

— πραγματικές δόσεις (mg/kg βάρους σώματος/ημέρα) και συντελεστής μετατροπής της συγκέντρωσης (ppm) της υπό δοκιμή ουσίας στην τροφή ή στο πόσιμο νερό στην πραγματική δόση, εφόσον συντρέχει περίπτωση,

— λεπτομέρειες για την ποιότητα της τροφής και του νερού.

2.2.4. **Αποτελέσματα:**

— βάρος σώματος και αλλαγές βάρους σώματος,

— κατανάλωση τροφής και κατανάλωση ύδατος, εφόσον εφαρμόζεται,

— δεδομένα τοξικών αποκρίσεων ανά δόση και φύλο, συμπεριλαμβανόμενων ενδείξεων τοξικότητας,

▼B

— φύση, σοβαρότητα και διάρκεια των κλινικών παρατηρήσεων (είτε είναι αναστρέψιμες είτε όχι),

— αποτελέσματα οφθαλμολογικής εξέτασης,

— αξιολόγηση αισθητηριακής δραστηριότητας, δύναμης λαβής και κινητικής δραστηριότητας (όταν υπάρχουν),

— αιματολογικές δοκιμασίες με σχετικές τιμές αναφοράς,

— κλινικές βιοχημικές εξετάσεις με σχετικές τιμές αναφοράς,

— τελικό βάρος σώματος, βάρος οργάνων και λόγος βάρους οργάνων/βάρος σώματος,

— ευρήματα νεκροψίας,

— λεπτομερής περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών ευρημάτων,

— στοιχεία απορρόφησης εάν είναι διαθέσιμα,

— στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, όταν αυτό είναι δυνατό.

Σχολιασμός των αποτελεσμάτων.

Συμπεράσματα.

3. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No 60.

(2) Tupper, D. E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, pp. 999-1003.

(3) Gad, S. C. (1982). Λ Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology.). Toxicol. Environ. Health, 9. pp. 691-704.

(4) Moser, V. C, Mc Daniel, K. M.. Phillips, P. M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, pp. 267-283.

(5) Meyer O. A., Tilson H. A., Byrd \V. C, Riley M. T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxivol., 1, pp. 233-236.

(6) Crofton K. M., Howard]. L., Moser V. C, Gill M. W., Reiter L. W., Tilson H. A., MacPhail R. C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, pp. 599-609.

(7) Weingand K., Brown C, Hall R. et al. (1996). «Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies», Fundam. & Appl. Toxicol., 29, pp. 198-201.

▼B

B.27. **ΔΟΚΙΜΗ ΥΠΟΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ 90 ΗΜΕΡΩΝ ΜΕ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΔΟΣΗ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ ΣΕ ΜΗ ΤΡΩΚΤΙΚΑ**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

Η περιγραφόμενη μέθοδος δοκιμής της υποχρόνιας τοξικότητας ουσιών λαμβανόμενων από το στόμα αποτελεί αντιγραφή της μεθόδου TG 409 (1998) του ΟΟΣΑ.

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Για την αξιολόγηση των τοξικών χαρακτηριστικών μιας ουσίας, είναι δυνατόν να προσδιοριστεί η υποχρόνια τοξικότητα της ουσίας λαμβανόμενης από το στόμα με επαναλαμβανόμενες δόσεις αφού πρώτα έχουν ληφθεί αρχικές πληροφορίες όσον αφορά την τοξικότητα της ουσίας με δοκιμασίες οξείας τοξικότητας ή τοξικότητας επαναλαμβανόμενης δόσης *28* ημερών. Με τη μελέτη 90 ημερών λαμβάνονται πληροφορίες για πιθανούς κινδύνους για την υγεία οι οποίοι ενδεχομένως προκύψουν λόγω επαναλαμβανόμενης έκθεσης κατά το χρονικό διάστημα ταχείας ανάπτυξης και έως την αρχή της ενηλικίωσης. Από τη μελέτη θα προκύψουν στοιχεία για τις κύριες τοξικές επιπτώσεις καθώς και ενδείξεις για τα όργανα-στόχους και για την πιθανότητα συσσώρευσης· μπορεί επίσης να προκύψει εκτίμηση για ένα επίπεδο έκθεσης στο οποίο δεν παρατηρείται τοξική επίπτωση (no observed adverse effect level) και το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επιλογή των δόσεων για χρόνιες μελέτες και για τη θέσπιση κριτηρίων ασφαλείας για την έκθεση του ανθρώπου.

Η μέθοδος δοκιμής επιτρέπει τον προσδιορισμό σε μη τρωκτικά των παρενεργειών από την έκθεση σε χημικές ουσίες και πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο:

— όταν οι παρατηρούμενες σε άλλες μελέτες επιπτώσεις υποδεικνύουν την ανάγκη για διασάφηση/χαρακτηρισμό σε ένα δεύτερο είδος, μη τρωκτικό, ή

— όταν μελέτες τοξικοκινητικότητας δείχνουν ότι η χρήση ενός ειδικού είδους το οποίο δεν ανήκει στα τρωκτικά είναι η καταλληλότερη επιλογή εργαστηριακού ζώου ή

— όταν άλλοι ειδικοί λόγοι αιτιολογούν τη χρήση μη τρωκτικού είδους.

Βλέπε επίσης γενική εισαγωγή μέρος Β.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Δόση: είναι η χορηγούμενη ποσότητα δοκιμαζόμενης ουσίας. Η δόση εκφράζεται σε βάρος (g, mg) ή σε βάρος δοκιμαζόμενης ουσίας ανά μονάδα βάρους πειραματόζωου (π.χ. mg/kg), ή σε σταθερές συγκεντρώσεις στη δίαιτα **(ppm).**

Δοσολογία: είναι ένας γενικός όρος που περιλαμβάνει τη δόση, τη συχνότητα και τη διάρκεια χορήγησης της.

NOAEL: πρόκειται για συ\τομογραφία του «no observed adverse effect level» και είναι η υψηλότερη δόση στην οποία δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιπτώσεις σχετιζόμενες με την αγωγή.

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται από το στόμα ημερησίως σε σταδιακά αυξανόμενες δόσεις σε αρκετές ομάδες πειραματόζωων, μία δόση (ένα επίπεδο συγκέντρωσης) ανά ομάδα για χρονικό διάστημα 90 ημερών. Κατά την περίοδο χορήγησης της αγωγής, τα ζώα παρατηρούνται εντατικά για την ανίχνευση σημείων τοξικότητας. Τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας υποβάλλονται σε νεκροψία και, στο τέλος της δοκιμασίας, τα επιζήσαντα ζώα θανατώνονται και επίσης υποβάλλονται σε νεκροψία.

▼B

1.4. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.4.1. **Επιλογή είδους πειραματόζωου**

Το συνήθως χρησιμοποιούμενο είδος μη τρωκτικού πειραματόζωου είναι ο σκύλος, και πρέπει να είναι καθορισμένης ποικιλίας συχνά χρησιμοποιείται το εγγλέζικο λαγωνικό (beagle). Άλλα είδη όπως ο χοίρος και τα χοιρίδια μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν. Η χρήση πρωτευόντων θηλαστικών δεν συνιστάται και θα πρέπει να αιτιολογείται. Χρησιμοποιούνται νεαρά υγιή ζώα και στην περίπτωση του σκύλου η αγωγή ξεκινά κατά προτίμηση στην ηλικία των 4-6 μηνών και όχι αργότερα από την ηλικία των 9 μηνών. Όταν η μελέτη διενεργείται ως προκαταρκτική μελέτη για μακρόχρονη μελέτη χρόνιας τοξικότητας πρέπει και στις δύο μελέτες να χρησιμοποιηθούν το ίδιο είδος και ποικιλία.

1.4.2. **Προετοιμασία των ζώων**

Χρησιμοποιούνται νεαρά υγιή ζώα, τα οποία έχουν Εγκλιματισθεί στις εργαστηριακές συνθήκες και δεν έχουν υποβληθεί σε προηγούμενους πειραματικούς χειρισμούς. Η διάρκεια εγκλιματισμού εξαρτάται από το είδος και την προέλευσή του. Συνιστάται χρόνος τουλάχιστον πέντε ημερών για σκύλους ή χοίρους που έχουν ανατραφεί για το σκοπό αυτό σε μόνιμη αποικία και τουλάχιστον δύο εβδομάδων για τα ζώα εξωτερικής προέλευσης. Τα πειραματόζωα χαρακτηρίζονται με βάση το είδος, την ποικιλία, την προέλευση, το φύλο, το βάρος ή/και την ηλικία. Τα πειραματόζωα κατανέμονται με τυχαία επιλογή σε ομάδες αγωγής και ομάδες μαρτύρων. Οι κλωβοί διατάσσονται με τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται τυχόν πιθανές επιδράσεις οφειλόμενες στη θέση των κλωβών. Σε κάθε ζώο αποδίδεται ένας μοναδικός αναγνωριστικός αριθμός.

1.4.3. **Παρασκευή των δόσεων**

Οι υπό δοκιμή ουσίες μπορεί να χορηγούνται μέσα στην τροφή ή στο πόσιμο νερό, με στοματική καθετηρίαση ή σε κάψουλες. Η μέθοδος χορήγησης από το στόμα εξαρτάται από τον σκοπό της μελέτης και τις φυσικοχημικές ιδιότητες του υλικού της δοκιμής.

Όταν χρειάζεται, δημιουργείται διάλυμα ή εναιώρημα της δοκιμαζόμενης ουσίας σε κατάλληλο έκδοχο. Συνιστάται, όταν είναι εφικτό, να εξετάζεται πρώτα η δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί υδατικό διάλυμα/εναιώρημα, κατόπιν διάλυμα/γαλάκτωμα σε έλαιο (π.χ. αραβοσιτέλαιο) και τέλος η διάλυση σε άλλα έκδοχα. Πρέπει να είναι γνωστά τα τοξικά χαρακτηριστικά των άλλων (πλην του ύδατος) εκδόχων. Πρέπει να προσδιορίζεται η σταθερότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας στις συνθήκες χορήγησης.

1.5. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.5.1. **Αριθμός και ηλικία των ζώων**

Για κάθε δόση χρησιμοποιούνται τουλάχιστον οκτώ ζώα (τέσσερα θηλυκά και τέσσερα αρσενικά). Εάν προβλέπονται θανατώσεις κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, ο αριθμός αυξάνεται ανάλογα κατά τον αριθμό των ζώων που πρόκειται να θανατωθούν πριν την ολοκλήρωση της μελέτης. Ο αριθμός ζώων με την ολοκλήρωση της μελέτης πρέπει να είναι επαρκής για ουσιαστική αξιολόγηση των τοξικών επιπτώσεων. Με βάση όσα είναι ήδη γνωστά για τη χημική ουσία ή άλλη ουσία ανάλογη αυτής, πρέπει να εξετάζεται η περίπτωση να περιληφθεί πρόσθετη δορυφορική ομάδα οκτώ ζώων (τεσσάρων ανά φύλο), στην ομάδα των μαρτύρων και στην ομάδα της υψηλότερης δόσης για να διαπιστωθεί κατά πόσον οι τοξικές επιπτώσεις εμμένουν ή αναστρέφονται μετά την περίοδο της αγωγής. Η διάρκεια της μετά την αγωγή περιόδου καθορίζεται με κατάλληλο τρόπο, ανάλογα με τις επιπτώσεις που θα παρατηρηθούν.

▼B

1.5.2. **Δοσολογία**

Χρησιμοποιούνται τρεις τουλάχιστον διαφορετικές δόσεις και ταυτόχρονα ένας μάρτυρας, εκτός από τις περιπτώσεις οριακής δοκιμής (βλέπε 1.5.3). Η επιλογή των δόσεων μπορεί να βασιστεί στα αποτελέσματα μελετών επαναλαμβανόμενης δόσης ή εντοπισμού εύρους τιμών και πρέπει να λαμβάνει υπόψη τα διαθέσιμα τοξικολογικά και τοξικοκινητικά δεδομένα που αφορούν τη δοκιμαζόμενη ουσία ή συναφείς ουσίες. Εκτός από τις περιπτώσεις όπου οι φυσικοχημικές ιδιότητες ή οι βιολογικές επιπτώσεις της δοκιμαζόμενης ουσίας δεν το επιτρέπουν, η υψηλότερη δόση επιλέγεται με σκοπό να επιφέρει τοξικότητα αλλά όχι τον θάνατο ή έντονη οδύνη. Επιλέγεται σειρά ελαττούμενων δόσεων με τρόπο ώστε αφενός να καταδειχθεί η σχέση της απόκρισης με τη δόση και αφετέρου η χαμηλότερη δόση να αποτελεί επίπεδο έκθεσης χωρίς τοξική επίδραση (NOAEL). Συχνά, η καλύτερη επιλογή για τον καθορισμό των ελαττούμενων δόσεων είναι τα υποδιπλάσια ή υποτετραπλάσια διαστήματα μεταξύ δόσεων και πολλές φορές είναι προτιμότερο να προστεθεί μία τέταρτη ομάδα δοκιμασίας παρά να είναι τα διαστήματα μεταξύ των δόσεων εξαιρετικά μεγάλα (π.χ. με συντελεστή μεγαλύτερο από 6 έως 10).

Η ομάδα των μαρτύρων είναι ομάδα μη υποβαλλόμενη σε αγωγή ή ομάδα έλεγχου του εκδόχου όταν χρησιμοποιείται έκδοχο για τη χορήγηση της δοκιμαζόμενης ουσίας. Εκτός από το ότι δεν τους χορηγείται η υπό δοκιμή ουσία, κατά τα άλλα οι μάρτυρες υπόκεινται στους ίδιους ακριβώς χειρισμούς με τα ζώα των ομάδων αγωγής. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται έκδοχο, οι μάρτυρες λαμβάνουν το έκδοχο στον μέγιστο όγκο από αυτούς που χρησιμοποιούνται στις ομάδες που υποβάλλονται σε αγωγή. Όταν η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται στην τροφή, και προκαλεί μείωση της πρόσληψης τροφής, τότε ίσως είναι χρήσιμη μια ομάδα μαρτύρων που υποβάλλεται στην ίδια δίαιτα προκειμένου να γίνει διαχωρισμός μεταξύ της μείωσης για γευστικούς λόγους και της μείωσης λόγω τοξικής επίπτωσης στο δοκιμαστικό μοντέλο.

Πρέπει να εξετάζονται τα ακόλουθα χαρακτηριστικά του εκδόχου και άλλων προσθέτων, όπου χρησιμοποιούνται: Επιπτώσεις στην απορρόφηση, στην κατανομή, στο μεταβολισμό ή στην κατακράτηση της υπό δοκιμή ουσίας, επιπτώσεις στις χημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή ουσίας οι οποίες μπορούν να μεταβάλουν τα τοξικά χαρακτηριστικά αυτής και επιπτώσεις στην κατανάλωση τροφής ή ύδατος ή στη διατροφική κατάσταση των ζώων.

1.5.3. **Οριακή δοκιμή**

Εάν δοκιμή με δόση ισοδύναμη τουλάχιστον με 1 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα, με τη διαδικασία που περιγράφεται στη συνέχεια, δεν προκαλέσει εμφανείς τοξικές επιπτώσεις, και εφόσον δεν αναμένεται η εμφάνιση τοξικότητας με βάση στοιχεία για ουσίες παρόμοιας δομής, τότε μπορεί να κριθεί ως μη αναγκαία η εκτέλεση πλήρους μελέτης με τρεις διαφορετικές δόσεις. Η οριακή δοκιμή δεν εφαρμόζεται σε περιπτώσεις κατά τις οποίες δεδομένα που αφορούν την έκθεση του ανθρώπου δείχνουν ότι είναι αναγκαίο να χρησιμοποιηθεί υψηλότερη δόση.

1.5.4. **Χορήγηση των δόσεων**

Στα ζώα χορηγείται η δοκιμαζόμενη ουσία καθημερινά, εφτά ημέρες την εβδομάδα επί 90 ημέρες. Κάθε άλλο καθεστώς χορήγησης, π.χ. πέντε ημέρες την εβδομάδα, πρέπει να αιτιολογείται. Όταν η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται στα ζώα με καθετήρα, χορηγείται σε εφάπαξ δόση με στομαχικό σωλήνα ή με άλλη κατάλληλη διασωλήνωση. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Συνήθως ο όγκος πρέπει να παραμένει ο μικρότερος δυνατός. Με εξαίρεση τις ερεθιστικές ή διαβρωτικές ουσίες οι οποίες κανονικά εμφανίζουν εντονότερα αποτελέσματα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, οι διαφοροποιήσεις στον όγκο ελαχιστοποιούνται με προσαρμογή της συγκέντρωσης ώστε να διασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλες τις δόσεις.

▼B

Για τις ουσίες που χορηγούνται μέσω της τροφής ή του πόσιμου ύδατος, μεριμνάτε ώστε οι απαιτούμενες ποσότητες της υπό δοκιμή ουσίας να μην επηρεάζουν την κανονική διατροφική ή υδατική ισορροπία. Όταν η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται με την τροφή, χρησιμοποιείται είτε η σταθερή συγκέντρωση στην δίαιτα (ppm) είτε η σταθερή δόση εκφρασμένη επί του βάρους του σώματος του ζώου. Εάν χρησιμοποιηθεί άλλος εναλλακτικός τρόπος, ορίζεται με λεπτομέρειες. Για ουσίες που χορηγούνται με καθετηρίαση ή με κάψουλα, η χορήγηση γίνεται τις ίδιες περίπου ώρες κάθε μέρα και οι δόσεις προσαρμόζονται ώστε η δόση σε αναλογία με το βάρος σώματος του ζώου να διατηρείται σταθερή. Όταν η μελέτη 90 ημερών διενεργείται ως προκαταρκτική μελέτη για μακρόχρονη μελέτη χρόνιας τοξικότητας, χρησιμοποιείται και στις δύο μελέτες παρόμοια δίαιτα.

1.5.5. **Παρατηρήσεις**

Η ελάχιστη περίοδος παρατήρησης είναι 90 ημέρες. Τα ζώα των δορυφορικών ομάδων που έχουν προβλεφθεί για παρατηρήσεις των επακόλουθων επιπτώσεων διατηρούνται για κατάλληλο χρονικό διάστημα χωρίς αγωγή, ώστε να εξακριβωθεί η ανάρρωση από τις τοξικές επιπτώσεις ή η εμμονή τους.

Τα ζώα υποβάλλονται σε γενική κλινική παρατήρηση τουλάχιστον μία φορά την ημέρα, κατά προτίμηση την ίδια ώρα, με συνεκτίμηση του σημείου αιχμής των συμπτωμάτων που αναμένονται μετά τη χορήγηση της δόσης. Καταγράφεται η κλινική κατάσταση των ζώων. Τουλάχιστον δύο φορές την ημέρα, συνήθως στην αρχή και στο τέλος κάθε μέρας, όλα τα ζώα εξετάζονται για σημεία νοσηρότητας και θνησιμότητας.

Τουλάχιστον μία φορά πριν την πρώτη έκθεση (ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση κάθε πειραματόζωου με την προ της δοκιμής κατάστασή του), και μία φορά την εβδομάδα στη συνέχεια, εκτελείται λεπτομερής κλινική παρατήρηση όλων των ζώων. Οι παρατηρήσεις γίνονται εκτός των κλωβών, κατά προτίμηση στο ίδιο πάντα μέρος και την ίδια περίπου ώρα κάθε φορά. Καταβάλλεται προσπάθεια ώστε να είναι ελάχιστες οι διαφορές στις συνθήκες παρατήρησης. Καταγράφονται προσεκτικά τα συμπτώματα τοξικότητας, ο χρόνος έναρξης, ο βαθμός και η διάρκειά τους. Τα συμπτώματα που καταγράφονται πρέπει να περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, μεταβολές στο δέρμα και στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους υμένες, εμφάνιση εκκρίσεων και απεκκρίσεων και αυτόνομης δραστηριότητας (π.χ. δακρύρροια, όρθωση τριχών, μέγεθος οφθαλμικής κόρης, ασυνήθης αναπνοή). Τυχόν μεταβολές στο βάδισμα, στη στάση του σώματος ή στην ανταπόκριση στο χειρισμό καθώς και εμφάνιση κλονικών (κινήσεις με τη μορφή νευρικού τικ) ή τονικών κινήσεων, στερεοτυπίας (π.χ. υπερβολική αυτοπεριποίηση, επαναλαμβανόμενη κυκλική βάδιση) ή παράξενης συμπεριφοράς καταγράφονται επίσης.

Η οφθαλμολογική εξέταση, με χρήση οφθαλμοσκοπίου ή ισοδύναμου κατάλληλου εξοπλισμού, διενεργείται πριν από τη χορήγηση της υπό δοκιμή ουσίας και στο τέλος της μελέτης, κατά προτίμηση σε όλα τα ζώα, τουλάχιστον όμως στις ομάδες υψηλής δόσης και στις ομάδες των μαρτύρων. Εάν διαπιστωθούν μεταβολές στους οφθαλμούς, εξετάζονται όλα τα ζώα.

1.5.5.1. *Βάρος πώματος και κατανάλωση τροφής/ύδατος*

Τα ζώα ζυγίζονται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα. Η κατανάλωση τροφής μετρείται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα. Εάν η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται στο πόσιμο νερό, η κατανάλωση ύδατος επίσης μετρείται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα. Η κατανάλωση ύδατος πρέπει επίσης να λαμβάνεται υπόψη στις μελέτες με χορήγηση της ουσίας στην τροφή ή με στομαχικό καθετηριασμό κατά τις οποίες μπορεί να σημειωθούν μεταβολές στην πόση.

▼B

1.5.5.2. *Αιματολογικές εξετάσεις και κλινική βιοχημεία*

Τα δείγματα αίματος λαμβάνονται από ένα συγκεκριμένο σημείο και αποθηκεύονται, κατά περίπτωση, υπό κατάλληλες συνθήκες. Στο τέλος της περιόδου δοκιμής, τα δείγματα συλλέγονται αμέσως πριν τη διαδικασία θανάτωσης των ζώων ή στο πλαίσιο της διαδικασίας αυτής.

Αιματολογικές εξετάσεις που περιλαμβάνουν τουλάχιστον μετρήσεις αιματοκρίτη, συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης, ερυθρών αιμοσφαιρίων, λευκών αιμοσφαιρίων και διαφορικού λευκοκυτταρικού τύπου, αιμοπεταλίων καθώς και μετρήσεις της πηκτικότητας του αίματος όπως είναι ο χρόνος πήξης, ο χρόνος προθρομβίνης ή θρομβοπλαστίνης πρέπει να εκτελούνται στην αρχή της μελέτης, κατόπιν ανά μήνα ή στο μέσο της μελέτης και τέλος όταν η μελέτη ολοκληρωθεί.

Εκτελούνται κλινικοί βιοχημικοί προσδιορισμοί για τη διερεύνηση κύριων τοξικών επιπτώσεων στους ιστούς και, ειδικότερα, στο νεφρό και στο ήπαρ στα δείγματα αίματος που λαμβάνονται από κάθε ζώο στην αρχή της μελέτης, κατόπιν ανά μήνα ή στο μέσο της μελέτης και τέλος όταν λήξει το χρονικό διάστημα της μελέτης. Εξετάζονται τα εξής: ηλεκτρολυτική ισορροπία, μεταβολισμός υδρογονανθράκων και νεφρική και ηπατική λειτουργία. Η επιλογή των συγκεκριμένων δοκιμασιών εξαρτάται από τις παρατηρήσεις για τον τρόπο δράσης της υπό δοκιμή ουσίας. Πριν την αιμοληψία, τα ζώα υποβάλλονται σε νηστεία για διάστημα ανάλογο με το είδος. Προτείνεται να προσδιορίζονται: ασβέστιο, φώσφορος, χλώριο, νάτριο, κάλιο, γλυκόζη μετά από νηστεία, αμινοτρανσφεράση της αλα-νίνης, αμινοτρανσφεράση του ασπαρτικού οξέος δεκαρβοξυλάση της ορνιθίνης, γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάση, άζωτο ουρίας, αλβουμίνη, κρεατινίνη αίματος, ολική χολερυθρίνη και ολικές πρωτεΐνες ορού.

Αναλύσεις ούρων εκτελούνται τουλάχιστον στην αρχή, στο μέσο και στο τέλος της μελέτης με δείγματα ούρων τα οποία συλλέγονται σε προκαθορισμένο χρόνο: Με τις αναλύσεις ούρων προσδιορίζονται τα εξής: εμφάνιση, όγκος, οσμωτική ικανότητα ή ειδικό βάρος, pH, πρωτεΐνη, γλυκόζη και αίμα/αιμοκύτταρα. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθούν και πρόσθετες παράμετροι όπου απαιτείται για την επέκταση της έρευνας των επιπτώσεων που παρατηρήθηκαν.

Επιπλέον, εξετάζεται η σκοπιμότητα να μελετηθούν οι ορολογικοί δείκτες για τις γενικής φύσεως βλάβες που έχουν υποστεί οι ιστοί. Άλλοι προσδιορισμοί, οι οποίοι μπορεί να είναι αναγκαίοι για την τοξικολογική αξιολόγηση, περιλαμβάνουν: ανάλυση λιπιδίων, ορμονών, ισορροπία οξέων/βάσεων, μεθαιμοσφαιρίνης και αναστολής χολινεστεράσης. Μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθούν και άλλοι κλινικοί βιοχημικοί προσδιορισμοί για την επέκταση της έρευνας των παρατηρηθεισών επιπτώσεων. Αυτοί οι προσδιορισμοί εκτελούνται για χημικές ουσίες ορισμένων κατηγοριών ή κατά περίπτωση.

Γενικά, απαιτείται ευέλικτη προσέγγιση, εξαρτώμενη από τα είδη και την παρατηρούμενη ή/και αναμενόμενη επίπτωση μιας δεδομένης ουσίας.

1.5.5.3. *Μακροσκοπική νεκροψία*

Όλα τα ζώα της μελέτης υποβάλλονται σε πλήρη μακροσκοπική νεκροψία που περιλαμβάνει προσεκτική εξέταση της εξωτερικής επιφάνειας του σώματος, όλων των φυσικών στομίων του σώματος καθώς επίσης και της κρανιακής, θωρακικής και κοιλιακής κοιλότητας και του περιεχομένου τους. Το ήπαρ με τη χοληδόχο κύστη, οι νεφροί, τα επινεφρίδια, οι όρχεις, οι επιδιδυμίδες, οι ωοθήκες, η μήτρα, ο θυροειδής (με τους παραθυροειδείς), ο θύμος, η σπλήνα, ο εγκέφαλος και η καρδιά όλων των ζώων (εξαιρούνται τα ετοιμοθάνατα ή/και όσα έχουν στο μεταξύ πεθάνει) καθαρίζονται από τυχόν άλλους προσκολλημένους ιστούς, όπως ενδείκνυται, και ζυγίζονται υγρά αμέσως μετά την ανατομή ώστε να αποφεύγεται η ξήρανση.

▼B

Οι ακόλουθοι ιστοί διατηρούνται σε στερεωτικό μέσο κατάλληλο και για τον τύπο ιστού και για το είδος ιστοπαθολογικής εξέτασης στο οποίο ενδεχομένως υποβληθεί ο εν λόγω ιστός στο μέλλον: όλες οι μακροσκοπικές βλάβες, ο εγκέφαλος (αντιπροσωπευτικές περιοχές στις οποίες περιλαμβάνονται το άνω τμήμα του εγκεφάλου, η παρεγκεφαλίδα και ο μυελός/γέφυρα), ο νωτιαίος μυελός (σε τρία επίπεδα: αυχενικός, μεσοθωρακικός και οσφυϊκός), η υπόφυση, τα μάτια, ο θυρεοειδής, ο παραθυρεοειδής, ο θύμος, ο οισοφάγος, οι σιελογόνοι αδένες, ο στόμαχος, το λεπτό και το παχύ έντερο (συμπεριλαμβανομένων των κηλίδων του Peyer), το ήπαρ, η χοληδόχος κύστη, το πάγκρεας, οι νεφροί, τα επινεφρίδια, η σπλήνα, η καρδιά, η τραχεία και οι πνεύμονες, η αορτή, οι γονάδες, η μήτρα, τα βοηθητικά γεννητικά όργανα, ο θηλαστικός αδένας θήλεος. ο προστάτης, η ουροδόχος κύστη, η χοληδόχος κύστη, οι λεμφαδένες (κατά προτίμηση ένας λεμφαδένας που καλύπτει την οδό χορήγησης και ένας άλλος, απομακρυσμένος ως προς την οδό χορήγησης, ο οποίος καλύπτει τις επιπτώσεις στο σωματικό σύστημα), το περιφερειακό νεύρο (ισχιακό ή κνημιαίο) κατά προτίμηση κοντά στον μυ, τμήμα του μυελού οστού (ή/και νωπός μυελός οστού λαμβανόμενος με αναρρόφηση) και το δέρμα. Κλινικά και άλλα ευρήματα ενδεχομένως υποδεικνύουν ότι θα πρέπει να εξεταστούν και άλλοι πρόσθετοι ιστοί.

Διατηρούνται επίσης και όλα τα όργανα τα οποία, με βάση τις ήδη γνωστές ιδιότητες της δοκιμαζόμενης ουσίας, ενδέχεται να αποτελούν όργανα στόχους.

1.5.5.4. *Ιστοπαθολογία*

Διεξάγεται πλήρης ιστοπαθολογική εξέταση στα όργανα και στους ιστούς (που έχουν διατηρηθεί) όλων των ζώων που ανήκουν στις ομάδες των μαρτύρων και στις ομάδες υψηλής δόσης. Οι εξετάσεις επεκτείνονται στα ζώα των ομάδων άλλων δόσεων εάν στην ομάδα υψηλής δόσης έχουν παρατηρηθεί αλλαγές σχετιζόμενες με την αγωγή.

Εξετάζονται όλες οι μακροσκοπικές βλάβες.

Όταν χρησιμοποιείται δορυφορική ομάδα, εκτελείται ιστοπαθολογική εξέταση στους ιστούς και στα όργανα τα οποία έχει διαπιστωθεί ότι εμφανίζουν επιπτώσεις στις ομάδες που υποβάλλονται σε αγωγή.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΕΙΣ**

2.1. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Για κάθε ζώο παρέχονται αναλυτικά στοιχεία. Επιπλέον, όλα τα δεδομένα καταγράφονται συνοπτικά σε πίνακες, όπου εμφαίνονται, για κάθε ομάδα δοκιμής ο αριθμός των ζώων στην αρχή της δοκιμασίας, ο αριθμός των ζώων που βρέθηκαν νεκρά κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας ή θανατώθηκαν για ανθρωπιστικούς λόγους και ο χρόνος θανάτου ή θανάτωσης, ο αριθμός αυτών που εμφάνισαν τοξικότητα, περιγραφή των συμπτωμάτων τοξικότητας (χρόνος εμφάνισης, διάρκεια και σοβαρότητα των τοξικών επιπτώσεων, αριθμός των ζώων που εμφανίζουν βλάβες, τι είδους βλάβες και ποσοστό ζώων που εμφανίζουν κάθε είδους βλάβη).

Τα αριθμητικά αποτελέσματα αξιολογούνται με κατάλληλη και γενικώς αποδεκτή στατιστική μέθοδο. Οι στατιστικές μέθοδοι και τα προς ανάλυση δεδομένα επιλέγονται κατά το σχεδιασμό της μελέτης.

2.2. ΕΚΘΕΣΗ

Η έκθεση με τα αποτελέσματα της δοκιμασίας πρέπει να περιέχει τις ακόλουθες πληροφορίες:

▼B

2.2.1. **Υπό δοκιμή ουσία:**

— φυσική μορφή, καθαρότητα και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά,

— αναγνωριστικά στοιχεία,

— έκδοχο (όπου απαιτείται): αιτιολόγηση της επιλογής του εκδόχου, όταν δεν είναι το νερό.

2.2.2. **Είδος πειραματόζωου:**

— χρησιμοποιηθέν είδος/φυλή,

— αριθμό, ηλικία και φύλο των ζώων,

— πηγή προέλευσης, συνθήκες στέγασης, δίαιτα, κ.λπ.

— βάρος κάθε ζώου στην αρχή της δοκιμασίας.

2.2.3. **Συνθήκες δοκιμής:**

— σκεπτικό επιλογής των δόσεων.

— λεπτομέρειες σχηματισμού της υπό δοκιμή ουσίας/της προετοιμασίας της τροφής, επιτευχθείσα συγκέντρωση, σταθερότητα και ομογένεια του παρασκευάσματος,

— λεπτομέρειες για τη χορήγηση της υπό δοκιμή ουσίας,

— ακριβείς δόσεις (mg/km βάρους σώματος/ημέρα) και συντελεστής μετατροπής της συγκέντρωσης (ppm) της υπό δοκιμή ουσίας στην τροφή ή στο πόσιμο νερό στην πραγματικά λαμβανόμενη δόση, εφόσον συντρέχει περίπτωση,

— λεπτομέρειες για την ποιότητα της τροφής και του νερού.

2.2.4. **Αποτελέσματα:**

— βάρος σώματος και αλλαγές βάρους σώματος,

— κατανάλωση τροφής και κατανάλωση ύδατος, κατά περίπτωση,

— δεδομένα τοξικών αποκρίσεων ανά δόση και φύλο, συμπεριλαμβανόμενων ενδείξεων τοξικότητας,

— φύση, σοβαρότητα και διάρκεια των κλινικών παρατηρήσεων (είτε είναι αναστρέψιμες είτε όχι),

— οφθαλμολογική εξέταση,

— αιματολογικές δοκιμασίες με σχετικές τιμές αναφοράς,

— κλινικές βιοχημικές εξετάσεις με σχετικές τιμές αναφοράς,

— τελικό βάρος σώματος, βάρος οργάνων και λόγος βάρους οργάνων/βάρος σώματος,

— ευρήματα νεκροψίας,

— λεπτομερής περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών ευρημάτων,

— στοιχεία απορρόφησης εάν είναι διαθέσιμα,

— στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, όταν αυτό είναι δυνατό.

Σχολιασμός των αποτελεσμάτων.

Συμπεράσματα.

▼B

B.28 **ΜΕΛΕΤΗ ΥΠΟΧΡΟΝΙΑΣ ΔΕΡΜΑΤΙΚΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΥΣΙΩΝ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΔΟΣΗ 90 ΗΜΕΡΩΝ ΣΤΟ ΔΕΡΜΑ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΡΩΚΤΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Καμία.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Η δοκιμαζόμενη ουσία τίθεται καθημερινά πάνω στο δέρμα σε προοδευτικά αυξανόμενες δόσεις σε αρκετές ομάδες πειραματόζωων, μία δόση ανά ομάδα για περίοδο 90 ημερών. Κατά την περίοδο της αγωγής τα ζώα παρατηρούνται καθημερινά για την ανίχνευση σημείων τοξικότητας. Τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια του πειράματος, καθώς επίσης και τα επιζήσαντα ζώα στο τέλος του πειράματος, υφίστανται νεκροψία.

1.5. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Κανένα.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Προπαρασκευή

Τα ζώα διατηρούνται κάτω από τις πειραματικές συνθήκες κατοικίας και διατροφής επί πέντε τουλάχιστον ημέρες πριν από τη δοκιμασία. Πριν από τη δοκιμασία, υγιή νεαρά ζώα ξεχωρίζονται με τυχαία επιλογή και κατανέμονται σε ομάδες αγωγής και ομάδες μάρτυρες. Λίγο πριν από τη δοκιμασία το τρίχωμα απομακρύνεται με κούρεμα από τη νωτιαία περιοχή του κορμού των πειραματόζωων. Μπορεί επίσης να απομακρυνθεί με ξύρισμα, που πρέπει όμως να γίνει 24 ώρες περίπου πριν από τη δοκιμασία. Επανάληψη του κουρέματος ή ξυρίσματος απαιτείται συνήθως κάθε εβδομάδα περίπου. Κατά το κούρεμα ή το ξύρισμα του τριχώματος πρέπει να καταβληθεί προσοχή ώστε να αποφευχθεί ή εκδορά του δέρματος. Δέκα τοις εκατό τουλάχιστον της επιφάνειας του δέρματος πρέπει να είναι γυμνή για την επίθεση της δοκιμαζόμενης ουσίας. Το βάρος του ζώου πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά τη λήψη της απόφασης σχετικά με την περιοχή που θα πρέπει να απογυμνωθεί και για τις διαστάσεις της επικάλυψης. Κατά τη δοκιμασία στερεών ουσιών, που μπορούν, εφόσον είναι δυνατό, να κονιοποιηθούν, η δοκιμαζόμενη ουσία πρέπει να υγρανθεί επαρκώς με νερό ή, εφόσον χρειάζεται, με κατάλληλο έκδοχο για να εξασφαλισθεί καλή επαφή με το δέρμα. Οι υγρές δοκιμαζόμενες ουσίες χρησιμοποιούνται συνήθως χωρίς αραίωση. Εφαρμόζεται καθημερινή επίθεση της ουσίας επί πέντε ή επτά ημέρες την εβδομάδα.

Συνθήκες δοκιμασίας

Πειραματόζωα

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο αρουραίος, το κουνέλι ή το ινδικό χοιρίδιο, πλήρους ανάπτυξης. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη, αλλά η χρήση τους θα απαιτούσε αιτιολόγηση. Στην αρχή του πειράματος, η διαφορά βάρους δεν πρέπει να υπερβαίνει το ± 20 % του μέσου βάρους. Στην περίπτωση που διεξάγεται υποχρόνια μελέτη δερματικής τοξικότητας, για να χρησιμεύσει σαν προκαταρκτική για μια μακροπρόθεσμη μελέτη, πρέπει να χρησιμοποιηθούν και στις δύο μελέτες τα ίδια είδη και στελέχη.

▼B

Αριθμός και φύλο

Τουλάχιστον 20 ζώα (10 θηλυκά και 10 αρσενικά) με υγιές δέρμα πρέπει να χρησιμοποιηθούν σε κάθε επίπεδο δόσης. Τα θηλυκά πρέπει να είναι άτοκα και όχι έγκυα. Εάν σχεδιάζονται ενδιάμεσες θανατώσεις, ο αριθμός θα πρέπει να αυξηθεί ανάλογα με τον αριθμό των ζώων που πρόκειται να θανατωθούν πριν από την ολοκλήρωση της μελέτης. Εκτός αυτού, μία δορυφορική ομάδα 20 ζώων (10 ζώα ανά φύλο) μπορεί να υποβληθεί σε αγωγή με το υψηλό επίπεδο δόσης επί 90 ημέρες και να παρατηρείται για αναστρεψιμότητα, εμμονή ή καθυστερημένη εμφάνιση των τοξικών επιδράσεων για μεταγενέστερη αγωγή 28 ημερών.

Επίπεδα δόσεων

Απαιτούνται τρία τουλάχιστον επίπεδα δόσεων και ένας μάρτυρας ή έκδοχο μάρτυρας εάν χρησιμοποιηθεί έκδοχο. Η περίοδος έκθεσης θα πρέπει να ανέρχεται σε έξι ώρες τουλάχιστον την ημέρα. Η επίθεση της δοκιμαζόμενης ουσίας πρέπει να γίνεται σε παραπλήσιες χρονικές στιγμές κάθε ημέρα, και η ποσότητα της επιτιθέμενης ουσίας να προσαρμόζεται κατά διαστήματα (κάθε μία ή δύο εβδομάδες) για τη διατήρηση ενός σταθερού επιπέδου δόσης, με βάση το βάρος του σώματος του ζώου. Εκτός από την αγωγή με τη δοκιμαζόμενη ουσία τα ζώα στην ομάδα μάρτυρα πρέπει κατά τα άλλα να έχουν την ίδια μεταχείριση με εκείνα της ομάδας. Σε περίπτωση που χρησιμοποιείται έκδοχο για να διευκολύνει τη χορήγηση των δόσεων, τα ζώα της ομάδας ελέγχου εκδόχου λαμβάνουν δόσεις κατά τον ίδιο τρόπο όπως οι ομάδες που υφίστανται την αγωγή και λαμβάνουν την ίδια ποσότητα $μ^2$ εκείνη που λαμβάνεται από την ομάδα υψηλότερου επιπέδου δόσης. Το υψηλότερο επίπεδο δόσης πρέπει να προκαλέσει τοξικές επιδράσεις όχι όμως και θανάτους ή τουλάχιστον πολύ λίγους. Το χαμηλότερο επίπεδο δόσης δεν πρέπει να προκαλεί οποιοδήποτε ίχνος τοξικότητας. Στην περίπτωση που υπάρχει χρησιμοποιήσιμη εκτίμηση ανθρώπινης έκθεσης, το χαμηλότερο επίπεδο θα πρέπει να την υπερβεί. Στην ιδανική περίπτωση το ενδιάμεσο επίπεδο δόσης πρέπει να προκαλεί ελάχιστες παρατηρήσιμες τοξικές επιδράσεις. Εάν χρησιμοποιηθούν περισσότερες από μία ενδιάμεσες δόσεις, τα επίπεδα δόσεων θα πρέπει να απέχουν μεταξύ τους έτσι ώστε να προκαλούν μια κλιμάκωση τοξικών επιδράσεων.

Στη χαμηλή και στην ενδιάμεση ομάδα, καθώς και στην ομάδα μάρτυρα, η επέλευση οποιωνδήποτε θανάτων πρέπει να είναι χαμηλή έτσι ώστε να επιτρέπει μια ουσιαστική εκτίμηση αποτελεσμάτων.

Εάν η επίθεση της δοκιμαζόμενης ουσίας δημιουργήσει σοβαρό ερεθισμό του δέρματος, οι συγκεντρώσεις πρέπει να ελαττωθούν, και αυτό ίσως να έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση ή την απουσία άλλων τοξικών επιδράσεων στο υψηλό επίπεδο δόσης. Εάν το δέρμα έχει υποστεί σοβαρή βλάβη, πιθανόν να χρειαστεί να τερματιστεί η μελέτη και να επαναληφθεί με χαμηλότερες συγκεντρώσεις.

Οριακή δοκιμασία

Εάν μια προκαταρκτική μελέτη σε επίπεδο δόσης 1 000 mg/kg ή σε υψηλότερα επίπεδο δόσης αναφορικά με ενδεχόμενη ανθρώπινη έκθεση, όπου αυτό είναι γνωστό, δεν προκαλεί τοξικές επιδράσεις, η συνέχιση του πειράματος μπορεί να μη θεωρηθεί αναγκαία.

Περίοδος παρατήρησης

Τα πειραματόζωα πρέπει να παρατηρούνται καθημερινά για ενδείξεις τοξικότητας. Πρέπει να καταγράφεται ο χρόνος θανάτου και ο χρόνος εμφάνισης και εξαφάνισης των σημείων τοξικότητας.

▼B

Διαδικασία

Τα ζώα πρέπει να παραμένουν σε χωριστά κλουβιά και το ιδανικό είναι να υποβάλλονται σε αγωγή με τη δοκιμαζόμενη ουσία επτά ημέρες την εβδομάδα για περίοδο 90 ημερών. Τα ζώα σε οποιαδήποτε δορυφορική ομάδα, που έχει προγραμματισθεί για παραπέρα παρατηρήσεις, πρέπει να διατηρούνται για 28 ημέρες ακόμα χωρίς αγωγή για τη διάγνωση της θεραπείας ή της εμμονής των τοξικών επιδράσεων. Ο χρόνος έκθεσης πρέπει να ανέρχεται σε έξι ώρες την ημέρα.

Η δοκιμαζόμενη ουσία πρέπει να επιτίθεται ομοιόμορφα σε έκταση ίση με το 10 % περίπου της συνολικής επιφάνειας του σώματος. Στην περίπτωση ουσιών υψηλής τοξικότητας, η καλυπτόμενη επιφάνεια μπορεί να είναι μικρότερη, αλλά θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε όσο το δυνατόν περισσότερη επιφάνεια να καλύπτεται με όσο το δυνατόν λεπτό και ομοιόμορφο στρώμα.

Κατά τη διάρκεια της έκθεσης η δοκιμαζόμενη ουσία διατηρείται σε επαφή με το δέρμα με τη χρήση πορώδους επίδεσμου και λευκοπλάστη που δεν προκαλεί ερεθισμό. Η περιοχή της έκθεσης πρέπει να καλύπτεται ακόμη με κατάλληλο τρόπο για τη συγκράτηση του επιδέσμου και της δοκιμαζόμενης ουσίας και για την εξασφάλιση της μη κατάποσης της δοκιμαζόμενης ουσίας από τα ζώα. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν συστήματα συγκράτησης για την πρόληψη της κατάποσης της δοκιμαζόμενης ουσίας, αλλά δεν συνιστάται η πλήρης ακινητοποίηση. Στο τέλος της περιόδου έκθεσης τα κατάλοιπα της δοκιμαζόμενης ουσίας θα πρέπει να απομακρυνθούν, εφόσον είναι δυνατό με τη χρήση νερού ή κάποιας άλλης κατάλληλης μεθόδου καθαρισμού του δέρματος. Όλα τα ζώα θα πρέπει να παρατηρούνται καθημερινά και να καταγράφονται οι ενδείξεις τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένου του χρόνου εμφάνισης, του βαθμού και της διάρκειας τους.

Οι παρατηρήσεις «κλωβού» πρέπει να περιλαμβάνουν τις μεταβολές στο δέρμα και στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους υμένες καθώς επίσης και στο αναπνευστικό, κυκλοφορικό, αυτόνομο και κεντρικό νευρικό σύστημα, στη σωματοκινητική δραστηριότητα και στο πρότυπο συμπεριφοράς. Πρέπει να διενεργούνται μετρήσεις νια την κατανάλωση τροφής, καθώς και ζύγιση των ζώων κάθε εβδομάδα.

Η τακτική παρατήρηση των ζώων είναι αναγκαία για την το κατά μέγιστο δυνατόν εξασφάλιση της μη απωλείας ζώων από τη δοκιμασία, οφειλομένη σε αιτίες όπως είναι ο κανιβαλισμός, η αυτόλυση των ιστών ή η εσφαλμένη τοποθέτηση. Στο τέλος της περιόδου της μελέτης όλα τα επιζώντα ζώα στις μη δορυφορικές ομάδες αγωγής υφίστανται νεκροψία. Όταν παρατηρούνται ετοιμοθάνατα ζώα, πρέπει να απομακρύνονται και να υφίστανται νεκροψία.

Οι παρακάτω εξετάσεις γίνονται συνήθως σε όλα τα ζώα, συμπεριλαμβανομένων των μαρτύρων:

α) οφθαλμολογική εξέταση, με τη χρήση οφθαλμοσκοπίου ή ισοδύναμου κατάλληλου εξοπλισμού, πρέπει να διενεργείται πριν από την έκθεση στη δοκιμαζόμενη ουσία και κατά το τέλος της μελέτης, κατά προτίμηση σε όλα τα ζώα, τουλάχιστον όμως στις ομάδες υψηλής δόσης και στις ομάδες μάρτυρες. Εάν διαπιστωθούν μεταβολές στους οφθαλμούς, πρέπει να εξετασθούν όλα τα ζώα·

β) αιματολογική εξέταση, που περιλαμβάνει εξέταση του αιματοκρίτη, της συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης, του ερυθροκυτταρικού τύπου, του συνολικού και διαφορικού λευκοκυτταρικού τύπου, καθώς επίσης και μέτρηση της πηκτικής ικανότητας, όπως είναι ο χρόνος πήξης, ο χρόνος προθρομβίνης, ο χρόνος θρομβοπλαστίνης ή ο αριθμός των αιματοπεταλίων, πρέπει να διενεργείται στο τέλος της περιόδου δοκιμασίας·

▼B

γ) κλινικός βιοχημικός προσδιορισμός του αίματος πρέπει να διενεργείται στο τέλος της περιόδου δοκιμασίας. Οι περιοχές της δοκιμασίας που θεωρούνται κατάλληλες για όλες τις μελέτες είναι η ηλεκτρολυτική ισορροπία ο μεταβολισμός των υδατανθράκων και η λειτουργία του ήπατος και νεφρού. Η επιλογή ιδιαίτερων πειραμάτων θα επηρεασθεί από τις παρατηρήσεις για τον τρόπο επενέργειας της ουσίας. Προτείνονται προσδιορισμοί του ασβεστίου, του φωσφόρου, των χλωριούχων, του νατρίου, του καλίου, της γλυκόζης νηστείας (με περίοδο νηστείας ανάλογα με το είδος του ζώου), της τρανσαμινάσης του γλουταμιντκού και πυροαταφυλικού οξέος του ορού, της τρανσαμινάπης του γλουταμινικού ([1]) και οξαλοξεικού οξέος του ορού ([2]), της αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης, της γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάσης, του αζώτου ουρίας, του λευκώματος, της κρεατινίνης του αίματος, της συνολικής χολερυθρίνης και της συνολικής πρωτεΐνης του ορού. Άλλοι προσδιορισμοί που μπορεί να είναι αναγκαίοι για μία επαρκή τοξικολογική εκτίμηση περιλαμβάνουν αναλύσεις των λιπιδίων, των ορμονών, της ισορροπίας οξέος/βάσης, της μεθαιμοσφαιρίνης και της δραστικότητας της χολινεστεράσης. Πρόσθετη κλινική βιοχημική εξέταση μπορεί να διενεργηθεί, όπου είναι αναγκαίο, για την επέκταση της έρευνας των παρατηρούμενων αποτελεσμάτων

(δ) η ανάλυση των ούρων δεν απαιτείται επί τακτικής βάσεως αλλά μόνον όταν υπάρξει ένδειξη που θα βασίζεται σε αναμενόμενη ή παρατηρούμενη τοξικότητα.

Εάν τα βασικά ιστορικά στοιχεία είναι ανεπαρκή, πρέπει να εξετασθεί αν χρειάζεται ο προσδιορισμός των αιματολογικών και κλινικών βιοχημικών παραμέτρων πριν την έναρξη της χορήγησης των δόσεων.

Μακροσκοπική νεκροψία

Όλα τα ζώα πρέπει να υποστούν πλήρη μακροσκοπική νεκροψία που περιλαμβάνει εξέταση της εξωτερικής επιφάνειας του σώματος, όλων των στομίων, καθώς επίσης και της κρανιακής, θωρακικής και κοιλιακής κοιλότητας και του περιεχομένου τους. Το ήπαρ, οι νεφροί, τα επινεφρίδια και οι όρχεις πρέπει να ζυγισθούν υγρά το συντομότερο δυνατόν μετά την ανατομή έτσι ώστε να αποφευχθεί η ξήρανση. Τα παρακάτω όργανα και ιστοί θα πρέπει να διατηρηθούν σε κατάλληλο μέσο για ενδεχόμενη μελλοντική ιστοπαθολογική εξέταση: όλες οι μακροσκοπικές βλάβες, ο εγκέφαλος — συμπεριλαμβανομένων τμημάτων μυελού/γέφυρας του εγκεφάλου, παρεγκεφαλικού και εγκεφαλικού φλοιού —, η υπόφυση, ο θυρεοειδής/παραθυρεοειδής, όλοι οι θυμικοί ιστοί (η τραχεία), οι πνεύμονες, η καρδιά, η αορτή, οι σιελογόνοι αδένες, το ήπαρ, η σπλήνα, οι νεφροί, τα επινεφρίδια, το πάγκρεας, οι γεννητικοί αδένες, η μήτρα, τα βοηθητικά γεννητικά όργανα, η χοληδόχος κύστη (εάν υπάρχει), ο οισοφάγος, το στομάχι, το δωδεκαδάκτυλο, η νήστις, ο ειλεός, το τυφλό έντερο, το κόλον, το ορθό έντερο, η ουροδόχος κύστη, ο αντιπροσωπευτικός λεμφαδένας (ο μαστικός αδένας θήλεος), (το μυϊκό σύστημα μηρών), το περιφερικό νεύρο (οι οφθαλμοί), (το στέρνο με μυελό των οστών), (το μηριαίον οστούν, συμπεριλαμβανομένης της αρθρικής επιφάνειας), (ο νωτιαίος μυελός σε τρία επίπεδα —αυχενικός, μεσοθωρακικός και οσφυϊκός), και (οι εξώφθαλμοι δακρυϊκοί αδένες). Οι ιστοί που αναφέρονται μεταξύ παρενθέσεων χρειάζονται εξέταση μόνον εάν υπάρχουν ενδείξεις τοξικότητας ή επιπλοκής οργάνων που αποτελούν αντικείμενο μελέτης.

Ιστοπαθολογική εξέταση

α) Πλήρης ιστοπαθολογική εξέταση πρέπει να διεξαχθεί στο μη θιγέν δέρμα και στο δέρμα που υπέστη αγωγή, καθώς επίσης και στα όργανα και στους ιστούς όλων των ζώων που ανήκουν στις ομάδες μάρτυρα και υψηλής δόσης.

β) Όλες οι μακροσκοπικές βλάβες πρέπει να εξετασθούν.

([1]) Γνωστή τώρα σαν αμινοτρανσφεράση της αλανίνης του ορού.
([2]) Γνωστή τώρα σαν αμινοτρανοφεράση του ασπαρτικού οξέος του ορού.

▼B

γ) Τα όργανα που αποτελούν αντικείμενο της μελέτης σε άλλες ομάδες δόσης πρέπει να εξετασθούν.

δ) Στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται αρουραίοι, οι πνεύμονες των ζώων στις ομάδες χαμηλής και ενδιάμεσης δόσης πρέπει να υποστούν ιστοπαθολογική εξέταση για τη διαπίστωση λοίμωξης, γιατί έτσι επιτυγχάνεται μια εύκολη εκτίμηση της κατάστασης της υγείας των ζώων. Μπορεί να μην απαιτείται τακτικά πρόσθετη ιστοπαθολογική εξέταση των ζώων των ομάδων αυτών, αλλά θα πρέπει πάντοτε να διενεργείται σε όργανα τα οποία παρουσίασαν ίχνη βλάβης στην ομάδα υψηλής δόσης.

ε) Όταν χρησιμοποιείται δορυφορική ομάδα, η ιστοπαθολογική εξέταση πρέπει να διενεργείται σε ιστούς και όργανα τα οποία έχει εξακριβωθεί ότι παρουσιάζουν επιδράσεις στις άλλες ομάδες που υφίστανται την αγωγή.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται με τη μορφή πίνακα, που θα παρουσιάζει για κάθε ομάδα δοκιμασίας τον αριθμό των ζώων κατά την αρχή της δοκιμασίας, τον αριθμό των ζώων που παρουσίασαν βλάβες τον τύπο των βλαβών και το ποσοστό των ζώων ανά τύπο βλάβης. Όλα τα παρατηρούμενα αποτελέσματα πρέπει να εκτιμώνται με κατάλληλη στατιστική μέθοδο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε αναγνωρισμένη στατιστική μέθοδος.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Η έκθεση της δοκιμασίας δα πρέπει να περιλαμβάνει τις παρακάτω πληροφορίες:

— είδος ζώου, ποικιλία ζώου, πηγή, συνθήκες περιβάλλοντος, δίαιτα κλπ.,

— συνθήκες δοκιμασίας,

— επίπεδα δόσεων (συμπεριλαμβανομένου του εκδόχου, αν χρησιμοποιήθηκε) και συγκεντρώσεις,

— στοιχεία τοξικής αντίδρασης ανά φύλο και δόση,

— επίπεδο στο οποίο η ουσία δεν παρουσίασε επιδράσεις, εφόσον είναι δυνατόν,

— χρόνο θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης ή, εάν τα ζώα επέζησαν, χρόνο λήξης της μελέτης,

— περιγραφή τοξικών ή άλλων επιδράσεων,

— χρόνο παρατήρησης κάθε ανωμαλίας και μετέπειτα πορεία της,

— στοιχεία για την τροφή και το βάρος του σώματος,

— οφθαλμολογικά ευρήματα,

— αιματολογικές εξετάσεις που διενεργήθηκαν και όλα τα αποτελέσματά τους,

— κλινικές βιοχημικές εξετάσεις που διενεργήθηκαν και αποτελέσματα (συμπεριλαμβανομένων των αποτελεσμάτων τυχόν ανάλυσης ούρων),

— ευρήματα νεκροψίας,

▼B

— λεπτομερή περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών ευρημάτων,

— στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, όπου είναι δυνατόν,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

▼M4

B.29. ΥΠΟΧΡΟΝΙΑ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ: ΜΕΛΕΤΗ 90 ΗΜΕΡΩΝ

ΣΥΝΟΨΗ

Η παρούσα αναθεωρημένη έκθεση δοκιμής B.29 έχει σχεδιαστεί για τον πλήρη χαρακτηρισμό της τοξικότητας μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας, η οποία χορηγείται μέσω της αναπνευστικής οδού για μια υποχρόνια περίοδο (90 ημέρες), και για την παροχή αξιόπιστων δεδομένων με στόχο την ποσοτική εκτίμηση των αναπνευστικών κινδύνων. Ομάδες 10 αρσενικών και 10 θηλυκών τρωκτικών εκτίθενται για 6 ώρες την ημέρα για 90 ημέρες (13 εβδομάδες) α) στην ελεγχόμενη χημική ουσία σε τρία ή περισσότερα επίπεδα συγκέντρωσης, β) σε φιλτραρισμένο αέρα (αρνητικός μάρτυρας) και/ή γ) στον φορέα (μάρτυρας για τον φορέα). Τα ζώα εκτίθενται γενικά 5 ημέρες την εβδομάδα αλλά επιτρέπεται επίσης έκθεση 7 ημέρες την εβδομάδα. Ελέγχονται πάντα θηλυκά και αρσενικά ζώα, αλλά ενδέχεται να εκτίθενται σε διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης εάν είναι γνωστό ότι ένα φύλο είναι πιο ευαίσθητο σε μια δεδομένη ελεγχόμενη χημική ουσία. Με τη μέθοδο αυτή ο διευθυντής της μελέτης έχει την ευελιξία να συμπεριλάβει στη μελέτη δορυφορικές ομάδες (αναστρεψιμότητας), ενδιάμεσες θανατώσεις, βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL), νευρολογικές δοκιμές και πρόσθετες εκτιμήσεις κλινικής παθολογίας και ιστοπαθολογίας ώστε να χαρακτηριστεί καλύτερα η τοξικότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 413 του ΟΟΣΑ (2009). Η αρχική κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 413 (TG 413) για την υποχρόνια αναπνευστική τοξικότητα εκδόθηκε το 1981 (1). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών B.29 [όντας ισοδύναμη της αναθεωρημένης TG 413 (2009)] έχει επικαιροποιηθεί ώστε να αντανακλά την πρόοδο της επιστήμης και να ανταποκρίνεται στις τρέχουσες και τις μελλοντικές κανονιστικές ανάγκες.

2. Οι μελέτες υποχρόνιας αναπνευστικής τοξικότητας χρησιμοποιούνται κυρίως για την εξαγωγή κανονιστικών επιπέδων συγκέντρωσης για την εκτίμηση των κινδύνων για τους εργαζόμενους σε χώρους εργασίας. Χρησιμοποιούνται επίσης για την εκτίμηση των κινδύνων για τις κατοικίες, τις μεταφορές και το περιβάλλον. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τον χαρακτηρισμό των δυσμενών επιδράσεων που προκαλούνται από επανειλημμένη καθημερινή αναπνευστική έκθεση σε μια ελεγχόμενη χημική ουσία για 90 ημέρες (περίοδος ίση με το 10 % περίπου της διάρκειας ζωής ενός επίμυ). Τα δεδομένα που προέρχονται από μελέτες υποχρόνιας αναπνευστικής τοξικότητας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ποσοτική εκτίμηση των κινδύνων και την επιλογή συγκεντρώσεων για χρόνιες μελέτες. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν έχει σχεδιαστεί ειδικά για τον έλεγχο νανοϋλικών. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών παρέχονται στο τέλος του παρόντος κεφαλαίου και στο έγγραφο καθοδήγησης GD 39 (2).

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

3. Θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη από το πειραματικό εργαστήριο όλες οι διαθέσιμες πληροφορίες για την ελεγχόμενη χημική ουσία πριν από τη διεξαγωγή της μελέτης ώστε να βελτιώνεται η ποιότητα της μελέτης και να ελαχιστοποιείται η χρήση των ζώων. Πληροφορίες που θα βοηθήσουν στην επιλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων ελέγχου είναι, μεταξύ άλλων, η ταυτότητα, η χημική δομή και οι φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας· τα αποτελέσματα δοκιμών τοξικότητας in vitro ή in vivo· οι προβλεπόμενες χρήσεις και η δυνητική έκθεση του ανθρώπου· τα διαθέσιμα δεδομένα (Q)SAR και τα τοξικολογικά δεδομένα για δομικά συγγενείς ουσίες· και τα δεδομένα που προέρχονται από άλλες μελέτες επανειλημμένης έκθεσης. Εάν αναμένεται να προκληθεί ή παρατηρείται κατά τη διάρκεια της μελέτης νευροτοξικότητα, ο διευθυντής της μελέτης μπορεί να επιλέξει να συμπεριλάβει κατάλληλες αξιολογήσεις, όπως σειρά δοκιμασιών παρατήρησης λειτουργικών διαταραχών (functional observational battery — FOB) και μέτρηση της κινητικής δραστηριότητας. Αν και το χρονοδιάγραμμα των εκθέσεων που σχετίζονται με ειδικές εξετάσεις ενδέχεται να είναι πολύ σημαντικό, η εκτέλεση αυτών των πρόσθετων δραστηριοτήτων δεν θα πρέπει να παρεμβάλλεται στον σχεδιασμό της κυρίως μελέτης.

▼M4

4. Διαλύματα διαβρωτικών ή ερεθιστικών ελεγχόμενων χημικών ουσιών μπορούν να ελέγχονται σε συγκεντρώσεις που θα αποδώσουν τον επιθυμητό βαθμό τοξικότητας. Περισσότερες πληροφορίες παρέχονται στο έγγραφο GD 39 (2). Κατά την έκθεση ζώων σε αυτά τα υλικά, οι επιδιωκόμενες συγκεντρώσεις θα πρέπει να τόσο χαμηλές ώστε να μην προκαλούν έντονο πόνο και δυσφορία, αλλά να επιτρέπουν την επέκταση της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης σε επίπεδα που επιτυγχάνουν τους κανονιστικούς και επιστημονικούς στόχους της δοκιμής. Οι συγκεντρώσεις αυτές θα πρέπει να επιλέγονται κατά περίπτωση, κατά προτίμηση βάσει μιας καταλλήλως σχεδιασμένης μελέτης καθορισμού εύρους που επιτρέπει τη λήψη πληροφοριών σχετικά με το κρίσιμο καταληκτικό σημείο, τυχόν όριο ερεθισμού και τον χρόνο εμφάνισης των εκδηλώσεων (βλέπε παραγράφους 11-13). Θα πρέπει να αιτιολογείται η επιλογή των συγκεντρώσεων.

5. Τα ετοιμοθάνατα ζώα, καθώς και εκείνα που παρουσιάζουν έντονο πόνο ή έντονη και διαρκή δυσφορία, πρέπει να θανατώνονται με ανώδυνο τρόπο. Τα ετοιμοθάνατα ζώα αντιμετωπίζονται όπως τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη δοκιμή. Τα κριτήρια για τη λήψη της απόφασης να θανατωθούν ετοιμοθάνατα ή βαρέως πάσχοντα ζώα, καθώς και οι κατευθύνσεις για την αναγνώριση των ενδείξεων προβλέψιμου ή επικείμενου θανάτου, αποτελούν το αντικείμενο εγγράφου καθοδήγησης του ΟΟΣΑ για τα λιγότερο βάναυσα καταληκτικά σημεία (3).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Επιλογή των ειδών ζώων

6. Πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή νεαρά ενήλικα τρωκτικά των συνήθων εργαστηριακών φυλών. Το προτιμώμενο είδος είναι ο επίμυς. Εάν χρησιμοποιούνται άλλα είδη πρέπει να παρέχεται σχετική αιτιολόγηση.

Προετοιμασία των ζώων

7. Τα θηλυκά πρέπει να είναι άτοκα και να μη βρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης. Κατά την ημέρα τυχαιοποίησης, τα ζώα πρέπει να είναι νεαρά ενήλικα ζώα ηλικίας 7 έως 9 εβδομάδων. Το βάρος του σώματός τους πρέπει να είναι ± 20 % του μέσου βάρους κάθε φύλου. Τα ζώα επιλέγονται τυχαία, σημαδεύονται για να μπορούν να αναγνωριστούν και στεγάζονται σε κλωβούς επί 5 τουλάχιστον ημέρες πριν από την έναρξη της δοκιμής προκειμένου να εγκλιματιστούν στις συνθήκες του εργαστηρίου.

Ζωοτεχνία

8. Κάθε ζώο πρέπει να ταυτοποιείται, κατά προτίμηση με υποδόριο αναμεταδότη, ώστε να διευκολύνεται η παρατήρηση και να αποφεύγεται η σύγχυση. Η θερμοκρασία στην αίθουσα πειραματόζωων θα πρέπει να είναι 22 ± 3 °C. Η σχετική υγρασία θα πρέπει να διατηρείται, σε ιδανικές συνθήκες, εντός ενός εύρους 30 έως 70 %, αν και αυτό ενδέχεται να μην είναι δυνατό όταν χρησιμοποιείται το νερό ως φορέας. Πριν και μετά την έκθεση, τα ζώα πρέπει γενικά να στεγάζονται σε κλωβούς σε ομάδες ανά φύλο και συγκέντρωση, αλλά ο αριθμός των ζώων ανά κλωβό δεν πρέπει να εμποδίζει την παρατήρηση κάθε ζώου, ενώ θα πρέπει να ελαχιστοποιεί τυχόν απώλειες λόγω κανιβαλισμού ή μαχών. Όταν τα ζώα πρόκειται να εκτεθούν μόνο ρινικά, ενδέχεται να είναι απαραίτητο να εγκλιματίζονται στους σωλήνες συγκράτησης. Οι σωλήνες συγκράτησης δεν θα πρέπει να προκαλούν περιττή φυσική, θερμική δυσφορία ή δυσφορία λόγω ακινητοποίησης στα ζώα. Η συγκράτηση ενδέχεται να επηρεάζει τα φυσικά καταληκτικά σημεία, όπως τη θερμοκρασία του σώματος (υπερθερμία) και/ή τον όγκο του αναπνεόμενου αέρα ανά λεπτό. Εάν υπάρχουν διαθέσιμα γενικά δεδομένα που δείχνουν ότι δεν προκαλούνται τέτοιες αλλαγές σε σημαντικό βαθμό, τότε δεν είναι απαραίτητη η προκαταρκτική προσαρμογή στους σωλήνες συγκράτησης. Τα ζώα που εκτίθενται ολόσωμα σε αερόλυμα θα πρέπει να στεγάζονται απομονωμένα κατά τη διάρκεια της έκθεσης, ώστε να αποφεύγεται η διήθηση του ελεγχόμενου αερολύματος μέσω του τριχώματος των ζώων που στεγάζονται στον ίδιο κλωβό. Μπορούν να χρησιμοποιούνται συμβατικά και πιστοποιημένα εργαστηριακά σιτηρέσια, εκτός από την περίοδο έκθεσης, συνοδευόμενα από απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού από το δίκτυο ύδρευσης. Ο φωτισμός θα πρέπει να είναι τεχνητός, με φωτοπερίοδο 12 ωρών.

▼M4

Θάλαμοι εισπνοής

9. Κατά την επιλογή θαλάμου εισπνοής θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη η φύση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και ο στόχος της δοκιμής. Προτιμώμενος τρόπος έκθεσης είναι η ρινική έκθεση (ο εν λόγω όρος περιλαμβάνει κεφαλική, ρινική ή ρυγχική έκθεση). Η ρινική έκθεση προτιμάται γενικά για μελέτες με υγρά ή στερεά αερολύματα και για ατμούς που ενδέχεται να συμπυκνώνονται σε αερολύματα. Ειδικοί στόχοι της μελέτης ενδέχεται να επιτυγχάνονται καλύτερα με την εφαρμογή μεθόδου ολόσωμης έκθεσης, αλλά αυτό θα πρέπει να αιτιολογείται στην έκθεση της μελέτης. Για να εξασφαλίζεται η σταθερότητα της ατμόσφαιρας κατά τη χρήση θαλάμου ολόσωμης έκθεσης, ο συνολικός όγκος των ελεγχόμενων ζώων δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 5 % του όγκου του θαλάμου. Οι αρχές των τεχνικών ρινικής και ολόσωμης έκθεσης, καθώς και τα ιδιαίτερα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά τους, αναφέρονται στο έγγραφο GD 39 (2).

ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

Οριακές συγκεντρώσεις

10. Σε αντίθεση με τις μελέτες οξείας τοξικότητας, δεν υπάρχουν καθορισμένες οριακές συγκεντρώσεις στις μελέτες υποχρόνιας αναπνευστικής τοξικότητας. Η μέγιστη ελεγχόμενη συγκέντρωση θα πρέπει να εξαρτάται από: 1) τη μέγιστη εφικτή συγκέντρωση, 2) το επίπεδο έκθεσης του ανθρώπου βάσει του «χείριστου σεναρίου», 3) την ανάγκη διατήρησης επαρκούς παροχής οξυγόνου και/ή 4) ζητήματα καλής μεταχείρισης των ζώων. Εάν δεν υπάρχουν όρια βάσει στοιχείων, μπορούν να χρησιμοποιούνται τα όρια οξείας τοξικότητας του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 (13) (ήτοι, μέγιστη συγκέντρωση 5 mg/l για αερολύματα, 20 mg/l για ατμούς και 20 000 ppm για αέρια)· βλέπε έγγραφο GD 39 (2). Τυχόν υπέρβαση των ορίων αυτών κατά τον έλεγχο αερίων ή ιδιαιτέρως πτητικών ελεγχόμενων χημικών ουσιών (π.χ. ψυκτικών μέσων) θα πρέπει να αιτιολογείται. Η οριακή συγκέντρωση θα πρέπει να προκαλεί σαφή τοξικότητα χωρίς να προκαλείται περιττό άγχος στα ζώα και χωρίς να επηρεάζεται η μακροζωία τους (3).

Μελέτη καθορισμού εύρους

11. Πριν από την έναρξη της κυρίως μελέτης, είναι γενικά απαραίτητη η διεξαγωγή μελέτης καθορισμού εύρους. Η μελέτη καθορισμού εύρους είναι πιο ολοκληρωμένη από την αναγνωριστική μελέτη διότι δεν περιορίζεται στην επιλογή συγκεντρώσεων. Οι γνώσεις που αποκτώνται από τη μελέτη καθορισμού εύρους μπορούν να οδηγήσουν στην επιτυχία της κυρίως μελέτης. Μια μελέτη καθορισμού εύρους μπορεί, παραδείγματος χάριν, να παρέχει τεχνικές πληροφορίες σχετικά με αναλυτικές μεθόδους, την κατανομή μεγέθους σωματιδίων, την ανακάλυψη τοξικών μηχανισμών, δεδομένα κλινικής παθολογίας και ιστοπαθολογίας, και εκτιμήσεις των συγκεντρώσεων NOAEL και MTC σε μια κυρίως μελέτη. Ο διευθυντής της μελέτης μπορεί να επιλέξει να χρησιμοποιήσει τη μελέτη καθορισμού εύρους για να εντοπίσει το όριο ερεθισμού της αναπνευστικής οδού (π.χ. μέσω της ιστοπαθολογίας της αναπνευστικής οδού, δοκιμής της λειτουργίας των πνευμόνων ή βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος), την ανώτερη συγκέντρωση που είναι ανεκτή χωρίς να προκαλείται περιττό άγχος στα ζώα και τις παραμέτρους που χαρακτηρίζουν με τον καλύτερο τρόπο την τοξικότητα μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

12. Η μελέτη καθορισμού εύρους μπορεί να περιλαμβάνει ένα ή περισσότερα επίπεδα συγκέντρωσης. Ανάλογα με τα επιλεγμένα καταληκτικά σημεία, θα πρέπει να εκτίθενται σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης τρία έως έξι αρσενικά και τρία έως έξι θηλυκά ζώα. Η μελέτη καθορισμού εύρους θα πρέπει να διαρκεί τουλάχιστον 5 μέρες και γενικά να μην υπερβαίνει τις 28 ημέρες. Στην έκθεση της μελέτης θα πρέπει να αιτιολογείται η επιλογή συγκεντρώσεων για την κυρίως μελέτη. Στόχος της κυρίως μελέτης είναι να καταδειχθεί η σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης βάσει των προσδοκιών σχετικά με το πλέον ευαίσθητο καταληκτικό σημείο. Η χαμηλή συγκέντρωση θα πρέπει, σε ιδανικές συνθήκες, να είναι η μέγιστη συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις, ενώ η υψηλή συγκέντρωση θα πρέπει να προκαλεί σαφή τοξικότητα χωρίς να προκαλεί περιττό άγχος στα ζώα ή να επηρεάζει τη μακροζωία τους (3).

▼M4

13. Κατά την επιλογή επιπέδων συγκέντρωσης για τη μελέτη καθορισμού εύρους, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όλες οι διαθέσιμες πληροφορίες, συμπεριλαμβανομένων των σχέσεων δομής-δράσης και στοιχείων για παρόμοιες χημικές ουσίες (βλέπε παράγραφο 3). Η μελέτη καθορισμού εύρους μπορεί να επαληθεύει/διαψεύδει τα θεωρούμενα ως πλέον ευαίσθητα, από μηχανιστική πλευρά, καταληκτικά σημεία, π.χ. αναστολή χολινεστεράσης από οργανοφωσφορικές ενώσεις, σχηματισμό μεθαιμοσφαιρίνης από ερυθροκυτταροτοξικούς παράγοντες, θυρεοειδικές ορμόνες (T_3, T_4) για θυρεοτοξικές ουσίες, πρωτεΐνη, LDH ή ουδετερόφυλα σε βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ή αβλαβή δυσδιάλυτα σωματίδια ή αερολύματα ερεθιστικά για τους πνεύμονες.

Κυρίως μελέτη

14. Η κυρίως μελέτη υποχρόνιας τοξικότητας γενικά περιλαμβάνει τρία επίπεδα συγκέντρωσης και επίσης παράλληλους αρνητικούς μάρτυρες (αέρας) και/ή μάρτυρες για τον φορέα κατά περίπτωση (βλέπε παράγραφο 18). Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται όλα τα διαθέσιμα δεδομένα για την επιλογή κατάλληλων επιπέδων έκθεσης, συμπεριλαμβανομένων των αποτελεσμάτων μελετών συστημικής τοξικότητας, του μεταβολισμού και της κινητικής (ιδιαίτερη έμφαση πρέπει να δίνεται στην αποφυγή υψηλών επιπέδων συγκέντρωσης που προκαλούν κορεσμό των κινητικών διεργασιών). Κάθε ομάδα αγωγής περιλαμβάνει 10 αρσενικά και 10 θηλυκά τρωκτικά τα οποία εκτίθενται στην ελεγχόμενη χημική ουσία για 6 ώρες καθημερινά, βάσει μιας εβδομάδας 5 ημερών, για μια περίοδο 13 εβδομάδων (η συνολική διάρκεια της μελέτης είναι τουλάχιστον 90 ημέρες). Τα ζώα ενδέχεται επίσης να εκτίθενται 7 ημέρες την εβδομάδα (π.χ. κατά τον έλεγχο εισπνεόμενων φαρμακευτικών ουσιών). Εάν είναι γνωστό ότι ένα φύλο είναι περισσότερο ευαίσθητο σε μια δεδομένη ελεγχόμενη χημική ουσία, τα δύο φύλα ενδέχεται να εκτίθενται σε διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης ώστε να βελτιστοποιείται η σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 15. Σε περίπτωση ρινικής έκθεσης άλλων ειδών τρωκτικών εκτός των επιμύων, οι μέγιστες περίοδοι έκθεσης μπορούν να προσαρμόζονται ώστε να ελαχιστοποιείται η δυσφορία που νιώθει το κάθε είδος. Εάν η διάρκεια έκθεσης είναι μικρότερη των 6 ωρών/ημέρα ή όταν είναι απαραίτητο να διεξαχθεί μελέτη μακράς ολόσωμης έκθεσης (π.χ. 22 ώρες/ημέρα), θα πρέπει να παρέχεται σχετική αιτιολόγηση (βλέπε έγγραφο GD 39) (2). Κατά την περίοδο έκθεσης τα ζώα θα πρέπει να στερούνται τροφής, εκτός εάν η έκθεση υπερβαίνει τις 6 ώρες. Νερό μπορεί να παρέχεται καθ' όλη τη διάρκεια της ολόσωμης έκθεσης.

15. Οι επιλεγμένες επιδιωκόμενες συγκεντρώσεις θα πρέπει να προσδιορίζουν το (τα) όργανο(-α)-στόχο και να καταδεικνύουν σαφή σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης:

— Το υψηλό επίπεδο συγκέντρωσης θα πρέπει να προκαλεί τοξικές επιδράσεις αλλά όχι παρατεταμένες εκδηλώσεις ή θνησιμότητα που δεν θα επέτρεπαν την ουσιαστική αξιολόγηση.

— Το/-α ενδιάμεσο/-α επίπεδο/-α συγκέντρωσης θα πρέπει να απέχει/-ουν χρονικά έτσι ώστε να επιτρέπεται η διαβάθμιση μεταξύ των τοξικών επιδράσεων που προκαλούνται από τη χαμηλή και την υψηλή συγκέντρωση.

— Το χαμηλό επίπεδο συγκέντρωσης θα πρέπει να προκαλεί ελάχιστες ή καθόλου ενδείξεις τοξικότητας.

Ενδιάμεσες θανατώσεις

16. Εάν έχουν προγραμματιστεί ενδιάμεσες θανατώσεις ζώων, τότε ο αριθμός των ζώων σε κάθε επίπεδο έκθεσης πρέπει να αυξηθεί κατά τον αριθμό των ζώων που έχουν προγραμματιστεί να θανατωθούν πριν την ολοκλήρωση της μελέτης. Η χρήση ενδιάμεσων θανατώσεων θα πρέπει να αιτιολογείται και οι στατιστικές αναλύσεις θα πρέπει να τις αντιπροσωπεύουν σωστά.

▼M4

Δορυφορική μελέτη (αναστρεψιμότητας)

17. Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί δορυφορική μελέτη (αναστρεψιμότητας) ώστε να παρατηρηθεί τυχόν αναστρεψιμότητα, παραμονή ή καθυστερημένη εμφάνιση τοξικότητας για μια αρκετά μεγάλη περίοδο μετά την αγωγή, η οποία έχει διάρκεια τουλάχιστον 14 ημέρες. Οι δορυφορικές ομάδες (αναστρεψιμότητας) αποτελούνται από 10 αρσενικά και 10 θηλυκά ζώα που εκτίθενται παράλληλα με τα πειραματόζωα της κυρίως μελέτης. Οι ομάδες της δορυφορικής μελέτης (αναστρεψιμότητας) θα πρέπει να εκτίθενται στην ελεγχόμενη χημική ουσία στο υψηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης και θα πρέπει να υπάρχουν παράλληλα μάρτυρες για τον αέρα και/ή τον φορέα κατά περίπτωση (βλέπε παράγραφος 18).

Ζώα-μάρτυρες

18. Τα ζώα που χρησιμοποιούνται ως παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες (αέρας) θα πρέπει να υφίστανται την ίδια μεταχείριση με τα ζώα των ομάδων-αγωγής, με τη μόνη διαφορά ότι τα πρώτα εκτίθενται σε φιλτραρισμένο αέρα και όχι στην ελεγχόμενη χημική ουσία. Όταν χρησιμοποιείται νερό ή άλλη ουσία για τη δημιουργία της πειραματικής ατμόσφαιρας, θα πρέπει να περιλαμβάνεται στη μελέτη ομάδα με μάρτυρες για τον φορέα και όχι ομάδα με αρνητικούς μάρτυρες (αέρας). Το νερό θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως φορέας, όποτε αυτό είναι δυνατό. Όταν χρησιμοποιείται νερό ως φορέας, τα ζώα-μάρτυρες θα πρέπει να εκτίθενται σε αέρα με την ίδια σχετική υγρασία στην οποία εκτίθενται και οι ομάδες έκθεσης. Η επιλογή κατάλληλου φορέα θα πρέπει να βασίζεται σε μια καταλλήλως διεξαχθείσα προκαταρκτική μελέτη ή σε ιστορικά δεδομένα. Εάν δεν είναι ιδιαιτέρως γνωστή η τοξικότητα ενός φορέα, ο διευθυντής της μελέτης μπορεί να επιλέξει να χρησιμοποιήσει και αρνητικούς μάρτυρες (αέρας) και μάρτυρες για τον φορέα, αλλά αυτό δεν συνιστάται. Εάν, βάσει ιστορικών δεδομένων, ένας φορέας δεν είναι τοξικός, τότε δεν απαιτείται να χρησιμοποιηθεί ομάδα αρνητικών μαρτύρων (αέρας) αλλά μόνο ομάδα μαρτύρων για τον φορέα. Εάν η προκαταρκτική μελέτη μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας που έχει μορφοποιηθεί σε φορέα δεν αποκαλύψει τοξικότητα, θεωρείται ότι ο φορέας δεν είναι τοξικός στην ελεγχόμενη συγκέντρωση, οπότε θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί μάρτυρας για τον φορέα αυτόν.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΚΘΕΣΗΣ

Χορήγηση των συγκεντρώσεων

19. Τα ζώα εκτίθενται στην ελεγχόμενη ουσία σε μορφή αερίου, ατμού, αερολύματος ή μείγματος αυτών. Η φυσική κατάσταση που ελέγχεται εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τις επιλεχθείσες συγκεντρώσεις και/ή τη φυσική μορφή που είναι πιθανότερο να υπάρχει κατά τον χειρισμό και τη χρήση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Υγροσκοπικές και χημικά δραστικές ελεγχόμενες χημικές ουσίες θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή υπό συνθήκες ξηρού αέρα. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μην παράγονται εκρηκτικές συγκεντρώσεις. Σωματιδιακά υλικά μπορούν να υποβάλλονται σε μηχανικές διαδικασίες ώστε να μειώνεται το μέγεθος των σωματιδίων. Περαιτέρω καθοδήγηση παρέχει το έγγραφο GD 39 (2).

Κατανομή μεγέθους σωματιδίων

20. Πρέπει να προσδιορίζεται η κατανομή μεγέθους σωματιδίων για όλα τα αερολύματα και για τους ατμούς που ενδέχεται να συμπυκνωθούν σε αερολύματα. Για να είναι δυνατή η έκθεση όλων των σχετικών περιοχών της αναπνευστικής οδού, συνιστώνται αερολύματα με διάμεσο αεροδυναμικής διαμέτρου κατά μάζα (MMAD) που κυμαίνεται από 1 έως 3 μm με γεωμετρική τυπική απόκλιση (σ_g) από 1,5 έως 3,0 (4). Παρόλο που θα πρέπει να καταβάλλονται εύλογες προσπάθειες για τη συμμόρφωση με το πρότυπο αυτό, εάν αυτό δεν είναι δυνατό θα πρέπει να πραγματοποιείται εμπειρογνωμοσύνη. Παραδείγματος χάριν, σωματίδια μεταλλικών καπνών μπορεί να υπολείπονται του προτύπου αυτού, ενώ φορτισμένα σωματίδια και ίνες ενδέχεται να το υπερβαίνουν.

▼M4

Παρασκεύασμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε φορέα

21. Σε ιδανικές συνθήκες, η ελεγχόμενη χημική ουσία θα πρέπει να ελέγχεται χωρίς φορέα. Εάν είναι απαραίτητη η χρήση φορέα για την παραγωγή κατάλληλης συγκέντρωσης και κατάλληλου μεγέθους σωματιδίων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, θα πρέπει να προτιμάται το νερό. Κάθε φορά που μια ελεγχόμενη χημική ουσία διαλύεται σε νερό, πρέπει να καταδεικνύεται η σταθερότητά της.

ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΕΚΘΕΣΗΣ

Ροή αέρα στον θάλαμο

22. Η ροή του αέρα μέσω του θαλάμου έκθεσης πρέπει να ελέγχεται προσεκτικά, να παρακολουθείται συνεχώς και να καταγράφεται τουλάχιστον σε ωριαία βάση κατά τη διάρκεια κάθε έκθεσης. Η παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο της ελεγχόμενης συγκέντρωσης στην ατμόσφαιρα (ή χρονική σταθερότητα) είναι ολοκληρωτική μέτρηση όλων των δυναμικών παραμέτρων και αποτελεί έμμεσο τρόπο ελέγχου όλων των σχετικών δυναμικών αναπνευστικών παραμέτρων. Εάν η συγκέντρωση παρακολουθείται σε πραγματικό χρόνο, η συχνότητα μέτρησης των ροών αέρα μπορεί να μειωθεί σε μία μόνο μέτρηση ανά έκθεση ανά ημέρα. Θα πρέπει να αποφεύγεται η εκ νέου αναπνοή σε θαλάμους ρινικής έκθεσης. Η συγκέντρωση οξυγόνου πρέπει να είναι τουλάχιστον 19 % και η συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1 %. Εάν υπάρχει λόγος να θεωρείται ότι δεν μπορεί να υπάρξει συμμόρφωση με το πρότυπο αυτό, οι συγκεντρώσεις οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα πρέπει να μετρώνται. Εάν οι μετρήσεις κατά την πρώτη ημέρα έκθεσης δείχνουν ότι τα αέρια αυτά βρίσκονται σε κατάλληλα επίπεδα, δεν είναι απαραίτητο να εκτελούνται περαιτέρω μετρήσεις.

Θερμοκρασία και σχετική υγρασία του θαλάμου

23. Η θερμοκρασία του θαλάμου πρέπει να διατηρείται στους 22 ± 3 °C. Η σχετική υγρασία στη ζώνη αναπνοής των ζώων, τόσο για ρινική όσο και για ολόσωμη έκθεση, θα πρέπει να παρακολουθείται συνεχώς και να καταγράφεται ανά ώρα κατά τη διάρκεια κάθε έκθεσης, εφόσον είναι δυνατό. Η σχετική υγρασία θα πρέπει κατά προτίμηση να διατηρείται σε επίπεδα από 30 έως 70 %, αλλά αυτό μπορεί να είναι είτε ανέφικτο (π.χ. κατά τη δοκιμή μειγμάτων που έχουν ως βάση το νερό) ή μη μετρήσιμο λόγω της αλληλεπίδρασης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας με τη μέθοδο δοκιμών.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: ονομαστική συγκέντρωση

24. Εάν είναι εφικτό, θα πρέπει να υπολογίζεται και να καταγράφεται η ονομαστική συγκέντρωση στον θάλαμο έκθεσης. Η ονομαστική συγκέντρωση ορίζεται ως η μάζα της παραγόμενης ελεγχόμενης χημικής ουσίας διά του συνολικού όγκου αέρα που διαβιβάζεται μέσω του συστήματος του θαλάμου εισπνοής. Η ονομαστική συγκέντρωση δεν χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό της έκθεσης των ζώων, αλλά μια σύγκριση της ονομαστικής συγκέντρωσης και της πραγματικής συγκέντρωσης αποτελεί ένδειξη της αποτελεσματικότητας παραγωγής του συστήματος δοκιμών και, συνεπώς, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανακάλυψη προβλημάτων παραγωγής.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: πραγματική συγκέντρωση

25. Η πραγματική συγκέντρωση ορίζεται ως η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που λαμβάνεται από τη ζώνη αναπνοής των ζώων σε θάλαμο εισπνοής. Οι πραγματικές συγκεντρώσεις μπορούν να λαμβάνονται είτε με ειδικές μεθόδους (π.χ. άμεση δειγματοληψία, μέθοδοι προσρόφησης ή χημικής αντίδρασης και επακόλουθος αναλυτικός χαρακτηρισμός) είτε με μη ειδικές μεθόδους, όπως η σταθμική ανάλυση φίλτρου. Η χρήση σταθμικής ανάλυσης είναι αποδεκτή μόνο για αερολύματα σκόνης με ένα μέρος ή για αερολύματα υγρών χαμηλής πτητικότητας και θα πρέπει να υποστηρίζεται από κατάλληλους χαρακτηρισμούς της ελεγχόμενης ουσίας πριν από τη μελέτη. Η συγκέντρωση αερολυμάτων σκόνης με πολλά μέρη μπορεί επίσης να προσδιορίζεται με σταθμική ανάλυσης. Ωστόσο, απαιτούνται γι'

▼M4

αυτό αναλυτικά δεδομένα που αποδεικνύουν ότι η σύνθεση του αερομεταφερόμενου υλικού είναι παρόμοια με το αρχικό υλικό. Εάν οι πληροφορίες αυτές δεν είναι διαθέσιμες, ενδέχεται να απαιτείται εκ νέου ανάλυση της ελεγχόμενης ουσίας (ιδανικά, στην αερομεταφερόμενη κατάσταση) ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της μελέτης. Σε ουσίες σε μορφή αερολύματος που ενδέχεται να εξατμίζονται ή να εξαχνίζονται, θα πρέπει να αποδεικνύεται ότι όλες οι φάσεις έχουν συλλεχθεί με την επιλεχθείσα μέθοδο.

26. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται μία παρτίδα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης, εάν είναι δυνατόν, και το ελεγχόμενο δείγμα θα πρέπει να αποθηκεύεται υπό συνθήκες που διατηρούν την καθαρότητά του, την ομοιογένειά του και τη σταθερότητά του. Πριν από την έναρξη της μελέτης, η ελεγχόμενη ουσία θα πρέπει να χαρακτηρίζεται, ως προς την καθαρότητά της και, εάν είναι τεχνικά εφικτό, ως προς την ταυτότητα και τις ποσότητες τυχόν εντοπισθέντων ρύπων και προσμείξεων. Αυτό μπορεί να αποδειχθεί, μεταξύ άλλων, από τα ακόλουθα δεδομένα: χρόνος κατακράτησης και σχετική ζώνη κορυφής, μοριακό βάρος μέσω αναλύσεων φασματομετρίας μάζας ή αεριοχρωματογραφίας ή άλλες εκτιμήσεις. Παρόλο που η ταυτότητα του ελεγχόμενου δείγματος δεν αποτελεί ευθύνη του εργαστηρίου ελέγχου, θα ήταν σκόπιμο να επιβεβαιώνει το εργαστήριο τον χαρακτηρισμό από τον χορηγό, έστω και σε περιορισμένη έκταση (π.χ. χρώμα, φυσική κατάσταση κ.λπ.)

27. Η ατμόσφαιρα έκθεσης θα πρέπει να διατηρείται κατά το δυνατόν σταθερή. Μπορεί να χρησιμοποιείται συσκευή παρακολούθησης σε πραγματικό χρόνο, όπως φωτόμετρο αερολυμάτων για τα αερολύματα ή αναλυτής ολικών υδρογονανθράκων για τους ατμούς, ώστε να καταδεικνύεται η σταθερότητα των συνθηκών έκθεσης. Η πραγματική συγκέντρωση στον θάλαμο θα πρέπει να μετράται τουλάχιστον 3 φορές κατά τη διάρκεια κάθε ημέρας έκθεσης για κάθε επίπεδο έκθεσης. Εάν δεν είναι εφικτό λόγω περιορισμένου ρυθμού ροής αέρα ή χαμηλών συγκεντρώσεων, είναι αποδεκτή η λήψη ενός δείγματος ανά περίοδο έκθεσης. Σε ιδανικές συνθήκες, το δείγμα αυτό θα πρέπει στη συνέχεια να συλλέγεται καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης. Τα δείγματα συγκέντρωσης από έναν μεμονωμένο θάλαμο δεν θα πρέπει να αποκλίνουν από τη μέση συγκέντρωση του θαλάμου περισσότερο από ± 10 %, προκειμένου για αέρια και ατμούς, ή ± 20 %, προκειμένου για υγρά ή στερεά αερολύματα. Ο χρόνος για την εξισορρόπηση του θαλάμου (t_{95}) πρέπει να υπολογίζεται και να καταγράφεται. Η διάρκεια μιας έκθεσης καλύπτει τον χρόνο παραγωγής της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Λαμβάνονται υπόψη οι χρόνοι που απαιτούνται για την εξισορρόπηση του θαλάμου (t_{95}) και τη διάσπαση. Καθοδήγηση για την εκτίμηση του t_{95} παρέχει το έγγραφο GD 39 (2).

28. Στην περίπτωση πολύ πολύπλοκων μειγμάτων αποτελούμενων από αέρια/ατμούς και αερολύματα (π.χ. ατμόσφαιρες καύσης και ελεγχόμενες χημικές ουσίες εκπεμπόμενες από στοχοστρεφή προϊόντα/συσκευές τελικής χρήσης), κάθε φάση ενδέχεται να συμπεριφέρεται διαφορετικά σε θάλαμο εισπνοής. Ως εκ τούτου, θα πρέπει να επιλέγεται τουλάχιστον μία ουσία δείκτης (αναλύτης), συνήθως το κύριο δραστικό συστατικό του μείγματος, από κάθε φάση (αέριο/ατμός και αερόλυμα). Όταν η ελεγχόμενη ουσία είναι μείγμα, η αναλυτική συγκέντρωση θα πρέπει να αναφέρεται για ολόκληρο το μείγμα και όχι μόνο για τη δραστική ουσία ή την ουσία-δείκτη (αναλύτης). Πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με τις πραγματικές συγκεντρώσεις παρέχονται στο έγγραφο GD 39 (2).

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κατανομή μεγέθους σωματιδίων

29. Η κατανομή μεγέθους σωματιδίων των αερολυμάτων θα πρέπει να προσδιορίζεται τουλάχιστον σε εβδομαδιαία βάση για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης με τη χρήση κρουστικού διαχωριστήρα ή εναλλακτικού οργάνου, όπως ο αεροδυναμικός κατανεμητής σωματιδίων (APS). Εάν μπορεί να αποδειχθεί ισοδυναμία των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται μέσω κρουστικού διαχωριστήρα και του εναλλακτικού οργάνου, το εναλλακτικό όργανο μπορεί να χρησιμοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης.

▼M4

30. Παράλληλα με το κύριο όργανο θα πρέπει να χρησιμοποιείται μια δεύτερη συσκευή, όπως ένα σταθμικό φίλτρο ή πλυντρίδα αερίου/φυσαλιδοδείκτης, για να επιβεβαιώνει την απόδοση συλλογής του κύριου οργάνου. Η συγκέντρωση μάζας που λαμβάνεται μέσω ανάλυσης μεγέθους σωματιδίων θα πρέπει να είναι εντός των εύλογων ορίων συγκέντρωσης μάζας που λαμβάνονται μέσω ανάλυσης με φίλτρο [βλέπε GD 39 (2)]. Εάν είναι δυνατόν να αποδειχθεί ισοδυναμία σε όλες τις ελεγχόμενες συγκεντρώσεις σε αρχικό στάδιο της μελέτης, οι περαιτέρω επιβεβαιωτικές μετρήσεις μπορούν να παραλείπονται. Για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων, θα πρέπει να λαμβάνονται μέτρα ώστε να ελαχιστοποιούνται τα αβέβαια δεδομένα που ενδέχεται να οδηγούν σε ανάγκη επανάληψης μιας μελέτης.

31. Θα πρέπει να προσδιορίζεται η κατανομή μεγέθους σωματιδίων στην περίπτωση των ατμών, εάν υπάρχει πιθανότητα η συμπύκνωση των ατμών να οδηγήσει στον σχηματισμό αερολύματος ή εάν εντοπίζονται σε ατμόσφαιρα ατμού σωματίδια με δυναμικό πρόκλησης μεικτών φάσεων.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

32. Τα ζώα θα πρέπει να υποβάλλονται σε κλινική εξέταση πριν, κατά τη διάρκεια και μετά την περίοδο έκθεσης. Μπορεί να ενδείκνυνται συχνότερες παρατηρήσεις ανάλογα με την αντίδραση των ζώων κατά τη διάρκεια της έκθεσης. Όταν δεν είναι δυνατή η παρατήρηση των ζώων λόγω της χρήσης σωλήνων συγκράτησης, ανεπαρκούς φωτισμού των θαλάμων ολόσωμης έκθεσης ή αδιαφανούς ατμόσφαιρας, θα πρέπει να παρατηρούνται προσεκτικά τα ζώα μετά την έκθεση. Μέσω παρατηρήσεων πριν από την έκθεση της επόμενης ημέρας μπορεί να αξιολογηθεί τυχόν αναστρεψιμότητα ή επιδείνωση των τοξικών επιδράσεων.

33. Όλες οι παρατηρήσεις καταγράφονται χωριστά για κάθε ζώο. Ο χρόνος θανάτου των ζώων που έχουν θανατωθεί προκειμένου να μην ταλαιπωρηθούν ή που έχουν βρεθεί νεκρά καταγράφεται με τη μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια.

34. Οι παρατηρήσεις στον κλωβό θα πρέπει να περιλαμβάνουν τις μεταβολές στο δέρμα και στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους, αλλαγές στο αναπνευστικό και κυκλοφοριακό σύστημα, αλλαγές στο νευρικό σύστημα, καθώς και αλλαγές στη σωματοκινητική δραστηριότητα και στον τρόπο συμπεριφοράς. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίδεται στην παρατήρηση τρόμου, σπασμών, σιελόρροιας, διάρροιας, λήθαργου, ύπνου και κώματος. Η μέτρηση της θερμοκρασίας του ορθού μπορεί να παρέχει υποστηρικτικά αποδεικτικά στοιχεία αντανακλαστικής βραδύπνοιας ή υποθερμίας/υπερθερμίας που σχετίζεται με την αγωγή ή τη στέρηση της ελευθερίας. Μπορούν να περιλαμβάνονται επίσης στο πρωτόκολλο της μελέτης πρόσθετες αξιολογήσεις σχετικά, μεταξύ άλλων, με την κινητική, τη βιοπαρακολούθηση, τη λειτουργία πνευμόνων, τη συγκράτηση δυσδιάλυτων υλικών που συσσωρεύονται στους ιστούς των πνευμόνων και αλλαγές στη συμπεριφορά.

ΒΑΡΟΣ ΣΩΜΑΤΟΣ

35. Θα πρέπει να καταγράφεται το βάρος κάθε ζώου λίγο πριν από την πρώτη έκθεση (ημέρα 0) και, στη συνέχεια, δύο φορές την εβδομάδα (παραδείγματος χάριν κάθε Παρασκευή και Δευτέρα ώστε να καταδεικνύεται η ανάρρωση μετά από Σαββατοκύριακο χωρίς έκθεση ή ανά χρονικό διάστημα που επιτρέπει την αξιολόγηση της συστημικής τοξικότητας), καθώς και κατά τον χρόνο θανάτου ή ευθανασίας. Εάν δεν εμφανιστούν επιδράσεις κατά τις πρώτες 4 εβδομάδες, το βάρος του σώματος των ζώων μπορεί να μετράται σε εβδομαδιαία βάση για το υπόλοιπο της μελέτης. Η ζύγιση των δορυφορικών ζώων (αναστρεψιμότητας), εφόσον χρησιμοποιούνται, θα πρέπει να συνεχίζεται σε εβδομαδιαία βάση καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου ανάρρωσης. Κατά την ολοκλήρωση της μελέτης, θα πρέπει να ζυγίζονται όλα τα ζώα λίγο πριν από τη θανάτωση ώστε να υπολογίζονται χωρίς συστηματικά σφάλματα οι σχέσεις βάρους οργάνων-σώματος.

ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΝΕΡΟΥ

36. Η κατανάλωση τροφής θα πρέπει να μετράται σε εβδομαδιαία βάση. Μπορεί επίσης να μετράται η κατανάλωση νερού.

▼**M4**

ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

37. Θα πρέπει να πραγματοποιούνται εκτιμήσεις κλινικής παθολογίας για όλα τα ζώα, συμπεριλαμβανομένων των ζώων-μαρτύρων και των δορυφορικών ζώων (αναστρεψιμότητας), κατά τη θανάτωσή τους. Το χρονικό διάστημα από το τέλος της έκθεσης έως την αιμοληψία θα πρέπει να καταγράφεται, ιδίως όταν η αποκατάσταση του εξεταζόμενου καταληκτικού σημείου είναι ταχεία. Ενδείκνυται η πραγματοποίηση δειγματοληψίας μετά το τέλος της έκθεσης όσον αφορά τις παραμέτρους με βραχύ χρόνο υποδιπλασιασμού πλάσματος (π.χ. COHb, CHE και MetHb).

38. Στον πίνακα 1 παρατίθενται παράμετροι κλινικής παθολογίας που απαιτούνται γενικά σε όλες τις τοξικολογικές μελέτες. Δεν απαιτείται τακτικά ανάλυση ούρων, αλλά μπορεί να διενεργείται όταν κρίνεται χρήσιμο βάσει στοιχείων αναμενόμενης ή παρατηρούμενης τοξικότητας. Ο διευθυντής της μελέτης μπορεί να επιλέξει να αξιολογήσει πρόσθετες παραμέτρους για τον καλύτερο χαρακτηρισμό της τοξικότητας μιας χημικής ουσίας (π.χ. χολινεστεράση, λιπίδια, ορμόνες, οξεοβασική ισορροπία, μεθαιμοσφαιρίνη ή σωμάτια Heinz, κινάση της κρεατίνης, λόγος μυελικών κυττάρων/ερυθρών αιμοσφαιρίων, τροπονίνες, αέρια αρτηριακού αίματος, γαλακτική αφυδρογονάση, αφυδρογονάση σορβιτόλης, γλουταμική αφυδρογονάση και γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάση).

Πίνακας 1

Τυπικές παράμετροι κλινικής παθολογίας

Αιματολογικές εξετάσεις	
Αριθμός ερυθροκυττάρων	Συνολικός αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων
Αιματοκρίτης	Λευκοκυτταρικός τύπος
Συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης	Αριθμός αιμοπεταλίων
Μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης	Πηκτικότητα (να επιλεγεί ένα):
Μέσος όγκος ερυθρών αιμοσφαιρίων	— Χρόνος προθρομβίνης
Μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης	— Χρόνος πήξης
Δικτυοερυθροκύτταρα	— Μερικός χρόνος θρομβοπλαστίνης
Κλινική χημεία	
Γλυκόζη (*)	Αλανινο-αμινοτρανσφεράση
Ολική χοληστερόλη	Ασπαργινική αμινοτρανσφεράση
Τριγλυκερίδια	Αλκαλική φωσφατάση
Άζωτο ουρίας αίματος	Κάλιο
Ολική χολερυθρίνη	Νάτριο
Κρεατινίνη	Ασβέστιο
Ολικές πρωτεΐνες	Φωσφόρος
Αλβουμίνη	Χλωριούχα
Σφαιρίνη	
Ανάλυση ούρων (προαιρετικά)	
Όψη (χρώμα και θολερότητα)	Ολικές πρωτεΐνες
Όγκος	Γλυκόζη
Ειδικό βάρος ή ωσμοτικότητα	Αίμα/Αιμοκύτταρα
pH	

(*) Δεδομένου ότι η μακρά περίοδος νηστείας μπορεί να επηρεάζει τις μετρήσεις γλυκόζης των ζώων που υποβάλλονται σε αγωγή σε σχέση με τα ζώα-μάρτυρες ο διευθυντής της μελέτης θα πρέπει να αποφασίσει εάν τα ζώα θα πρέπει να υποβάλλονται σε νηστεία. Εάν εφαρμόζεται περίοδος νηστείας, θα πρέπει να είναι κατάλληλη για τα χρησιμοποιούμενα είδη. Στην περίπτωση των επιμύων, η περίοδος αυτή μπορεί να είναι 16 ώρες (νηστεία κατά τη διάρκεια της νύχτας πριν από την αιμοληψία). Ο προσδιορισμός της γλυκόζης μετά από νηστεία μπορεί να διενεργείται μετά από ολονύχτια νηστεία κατά την τελευταία εβδομάδα έκθεσης ή μετά από ολονύχτια νηστεία πριν από τη νεκροψία (στη δεύτερη περίπτωση, μαζί με τη μέτρηση όλων των άλλων παραμέτρων κλινικής παθολογίας).

▼**M4**

39. Εάν υπάρχουν ενδείξεις απόθεσης και κατακράτησης κυρίως στην κατώτερη αναπνευστική οδό (ήτοι, στις κυψελίδες), το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) μπορεί να αποτελεί την προτιμότερη τεχνική για την ποσοτική ανάλυση παραμέτρων δόσης-επιδράσεων βάσει υποθέσεων, με εστίαση στην κυψελίτιδα, την πνευμονική φλεγμονή και τη φωσφολιπίδωση. Με τον τρόπο αυτόν διερευνώνται κατάλληλα οι αλλαγές στις κακώσεις των κυψελίδων βάσει δόσης-απόκρισης και χρονικής διάρκειας. Το υγρό του BAL μπορεί να υποβληθεί σε ανάλυση για τον προσδιορισμό του αριθμού λευκών αιμοσφαιρίων και λευκοκυτταρικού τύπου, των ολικών πρωτεϊνών και της γαλακτικής αφυδρογονάσης. Άλλες παράμετροι που μπορούν να εξετάζονται είναι αυτές που παρέχουν ενδείξεις κακώσεων των λυσοσωμάτων, φωσφολιπίδωσης, ίνωσης και ερεθιστικής ή αλλεργικής φλεγμονής, συμπεριλαμβανομένου του προσδιορισμού προ-φλεγμονωδών κυτοκινών/χημοκινών. Οι μετρήσεις BAL συμπληρώνουν γενικά τα αποτελέσματα των ιστοπαθολογικών εξετάσεων αλλά δεν μπορούν να τις αντικαταστήσουν. Καθοδήγηση για τον τρόπο έκπλυσης των πνευμόνων παρέχει το έγγραφο GD 39 (2).

ΟΦΘΑΛΜΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ

40. Πρέπει να διενεργείται, με τη χρήση οφθαλμοσκοπίου ή ισοδύναμου κατάλληλου οργάνου, οφθαλμολογική εξέταση του βυθού, των διαθλαστικών μέσων, της ίριδας και του επιπεφυκότος του οφθαλμού, πριν από τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας σε όλα τα ζώα, και κατά τη λήξη της μελέτης, στις ομάδες υψηλής συγκέντρωσης και στις ομάδες των μαρτύρων. Εάν εντοπιστούν αλλαγές στους οφθαλμούς, θα πρέπει να εξεταστούν όλα τα ζώα των άλλων ομάδων, συμπεριλαμβανομένης της δορυφορικής ομάδας (αναστρεψιμότητας).

ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΒΑΡΟΣ ΤΩΝ ΟΡΓΑΝΩΝ

41. Όλα τα πειραματόζωα, συμπεριλαμβανομένων των θανόντων κατά τη διάρκεια της δοκιμής και εκείνων που αποσύρθηκαν από τη μελέτη για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων, υποβάλλονται σε πλήρη αφαίμαξη (εάν είναι εφικτό) και ολική νεκροψία. Θα πρέπει να καταγράφεται ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ του τέλους της τελευταίας έκθεσης κάθε ζώου και της θανάτωσής του. Εάν δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί νεκροψία αμέσως μετά την ανακάλυψη κάποιου νεκρού ζώου, το ζώο θα πρέπει να ψύχεται (όχι να καταψύχεται) σε θερμοκρασίες αρκετά χαμηλές ώστε να ελαχιστοποιείται η αυτόλυση. Η νεκροψία θα πρέπει να εκτελείται όσο το δυνατόν συντομότερα, κατά κανόνα εντός μιας ή δύο ημερών. Όλες οι μακροσκοπικές παθολογικές αλλοιώσεις θα πρέπει να καταγράφονται για κάθε ζώο, δίδοντας ιδιαίτερη προσοχή σε τυχόν αλλοιώσεις της αναπνευστικής οδού.

42. Στον πίνακα 2 αναφέρονται τα όργανα και οι ιστοί που θα πρέπει να διατηρούνται σε κατάλληλο μέσο κατά τη νεκροψία, για ιστοπαθολογική εξέταση. Η διατήρηση των οργάνων και ιστών που αναφέρονται [εντός αγκίστρων] και τυχόν άλλων οργάνων και ιστών εναπόκειται στη διακριτική ευχέρεια του διευθυντή της μελέτης. Τα όργανα που αναφέρονται με **έντονους χαρακτήρες** θα πρέπει να καθαρίζονται από ιστούς και να ζυγίζονται σε νωπή κατάσταση το συντομότερο δυνατό μετά την ανατομή ώστε να αποφεύγεται η ξήρανσή τους. Ο θυρεοειδής και οι επιδιδυμίδες θα πρέπει να ζυγίζονται μόνο εάν χρειάζεται, διότι τεχνητές ενδείξεις που συνδέονται με τον καθαρισμό ενδέχεται να εμποδίζουν την ιστοπαθολογική αξιολόγηση. Οι ιστοί και τα όργανα θα πρέπει να μονιμοποιούνται σε φορμαλίνη με ρυθμιστικό διάλυμα 10 % ή άλλο κατάλληλο μονιμοποιητικό υλικό, αμέσως μετά τη νεκροψία και τουλάχιστον 24-48 ώρες πριν από τον καθαρισμό από ιστούς, ανάλογα με το μονιμοποιητικό υλικό που θα χρησιμοποιηθεί.

▼**M4**

Πίνακας 2

Διατηρούμενα όργανα και ιστοί κατά τη νεκροψία

Επινεφρίδια	Οισοφάγος
Αορτή	[Οσφρητικός βολβός]
Μυελός των οστών (και/ή πρόσφατα αναρροφηθείς μυελός των οστών)	**Ωοθήκες**
Εγκέφαλος (συμπεριλαμβανομένων τομών του εγκεφάλου, της παρεγκεφαλίδας και του προμήκη μυελού/της γέφυρας)	Πάγκρεας
	Παραθυρεοειδείς
Τυφλό έντερο	Περιφερειακό νεύρο (ισχιακό ή κνημιαίο, κατά προτίμηση κοντά στο μυ)
Κόλον	Υπόφυση
Δωδεκαδάκτυλο	Προστάτης
[**Επιδιδυμίδες**]	Ορθό
[Οφθαλμοί (αμφιβληστροειδής, οπτικό νεύρο) και βλέφαρα]	Σιελογόνοι αδένες
Μηριαίο οστό και κνημομηριαία άρθρωση	Σπερματοδόχες κύστεις
Χοληδόχος κύστη (όπου υπάρχει)	Δέρμα
[Αδένες Harderian]	Νωτιαίος μυελός (αυχενικός, μεσοθωρακικός και οσφυϊκός)
Καρδιά	**Σπλήνα**
Ειλεός	Στέρνο
Νήστις	Στομάχι
Νεφροί	Δόντια
[Δακρυγόνοι αδένες (εξωβολβικοί)]	**Όρχεις**
Λάρυγγας (3 επίπεδα, συμπεριλαμβανομένης της βάσης της επιγλωττίδας)	**Θύμος αδένας**
Ήπαρ	**Θυρεοειδείς αδένες**
Πνεύμονας (όλοι οι λοβοί σε ένα επίπεδο, συμπεριλαμβανομένων των κυρίων βρόγχων)	[Γλώσσα]
Λεμφαδένες από την πυλαία περιοχή του πνεύμονα, ιδίως στην περίπτωση δυσδιάλυτων ελεγχόμενων χημικών ουσιών σε σωματιδιακή μορφή. Για περισσότερο ενδελεχείς εξετάσεις και/ή μελέτες με ανοσολογική εστίαση, εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης περισσότερων λεμφαδένων, π.χ. από τη μεσοθωρακική, την αυχενική/την υπογνάθια και/ή την ωτική περιοχή.	Τραχεία (τουλάχιστον 2 επίπεδα, συμπεριλαμβανομένης 1 διαμήκους τομής μέσω της τρόπιδας και 1 εγκάρσιας τομής)
	[Ουρητήρας]
Λεμφαδένες (σε απόσταση από το σημείο εισόδου)	[Ουρήθρα]
Μαστικός αδένας (θηλυκά ζώα)	Ουροδόχος κύστη
Μυς (μηρός)	**Μήτρα**
Ρινοφαρυγγικοί ιστοί (τουλάχιστον 4 επίπεδα· 1 επίπεδο πρέπει να περιλαμβάνει το ρινοφαρυγγικό πόρο και τον λεμφικό ιστό που συνοδεύει τη ρινική κοιλότητα (NALT).	Όργανα-στόχοι
	Όλες οι μακροσκοπικές βλάβες και μάζες

▼M4

43. Οι πνεύμονες θα πρέπει να αφαιρούνται άθικτοι, να ζυγίζονται και να διαποτίζονται με κατάλληλο μονιμοποιητικό υλικό σε πίεση 20-30 cm στήλης ύδατος ώστε να εξασφαλίζεται η διατήρηση της δομής τους (5). Πρέπει να συλλέγονται τομές όλων των λοβών σε ένα επίπεδο, συμπεριλαμβανομένων των κυρίων βρόγχων, αλλά σε περίπτωση έκπλυσης των πνευμόνων, ο λοβός που δεν έχει εκπλυθεί θα πρέπει να τέμνεται σε τρία επίπεδα (όχι σειριακές τομές).

44. Θα πρέπει να εξετάζονται τουλάχιστον 4 επίπεδα των ρινοφαρυγγικών ιστών, ένα από τα οποία θα πρέπει να περιλαμβάνει το ρινοφαρυγγικό πόρο (5) (6) (7) (8) (9) ώστε να εξετάζεται επαρκώς το πλακώδες, το μεταβατικό (μη βλεφαριδοφόρο αναπνευστικό), το αναπνευστικό (βλεφαριδοφόρο αναπνευστικό) και το οσφρητικό επιθήλιο, και ο αποχετευτικός λεμφικός ιστός (NALT) (10) (11). Θα πρέπει να εξετάζονται τρία επίπεδα του λάρυγγα, ένα από τα οποία θα πρέπει να περιλαμβάνει τη βάση της επιγλωττίδας (12). Θα πρέπει να εξετάζονται τουλάχιστον δύο επίπεδα της τραχείας, συμπεριλαμβανομένης μιας διαμήκους τομής, μέσω της τρόπιδας, της διακλάδωσης των εξωπνευμονικών βρόχων και μιας εγκάρσιας τομής.

ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

45. Θα πρέπει να διενεργείται ιστοπαθολογική αξιολόγηση όλων των οργάνων και ιστών που αναφέρονται στον πίνακα 2 για την ομάδα μάρτυρα και την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης και για όλα τα ζώα που πεθαίνουν ή θανατώνονται κατά τη διάρκεια της μελέτης. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίδεται στην αναπνευστική οδό, τα όργανα-στόχο και τις μακροσκοπικές βλάβες. Τα όργανα και οι ιστοί που παρουσιάζουν βλάβες στην ομάδα υψηλής συγκέντρωσης θα πρέπει να εξετάζονται σε όλες τις ομάδες. Ο διευθυντής της μελέτης μπορεί να επιλέξει να διενεργήσει ιστοπαθολογική αξιολόγηση επιπρόσθετων ομάδων ώστε να καταδειχθεί σαφής σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης. Σε περίπτωση που έχει χρησιμοποιηθεί δορυφορική ομάδα (αναστρεψιμότητας), απαιτείται ιστοπαθολογική αξιολόγηση όλων των ιστών και των οργάνων που έχουν παρουσιάσει αλλοιώσεις στα ζώα των ομάδων αγωγής. Εάν προκληθεί υπερβολικός αριθμός πρώιμων θανάτων ή άλλων προβλημάτων στην ομάδα υψηλής έκθεσης που επηρεάζουν αρνητικά τη σημασία των δεδομένων, θα πρέπει να διενεργηθεί ιστοπαθολογική εξέταση στην ομάδα με την αμέσως χαμηλότερη συγκέντρωση. Θα πρέπει να επιχειρείται συσχετισμός των μακροσκοπικών παρατηρήσεων με τα μικροσκοπικά ευρήματα.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Στοιχεία

46. Θα πρέπει να παρέχονται στοιχεία για κάθε ζώο σχετικά με το βάρος του, την τροφή που κατανάλωσε, την κλινική παθολογία, την παθολογοανατομία, το βάρος των οργάνων του και την ιστοπαθολογία. Τα στοιχεία κλινικής παρατήρησης πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα ο οποίος περιλαμβάνει, για κάθε ομάδα δοκιμής, τον αριθμό των χρησιμοποιηθέντων ζώων, τον αριθμό των ζώων που εμφανίζουν συγκεκριμένες τοξικές εκδηλώσεις, τον αριθμό των ζώων που βρέθηκαν νεκρά κατά τη διάρκεια της δοκιμής ή που θανατώθηκαν για να μην ταλαιπωρηθούν, τον χρόνο θανάτου κάθε ζώου, περιγραφή και χρονική πορεία των τοξικών εκδηλώσεων, αναστρεψιμότητα και ευρήματα νεκροψίας. Όλα τα αποτελέσματα, ποσοτικά και συμπτωματικά, πρέπει να αξιολογούνται με μια κατάλληλη στατιστική μέθοδο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε γενικά αποδεκτή στατιστική μέθοδος, ενώ οι στατιστικές μέθοδοι θα πρέπει να επιλέγονται κατά τον σχεδιασμό της μελέτης.

Έκθεση δοκιμής

47. Η έκθεση της δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία, κατά περίπτωση:

Πειραματόζωα και διαχείρισή τους

— περιγραφή των συνθηκών εγκλωβισμού, συμπεριλαμβανομένων των εξής: αριθμό (ή μεταβολή του αριθμού) ζώων ανά κλωβό, στρωμνή, θερμοκρασία και σχετική υγρασία του περιβάλλοντος, φωτοπερίοδο και προσδιορισμό του σιτηρεσίου,

▼M4

— είδος/φυλή που χρησιμοποιήθηκε και αιτιολόγηση της χρήσης άλλου είδους εκτός του επίμυ· μπορούν να παρέχονται πηγές και ιστορικά δεδομένα, εφόσον αφορούν ζώα που έχουν υποβληθεί σε παρόμοιες συνθήκες έκθεσης, στέγασης και στέρησης τροφής,

— αριθμός ηλικία και φύλο των ζώων,

— μέθοδος τυχαιοποίησης,

— περιγραφή τυχόν προετοιμασίας πριν από τον έλεγχο, μεταξύ άλλων του σιτηρεσίου, της περιόδου απομόνωσης και της αγωγής για ασθένειες.

Ελεγχόμενη χημική ουσία

— φυσική κατάσταση, καθαρότητα και, κατά περίπτωση, φυσικές και χημικές ιδιότητες (συμπεριλαμβανομένης της ισομερείωσης),

— στοιχεία αναγνώρισης και αριθμός CAS, εάν είναι γνωστός.

Φορέας

— αιτιολόγηση χρήσης του φορέα και αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα (εάν δεν είναι νερό),

— προϋπάρχοντα ή παράλληλα δεδομένα που καταδεικνύουν ότι ο φορέας δεν επηρεάζει το αποτέλεσμα της μελέτης.

Θάλαμος εισπνοής

— αναλυτική περιγραφή του θαλάμου εισπνοής, μεταξύ άλλων του όγκου και ενός διαγράμματος,

— πηγή και περιγραφή του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται για την έκθεση ζώων, καθώς και για την παραγωγή της ατμόσφαιρας,

— εξοπλισμός για τη μέτρηση της θερμοκρασίας, της υγρασίας, του μεγέθους των σωματιδίων και της πραγματικής συγκέντρωσης,

— πηγή αέρα και χρησιμοποιούμενο σύστημα κλιματισμού,

— μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη βαθμονόμηση του εξοπλισμού ώστε να εξασφαλίζεται ομοιογενής πειραματική ατμόσφαιρα,

— διαφορά πίεσης (θετική ή αρνητική),

— θύρες έκθεσης ανά θάλαμο (ρινική έκθεση)· θέση των ζώων στο σύστημα (ολόσωμη έκθεση),

— σταθερότητα της πειραματικής ατμόσφαιρας,

— θέση των αισθητήρων θερμοκρασίας και υγρασίας και δειγματοληψία της πειραματικής ατμόσφαιρας στον θάλαμο,

— επεξεργασία του παρεχόμενου/εξαγόμενου αέρα,

— ταχύτητες ροής αέρα, ταχύτητα ροής αέρα/θύρα έκθεσης (ρινική έκθεση) ή φορτίο ζώων/θάλαμο (ολόσωμη έκθεση),

— χρόνος για την επίτευξη ισορροπίας στον θάλαμο εισπνοής (t95),

— αριθμός μεταβολών όγκου ανά ώρα,

— συσκευές μέτρησης (κατά περίπτωση).

Δεδομένα έκθεσης

— αιτιολόγηση της επιλογής της συγκέντρωσης στόχου για την κυρίως μελέτη,

▼M4

— ονομαστικές συγκεντρώσεις (συνολική μάζα της παραγόμενης ελεγχόμενης χημικής ουσίας μέσα στον θάλαμο εισπνοής διά του συνολικού όγκου αέρα που διαβιβάζεται μέσω του θαλάμου),

— πραγματικές συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που λαμβάνονται από τη ζώνη αναπνοής των ζώων· για μείγματα που παράγουν ετερογενείς φυσικές μορφές (αέρια, ατμούς, αερολύματα), κάθε μορφή μπορεί να αναλύεται χωριστά,

— όλες οι ατμοσφαιρικές συγκεντρώσεις θα πρέπει να αναφέρονται σε μονάδες μάζας (mg/l mg/m^3 κ.λπ.) αντί να αναφέρονται σε μονάδες όγκου (ppm, ppb κ.λπ.),

— κατανομή μεγέθους σωματιδίων διάμεσος αεροδυναμικής διαμέτρου κατά μάζα (MMAD) και γεωμετρική τυπική απόκλιση (σ_g), συμπεριλαμβανομένων των μεθόδων υπολογισμού τους. Θα πρέπει να αναφέρονται επιμέρους αναλύσεις μεγέθους σωματιδίων.

Συνθήκες δοκιμής

— λεπτομερή στοιχεία της παρασκευής της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, συμπεριλαμβανομένων λεπτομερών στοιχείων διαδικασιών που έχουν ενδεχομένως χρησιμοποιηθεί για τη μείωση του μεγέθους στερεών υλικών ή για την παρασκευή διαλυμάτων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας,

— περιγραφή (κατά προτίμηση μαζί με διάγραμμα) του εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή της ατμόσφαιρας ελέγχου και την έκθεση των ζώων στην ατμόσφαιρα ελέγχου,

— λεπτομερή στοιχεία του εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκε για την παρακολούθηση της θερμοκρασίας του θαλάμου, της υγρασίας και της ροής αέρα στον θάλαμο (ανάπτυξη καμπύλης βαθμονόμησης),

— λεπτομερή στοιχεία του εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκε για τη συλλογή δειγμάτων ώστε να προσδιοριστεί η συγκέντρωση και η κατανομή μεγέθους σωματιδίων στον θάλαμο,

— λεπτομερή στοιχεία της χημικής αναλυτικής μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε και επικύρωση της μεθόδου (συμπεριλαμβανομένης της ικανότητας ανάκτησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας από το μέσο δειγματοληψίας),

— μέθοδος τυχαιοποίησης κατά την κατανομή των ζώων στις ομάδες αγωγής και μαρτύρων,

— λεπτομερή στοιχεία για την ποιότητα της τροφής και του νερού (μεταξύ άλλων του είδους και της πηγής του σιτηρεσίου και της πηγής του νερού),

— αιτιολόγηση των επιλεγμένων συγκεντρώσεων ελέγχου.

Αποτελέσματα

— πίνακας με τη θερμοκρασία, την υγρασία και τη ροή αέρα στον θάλαμο,

— πίνακας με τα στοιχεία ονομαστικών και πραγματικών συγκεντρώσεων στον θάλαμο,

— πίνακας με τα στοιχεία μεγέθους σωματιδίων, συμπεριλαμβανομένων δεδομένων συλλογής του δείγματος ανάλυσης, της κατανομής μεγέθους σωματιδίων και υπολογισμών της MMAD και της σ_g,

— πίνακας με τα δεδομένα απόκρισης και το επίπεδο συγκέντρωσης για κάθε ζώο (δηλαδή ζώα που παρουσίασαν συμπτώματα τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένης της θνησιμότητας, της φύσης, της σοβαρότητας, του χρόνου εμφάνισης και της διάρκειας των επιδράσεων),

▼**M4**

— πίνακας με το βάρος κάθε ζώου,

— πίνακας με την κατανάλωση τροφής,

— πίνακας με δεδομένα κλινικής παθολογίας,

— ευρήματα νεκροψίας και ιστοπαθολογικά ευρήματα για καθένα από τα ζώα, εφόσον διατίθενται.

Συζήτηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

— Ιδιαίτερη έμφαση θα πρέπει να δίδεται στην περιγραφή των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπλήρωση των κριτηρίων της μεθόδου δοκιμών, π.χ. της οριακής συγκέντρωσης ή του μεγέθους σωματιδίων.

— Θα πρέπει να καλύπτεται το ζήτημα της εισπνευσιμότητας των σωματιδίων βάσει των συνολικών ευρημάτων, ιδίως εάν τα σχετικά με το μέγεθος των σωματιδίων κριτήρια δεν ήταν δυνατό να εκπληρωθούν.

— Η συνολική αξιολόγηση της μελέτης πρέπει να περιλαμβάνει τη συνοχή των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των ονομαστικών και πραγματικών συγκεντρώσεων και τη σχέση της πραγματικής προς την ονομαστική συγκέντρωση.

— Θα πρέπει να αναφέρεται η πιθανή αιτία θανάτου και ο επικρατέστερος τρόπος δράσης (συστημική δράση έναντι τοπικής).

— Θα πρέπει να παρέχεται εξήγηση εάν έπρεπε να θανατωθούν με ευθανασία ζώα που πονούσαν ή που εμφάνιζαν εκδηλώσεις έντονης και διαρκούς δυσφορίας, βάσει των κριτηρίων του εγγράφου καθοδήγησης του ΟΟΣΑ για τα λιγότερο βάναυσα καταληκτικά σημεία (3).

— Θα πρέπει να προσδιορίζεται το(τα) όργανο(-α)-στόχος.

— Θα πρέπει να προσδιορίζονται οι τιμές NOAEL και LOAEL.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) OECD (1981), *Subchronic Inhalation Toxicity Testing*, Original Test Guideline No 413, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) OECD (2009), *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing,* Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(3) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(4) Whalan E. και Redden J.C. (1994), Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies, Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

(5) Dungworth D.L., Tyler W.S., Plopper C.E. (1985), Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) στο *Toxicology of Inhaled Material,* Witschi, H.P. και Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229-258.

(6) Young J.T. (1981), Histopathological examination of the rat nasal cavity, *Fundam. Appl. Toxicol.* 1: 309-312.

(7) Harkema J.R. (1990), Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants, *Environ. Health Perspect.* 85: 231-238.

▼**M4**

(8) Woutersen R.A., Garderen-Hoetmer A., van Slootweg P.J., Feron V.J. (1994), Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans, στο: Waalkes M.P. και Ward J.M. (eds), Carcinogenesis, Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

(9) Mery S., Gross E.A., Joyner D.R., Godo M., Morgan K.T. (1994), Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice, *Toxicol. Pathol.* 22: 353-372.

(10) Kuper C.F., Koornstra P.J., Hameleers D.M.H., Biewenga J., Spit B.J., Duijvestijn A.M., Breda Vriesman van P.J.C., Sminia T. (1992), The role of nasopharyngeal lymphoid tissue, *Immunol. Today* 13: 219-224.

(11) Kuper C.F., Arts J.H.E., Feron V.J. (2003), Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue, *Toxicol. Lett.* 140-141: 281-285.

(12) Lewis D.J. (1981), Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia, *Journal of Anatomy* 132(3): 419-428.

(13) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων, την τροποποίηση και την κατάργηση των οδηγιών 67/548/ΕΟΚ και 1999/45/ΕΚ και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 (ΕΕ L 353 της 31.12.2008, σ. 1).

▼**M4**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΣ

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

▼**M4**

Β.30. **ΜΕΛΕΤΕΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 452 του ΟΟΣΑ (2009). Η αρχική κατευθυντήρια γραμμή TG 452 εκδόθηκε το 1981. Θεωρήθηκε απαραίτητο να αναπτυχθεί η παρούσα αναθεωρημένη μέθοδος δοκιμών Β.30 ώστε να αντανακλά τις πλέον πρόσφατες εξελίξεις στον τομέα της καλής μεταχείρισης των ζώων και τις κανονιστικές απαιτήσεις (1) (2) (3) (4). Η επικαιροποίηση της παρούσας μεθόδου δοκιμών Β.30 διενεργήθηκε παράλληλα με τις αναθεωρήσεις του κεφαλαίου Β.32 «Μελέτες καρκινογενετικότητας» και του κεφαλαίου Β.33 «Συνδυασμένες μελέτες χρόνιας τοξικότητας/καρκινογενετικότητας» του παρόντος παραρτήματος με στόχο τη λήψη πρόσθετων πληροφοριών από τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και την παροχή περαιτέρω λεπτομερών στοιχείων για την επιλογή των δόσεων. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών έχει σχεδιαστεί ώστε να χρησιμοποιείται για τον έλεγχο ενός ευρέος φάσματος χημικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένων φυτοφαρμάκων και βιομηχανικών χημικών ουσιών.

2. Στην πλειονότητά τους, οι μελέτες χρόνιας τοξικότητας διεξάγονται σε είδη τρωκτικών. Επομένως και η παρούσα μέθοδος δοκιμών πρόκειται να εφαρμοστεί κυρίως σε μελέτες που αφορούν αυτά τα είδη. Εάν απαιτείται η διεξαγωγή τέτοιων μελετών σε άλλα είδη εκτός των τρωκτικών, μπορούν επίσης να εφαρμόζονται οι αρχές και οι διαδικασίες που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, μαζί με αυτές που περιγράφονται στο κεφάλαιο Β.27 «Μελέτη τοξικότητας 90 ημερών με επαναλαμβανόμενη δόση από το στόμα σε μη τρωκτικά» του παρόντος παραρτήματος (5), με κατάλληλες τροποποιήσεις, όπως περιγράφεται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 του ΟΟΣΑ για τον σχεδιασμό και τη διεξαγωγή μελετών χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας.

3. Οι τρεις βασικές οδοί χορήγησης ουσιών που χρησιμοποιούνται σε μελέτες χρόνιας τοξικότητας είναι μέσω του στόματος, μέσω του δέρματος και μέσω της εισπνοής. Η επιλογή οδού χορήγησης εξαρτάται από τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και την κύρια οδό έκθεσης του ανθρώπου. Πρόσθετες πληροφορίες για την επιλογή οδού έκθεσης παρέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 του ΟΟΣΑ (6).

4. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών εστιάζει στην έκθεση μέσω του στόματος, τη συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη οδό στις μελέτες χρόνιας τοξικότητας. Παρόλο που οι μακροπρόθεσμες μελέτες χρόνιας τοξικότητας που περιλαμβάνουν έκθεση μέσω του δέρματος ή της αναπνευστικής οδού ενδέχεται να είναι επίσης απαραίτητες για την εκτίμηση των κινδύνων για την υγεία και/ή ενδέχεται να απαιτούνται βάσει συγκεκριμένων ρυθμιστικών καθεστώτων, και οι δύο οδοί έκθεσης είναι τεχνικά πολύπλοκες σε σημαντικό βαθμό. Παρόλο που οι μελέτες αυτές θα πρέπει να σχεδιάζονται κατά περίπτωση, η μέθοδος δοκιμών που περιγράφεται στο παρόν κεφάλαιο για την εκτίμηση και την αξιολόγηση της χρόνιας τοξικότητας που προκαλείται με χορήγηση από το στόμα θα μπορούσε να αποτελέσει τη βάση ενός πρωτοκόλλου για αναπνευστικές και/ή δερματικές μελέτες όσον αφορά συστάσεις για περιόδους αγωγής, κλινικές και παθολογικές παραμέτρους κ.λπ. Ο ΟΟΣΑ έχει εκδώσει έγγραφο καθοδήγησης σχετικά με τη χορήγηση ελεγχόμενων χημικών ουσιών μέσω της αναπνευστικής οδού (6)(7) και μέσω του δέρματος (6). Το κεφάλαιο Β.8 (8) και το κεφάλαιο Β.29 (9) του παρόντος παραρτήματος, καθώς και το έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ σχετικά με τις δοκιμές οξείας αναπνευστικής τοξικότητας (7), θα πρέπει να λαμβάνονται ιδιαιτέρως υπόψη κατά τον σχεδιασμό πιο μακροπρόθεσμων μελετών που περιλαμβάνουν έκθεση μέσω της αναπνευστικής οδού. Το κεφάλαιο Β.9 του παρόντος παραρτήματος (10) θα πρέπει να λαμβάνεται ιδιαιτέρως υπόψη στην περίπτωση δοκιμών μέσω του δέρματος.

▼M4

5. Η μελέτη χρόνιας τοξικότητας παρέχει πληροφορίες σχετικά με τους πιθανούς κινδύνους για την υγεία που ενδέχεται να προκύπτουν από την επανειλημμένη έκθεση για ένα σημαντικό χρονικό διάστημα της ζωής του χρησιμοποιούμενου είδους. Η μελέτη παρέχει πληροφορίες για τις τοξικές επιδράσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, για ενδεχόμενα όργανα-στόχο και για την πιθανότητα συσσώρευσης. Επίσης μπορεί να παρέχει εκτίμηση του επιπέδου NOAEL (επίπεδο στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις), η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό κριτηρίων ασφάλειας για την έκθεση του ανθρώπου. Τονίζεται επίσης η ανάγκη προσεκτικής κλινικής παρατήρησης των πειραματόζωων προκειμένου να ληφθούν όσο το δυνατόν περισσότερες πληροφορίες.

6. Οι στόχοι των μελετών που καλύπτονται από την παρούσα μέθοδο δοκιμών περιλαμβάνουν:

— τον προσδιορισμό της χρόνιας τοξικότητας μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας,

— τον προσδιορισμό οργάνων στόχου,

— τον χαρακτηρισμό της σχέσης δόσης-απόκρισης,

— τον προσδιορισμό του επιπέδου στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις (NOAEL) ή της αφετηρίας για τον καθορισμό δόσης αναφοράς (BMD),

— την πρόβλεψη επιδράσεων χρόνιας τοξικότητας στα επίπεδα έκθεσης του ανθρώπου,

— την παροχή δεδομένων για τον έλεγχο υποθέσεων σχετικά με τον τρόπο δράσης (6).

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

7. Κατά την εκτίμηση και την αξιολόγηση των τοξικολογικών χαρακτηριστικών μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας, το πειραματικό εργαστήριο θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη όλες τις διαθέσιμες πληροφορίες για την ελεγχόμενη χημική ουσία πριν από τη διεξαγωγή της μελέτης, ώστε να εστιάζεται ο σχεδιασμός στον πλέον αποδοτικό έλεγχο του δυναμικού χρόνιας τοξικότητας και να ελαχιστοποιείται η χρήση των ζώων. Πληροφορίες που θα βοηθήσουν στον σχεδιασμό της μελέτης είναι, μεταξύ άλλων, η ταυτότητα, η χημική δομή και οι φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας· οποιεσδήποτε πληροφορίες για τον τρόπο δράσης· τα αποτελέσματα δοκιμών τοξικότητας in vitro ή in vivo· οι προβλεπόμενες χρήσεις και η δυνητική έκθεση του ανθρώπου· τα διαθέσιμα δεδομένα (Q)SAR και τα τοξικολογικά δεδομένα που αφορούν χημικά προϊόντα ανάλογης δομής· διαθέσιμα τοξικοκινητικά δεδομένα (κινητική μεμονωμένης δόσης και επανειλημμένων δόσεων, εφόσον είναι διαθέσιμα) και δεδομένα που προέρχονται από άλλες μελέτες επανειλημμένης έκθεσης. Ο προσδιορισμός της χρόνιας τοξικότητας πρέπει να πραγματοποιείται μόνο μετά τη λήψη αρχικών πληροφοριών για την τοξικότητα μέσω δοκιμών τοξικότητας 28 ημερών και/ή 90 ημερών με επαναλαμβανόμενη δόση. Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο εφαρμογής μιας κλιμακωτής πειραματικής προσέγγισης για τον έλεγχο της χρόνιας τοξικότητας στο πλαίσιο της συνολικής αξιολόγησης των ενδεχόμενων δυσμενών επιδράσεων μιας συγκεκριμένης ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην υγεία (11) (12) (13) (14).

8. Θα πρέπει να προσδιορίζονται οι πλέον κατάλληλες στατιστικές μέθοδοι για την ανάλυση των αποτελεσμάτων, δεδομένου του σχεδιασμού και των στόχων του πειράματος, πριν από την έναρξη της μελέτης. Στα ζητήματα που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη είναι εάν τα στατιστικά στοιχεία θα πρέπει να περιλαμβάνουν διορθώσεις βάσει των ζώων που επιβιώνουν και ανάλυση στην περίπτωση πρόωρου τερματισμού μιας ή περισσότερων ομάδων. Κατευθύνσεις για τις κατάλληλες στατιστικές αναλύσεις και βασικές παραπομπές σε διεθνώς αποδεκτές στατιστικές μεθόδους περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (6) και στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 35 για την ανάλυση και την αξιολόγηση μελετών χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας (15).

▼M4

9. Κατά τη διεξαγωγή μελέτης χρόνιας τοξικότητας, θα πρέπει να ακολουθούνται πάντα οι κατευθυντήριες αρχές και εκτιμήσεις που περιγράφονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 19 του ΟΟΣΑ για την αναγνώριση, την αξιολόγηση και τη χρήση κλινικών ενδείξεων ως λιγότερο βάναυσα καταληκτικά σημεία για τα χρησιμοποιούμενα πειραματόζωα στην αξιολόγηση ασφαλείας (16), και ιδίως η παράγραφος 62 του εγγράφου αυτού. Η παράγραφος αυτή αναφέρει ότι «Σε μελέτες που περιλαμβάνουν επανειλημμένες χορηγήσεις, όταν ένα ζώο εμφανίζει κλινικές ενδείξεις που είναι προοδευτικές και οδηγούν σε περαιτέρω επιδείνωση της κατάστασής του, θα πρέπει να λαμβάνεται μια τεκμηριωμένη απόφαση σχετικά με το εάν πρέπει να γίνει ευθανασία στο ζώο ή όχι. Η απόφαση θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη ζητήματα σχετικά με την αξία των πληροφοριών που θα ληφθούν από τη συνέχιση της συμμετοχής του ζώου αυτού στη μελέτη σε σχέση με τη συνολική του κατάσταση. Εάν ληφθεί απόφαση να εξακολουθήσει το ζώο να υποβάλλεται σε δοκιμή, θα πρέπει να αυξάνεται η συχνότητα των παρατηρήσεων, ανάλογα με τις ανάγκες. Επίσης ενδέχεται να διακόπτεται προσωρινά η χορήγηση δόσεων, εάν αυτό θα απαλύνει τον πόνο ή τη δυσφορία, ή να μειώνεται η δόση, εφόσον αυτό δεν επηρεάζει αρνητικά τον σκοπό της δοκιμής.».

10. Λεπτομερής καθοδήγηση σχετικά με τις αρχές επιλογής δόσεων για μελέτες χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας και ανάλυση των αρχών αυτών περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (6), καθώς και σε δύο δημοσιεύσεις του International Life Sciences Institute (17) (18). Η βασική στρατηγική επιλογής των δόσεων εξαρτάται από τον πρωταρχικό στόχο (ή τους πρωταρχικούς στόχους) της μελέτης (παράγραφος 6). Κατά την επιλογή κατάλληλων επιπέδων δόσης θα πρέπει να επιτυγχάνεται ισορροπία μεταξύ του ελέγχου των κινδύνων αφενός και του χαρακτηρισμού των αντιδράσεων που προκαλούν οι χαμηλές δόσεις και της καταλληλότητάς τους αφετέρου. Αυτό είναι ιδιαιτέρως σημαντικό στην περίπτωση που πρόκειται να διεξαχθεί συνδυασμένη μελέτη χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας (κεφάλαιο B.33 του παρόντος παραρτήματος) (παράγραφος 11).

11. Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο διεξαγωγής συνδυασμένης μελέτης χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας (κεφάλαιο B.33 του παρόντος παραρτήματος) αντί μιας μελέτης χρόνιας τοξικότητας (η παρούσα μέθοδος δοκιμών B.30) και μιας μελέτης καρκινογενετικότητας (κεφάλαιο B.32 του παρόντος παραρτήματος). Η συνδυασμένη δοκιμή προσφέρει μεγαλύτερη αποδοτικότητα ως προς τον χρόνο και το κόστος σε σύγκριση με τη διεξαγωγή δύο χωριστών μελετών, χωρίς να τίθεται σε κίνδυνο η ποιότητα των δεδομένων ούτε στη φάση χρόνιας τοξικότητας ούτε στη φάση καρκινογενετικότητας. Ωστόσο, ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίδεται στις αρχές επιλογής των δόσεων (παράγραφοι 9 και 20-25) κατά τη διεξαγωγή συνδυασμένης μελέτης χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας (κεφάλαιο B.33 του παρόντος παραρτήματος), ενώ είναι γνωστό επίσης ότι ενδέχεται να απαιτούνται χωριστές μελέτες βάσει ορισμένων κανονιστικών πλαισίων.

12. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών παρέχονται στο τέλος του παρόντος κεφαλαίου και στο έγγραφο καθοδήγησης GD 116 (6).

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

13. Η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται καθημερινά σε διαβαθμισμένες δόσεις σε διάφορες ομάδες πειραματόζωων, τυπικά για μια περίοδο 12 μηνών, παρόλο που είναι δυνατόν να επιλεγούν μεγαλύτερες ή μικρότερες περίοδοι ανάλογα με τις κανονιστικές απαιτήσεις (βλέπε παράγραφο 33). Η διάρκεια αυτή επιλέγεται να είναι αρκετά μεγάλη ώστε να επιτρέπεται η εκδήλωση τυχόν επιδράσεων σωρευτικής τοξικότητας, χωρίς να προκαλείται σύγχυση από τυχόν αλλαγές οφειλόμενες στη γήρανση. Θα πρέπει να αιτιολογείται οποιαδήποτε απόκλιση από τη διάρκεια έκθεσης των 12 μηνών, ιδίως στην περίπτωση βραχύτερων περιόδων. Η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται συνήθως από το στόμα, αν και μπορεί να είναι επίσης κατάλληλη η δοκιμή μέσω της αναπνευστικής οδού ή του δέρματος. Ο σχεδιασμός της μελέτης μπορεί να περιλαμβάνει επίσης μία ή περισσότερες ενδιάμεσες θανατώσεις, π.χ. κατά τον 3ο και τον 6ο μήνα, και πρόσθετες ομάδες ζώων για τον σκοπό αυτό (βλέπε παράγραφο 19). Τα ζώα εξετάζονται με προσοχή κατά τη διάρκεια της περιόδου χορήγησης για τη διαπίστωση τοξικών συμπτωμάτων. Τα ζώα που πεθαίνουν ή θανατώνονται κατά τη διάρκεια της δοκιμής νεκροτομούνται, και στο τέλος της δοκιμής, αυτά που έχουν επιζήσει θανατώνονται και νεκροτομούνται επίσης.

▼M4

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Επιλογή των ειδών ζώων

14. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών καλύπτει κυρίως την εκτίμηση και την αξιολόγηση της χρόνιας τοξικότητας σε τρωκτικά (βλέπε παράγραφο 2), αν και είναι γνωστό ότι ενδέχεται να απαιτείται η διεξαγωγή παρόμοιων μελετών σε άλλα είδη εκτός των τρωκτικών, βάσει ορισμένων κανονιστικών καθεστώτων. Η επιλογή του είδους πρέπει να αιτιολογείται. Ο σχεδιασμός και η διεξαγωγή των μελετών χρόνιας τοξικότητας σε άλλα είδη εκτός των τρωκτικών, όταν απαιτούνται τέτοιες μελέτες, θα πρέπει να βασίζονται στις αρχές που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, καθώς και στις αρχές του κεφαλαίου B.27 «Μελέτη τοξικότητας 90 ημερών με επαναλαμβανόμενη δόση από το στόμα σε μη τρωκτικά» του παρόντος παραρτήματος (5). Πρόσθετες πληροφορίες για την επιλογή είδους και φυλής παρέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 του ΟΟΣΑ (6).

15. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, το προτιμότερο είδος είναι ο επίμυς αν και μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλα είδη τρωκτικών, π.χ. ποντικοί. Οι επίμυες και οι ποντικοί είναι προτιμώμενα πειραματικά μοντέλα, λόγω της σχετικά μικρής διάρκειας ζωής τους, της εκτεταμένης χρήσης τους σε φαρμακολογικές και τοξικολογικές μελέτες, της ευαισθησίας τους στην ογκογένεση και της διαθεσιμότητας καταλλήλως χαρακτηρισμένων φυλών. Λόγω των χαρακτηριστικών αυτών, υπάρχουν διαθέσιμες πολλές πληροφορίες για τη φυσιολογία και την παθολογία τους. Πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή νεαρά ενήλικα ζώα των συνήθων εργαστηριακών φυλών. Η μελέτη χρόνιας τοξικότητας θα πρέπει να διεξάγεται σε ζώα της ίδιας φυλής και προέλευσης με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν σε προκαταρκτικές μελέτες τοξικότητας βραχύτερης διάρκειας. Τα θηλυκά πρέπει να είναι άτοκα και να μη βρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης.

Συνθήκες στέγασης και διατροφής

16. Τα ζώα μπορούν να στεγάζονται σε ατομικό κλωβό ή σε κλωβούς σε μικρές ομάδες του ίδιου φύλου· τα ζώα θα πρέπει να στεγάζονται ατομικά μόνο εάν αυτό αιτιολογείται επιστημονικά. Οι κλωβοί διευθετούνται με τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται οι οφειλόμενες στη θέση των κλωβών επιδράσεις. Η θερμοκρασία στην αίθουσα πειραματόζωων θα πρέπει να είναι 22 °C (± 3 °C). Παρόλο που η σχετική υγρασία θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, παρά μόνο κατά τη διάρκεια του καθαρισμού της αίθουσας, τα επιδιωκόμενα επίπεδα της υγρασίας θα πρέπει να είναι 50-60 %. Ο φωτισμός πρέπει να είναι τεχνητός και η φωτοπερίοδος να αποτελείται από δώδεκα ώρες φωτός και δώδεκα ώρες σκότους. Όσον αφορά τη διατροφή, μπορούν να χρησιμοποιούνται συμβατικά εργαστηριακά σιτηρέσια με παροχή απεριόριστου πόσιμου νερού. Το σιτηρέσιο θα πρέπει να ανταποκρίνεται σε όλες τις διατροφικές απαιτήσεις των ειδών που υποβάλλονται στη δοκιμή και η περιεκτικότητα σε τροφικές προσμείξεις, συμπεριλαμβανομένων, μεταξύ άλλων, υπολειμμάτων ζιζανιοκτόνων, ανθεκτικών οργανικών ρύπων, φυτοοιστρογόνων, βαρέων μετάλλων και μυκοτοξινών, που θα μπορούσαν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της δοκιμής, θα πρέπει να είναι όσον το δυνατόν μικρότερη. Αναλυτικές πληροφορίες για τα επίπεδα θρεπτικών ουσιών και τροφικών προσμείξεων θα πρέπει να παρέχονται σε περιοδική βάση, τουλάχιστον στην αρχή της μελέτης και όταν υπάρχει αλλαγή στη χρησιμοποιούμενη παρτίδα και θα πρέπει να περιλαμβάνονται στην τελική έκθεση. Θα πρέπει αντίστοιχα να παρέχονται αναλυτικές πληροφορίες για το πόσιμο νερό που χρησιμοποιείται στη μελέτη. Η επιλογή σιτηρεσίου ενδέχεται να επηρεάζεται από την ανάγκη διασφάλισης κατάλληλης πρόσμειξης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και κάλυψης των διατροφικών απαιτήσεων των ζώων, όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται μαζί με την τροφή.

Προετοιμασία των ζώων

17. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή ζώα, εγκλιματισμένα στις εργαστηριακές συνθήκες για τουλάχιστον 7 ημέρες, τα οποία δεν έχουν υποβληθεί σε άλλες πειραματικές διαδικασίες στο παρελθόν. Στην περίπτωση τρωκτικών, η χορήγηση δόσεων στα ζώα θα πρέπει να ξεκινήσει το συντομότερο δυνατό μετά τον απογαλακτισμό και τον εγκλιματισμό και, κατά προτίμηση, πριν από την ηλικία των 8 εβδομάδων. Τα πειραματόζωα θα πρέπει να είναι χαρακτηρισμένα ως προς το είδος, τη φυλή, την προέλευση, το φύλο,

▼M4

το βάρος και την ηλικία τους. Στην αρχή της μελέτης, η διαφορά βάρους των χρησιμοποιούμενων ζώων σε κάθε φύλο θα πρέπει να είναι ελάχιστη και να μην υπερβαίνει το ± 20 % του μέσου βάρους όλων των ζώων της μελέτης, χωριστά για κάθε φύλο. Τα ζώα πρέπει να κατανέμονται τυχαία σε ομάδες μαρτύρων και αγωγής. Μετά την τυχαία κατανομή, δεν πρέπει να υπάρχουν σημαντικές διαφορές στο μέσο σωματικό βάρος μεταξύ των ομάδων σε κάθε φύλο. Εάν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, θα πρέπει να επαναλαμβάνεται, εάν είναι δυνατό, το στάδιο της τυχαίας κατανομής. Κάθε ζώο πρέπει να λαμβάνει έναν μοναδικό αριθμό αναγνώρισης και να φέρει μόνιμη σήμανση με τον αριθμό αυτό μέσω δερματοστηξίας, εμφυτεύματος μικροτσίπ ή άλλης κατάλληλης μεθόδου.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αριθμός και φύλο των ζώων

18. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ζώα και των δύο φύλων. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται επαρκής αριθμός ζώων έτσι ώστε στο τέλος της μελέτης να υπάρχουν αρκετά ζώα διαθέσιμα σε κάθε ομάδα για ενδελεχή βιολογική και στατιστική αξιολόγηση. Στην περίπτωση τρωκτικών, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται συνήθως τουλάχιστον 20 ζώα ανά φύλο ανά ομάδα σε κάθε επίπεδο δόσης, ενώ εάν χρησιμοποιούνται άλλα ζώα εκτός τρωκτικών, συνιστάται να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 4 ζώα ανά φύλο ανά ομάδα. Σε μελέτες με ποντικούς, ενδέχεται να απαιτούνται επιπλέον ζώα σε κάθε ομάδα δόσης για τη διεξαγωγή όλων των απαιτούμενων αιματολογικών εξετάσεων.

Πρόβλεψη για ενδιάμεσες θανατώσεις, δορυφορικές ομάδες και ζώα-φρουρούς

19. Η μελέτη ενδέχεται να προβλέπει ενδιάμεσες θανατώσεις (τουλάχιστον 10 ζώα/φύλο/ομάδα), π.χ. τον 6ο μήνα, για την παροχή πληροφοριών σχετικά με την εξέλιξη των τοξικολογικών αλλαγών και μηχανιστικών πληροφοριών, εφόσον αυτό αιτιολογείται επιστημονικά. Στην περίπτωση που οι πληροφορίες αυτές είναι ήδη διαθέσιμες από προηγούμενες μελέτες τοξικότητας με επαναλαμβανόμενη δόση σχετικά με την ελεγχόμενη χημική ουσία, οι ενδιάμεσες θανατώσεις ενδέχεται να μην δικαιολογούνται επιστημονικά. Είναι επίσης δυνατόν να συμπεριλαμβάνονται δορυφορικές ομάδες ώστε να παρακολουθείται η αναστρεψιμότητα τυχόν τοξικολογικών αλλαγών που προκαλεί η ελεγχόμενη χημική ουσία. Οι ομάδες αυτές περιορίζονται συνήθως στο επίπεδο μέγιστης δόσης της μελέτης συν τους μάρτυρες. Είναι επίσης δυνατόν να συμπεριλαμβάνεται μια πρόσθετη ομάδα ζώων-φρουρών (συνήθως 5 ζώα ανά φύλο) για την παρακολούθηση της κατάστασης ασθενείας, εάν είναι απαραίτητο, κατά τη διάρκεια της μελέτης (22). Εάν έχουν σχεδιαστεί ενδιάμεσες θανατώσεις ζώων ή συμμετοχή δορυφορικών ομάδων ή ομάδων ζώων-φρουρών, ο αριθμός των ζώων που προβλέπει ο σχεδιασμός της μελέτης πρέπει να αυξηθεί κατά τον αριθμό των ζώων που έχει προγραμματιστεί να θανατωθούν πριν από την ολοκλήρωση της μελέτης. Τα ζώα αυτά θα πρέπει να υποβάλλονται κανονικά στις ίδιες παρατηρήσεις σχετικά, μεταξύ άλλων, με το σωματικό βάρος τους, την κατανάλωση τροφής/νερού, αιματολογικές μετρήσεις και μετρήσεις κλινικής βιοχημείας και παθολογικές εξετάσεις με αυτές στις οποίες υποβάλλονται τα ζώα στη φάση χρόνιας τοξικότητας της κυρίως μελέτης. Ωστόσο, ενδέχεται να γίνεται πρόβλεψη (στις ομάδες ενδιάμεσης θανάτωσης) για τον περιορισμό των μετρήσεων σε συγκεκριμένες, βασικές μετρήσεις, όπως σχετικά με τη νευροτοξικότητα ή την ανοσοτοξικότητα.

Ομάδες δόσεων και δοσολογία

20. Κατευθύνσεις για όλα τα ζητήματα που αφορούν την επιλογή των δόσεων και το διάστημα που πρέπει να παρεμβάλλεται μεταξύ των δόσεων περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (6). Χρησιμοποιούνται τρεις τουλάχιστον διαφορετικές δόσεις και ένας μάρτυρας, πλην των περιπτώσεων όπου εκτελείται οριακή δοκιμή (βλέπε παράγραφο 27). Τα επίπεδα δόσης θα βασίζονται γενικά στα αποτελέσματα πιο βραχυχρόνιων μελετών με επαναλαμβανόμενη δόση ή μελετών καθορισμού εύρους και θα πρέπει να λαμβάνουν υπόψη τυχόν υφιστάμενα τοξικολογικά και τοξικοκινητικά δεδομένα που είναι διαθέσιμα για την ελεγχόμενη χημική ουσία ή για σχετικές χημικές ουσίες.

▼**M4**

21. Θα πρέπει να επιλέγεται συνήθως το μέγιστο επίπεδο δόσης για τον προσδιορισμό των κυρίων οργάνων-στόχου και τοξικών επιδράσεων, χωρίς να προκαλείται πόνος, σοβαρή τοξικότητα, νοσηρότητα ή θάνατος, εκτός εάν οι φυσικοχημικές ιδιότητες και οι βιολογικές επιδράσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας θέτουν περιορισμούς. Λαμβάνοντας παράλληλα υπόψη τους παράγοντες που περιγράφονται στην παράγραφο 22 κατωτέρω, το επίπεδο μέγιστης δόσης θα πρέπει να επιλέγεται έτσι ώστε να προκαλεί αποδεδειγμένη τοξικότητα, όπως αυτή μαρτυρείται, παραδείγματος χάριν, από τη μείωση της αύξησης του σωματικού βάρους (κατά περίπου 10 %).

22. Ωστόσο, ανάλογα με τους στόχους της μελέτης (βλέπε παράγραφο 6), ενδέχεται να επιλέγεται ένα ανώτατο επίπεδο δόσης χαμηλότερο από τη δόση που παρέχει αποδεικτικά στοιχεία τοξικότητας, π.χ. εάν μια δόση προκαλεί δυσμενείς επιδράσεις που προκαλούν προβληματισμό αλλά που επηρεάζουν ελάχιστα τη διάρκεια ζωής ή το βάρος του σώματος. Η ανώτατη δόση δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 1 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα (οριακή δόση, βλέπε παράγραφο 27).

23. Ενδέχεται να επιλέγονται επίπεδα δόσης και χρονικά διαστήματα μεταξύ των δόσεων ώστε να προσδιορίζεται σχέση δόσης-απόκρισης και επίπεδο NOAEL ή άλλο επιδιωκόμενο αποτέλεσμα της μελέτης, π.χ. δόση αναφοράς (BMD) (βλέπε παράγραφο 25) στο ελάχιστο επίπεδο δόσης. Παράγοντες που θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά τον προσδιορισμό των χαμηλότερων δόσεων είναι, μεταξύ άλλων, η αναμενόμενη κλίση της καμπύλης δόσης-απόκρισης, οι δόσεις στις οποίες ενδέχεται να προκαλούνται σημαντικές αλλαγές στον μεταβολισμό ή στον τρόπο τοξικής δράσης ή οι οποίες αναμένεται να είναι το κατώτατο όριο ή η αφετηρία για παρέκταση σε χαμηλές δόσεις.

24. Το επιλεγόμενο διάστημα μεταξύ των δόσεων εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και δεν μπορεί να προβλεφθεί στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, αλλά υποδιπλάσια ή υποτετραπλάσια διαστήματα εξασφαλίζουν συχνά καλές επιδόσεις στη δοκιμή όταν χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό μειούμενων επιπέδων δόσης και η προσθήκη μιας τέταρτης ομάδας δοκιμής είναι συνήθως προτιμότερη της χρήσης πολύ μεγάλων διαστημάτων (π.χ. μεγαλύτερων ενός συντελεστή της τάξης του 6-10) μεταξύ των δόσεων. Γενικά θα πρέπει να αποφεύγεται η χρήση συντελεστών μεγαλύτερων του 10, ενώ, όταν χρησιμοποιούνται τέτοιοι συντελεστές, η χρήση τους θα πρέπει να αιτιολογείται.

25. Όπως περιγράφεται περαιτέρω στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (6), τα σημεία που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την επιλογή των δόσεων είναι, μεταξύ άλλων, τα εξής:

— σημεία μη γραμμικότητας ή σημεία κλίσης στην καμπύλη δόσης-απόκρισης που είναι γνωστά ή για τα οποία υπάρχουν υπόνοιες ύπαρξης,

— τοξικοκινητική και ρύθμιση της δοσολογίας, στην περίπτωση που λαμβάνει ή δεν λαμβάνει χώρα μεταβολική επαγωγή, κορεσμός ή μη γραμμικότητα μεταξύ εξωτερικων και εσωτερικών δόσεων,

— πρόδρομες αλλοιώσεις, δείκτες επίδρασης ή δείκτες της λειτουργίας βασικών υποκείμενων βιολογικών διεργασιών,

— βασικές (ή πιθανολογούμενες) πτυχές του τρόπου δράσης, όπως δόσεις στις οποίες αρχίζει να εμφανίζεται κυτταροτοξικότητα, διαταράσσονται τα επίπεδα ορμονών, καταβάλλονται οι ομοιοστατικοί μηχανισμοί κ.λπ.,

— περιοχές στην καμπύλη δόσης-απόκρισης στις οποίες απαιτείται μια ιδιαιτέρως αξιόπιστη εκτίμηση, π.χ. στο πεδίο τιμών της αναμενόμενης δόσης αναφοράς ή ενός πιθανολογούμενου κατώτατου ορίου,

— εκτίμηση των αναμενόμενων επιπέδων έκθεσης του ανθρώπου.

▼M4

26. Οι μάρτυρες είναι ομάδα μη υποβαλλόμενη σε αγωγή ή ομάδα προοριζόμενη για τον έλεγχο του φορέα, εφόσον χρησιμοποιείται φορέας για τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Με εξαίρεση τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τα ζώα της ομάδας μάρτυρα πρέπει να υφίστανται την ίδια ακριβώς μεταχείριση με τα ζώα της ομάδας αγωγής. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται φορέας, ο όγκος φορέα που χορηγείται στους μάρτυρες είναι ο μεγαλύτερος που χρησιμοποιείται στις ομάδες αγωγής. Εάν μια ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με την τροφή και προκαλεί σημαντικά μειωμένη πρόσληψη τροφής λόγω μειωμένης γευστικότητας του σιτηρεσίου, τότε ίσως είναι χρήσιμη ως καταλληλότερος μάρτυρας μια επιπλέον ομάδα- μάρτυρας στην οποία χορηγείται το ίδιο σιτηρέσιο.

27. Εάν αναμένεται, βάσει πληροφοριών από προκαταρκτικές μελέτες, ότι μια δοκιμή με ένα επίπεδο δόσης, ισοδύναμης με τουλάχιστον 1 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα, εφαρμόζοντας τις διαδικασίες που περιγράφονται στην παρούσα μελέτη, δεν είναι πιθανό να προκαλέσει δυσμενείς επιδράσεις και εάν δεν αναμένεται πρόκληση τοξικότητας βάσει δεδομένων σχετικά με χημικές ουσίες ανάλογης δομής, είναι δυνατόν να μην απαιτείται διεξαγωγή πλήρους μελέτης με τρία επίπεδα δόσεων. Μπορεί να εφαρμόζεται όριο 1 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα, εκτός εάν από την έκθεση του ανθρώπου προκύψει ανάγκη χρησιμοποίησης υψηλοτέρου επίπεδου δόσης.

Παρασκευή των δόσεων και χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

28. Η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται συνήθως από το στόμα, με την τροφή ή το πόσιμο νερό ή με καθετήρα. Πρόσθετες πληροφορίες για την επιλογή οδών και μεθόδων χορήγησης παρέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 του ΟΟΣΑ (6). Η οδός και η μέθοδος χορήγησης εξαρτώνται από τον σκοπό της μελέτης, τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τη βιοδιαθεσιμότητά της και την κύρια οδό και μέθοδο έκθεσης του ανθρώπου. Θα πρέπει να αιτιολογείται η επιλογή οδού και μεθόδου χορήγησης. Για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων, η χορήγηση μέσω της στοματικής οδού με καθετήρα θα πρέπει να επιλέγεται συνήθως μόνο για τους παράγοντες για τους οποίους η συγκεκριμένη οδός και μέθοδος χορήγησης αναμένεται εύλογα να αποτελούν ενδεχόμενο τρόπο έκθεσης του ανθρώπου (π.χ. φαρμακευτικές ουσίες). Διατροφικές ή περιβαλλοντικές χημικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένων των ζιζανιοκτόνων, χορηγούνται συνήθως με την τροφή ή το πόσιμο νερό. Ωστόσο, βάσει ορισμένων σεναρίων, π.χ. έκθεση κατά την εργασία, ενδέχεται να είναι καταλληλότερη η χορήγηση μέσω άλλων οδών.

29. Εφόσον είναι αναγκαίο, παρασκευάζεται διάλυμα ή εναιώρημα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε κατάλληλο φορέα. Εξετάζονται τα ακόλουθα χαρακτηριστικά του φορέα και άλλων προσθέτων, όπου χρησιμοποιούνται: επιδράσεις στην απορρόφηση, στην κατανομή, στον μεταβολισμό ή στην κατακράτηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, επιδράσεις στις χημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας οι οποίες μπορούν να μεταβάλουν τα τοξικά χαρακτηριστικά της και επιδράσεις στην κατανάλωση τροφής ή νερού ή στη διατροφική κατάσταση των ζώων. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατόν, η χρήση υδατικού διαλύματος/εναιωρήματος, ως πρώτη επιλογή, διαλύματος/γαλακτώματος σε έλαιο (π.χ. αραβοσιτέλαιο) κατόπιν, και, ως τελευταία επιλογή, η χρήση διαλύματος σε άλλο φορέα. Σε περίπτωση που ο φορέας δεν είναι το νερό, τα τοξικά χαρακτηριστικά του φορέα πρέπει να είναι γνωστά. Πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες για τη σταθερότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και την ομοιογένεια των διαλυμάτων ή σιτηρεσίων δόσης (κατά περίπτωση) στις συνθήκες χορήγησης (π.χ. στο σιτηρέσιο).

30. Για τις χημικές ουσίες που χορηγούνται με την τροφή ή το πόσιμο νερό πρέπει να εξασφαλίζεται ότι οι χορηγούμενες ποσότητες ελεγχόμενης χημικής ουσίας δεν επηρεάζουν το κανονικό διατροφικό ισοζύγιο ή ισοζύγιο νερού. Σε μελέτες μακροπρόθεσμης τοξικότητας με χορήγηση με την τροφή, η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην τροφή δεν θα πρέπει να υπερβαίνει κανονικά ένα ανώτατο όριο 5 % του συνολικού σιτηρεσίου, ώστε να αποφεύγονται διατροφικές ανισορροπίες. Όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με την τροφή, πρέπει να χρησιμοποιείται είτε σταθερή συγκέντρωση στην τροφή (mg/kg σιτηρεσίου ή ppm) είτε σταθερό επίπεδο δόσης ως προς το βάρος του σώματος του ζώου (mg/kg βάρους σώματος), υπολογιζόμενο σε εβδομαδιαία βάση. Η χρησιμοποιούμενη εναλλακτική επιλογή πρέπει να διευκρινίζεται.

▼M4

31. Στην περίπτωση χορήγησης από το στόμα, χορηγούνται στα ζώα δόσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας καθημερινά (επτά ημέρες την εβδομάδα), συνήθως για περίοδο 12 μηνών (βλέπε επίσης παράγραφο 33), αν και ενδέχεται να απαιτείται μεγαλύτερο χρονικό διάστημα ανάλογα με τις κανονιστικές απαιτήσεις. Θα πρέπει να αιτιολογείται οποιοδήποτε άλλο καθεστώς δοσολογίας που τυχόν χρησιμοποιείται, π.χ. χορήγηση πέντε ημέρες την εβδομάδα. Στην περίπτωση χορήγησης μέσω του δέρματος, τα ζώα εκτίθενται κανονικά στην ελεγχόμενη χημική ουσία για τουλάχιστον 6 ώρες την ημέρα, 7 ημέρες την εβδομάδα, όπως προσδιορίζεται στο κεφάλαιο Β.9 του παρόντος παραρτήματος (10), για μια περίοδο 12 μηνών. Έκθεση μέσω της αναπνευστικής οδού πραγματοποιείται 6 ώρες την ημέρα, 7 ημέρες την εβδομάδα, αλλά ενδέχεται να εφαρμόζεται επίσης έκθεση για 5 ημέρες την εβδομάδα, εφόσον παρέχεται σχετική αιτιολόγηση. Η περίοδος έκθεσης διαρκεί συνήθως 12 μήνες. Σε περίπτωση ρινικής έκθεσης άλλων ειδών τρωκτικών εκτός των επιμύων, οι μέγιστες περίοδοι έκθεσης μπορούν να προσαρμόζονται ώστε να ελαχιστοποιείται η δυσφορία που νιώθει το κάθε είδος. Θα πρέπει να παρέχεται αιτιολόγηση στην περίπτωση που εφαρμόζεται διάρκεια έκθεσης μικρότερη των 6 ωρών ημερησίως. Βλέπε επίσης κεφάλαιο Β.8 του παρόντος παραρτήματος (8).

32. Όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με καθετήρα στα ζώα, η χορήγηση πρέπει να γίνεται με τη βοήθεια καθετήρα στομάχου ή κατάλληλης διασωλήνωσης, την ίδια περίπου ώρα κάθε ημέρα. Συνήθως χορηγείται μία δόση μία φορά την ημέρα, ενώ, στην περίπτωση που μια χημική ουσία έχει τοπική ερεθιστική δράση, μπορεί να διατηρείται η ημερήσια δοσολογία με τη χορήγηση μισών δόσεων (δύο φορές την ημέρα). Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Ο όγκος θα πρέπει να διατηρείται στο ελάχιστο εφικτό επίπεδο και δεν θα πρέπει να υπερβαίνει κανονικά το 1 ml / 100 g βάρους σώματος, στην περίπτωση των τρωκτικών (22). Οι διαφορές του όγκου πρέπει να ελαχιστοποιούνται ρυθμίζοντας τη συγκέντρωση κατά τρόπο ώστε να εξασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλα τα επίπεδα δόσης. Εξαίρεση αποτελούν οι ενδεχομένως διαβρωτικές ή ερεθιστικές χημικές ουσίες, οι οποίες θα πρέπει να αραιώνονται ώστε να αποφεύγονται οι σοβαρές τοπικές επιδράσεις. Θα πρέπει να αποφεύγεται η διεξαγωγή δοκιμών σε συγκεντρώσεις που πιθανόν να αποδειχθούν διαβρωτικές ή ερεθιστικές για το γαστρεντερικό σύστημα.

Διάρκεια της μελέτης

33. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών έχει σχεδιαστεί κυρίως ως μελέτη χρόνιας τοξικότητας με διάρκεια 12 μηνών. Ωστόσο, ο σχεδιασμός της μελέτης επιτρέπει επίσης την εφαρμογή της ως μελέτη είτε μικρότερης διάρκειας (π.χ. για 6 ή 9 μήνες) είτε μεγαλύτερης (π.χ. για 18 ή 24 μήνες), ανάλογα με τις απαιτήσεις συγκεκριμένων ρυθμιστικών καθεστώτων ή για συγκεκριμένους μηχανιστικούς σκοπούς. Θα πρέπει να αιτιολογείται οποιαδήποτε απόκλιση από τη διάρκεια έκθεσης των 12 μηνών, ιδίως στην περίπτωση βραχύτερων περιόδων. Στις δορυφορικές ομάδες που περιλαμβάνονται στη μελέτη, για την παρακολούθηση της αναστρεψιμότητας τυχόν τοξικολογικών αλλαγών προκαλούμενων από την ελεγχόμενη χημική ουσία, θα πρέπει να μην χορηγούνται δόσεις για περίοδο τουλάχιστον 4 εβδομάδων, η οποία, ωστόσο, δεν μπορεί να υπερβαίνει το ένα τρίτο της συνολικής διάρκειας της μελέτης μετά την παύση της έκθεσης. Περαιτέρω κατευθύνσεις, συμπεριλαμβανομένων ζητημάτων σχετικών με την επιβίωση των ζώων στη μελέτη, περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (6).

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

34. Θα πρέπει να ελέγχονται όλα τα ζώα, συνήθως στην αρχή και το τέλος κάθε ημέρας, καθώς και τα Σαββατοκύριακα και τις αργίες, ώστε να διαπιστώνεται τυχόν νοσηρότητα ή θνησιμότητά τους. Γενικές κλινικές παρατηρήσεις πρέπει να διεξάγονται τουλάχιστον μια φορά την ημέρα, κατά προτίμηση την (τις) ίδια(-ες) ώρα(-ες) κάθε μέρα και λαμβάνοντας υπόψη τον χρόνο κορυφώσεως των αναμενόμενων επιδράσεων μετά τη χορήγηση της δόσης, στην περίπτωση χορήγησης με καθετήρα.

▼M4

35. Όλα τα ζώα πρέπει να υποβληθούν σε λεπτομερή κλινική παρατήρηση τουλάχιστον μία φορά πριν από την πρώτη έκθεση (προκειμένου να γίνουν συγκρίσεις μεταξύ των διαφόρων ζώων), στο τέλος της πρώτης εβδομάδας της μελέτης και, στη συνέχεια, σε μηνιαία βάση. Το πρωτόκολλο παρατήρησης θα πρέπει να είναι καθορισμένο έτσι ώστε οι αποκλίσεις μεταξύ των επιμέρους προσώπων που διενεργούν την παρατήρηση να είναι ελάχιστες και ανεξάρτητες της ομάδας αγωγής. Οι παρατηρήσεις αυτές πρέπει να διενεργούνται έξω από τους κλωβούς, κατά προτίμηση σ' έναν τυποποιημένο χώρο και σε διάφορες χρονικές στιγμές σε κάθε περίπτωση. Καταγράφονται προσεκτικά, κατά προτίμηση με συστήματα βαθμολόγησης καθορισμένα σαφώς από το εργαστήριο. Καταβάλλεται προσπάθεια ώστε να είναι ελάχιστες οι διαφορές στις συνθήκες παρατήρησης. Καταγράφονται, μεταξύ άλλων, μεταβολές στο δέρμα, στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς, στους βλεννογόνους, εκκρίσεις και απεκκρίσεις καθώς και αυτόνομες ενέργειες (όπως δακρύρροια, ανόρθωση τριχών, μεταβολή της διαμέτρου της κόρης του οφθαλμού και του ρυθμού της αναπνοής). Καταγράφονται επίσης μεταβολές στο βάδισμα, στη στάση και στην αντίδραση κατά τη μεταχείριση, καθώς και η εμφάνιση κλονικών ή τονικών κινήσεων, στερεότυπων κινήσεων (όπως υπερβολική περιποίηση του εαυτού τους, συνεχείς περιστροφές) ή περίεργης συμπεριφοράς (όπως αυτοακρωτηριασμός, βάδισμα προς τα πίσω) (24).

36. Η οφθαλμολογική εξέταση, με χρήση οφθαλμοσκοπίου ή ισοδύναμου κατάλληλου εξοπλισμού, πρέπει να διενεργείται σε όλα τα ζώα πριν από την πρώτη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Στο τέλος της μελέτης, η εξέταση πρέπει να διενεργείται, κατά προτίμηση σε όλα τα ζώα, τουλάχιστον όμως στις ομάδες υψηλής δόσης και στις ομάδες των μαρτύρων. Εάν διαπιστωθούν μεταβολές στους οφθαλμούς που σχετίζονται με την αγωγή, πρέπει να εξετάζονται όλα τα ζώα. Εάν η ανάλυση της δομής ή άλλες πληροφορίες καταδεικνύουν πρόκληση οφθαλμικής τοξικότητας, θα πρέπει να αυξηθεί η συχνότητα της οφθαλμικής εξέτασης.

37. Στην περίπτωση χημικών ουσιών οι οποίες, βάσει προηγούμενων μελετών τοξικότητας 28 ημερών και/ή 90 ημερών με επαναλαμβανόμενη δόση, μπορούν να προκαλέσουν νευροτοξικές επιδράσεις, μπορούν να διενεργούνται προαιρετικά, πριν από την έναρξη της μελέτης και, μετά την έναρξη, ανά 3 μήνες έως και τη συμπλήρωση 12 μηνών, καθώς και στο τέλος της μελέτης (εάν η μελέτη διαρκεί περισσότερο από 12 μήνες), αξιολόγηση της αισθητηριακής αντίδρασης σε διαφορετικών ειδών ερεθίσματα (24) (π.χ. ακουστικά, οπτικά και ιδιοδεκτικά) (25), (26), (27), αξιολόγηση της δύναμης λαβής (28) και αξιολόγηση της μυϊκής δραστηριότητας (29). Λεπτομέρειες σχετικά με τις διαδικασίες που μπορούν να ακολουθηθούν παρέχονται στις σχετικές βιβλιογραφικές παραπομπές. Ωστόσο, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και άλλες διαδικασίες αντί των αναφερόμενων στις παραπομπές.

38. Στην περίπτωση χημικών ουσιών οι οποίες, βάσει προηγούμενων μελετών τοξικότητας 28 ημερών και/ή 90 ημερών με επαναλαμβανόμενη δόση, μπορούν να προκαλέσουν ανοσοτοξικές επιδράσεις, ενδέχεται να διενεργούνται προαιρετικά περαιτέρω έρευνες για το συγκεκριμένο καταληκτικό σημείο στο τέλος της μελέτης.

Βάρος σώματος, κατανάλωση τροφής και νερού και απόδοση της τροφής

39. Όλα τα ζώα πρέπει να ζυγίζονται κατά την έναρξη της αγωγής, τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα κατά τις πρώτες 13 εβδομάδες και τουλάχιστον μία φορά τον μήνα στη συνέχεια. Η κατανάλωση τροφής και η απόδοση της τροφής θα πρέπει να μετρώνται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα κατά τις πρώτες 13 εβδομάδες και τουλάχιστον μία φορά τον μήνα στη συνέχεια. Η κατανάλωση νερού θα πρέπει να μετράται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα κατά τις πρώτες 13 εβδομάδες και τουλάχιστον μία φορά τον μήνα στη συνέχεια, στην περίπτωση που η χημική ουσία χορηγείται μέσω του πόσιμου νερού. Μετρήσεις της κατανάλωσης ύδατος πρέπει επίσης να λαμβάνονται υπόψη στις μελέτες κατά τις οποίες η δραστηριότητα πόσης μπορεί να μεταβληθεί.

▼M4

Αιματολογικές εξετάσεις και κλινική βιοχημεία

40. Σε μελέτες που περιλαμβάνουν τρωκτικά, πρέπει να διενεργούνται αιματολογικές εξετάσεις σε τουλάχιστον 10 αρσενικά και 10 θηλυκά ζώα ανά ομάδα, κατά τον 3ο, τον 6ο και το 12ο μήνα, καθώς και στο τέλος της μελέτης (αν διαρκεί περισσότερο από 12 μήνες), με τη χρήση των ίδιων ζώων σε όλες τις εξετάσεις. Στην περίπτωση χρήσης ποντικών, ενδέχεται να απαιτούνται δορυφορικά ζώα για τη διενέργεια όλων των απαιτούμενων αιματολογικών εξετάσεων (βλέπε παράγραφο 18). Σε μελέτες που διεξάγονται σε άλλα είδη εκτός των τρωκτικών, λαμβάνονται δείγματα από μικρότερο αριθμό ζώων (π.χ. 4 ζώα ανά φύλο και ανά ομάδα, στην περίπτωση μελετών σε σκύλους), σε ενδιάμεσες χρονικές στιγμές δειγματοληψίας και στο τέλος της μελέτης, όπως προβλέπεται και για τα τρωκτικά. Ενδέχεται να μη χρειάζονται μετρήσεις τον 3ο μήνα, είτε σε τρωκτικά είτε σε άλλα είδη, εάν δεν έχει διαπιστωθεί επίδραση στις αιματολογικές παραμέτρους σε προηγούμενη μελέτη 90 ημερών που έχει διεξαχθεί με τη χρήση συγκρίσιμων επιπέδων δόσης. Τα δείγματα αίματος λαμβάνονται από ένα συγκεκριμένο σημείο, π.χ. με καρδιακή παρακέντηση ή από τον οφθαλμικό κόγχο, οπισθοβολβικά, υπό αναισθησία.

41. Θα πρέπει να εξετάζονται οι ακόλουθες παράμετροι (30): Συνολικός αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων και διαφορικός λευκοκυτταρικός τύπος, αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων, αριθμός αιμοπεταλίων, αιματοκρίτης (HCT), μέσος όγκος ερυθρών αιμοσφαιρίων (MCV), μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης (MCH), μέση πυκνότητα αιμοσφαιρίνης (MCHC), χρόνος προθρομβίνης και ενεργός μερικός χρόνος θρομβοπλαστίνης. Άλλες αιματολογικές παράμετροι, όπως τα σωμάτια Heinz ή άλλη άτυπη μορφολογία ερυθρών αιμοσφαιρίων ή μεθαιμοσφαιρίνης ενδέχεται να μετρώνται κατά περίπτωση, ανάλογα με την τοξικότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Θα πρέπει να επιλεγεί συνολικά μια ευέλικτη προσέγγιση, ανάλογα με τις παρατηρούμενες και/ή αναμενόμενες επιδράσεις μιας δεδομένης ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία επηρεάζει το αιμοποιητικό σύστημα, ενδέχεται να ενδείκνυται εξέταση του αριθμού των δικτυοερυθροκυττάρων και της κυτταρολογίας του μυελού των οστών, αν και οι εξετάσεις αυτές δεν χρειάζεται να διενεργούνται συχνά.

42. Διενεργούνται βιοχημικές εξετάσεις για τη διερεύνηση κύριων τοξικών επιδράσεων στους ιστούς και, ειδικότερα, στους νεφρούς και στο ήπαρ, σε δείγματα αίματος που λαμβάνονται από τουλάχιστον 10 αρσενικά και 10 θηλυκά ζώα ανά ομάδα, κατά τα ίδια χρονικά διαστήματα που προβλέπονται για τις αιματολογικές εξετάσεις, με τη χρήση των ίδιων ζώων σε όλες τις εξετάσεις. Στην περίπτωση χρήσης ποντικών, ενδέχεται να απαιτούνται δορυφορικά ζώα για τη διενέργεια όλων των απαιτούμενων εξετάσεων κλινικής βιοχημείας. Σε μελέτες που διεξάγονται σε άλλα είδη εκτός των τρωκτικών, λαμβάνονται δείγματα από μικρότερο αριθμό ζώων (π.χ. 4 ζώα ανά φύλο και ανά ομάδα, στην περίπτωση μελετών σε σκύλους), σε ενδιάμεσες χρονικές στιγμές δειγματοληψίας και στο τέλος της μελέτης, όπως προβλέπεται και για τα τρωκτικά. Ενδέχεται να μη χρειάζονται μετρήσεις τον 3ο μήνα, είτε σε τρωκτικά είτε σε άλλα είδη, εάν δεν έχει διαπιστωθεί επίδραση στις βιοχημικές παραμέτρους σε προηγούμενη μελέτη 90 ημερών που έχει διεξαχθεί με τη χρήση συγκρίσιμων επιπέδων δόσης. Συνιστάται να παραμένουν νηστικά τα ζώα (με την εξαίρεση των ποντικών) τη νύχτα που προηγείται της αιμοληψίας. Θα πρέπει να εξετάζονται οι ακόλουθες παράμετροι (30): γλυκόζη, ουρία (άζωτο ουρίας), κρεατινίνη, ολικές πρωτεΐνες, αλβουμίνη, ασβέστιο, νάτριο, κάλιο, ολική χοληστερόλη, τουλάχιστον δύο κατάλληλες εξετάσεις για την αξιολόγηση της ηπατοκυτταρικής επίδρασης (αλανινο-αμινοτρανσφεράση, ασπαραγινική αμινοτρασφεράση, γλουταμική αφυδρογονάση, ολικά χολικά οξέα) (31) και τουλάχιστον δύο κατάλληλες εξετάσεις για την αξιολόγηση της επίδρασης στο ηπατοχολικό σύστημα (αλκαλική φωσφατάση, γ-γλουταμυλοτρανσφεράση, 5-νουκλεοτιδάση, ολική χολερυθρίνη, ολικά χολικά οξέα) (31). Μπορούν να μετρώνται, κατά περίπτωση, άλλες παράμετροι κλινικής χημείας, όπως τα τριγλυκερίδια μετά από νηστεία, ειδικές ορμόνες και η χολινεστεράση, ανάλογα με την τοξικότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Γενικά πρέπει να ακολουθείται ευέλικτη προσέγγιση, ανάλογα με τις παρατηρούμενες και/ή αναμενόμενες επιδράσεις από μια συγκεκριμένη ελεγχόμενη χημική ουσία.

▼M4

43. Θα πρέπει να διενεργούνται αναλύσεις ούρων σε τουλάχιστον 10 αρσενικά και 10 θηλυκά ζώα ανά ομάδα σε δείγματα που συλλέγονται κατά τα ίδια διαστήματα με αυτά που προβλέπονται για τις αιματολογικές εξετάσεις και τις εξετάσεις κλινικής χημείας. Ενδέχεται να μη χρειάζονται μετρήσεις τον 3ο μήνα, εάν δεν έχει διαπιστωθεί επίδραση στις αναλύσεις ούρων σε προηγούμενη μελέτη 90 ημερών που έχει διεξαχθεί με τη χρήση συγκρίσιμων επιπέδων δόσης. Οι ακόλουθες παράμετροι περιλαμβάνονται σε μια σύσταση εμπειρογνωμόνων για τις μελέτες κλινικής παθολογίας (30): όψη, όγκος, οσμωτική ικανότητα ή ειδικό βάρος, pH, ολικές πρωτεΐνες και γλυκόζη. Άλλες εξετάσεις περιλαμβάνουν την κετόνη, το ουροχολιγόνο, τη χολερυθρίνη και τη μικροσκοπική αιμορραγία. Πρόσθετες παράμετροι μπορεί να χρησιμοποιηθούν όταν υπάρχει ανάγκη επέκτασης της έρευνας των παρατηρηθεισών επιδράσεων.

44. Γενικά θεωρείται ότι απαιτείται προσδιορισμός αιματολογικών και κλινικών βιοχημικών μεταβλητών αναφοράς πριν από μελέτες αγωγής σε σκύλους, αλλά όχι πριν από μελέτες σε τρωκτικά (30). Ωστόσο, εάν τα ιστορικά δεδομένα αναφοράς (βλέπε παράγραφο 50) δεν είναι κατάλληλα, εξετάζεται κατά πόσον θα πρέπει να προσδιοριστούν τα δεδομένα αυτά.

Παθολογοανατομία

Νεκροψία

45. Όλα τα ζώα της μελέτης πρέπει κανονικά να υποβάλλονται σε πλήρη, λεπτομερή νεκροψία η οποία περιλαμβάνει προσεκτική εξέταση της εξωτερικής επιφάνειας του σώματος, όλων των στομίων, της κρανιακής, θωρακικής και περιτοναϊκής κοιλότητας και του περιεχομένου τους. Ωστόσο, ενδέχεται να προβλέπεται (στις ομάδες ενδιάμεσης θανάτωσης ή στις δορυφορικές ομάδες) περιορισμός των μετρήσεων αυτών σε συγκεκριμένες βασικές μετρήσεις σχετικά, παραδείγματος χάριν, με τη νευροτοξικότητα ή την ανοσοτοξικότητα (βλέπε παράγραφο 19). Δεν απαιτείται νεκροψία και διεξαγωγή των επακόλουθων διαδικασιών που περιγράφονται στις επόμενες παραγράφους στα ζώα αυτά. Ενδέχεται να απαιτείται νεκροψία στα ζώα φρουρούς κατά περίπτωση, επαφιέμενη στη διακριτική ευχέρεια του διευθυντή της μελέτης.

46. Θα πρέπει να μετράται το βάρος των οργάνων όλων των ζωών, εκτός αυτών που εξαιρούνται βάσει του τελευταίου μέρους της παραγράφου 45. Τα επινεφρίδια, ο εγκέφαλος, οι επιδιδυμίδες, η καρδιά, οι νεφροί, το ήπαρ, οι ωοθήκες, η σπλήνα, οι όρχεις, ο θυρεοειδής (ζυγίζεται μετά τη μονιμοποίηση μαζί με τους παραθυρεοειδείς) και η μήτρα όλων των ζώων (εξαιρούνται τα ετοιμοθάνατα και/ή όσα έχουν στο μεταξύ πεθάνει) καθαρίζονται από τυχόν άλλους προσκολλημένους ιστούς, όπως ενδείκνυται, και ζυγίζονται υγρά αμέσως μετά την ανατομή ώστε να αποφεύγεται η ξήρανση. Σε μελέτες που χρησιμοποιούνται ποντικοί, η ζύγιση των επινεφριδίων είναι προαιρετική.

47. Οι ακόλουθοι ιστοί πρέπει διατηρούνται στο καταλληλότερο μονιμοποιητικό υλικό, τόσο για τον τύπο ιστού όσο και για την ιστοπαθολογική εξέταση που πρόκειται να ακολουθήσει (32) (οι ιστοί που αναφέρονται εντός αγκύλων διατηρούνται προαιρετικά):

όλες οι μακροσκοπικές βλάβες	καρδιά	πάγκρεας	στόμαχος (προστόμαχος, αδενικό τμήμα στομάχου)
επινεφρίδιος αδένας	ειλεός	παραθυρεοειδής αδένας	[δόντια]
αορτή	νήστις	περιφερειακό νεύρο	όρχις
εγκέφαλος (συμπεριλαμβανομένων τομών του εγκεφάλου, της παρεγκεφαλίδας και του προμήκη μυελού/της γέφυρας)	νεφρός	υπόφυση	θύμος αδένας
τυφλό έντερο	δακρυγόνος αδένας (εξωβολβικός)	προστάτης	θυρεοειδής
τράχηλος της μήτρας	ήπαρ	ορθό	[γλώσσα]

▼M4

πηκτικός αδένας	πνεύμονας	σιελογόνος αδένας	τραχεία
κόλον	λεμφαδένες (επιπολής και εν τω βάθει)	σπερματοδόχος κύστη	ουροδόχος κύστη
δωδεκαδάκτυλο	μαστικός αδένας (υποχρεωτικά για θηλυκά ζώα και, εάν μπορεί ορατά να ανατμηθεί, από αρσενικά ζώα)	σκελετικός μυς	μήτρα (συμπεριλαμβανομένου του τραχήλου)
επιδιδυμίδα	[ανώτερη αναπνευστική οδός, συμπεριλαμβανομένης της μύτης, των κογχών και των παραρρινίων κόλπων]	δέρμα	[ουρητήρας]
οφθαλμός (συμπεριλαμβανομένου του αμφιβληστροειδή)	οισοφάγος	νωτιαίος μυελός (σε τρία επίπεδα: αυχενικός, μεσοθωρακικός και οσφυϊκός)	[ουρήθρα]
[μηριαίο οστό μαζί με την άρθρωση]	[οσφρητικός βολβός]	σπλήνα	κόλπος
χοληδόχος κύστη (για άλλα είδη εκτός του επίμυ)	ωοθήκη	[στέρνο]	τομή του μυελού των οστών και/ή πρόσφατα αναρροφηθείς μυελός των οστών
αδένας του Harder			

Στην περίπτωση οργάνων σε ζεύγη, π.χ. νεφροί, επινεφρίδια, θα πρέπει να διατηρούνται αμφότερα τα όργανα. Βάσει των κλινικών και άλλων ευρημάτων, ενδέχεται να πρέπει να εξεταστούν επιπρόσθετοι ιστοί. Κάθε όργανο που, λόγω των γνωστών ιδιοτήτων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, θεωρείται πιθανό να αποτελεί όργανο-στόχο, πρέπει επίσης να διατηρείται. Σε μελέτες που περιλαμβάνουν χορήγηση μέσω του δέρματος, θα πρέπει να διατηρούνται τα όργανα που αναφέρονται στον κατάλογο οργάνων που πρέπει να διατηρούνται στις μελέτες χορήγησης από το στόμα, ενώ απαιτείται επίσης ειδική δειγματοληψία και διατήρηση δέρματος από το σημείο έκθεσης. Στις αναπνευστικές μελέτες, ο κατάλογος των προς διατήρηση και εξέταση ιστών της αναπνευστικής οδού θα πρέπει να συμμορφώνεται με τις συστάσεις των κεφαλαίων B.8 (8) και B.29 (9) του παρόντος παραρτήματος. Στην περίπτωση άλλων οργάνων/ιστών (επιπροσθέτως των συγκεκριμένων ιστών της αναπνευστικής οδού που πρέπει να διατηρούνται), θα πρέπει να εξετάζεται ο κατάλογος οργάνων που αναφέρεται στην περίπτωση μελετών έκθεσης μέσω του στόματος.

Ιστοπαθολογία

48. Διατίθεται καθοδήγηση σχετικά με τις βέλτιστες πρακτικές κατά τη διεξαγωγή μελετών τοξικολογικής παθολογίας (32). Ιστοπαθολογικές εξετάσεις πρέπει να διενεργούνται τουλάχιστον:

— σε όλους τους ιστούς της ομάδας υψηλής δόσης και της ομάδας των μαρτύρων,

— σε όλους τους ιστούς των ζώων που πέθαναν ή θανατώθηκαν κατά τη διάρκεια της μελέτης,

— σε όλους τους ιστούς που εμφανίζουν μακροσκοπικές ανωμαλίες,

— σε ιστούς-στόχο ή ιστούς που εμφάνισαν σχετικές με την αγωγή αλλαγές στην ομάδα υψηλής δόσης, από όλα τα ζώα σε όλες τις άλλες ομάδες δόσεων,

— στην περίπτωση οργάνων σε ζεύγη, π.χ. νεφροί, επινεφρίδια, θα πρέπει να εξετάζονται αμφότερα τα όργανα.

▼M4

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Στοιχεία

49. Θα πρέπει να παρέχονται δεδομένα για όλες τις παραμέτρους που αξιολογήθηκαν για κάθε ζώο χωριστά. Επιπλέον, όλα τα στοιχεία πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα ο οποίος περιλαμβάνει, για κάθε ομάδα αγωγής, τον αριθμό των ζώων κατά την έναρξη της αγωγής, τον αριθμό των ζώων που ευρέθησαν νεκρά κατά τη διάρκεια της αγωγής ή θανατώθηκαν για να μην ταλαιπωρηθούν, τον χρόνο θανάτου ή ευθανασίας, τον αριθμό των ζώων που εμφάνισαν εκδηλώσεις τοξικότητας, περιγραφή των παρατηρηθέντων τοξικών συμπτωμάτων, συμπεριλαμβανομένου του χρόνου εμφάνισής τους, της διάρκειας και της σοβαρότητάς τους, τον αριθμό των ζώων που παρουσίασαν αλλοιώσεις, το είδος των αλλοιώσεων και το ποσοστό των ζώων που εμφάνισαν καθέναν από τους τύπους αλλοιώσεων. Συνοπτικοί πίνακες στοιχείων θα πρέπει να αναφέρουν τις μέσες και τυπικές αποκλίσεις (όσον αφορά δεδομένα συνεχούς δοκιμής) που διαπιστώθηκαν σε ζώα που εμφάνισαν τοξικές επιδράσεις ή κακώσεις, καθώς και διαβάθμιση των κακώσεων.

50. Ιστορικά δεδομένα ελέγχου ενδέχεται να αποδειχθούν πολύτιμα για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της μελέτης, π.χ. στην περίπτωση που υπάρχουν ενδείξεις ότι τα δεδομένα που προκύπτουν από παράλληλους μάρτυρες αποκλίνουν σημαντικά σε σύγκριση με πρόσφατα δεδομένα από ζώα-μάρτυρες από την ίδια εγκατάσταση ελέγχου/αποικία. Εφόσον έχουν αξιολογηθεί, θα πρέπει να υποβάλλονται ιστορικά δεδομένα ελέγχου από το ίδιο εργαστήριο και να αφορούν ζώα της ίδιας ηλικίας και φυλής, τα οποία έχουν παραχθεί κατά τη διάρκεια των πέντε ετών που προηγήθηκαν της συγκεκριμένης μελέτης.

51. Όταν είναι δυνατόν, τα αριθμητικά αποτελέσματα αξιολογούνται με τη βοήθεια στατιστικής μεθόδου γενικής αποδοχής. Οι στατιστικές μέθοδοι και τα προς ανάλυση δεδομένα πρέπει να επιλέγονται κατά τον σχεδιασμό της μελέτης (παράγραφος 8). Η επιλογή θα πρέπει να προβλέπει διορθώσεις βάσει της επιβίωσης, εφόσον απαιτούνται.

Έκθεση δοκιμής

52. Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Ελεγχόμενη χημική ουσία:

— φυσική μορφή, καθαρότητα και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά,

— δεδομένα ταυτοποίησης,

— πηγή χημικής ουσίας,

— αριθμό παρτίδας,

— πιστοποιητικό χημικής ανάλυσης.

Φορέας (κατά περίπτωση):

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα (εάν δεν πρόκειται για νερό).

Για τα πειραματόζωα:

— είδος/φυλή που χρησιμοποιήθηκε και αιτιολόγηση της επιλογής,

— αριθμός, ηλικία και φύλο των ζώων στην αρχή της δοκιμής,

▼**M4**

— προέλευση, συνθήκες στέγασης, διατροφή κ.λπ.,

— βάρος κάθε ζώου κατά την έναρξη της δοκιμής.

Συνθήκες δοκιμής:

— αιτιολόγηση της οδού χορήγησης και της επιλογής δόσης,

— εφόσον έχουν χρησιμοποιηθεί, στατιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των δεδομένων,

— λεπτομερή στοιχεία της σύνθεσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας/του παρασκευάσματος του σιτηρεσίου,

— αναλυτικά στοιχεία για τη συγκέντρωση, τη σταθερότητα και την ομοιογένεια του παρασκευάσματος,

— οδός χορήγησης και λεπτομέρειες σχετικά με τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας,

— στην περίπτωση αναπνευστικών μελετών, εάν αφορούσαν ρινική ή ολόσωμη έκθεση,

— πραγματικές δόσεις (mg/kg βάρους σώματος/ημέρα) και συντελεστής μετατροπής της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην τροφή ή το πόσιμο νερό (mg/kg ή ppm) σε πραγματική δόση, εφόσον είναι εφικτό,

— λεπτομέρειες σχετικά με την ποιότητα της τροφής και του νερού.

Αποτελέσματα (θα πρέπει να παρουσιάζονται συνοπτικά δεδομένα σε πίνακα και δεδομένα για το κάθε ζώο):

— δεδομένα επιβίωσης,

— βάρος του σώματος/μεταβολές βάρους σώματος,

— κατανάλωση τροφής, υπολογισμοί απόδοσης τροφής, εάν έχουν γίνει, και κατανάλωση νερού, κατά περίπτωση,

— δεδομένα τοξικής απόκρισης κατά φύλο και επίπεδο δόσης, συμπεριλαμβανομένων των τοξικών εκδηλώσεων,

— φύση, συχνότητα (και σοβαρότητα, εάν έχει αξιολογηθεί) και διάρκεια των κλινικών παρατηρήσεων (εάν είναι παροδικές ή μόνιμες),

— οφθαλμολογική εξέταση,

— αιματολογικές εξετάσεις,

— βιοχημικές εξετάσεις,

— αναλύσεις ούρων,

— αποτέλεσμα ενδεχόμενων εξετάσεων νευροτοξικότητας ή ανοσοτοξικότητας,

— τελικό βάρος σώματος,

— βάρος οργάνων (και λόγος βάρους οργάνων/σώματος, κατά περίπτωση),

— ευρήματα νεκροψίας,

— αναλυτική περιγραφή όλων των σχετικών με την αγωγή ιστοπαθολογικών ευρημάτων,

— δεδομένα για την απορρόφηση, εφόσον διατίθενται.

▼**M4**

Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, κατά περίπτωση.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων, συμπεριλαμβανομένων των εξής:

— σχέσεις δόσης-απόκρισης,

— συνεκτίμηση τυχόν πληροφοριών για τον τρόπο δράσης της ουσίας,

— συζήτηση τυχόν προσεγγίσεων μοντελοποίησης,

— προσδιορισμός τιμών δόσης αναφοράς, NOAEL ή LOAEL,

— ιστορικά δεδομένα ελέγχου,

— σημασία για τον άνθρωπο.

Συμπεράσματα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) OECD (1995), Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) Combes R.D., Gaunt I., Balls M. (2004), A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System, *ATLA* 32: 163-208.

(3) Barlow S.M., Greig J.B., Bridges J.W. et al. (2002), Hazard identification by methods of animal-based toxicology, *Food. Chem. Toxicol.* 40, 145-191.

(4) Chhabra R.S., Bucher J.R., Wolfe M., Portier C. (2003), Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 206: 437-445.

(5) Chapter B.27 of this Annex, Sub-chronic Oral Toxicity Test Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Non-Rodents.

(6) OECD (2012), Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, διαθέσιμο στον δημόσιο ιστότοπο του ΟΟΣΑ για τις κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών, στη διεύθυνση www.oecd.org/env/testguidelines

(7) OECD (2009), Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment N°39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(8) Κεφάλαιο B.8 του παρόντος παραρτήματος: Υποξεία αναπνευστική τοξικότητα: μελέτη 28 ημερών.

(9) Κεφάλαιο B.29 του παρόντος παραρτήματος: Υποχρόνια αναπνευστική τοξικότητα: μελέτη 90 ημερών.

(10) Κεφάλαιο B.9 του παρόντος παραρτήματος: Τοξικότητα επαναλαμβανόμενης (28 ημέρες) δόσης (δερματική).

(11) Carmichael N.G., Barton H.A., Boobis A.R. et al. (2006), Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements, *Critical Reviews in Toxicology* 36: 1-7.

(12) Barton H.A., Pastoor T.P., Baetcke T. et al. (2006), The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, *Critical Reviews in Toxicology* 36: 9-35.

(13) Doe J.E., Boobis A.R., Blacker A. et al. (2006), A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment, *Critical Reviews in Toxicology* 36: 37-68.

▼M4

(14) Cooper R.L., Lamb J.S., Barlow S.M. et al. (2006), A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment, *Critical Reviews in Toxicology* 36: 69-98.

(15) OECD (2002), Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

(16) OECD (2000), Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(17) Rhomberg L.R., Baetcke K., Blancato J., Bus J., Cohen S., Conolly R., Dixit R., Doe J., Ekelman K., Fenner-Crisp P., Harvey P., Hattis D., Jacobs A., Jacobson-Kram D., Lewandowski T., Liteplo R., Pelkonen O., Rice J., Somers D., Turturro A., West W., Olin S. (2007), Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection, *Crit Rev. Toxicol.* 37 (9): 729-837.

(18) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997), Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(19) Οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 22ας Σεπτεμβρίου 2010, περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς (ΕΕ L 276 της 20.10.2010, σ. 33).

(20) National Research Council (1985), Guide for the care and use of laboratory animals, NIH Publication No. 86-23, Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

(21) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988), Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments, ISBN 3-906255-04-2.

(22) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006), Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(23) Diehl K.-H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J.-M., van de Vorstenbosch C. (2001), A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes, *Journal of Applied Toxicology* 21:15-23.

(24) IPCS (1986), Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(25) Tupper D.E., Wallace R.B. (1980), Utility of the Neurologic Examination in Rats, *Acta Neurobiol. Exp.* 40: 999-1003.

(26) Gad S.C. (1982), A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology, *J. Toxicol.Environ. Health* 9: 691-704.

(27) Moser V.C., McDaniel K.M., Phillips P.M. (1991), Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108: 267-283.

(28) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979), A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice, *Neurobehav. Toxicol.* 1: 233-236.

(29) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991), Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments, *Neurotoxicol. Teratol.* 13: 599-609.

▼**M4**

(30) Weingand K., Brown G., Hall R. et al. (1996), Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies, *Fundam. & Appl. Toxicol.* 29: 198-201.

(31) EMEA (draft) document «Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity» (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(32) Crissman J.W., Goodman D.G., Hildebrandt P.K. et al. (2004), Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32: 126-131, Προσάρτημα 1.

▼**M4**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΣ

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών..

▼B

B.31. **ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

Η παρούσα μέθοδος αποτελεί αναπαραγωγή της OECD TG 414 (2001).

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μέθοδος ελέγχου της τοξικότητας στην ανάπτυξη έχει σχεδιαστεί για την παροχή γενικών πληροφοριών σχετικά με τις επιπτώσεις της προγεννητικής έκθεσης στο κυοφορούν υπό δοκιμασία ζώο και στον οργανισμό που αναπτύσσεται στη μήτρα στις πληροφορίες αυτές μπορεί να περιλαμβάνονται αξιολόγηση των επιπτώσεων στην μητέρα, καθώς και τυχόν θάνατος, ανατομικές ανωμαλίες ή μη φυσιολογική αύξηση του εμβρύου. Οι λειτουργικές ανεπάρκειες, αν και σημαντικό μέρος της ανάπτυξης, δεν εντάσσονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμής. Αυτές μπορούν να ελεγχθούν σε ξεχωριστή μελέτη ή ως συμπλήρωμα της παρούσας μελέτης χρησιμοποιώντας τη μέθοδο δοκιμής για τη νευροτοξικότητα στην ανάπτυξη. Για τη λήψη πληροφοριών σχετικά με τον έλεγχο των λειτουργικών ανεπαρκειών και άλλων μεταγεννητικών επιπτώσεων, θα πρέπει να εξετάζεται η εφαρμογή της μεθόδου δοκιμής για τη μελέτη της τοξικότητας στην αναπαραγωγή σε δύο γενεές και για τη μελέτη της νευροτοξικότητας στην ανάπτυξη, ανάλογα.

Η παρούσα μέθοδος δοκιμής μπορεί να χρειάζεται κάποια ιδιαίτερη προσαρμογή σε επιμέρους περιπτώσεις με βάση κάποιες ειδικές γνώσεις για π.χ. τις φυσικοχημικές ή τοξικολογικές ιδιότητες της υπό δοκιμή ουσίας. Η προσαρμογή αυτή είναι αποδεκτή, όταν υπάρχουν πειστικές επιστημονικές ενδείξεις ότι η προσαρμογή θα οδηγήσει σε δοκιμή με δυνατότητες παροχής περισσότερων, πληροφοριών. Σε μια τέτοια περίπτωση, οι επιστημονικές αυτές ενδείξεις θα πρέπει να τεκμηριώνονται προσεκτικά στην έκθεση της μελέτης.

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

Αναπτυξιακή τοξικολογία: η μελέτη των δυσμενών επιδράσεων στον αναπτυσσόμενο οργανισμό, που μπορεί να προκύψουν από την έκθεση πριν από τη σύλληψη, κατά τη διάρκεια της προγεννητικής ανάπτυξης ή μεταγεννητικώς μέχρι την εποχή της σεξουαλικής ωρίμανσης. Στις σημαντικότερες εκδηλώσεις της τοξικότητας στην ανάπτυξη περιλαμβάνονται 1) ο θάνατος του οργανισμού, 2) ανατομικές ανωμαλίες, 3) μη φυσιολογική αύξηση του οργανισμού και 4) λειτουργική ανεπάρκεια. Η αναπτυξιακή τοξικολογία αναφερόταν συχνά στο παρελθόν ως τερατολογία.

Δυσμενής επίδραση: κάθε αλλαγή σε σχέση με το φυσιολογικό επίπεδο, η οποία επέρχεται ως αποτέλεσμα της έκθεσης και η οποία μειώνει την ικανότητα επιβίωσης, αναπαραγωγής ή προσαρμογής στο περιβάλλον ενός οργανισμού. Σε σχέση με την αναπτυξιακή τοξικολογία, λαμβανόμενη στην ευρεία της έννοια, ο ορισμός αυτός περιλαμβάνει κάθε επίδραση η οποία παρεμβαίνει στη φυσιολογική ανάπτυξη του κυήματος, τόσο πριν όσο και μετά τη γέννηση.

Μη φυσιολογική αύξηση: ανωμαλίες στο βάρος ή στο μέγεθος των οργάνων ή του βάρους των γόνων.

Αλλοιώσεις **(ανωμαλίες):** ανατομικές αλλοιώσεις στην ανάπτυξη, στις οποίες περιλαμβάνονται τόσον οι δυσπλασίες όσο και οι παρεκκλίσεις (28).

Δυσπλασία/Μείζων ανωμαλία: Ανατομική διαφορά που θεωρείται ως επιζήμια για το ζώο (μπορεί να είναι και θανατηφόρα) και είναι, συνήθως, σπάνια

▼B

Παρέκκλιση/Ησσων ανωμαλία: Ανατομική διαφορά που θεωρείται ότι έχει μικρή ή μη επιζήμια επίδραση στο ζώο. Μπορεί να έχει μεταβατικό χαρακτήρα και να εμφανίζεται σχετικά συχνά στον πληθυσμό-μάρτυρα.

Κύημα: το σύνολο των παραγώγων ενός γονιμοποιημένου ωαρίου σε οποιοδήποτε στάδιο της ανάπτυξης από τη γονιμοποίηση μέχρι τη γέννηση, συμπεριλαμβανομένων των εξωεμβρυϊκών μεμβρανών, καθώς και του ίδιου του εμβρύου.

Εμφύτευση: προσκόλληση της βλαστικής κύστεως στο επιθήλιο της μήτρας, συμπεριλαμβανομένης της διείσδυσής του σε αυτό και της εγκατάστασής του στο ενδομήτριο.

Έμβρυο: το αρχικό ή αναπτυξιακό στάδιο οποιουδήποτε οργανισμού, ιδιαίτερα του αναπτυσσόμενου προϊόντος της γονιμοποίησης ενός ωού μετά την εμφάνιση του μακρού άξονα και μέχρι να παρουσιαστούν όλες οι βασικές δομές.

Εμβρυοτοξικότητα: επιβλαβής επίδραση στη φυσιολογική δομή, ανάπτυξη, αύξηση και/ή βιωσιμότητα ενός εμβρύου.

Διαμορφωμένο έμβρυο: ο αγέννητος γόνος κατά την μετεμβρυϊκή περίοδο.

Μετεμβρυοτοξικότητα: επιβλαβής επίδραση στη φυσιολογική δομή, ανάπτυξη, αύξηση και/ή βιωσιμότητα ενός διαμορφωμένου εμβρύου.

Αποβολή: η πρώιμη εκβολή από τη μήτρα των προϊόντων της σύλληψης: του εμβρύου ή μη βιώσιμου διαμορφωμένου εμβρύου.

Απορρόφηση: κύημα το οποίο, αφού εμφυτεύθηκε στη μήτρα, στη συνέχεια πέθανε και απορροφάται ή έχει απορροφηθεί.

Πρώιμη απορρόφηση: ενδείξεις εμφύτευσης χωρίς αναγνωρίσιμο έμβρυο/διαμορφωμένο έμβρυο

Όψιμη απορρόφηση: νεκρό έμβρυο ή διαμορφωμένο έμβρυο με εξωτερικές εκφυλιστικές διαφορές

NOAEL: συντομογραφία του no-observed-adverse-effect-level (επίπεδο μη παρατήρησης δυσμενών επιδράσεων). Είναι η μέγιστη δόση ή επίπεδο έκθεσης όπου δεν παρατηρούνται δυσμενή ευρήματα σχετικά με την αγωγή.

1.3 ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Καμμία.

1.4 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Κανονικά, η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται σε κυοφορούντα ζώα από την εμφύτευση μέχρι μία ημέρα πριν από την προγραμματισμένη θανάτωση, η οποία θα πρέπει να είναι όσο το δυνατό πλησιέστερα στην κανονική ημέρα του τοκετού χωρίς, όμως, να τίθεται υπό κίνδυνο η απώλεια δεδομένων από πρόωρο τοκετό. Η μέθοδος δοκιμής δεν αποσκοπεί αποκλειστικά στην εξέταση της περιόδου της οργανογένεσης (π.χ. 5-15η ημέρα στα τρωκτικά και 6-18η ημέρα στα κουνέλια) αλλά ξεκινά από την προεμφύτευση, όπου γίνεται, και καλύπτει όλη την περίοδο της κύησης μέχρι την ημέρα πριν από την καισαρική τομή. Λίγο πριν από την καισαρική τομή, τα θηλυκά θανατώνονται, το περιεχόμενο της μήτρας εξετάζεται και τα έμβρυα αξιολογούνται από πλευράς ορατών εξωτερικά ανωμαλιών και διαφορών στους μαλακούς ιστούς και στο σκελετό.

▼B

1.5 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.5.1 **Επιλογή του είδους του ζώου**

Συνιστάται η δοκιμή να γίνεται στο πλέον σχετικό είδος και να χρησιμοποιούνται τα εργαστηριακά είδη και φυλές που χρησιμοποιούνται συνήθως σε δοκιμές προγεννητικής τοξικότητας στην ανάπτυξη. Το προτιμούμενο είδος τρωκτικού είναι ο επίμυς και το προτιμούμενο είδος μη τρωκτικού είναι του κουνέλι. Εάν χρησιμοποιηθεί κάποιο άλλο είδος, θα πρέπει να παρέχεται και σχετική αιτιολόγηση.

1.5.2 **Συνθήκες στέγασης και διατροφής**

Η θερμοκρασία στο θάλαμο πειραματισμού των ζώων θα πρέπει να είναι 22 °C (± 3°) για τα τρωκτικά και 18 °C (± 3°) για τα κουνέλια. Αν και η σχετική υγρασία θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 % εκτός κατά τη διάρκεια του καθαρισμού του θαλάμου, στόχος θα πρέπει να είναι μια υγρασία 50-60 %. Ο φωτισμός θα πρέπει να είναι τεχνητός, με εναλλαγή 12 ωρών φωτός και 12 ωρών σκότους. Για τη διατροφή, μπορούν να χρησιμοποιούνται συνήθεις εργαστηριακές δίαιτες με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού.

Οι διαδικασίες του ζευγαρώματος θα πρέπει να γίνονται σε κλουβιά κατάλληλα για το σκοπό αυτό. Αν και προτιμάται τα ζώα που ζευγαρώνουν να είναι μόνα τους σε ένα κλουβί, η ομαδική συστέγαση σε μικρούς αριθμούς είναι και αυτή αποδεκτή.

1.5.3 **Προετοιμασία των ζώων**

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή ζώα, τα οποία να έχουν εγκλιματιστεί στις εργαστηριακές συνθήκες για 5 ημέρες τουλάχιστον και να μην έχουν υποβληθεί σε προηγούμενες πειραματικές διαδικασίες. Τα υπό δοκιμή ζώα θα πρέπει να χαρακτηρίζονται ως προς το είδος, τη φυλή, την προέλευση, το φύλο, το βάρος και/ή την ηλικία. Τα ζώα όλων των υπό δοκιμή ομάδων θα πρέπει, κατά το δυνατόν, να έχουν ομοιόμορφο βάρος και ηλικία. Σε κάθε επίπεδο δόσης, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται νεαρά ενήλικα άτοκα θηλυκά ζώα. Τα θηλυκά θα πρέπει να ζευγαρώνουν με αρσενικά του ίδιου είδους και φυλής, ενώ θα πρέπει να αποφεύγεται το ζευγάρωμα αμφιθαλών ατόμων. Για τα τρωκτικά, ημέρα 0 της κύησης είναι η ημέρα κατά την οποία παρατηρούνται κολπικό βύσμα και/ή σπέρμα. Για τα κουνέλια, ημέρα 0 είναι συνήθως η ημέρα της συνουσίας ή της τεχνητής έγχυσης σπέρματος, εφόσον χρησιμοποιείται η τεχνική αυτή. Τα ζευγαρωμένα θηλυκά θα πρέπει να εντάσσονται με τυχαίο τρόπο στις ομάδες μαρτυρίας και δοκιμής. Τα κλουβιά θα πρέπει να τοποθετούνται με τέτοιο τρόπο ώστε να ελαχιστοποιείται το ενδεχόμενο επιδράσεων λόγω της θέσης των κλουβιών. Σε κάθε ζώο θα πρέπει να δίνεται ένας αποκλειστικός αριθμός αναγνώρισης. Τα ζευγαρωμένα θηλυκά θα πρέπει να εντάσσονται με τυχαίο τρόπο στις ομάδες μαρτυρίας και δοκιμής και, εάν τα θηλυκά είναι ζευγαρωμένα σε παρτίδες, τα ζώα σε κάθε παρτίδα θα πρέπει να κατανέμονται ομοιόμορφα στις ομάδες. Ομοίως, τα θηλυκά που έχουν γονιμοποιηθεί με τεχνητή έγχυση από το ίδιο αρσενικό, θα πρέπει να κατανέμονται ομοιόμορφα στις ομάδες.

1.6 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.6.1 **Αριθμός και φύλο των ζώων**

Κάθε ομάδα δοκιμής και μαρτυρίας θα πρέπει να περιλαμβάνει επαρκή αριθμό θηλυκών ώστε κατά τη νεκροψία να υπάρχουν 20 περίπου θηλυκά με εμφυτεύσεις. Ομάδες με λιγότερα από 16 ζώα με εμφυτεύσεις μπορεί να μην είναι κατάλληλες. Η θνησιμότητα των μητέρων δεν ακυρώνει κατ' ανάγκη τη μελέτη, υπό την προϋπόθεση ότι δεν υπερβαίνει το 10 % περίπου.

▼B

1.6.2 **Ετοιμασία των δόσεων**

Εάν, για τη διευκόλυνση της παροχής της ουσίας, χρησιμοποιείται φορέας ή άλλο πρόσθετο, θα πρέπει να εξετάζονται τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: οι επιδράσεις στην απορρόφηση, την κατανομή, το μεταβολισμό και την κατακράτηση ή απέκκριση της υπό δοκιμή ουσίας, οι επιδράσεις στις χημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή ουσίας που μπορεί να μεταβάλουν τις τοξικές της ιδιότητες και οι επιδράσεις στην κατανάλωση τροφής ή νερού ή της διατροφικής κατάστασης των ζώων. Ο φορέας δεν θα πρέπει να παρουσιάζει τοξικές επιδράσεις στην ανάπτυξη, ούτε επιδράσεις στην αναπαραγωγή.

1.6.3 **Δοσολογία**

Κανονικά, η υπό δοκιμή ουσία θα πρέπει να χορηγείται καθημερινά από την εμφύτευση (π.χ., την 5η ημέρα από το ζευγάρωμα) μέχρι την ημέρα πριν από την προγραμματιζόμενη καισαρική τομή. Εάν, από υφιστάμενες προκαταρκτικές μελέτες, δεν φαίνεται να υπάρχουν ιδιαίτερες πιθανότητες προεμφυτευτικών απωλειών, η αγωγή μπορεί να επεκταθεί ώστε να συμπεριληφθεί ολόκληρη η περίοδος της κύησης, από το ζευγάρωμα μέχρι την ημέρα πριν από την προγραμματισμένη θανάτωση. Είναι γνωστό ότι τυχόν ακατάλληλοι χειρισμοί ή καταπονήσεις κατά τη διάρκεια της κύησης μπορεί να απολήξουν σε προγεννητικές απώλειες. Για την αποφυγή προγεννητικών απωλειών από παράγοντες που δεν σχετίζονται με την αγωγή, θα πρέπει να αποφεύγονται μη αναγκαίοι χειρισμοί των εγκύων ζώων καθώς και καταπονήσεις από εξωτερικούς παράγοντες όπως π.χ. οι θόρυβοι.

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τρία τουλάχιστον επίπεδα δόσεων και ένας συντρέχων μάρτυρας. Τα υγιή ζώα θα πρέπει να εντάσσονται αβίαστα στις ομάδες μαρτυρίας και δοκιμής. Τα επίπεδα των δόσεων θα πρέπει να είναι κλιμακωμένα έτσι ώστε να επέρχεται μια διαβάθμιση των τοξικών επιδράσεων. Εκτός κι αν υπάρχουν περιορισμοί λόγω της φυσικής/χημικής φύσεως ή των βιολογικών ιδιοτήτων της υπό δοκιμή ουσίας, η μέγιστη δόση θα πρέπει να επιλέγεται με στόχο να προκαλεί κάποια τοξική δράση στην ανάπτυξη και/ή την μητέρα (κλινικά σημεία ή μείωση στο βάρος του σώματος) αλλά όχι θάνατο ή σοβαρή ταλαιπωρία. Ένα τουλάχιστον ενδιάμεσο επίπεδο δόσης θα πρέπει να επιφέρει κάποια ελάχιστα αντιληπτά τοξικά αποτελέσματα. Το μικρότερο επίπεδο δόσης δεν θα πρέπει να παρέχει οποιαδήποτε ένδειξη τοξικής δράσης στη μητέρα ή στην ανάπτυξη του εμβρύου. Θα πρέπει να επιλέγεται μια φθίνουσα σειρά επιπέδων δόσεων με σκοπό να γίνεται αντιληπτή κάθε απόκριση σχετική με τη δοσολογία και το επίπεδο μη παρατήρησης δυσμενών επιδράσεων (NOAEL). Για τη διαμόρφωση της φθίνουσας σειράς επιπέδων δόσεων, ο καλύτερος συχνά τρόπος είναι η χρησιμοποίηση διπλών ή τετραπλών διαστημάτων, ενώ η προσθήκη μιας τέταρτης ομάδας δοκιμής είναι συχνά προτιμότερη από τη χρησιμοποίηση πολύ μεγάλων διαστημάτων (π.χ. με συντελεστή άνω του 10) μεταξύ των δόσεων. Αν και στόχος είναι ο προσδιορισμός ενός μητρικού NOAEL, μπορούν να γίνουν δεκτές και μελέτες που δεν προσδιορίζουν ένα τέτοιο επίπεδο (1).

Τα επίπεδα δόσεων θα πρέπει να επιλέγονται λαμβάνοντας υπόψη όλα τα υπάρχοντα δεδομένα τοξικότητας καθώς και πρόσθετα στοιχεία για το μεταβολισμό και την τοξικοκινητικότητα της υπό δοκιμή ουσίας ή συναφών ουσιών. Τα στοιχεία αυτά βοηθούν επίσης και στην κατάδειξη της καταλληλότητας της δοσολογικής αγωγής.

Θα πρέπει να χρησιμοποιείται μια συντρέχουσα ομάδα μαρτύρων. Η ομάδα αυτή θα πρέπει να συνίσταται σε μια κατ' επίφαση υποβληθείσα σε αγωγή ομάδα μαρτύρων ή ομάδα με μάρτυρες στους οποίους έχει χορηγηθεί φορέας εφόσον, για τη χορήγηση της υπό δοκιμή ουσίας, χρησιμοποιείται φορέας. Σε όλες τις ομάδες θα πρέπει να χορηγείται η ίδια ποσότητα ουσίας υπό δοκιμή ή φορέα. Η μεταχείριση των ζώων στην ή στις ομάδες μαρτύρων θα πρέπει να είναι ίδια με εκείνη των ζώων των ομάδων δοκιμής. Στις ομάδες μαρτυρίας με χρήση φορέα, ο φορέας θα πρέπει να χορηγείται στη μέγιστη χρησιμοποιούμενη ποσότητα (όπως και στην ομάδα αγωγής με τη χαμηλότερη δόση).

▼B

1.6.4 **Δοκιμή ορίου**

Εάν δοκιμή με ένα μόνο επίπεδο δόσης τουλάχιστον 1 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα από το στόμα, χρησιμοποιώντας τις διαδικασίες που περιγράφονται για την παρούσα μελέτη, δεν εμφανίζει κάποια αντιληπτή τοξική δράση στα κυοφορούντα ζώα ή στους γόνους τους και εφόσον, από τα υφιστάμενα δεδομένα (π.χ. από ουσίες με παρόμοια δομή και/ή μεταβολισμό), δεν αναμένεται η εμφάνιση τέτοιας δράσης, τότε μπορεί να κριθεί ως μη αναγκαία η διενέργεια πλήρους μελέτης με τρία επίπεδα δόσεων. Από την αναμενόμενη έκθεση του ανθρώπου μπορεί να εκπορευθεί η ανάγκη χρησιμοποίησης υψηλότερου επιπέδου δόσης από το στόμα στη δοκιμή ορίου. Σε άλλους τρόπους χορήγησης, όπως η εισπνοή ή η δερματική επίθεση, από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή ουσίας μπορεί, συχνά, να υπάρχουν κάποιες ενδείξεις ή περιορισμοί ως προς το μέγιστο εφικτό επίπεδο έκθεσης (π.χ., η δερματική επίθεση δεν θα πρέπει να προκαλεί σοβαρή τοπική τοξικότητα).

1.6.5 **Χορήγηση δόσεων**

Η υπό δοκιμή ουσία ή φορέας χορηγείται, συνήθως, από το στόμα με διασωλήνωση. Εάν χρησιμοποιηθεί κάποια άλλη οδός χορήγησης, ο ερευνητής θα πρέπει να αναφέρει τους λόγους και να αιτιολογεί την επιλογή του, ενώ μπορεί να χρειάζονται κάποιες κατάλληλες τροποποιήσεις (2)(3)(4). Η υπό δοκιμή ουσία θα πρέπει να χορηγείται την ίδια ώρα περίπου κάθε μέρα.

Η δόση στα επιμέρους ζώα θα πρέπει κανονικά να βασίζεται στον πλέον πρόσφατο προσδιορισμό του βάρους του σώματος κάθε ζώου. Ωστόσο, θα πρέπει να δίδεται ιδιαίτερη προσοχή όταν η προσαρμογή της δόσης γίνεται κατά τη διάρκεια του τελευταίου τριμήνου της κυήσεως. Για την επιλογή των δόσεων θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υφιστάμενα δεδομένα για την παρεμπόδιση εμφάνισης φαινομένων υπερβολικής τοξικότητας στη μητέρα. Ωστόσο, εάν στις υπό αγωγή μητέρες παρατηρηθούν φαινόμενα υπερβολικής τοξικότητας, τα ζώα αυτά θα πρέπει να θανατώνονται με ανθρωπιστικό τρόπο. Εάν κάποια κυοφορούντα ζώα δείχνουν σημεία υπερβολικής τοξικότητας, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα τερματισμού της δοκιμή στη δοσολογική αυτή ομάδα. Όταν η ουσία χορηγείται με καθετήρα δια του στόματος, αυτή θα πρέπει κατά προτίμηση να δίδεται ως εφάπαξ δόση στα ζώα χρησιμοποιώντας στομαχικό σωλήνα ή κατάλληλο σωλήνα διασωλήνωσης. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγείται άπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του υπό δοκιμή ζώου. Ο όγκος δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 1 ml/100 g βάρους σώματος, εκτός στην περίπτωση υδατικών διαλυμάτων όπου μπορούν να χρησιμοποιούνται 2 ml/100 g βάρους σώματος. Όταν ως φορέας χρησιμοποιείται αραβοσιτέλαιο, ο όγκος δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 0,4 ml/100 g βάρους σώματος. Η διακύμανση στον όγκο δοκιμής θα πρέπει να ελαχιστοποιείται προσαρμόζοντας τις συγκεντρώσεις ώστε να διασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλα τα επίπεδα δόσεων.

1.6.6 **Παρατήρηση των μητέρων**

Μια φορά τουλάχιστον την ημέρα θα πρέπει να γίνονται και να καταγράφονται κλινικές παρατηρήσεις, κατά . προτίμηση την ίδια ή τις ίδιες χρονικές στιγμές κάθε μέρα, λαμβάνοντας υπόψη την περίοδο κορύφωσης των προβλεπόμενων επιδράσεων μετά τη χορήγηση. Η κατάσταση των ζώων θα πρέπει να καταγράφεται συμπεριλαμβανομένης της θνησιμότητας, των ετοιμοθάνατων, των σχετικών αλλαγών στη συμπεριφορά και όλων των σημείων έκδηλης τοξικότητας.

1.6.7 **Βάρος σώματος και κατανάλωση τροφής**

Τα ζώα θα πρέπει να ζυγίζονται την ημέρα 0 της κυήσεως ή το αργότερο την 3η ημέρα της κυήσεως εάν τα ζώα που ζευγαρώνουν τα προμηθεύει εξωτερικός τροφέας, την πρώτη ημέρα της χορήγησης, τουλάχιστον κάθε 3 ημέρες κατά τη διάρκεια της περιόδου χορήγησης και την ημέρα της προγραμματισμένης θανάτωσης.

▼B

Η κατανάλωση τροφής θα πρέπει να καταγράφεται ανά διαστήματα τριών ημερών και θα πρέπει να συμπίπτει με τις ημέρες προσδιορισμού του βάρους του σώματος.

1.6.8 **Μεταθανάτιος εξέταση**

Τα θηλυκά θα πρέπει να θανατώνονται μια ημέρα πριν από την αναμενόμενη ημέρα του τοκετού. Θηλυκά τα οποία εμφανίζουν σημεία αποβολής ή προώρου τοκετού πριν από την προγραμματισμένη θανάτωση θα πρέπει να θανατώνονται και να υποβάλλονται σε επισταμένη μακροσκοπική εξέταση.

Σε περίπτωση τερματισμού ή θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης, η μητέρα θα πρέπει να εξετάζεται μακροσκοπικά για τυχόν ανατομικές ανωμαλίες ή παθολογικές αλλαγές. Η αξιολόγηση των μητέρων κατά τη διάρκεια της καισαρικής τομής και οι μεταγενέστερες αναλύσεις του διαμορφωμένου εμβρύου θα πρέπει να διεξάγονται κατά προτίμηση χωρίς να είναι γνωστή η ομάδα δοκιμής για την ελαχιστοποίηση μεροληπτικών συμπερασμάτων.

1.6.9 **Εξέταση του περιεχομένου της μήτρας**

Αμέσως μετά τον τερματισμό ή το συντομότερο δυνατό μετά το θάνατο, οι μήτρες θα πρέπει να αφαιρούνται και να διαπιστώνεται η κατάσταση κυήσεως των ζώων. Μήτρες που δεν εμφανίζονται σε έγγυο κατάσταση θα πρέπει να εξετάζονται περαιτέρω (π.χ. με χρώση θειούχου αμμωνίου για τα τρωκτικά και με χρώση Salewski ή κατάλληλη εναλλακτική μέθοδο για τα κουνέλια) για την επιβεβαίωση της μη εγγύου καταστάσεως (5).

Οι έγγυοι μήτρες, συμπεριλαμβανομένου του τραχήλου, θα πρέπει να ζυγίζονται. Βάρη εγγύων μητρών δεν θα πρέπει να λαμβάνονται από ζώα που ανευρέθησαν νεκρά κατά τη διάρκεια της μελέτης.

Στα έγγυα ζώα θα πρέπει να προσδιορίζεται ο αριθμός των ωχρών σωματίων.

Το περιεχόμενο των μητρών θα πρέπει να εξετάζεται ως προς τον αριθμό των θανάτων εμβρύων ή διαμορφωμένων εμβρύων και βιώσιμων διαμορφωμένων εμβρύων. Θα πρέπει να περιγράφεται ο βαθμός της απορρόφησης για να εκτιμάται ο σχετικός χρόνος θανάτου του κυήματος (βλέπε τμήμα 1.2).

1.6.10 **Εξέταση διαμορφωμένων εμβρύων**

Θα πρέπει να προσδιορίζεται το φύλο και το σωματικό βάρος κάθε διαμορφωμένου εμβρύου.

Κάθε διαμορφωμένο έμβρυο θα πρέπει να εξετάζεται για εξωτερικές αλλοιώσεις (6).

Τα διαμορφωμένα έμβρυα θα πρέπει να εξετάζονται για σκελετικές αλλοιώσεις και αλλοιώσεις του μαλακού ιστού (π.χ. παρεκκλίσεις και δυσπλασίες ή ανωμαλίες) (7)(8)(9)(10)(11)(12)(13)(14)(15)(16)(17)(18)(19)(20) (21)(22)(23)(24). Είναι επιθυμητή, αλλά όχι και απαιτητή, η κατηγοριοποίηση των αλλοιώσεων των διαμορφωμένων εμβρύων. Εφόσον γίνει κατηγοριοποίηση, θα πρέπει να δηλώνονται σαφώς τα κριτήρια καθορισμού κάθε κατηγορίας. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίνεται στο αναπαραγωγικό σύστημα, το οποίο θα πρέπει να εξετάζεται για τυχόν ύπαρξη σημείων ανώμαλης ανάπτυξης.

Στην περίπτωση των τρωκτικών, θα πρέπει να ετοιμάζεται και να εξετάζεται το ήμισυ κάθε γέννας για σκελετικές αλλοιώσεις. Τα υπόλοιπα θα πρέπει να ετοιμάζονται και να εξετάζονται για αλλοιώσεις του μαλακού ιστού, χρησιμοποιώντας αποδεκτές ή κατάλληλες μεθόδους σειριακής τομής ή προσεκτικές τεχνικές αδρής εκτομής.

▼B

Στην περίπτωση μη τρωκτικών, π.χ. κουνέλια, όλα τα διαμορφωμένα έμβρυα θα πρέπει να εξετάζονται τόσο για σκελετικές, όσο και για αλλοιώσεις του μαλακού ιστού. Τα σώματα των διαμορφωμένων αυτών εμβρύων αξιολογούνται με προσεκτική εκτομή για τυχόν αλλοιώσεις του μαλακού ιστού, συμπεριλαμβανομένων ενδεχομένως και διαδικασιών για περαιτέρω αξιολόγηση της εσωτερικής καρδιακής κατασκευής (25). Τα κεφάλια του ημίσεος αριθμού τών διαμορφωμένων εμβρύων που εξετάζονται με τον τρόπο αυτό θα πρέπει να αφαιρούνται και να υποβάλλονται σε επεξεργασία για αξιολόγηση τυχόν αλλοιώσεων του μαλακού ιστού (συμπεριλαμβανομένων των οφθαλμών, του εγκεφάλου, των ρινικών διόδων και της γλώσσας), χρησιμοποιώντας τυποποιημένες μεθόδους σειριακής τομής (26) ή κάποια εξίσου ευαίσθητη μέθοδο. Τα σώματα των διαμορφωμένων αυτών εμβρύων και τα υπόλοιπα άθικτα διαμορφωμένα έμβρυα θα πρέπει να υποβάλλονται σε επεξεργασία και να εξετάζονται για σκελετικές αλλοιώσεις, χρησιμοποιώντας τις ίδιες μεθόδους με εκείνες που περιγράφτηκαν για τα τρωκτικά.

2 ΔΕΔΟΜΕΝΑ

2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα δεδομένα θα αναφέρονται κατ' άτομο για τις μητέρες καθώς και για τους γόνους τους και θα συνοψίζονται σε μορφή πινάκων, εμφαίνοντας για κάθε ομάδα δοκιμής τον. αριθμό των ζώων στην αρχή της δοκιμής, τον αριθμό των ζώων που βρέθηκαν νεκρά κατά τη διάρκεια της δοκιμής ή θανατώθηκαν για ανθρωπιστικούς λόγους, τη χρονική στιγμή κάθε θανάτου ή ανθρωπιστικής θανάτωσης, τον αριθμό των εγγύων θηλυκών, τον αριθμό των ζώων που εμφάνισαν σημεία τοξικότητας, μια περιγραφή των παρατηρηθέντων σημείων τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένης της χρονικής στιγμής εμφάνισης, της διάρκειας και της σοβαρότητας κάθε τοξικού αποτελέσματος, τους τύπους των παρατηρήσεων στα έμβρυα/διαμορφωμένα έμβρυα και κάθε σχετικό στοιχείο για τις γέννες.

Τα αριθμητικά αποτελέσματα θα πρέπει να αξιολογούνται με κατάλληλη στατιστική μέθοδο χρησιμοποιώντας τη γέννα ως μονάδα για ανάλυση δεδομένων. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται μια γενικώς αποδεκτή στατιστική μέθοδος. Οι στατιστικές μέθοδοι θα πρέπει να επιλέγονται ως τμήμα του σχεδιασμού της μελέτης και θα πρέπει να αιτιολογούνται. Θα πρέπει, επίσης, να αναφέρονται και στοιχεία από ζώα τα οποία δεν επιβιώνουν μέχρι την προγραμματισμένη θανάτωση. Τα στοιχεία αυτά μπορούν να περιλαμβάνονται στους μέσους όρους της ομάδας, όπου είναι σκόπιμο. Η σπουδαιότητα των στοιχείων που λαμβάνονται από τέτοια ζώα και, συνεπώς, η λήψη υπόψη ή ο αποκλεισμός τους από τον ή τους μέσους όρους για κάθε ομάδα, θα πρέπει να αιτιολογείται και να κρίνεται σε ατομική βάση.

2.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα ευρήματα της μελέτης της προγεννητικής τοξικότητας στην ανάπτυξη θα πρέπει να αξιολογούνται από πλευράς παρατηρούμενων αποτελεσμάτων. Στην αξιολόγηση πρέπει να περιλαμβάνονται οι ακόλουθες πληροφορίες:

— αποτελέσματα των δοκιμών στις μητέρες και στα έμβρυα/διαμορφωμένα έμβρυα, συμπεριλαμβανομένης αξιολόγησης της σχέσης, ή της έλλειψης σχέσεως, μεταξύ της έκθεσης των ζώων στην υπό δοκιμή ουσία και της συχνότητας και σοβαρότητας όλων των ευρημάτων,

— κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την κατηγοριοποίηση εξωτερικών και σκελετικών αλλοιώσεων ή αλλοιώσεων του μαλακού ιστού των διαμορφωμένων εμβρύων, εφόσον έχει γίνει τέτοια κατηγοριοποίηση,

▼B

— εφόσον είναι σκόπιμο, ιστορικά μαρτυρικά στοιχεία για ενίσχυση της ερμηνείας των αποτελεσμάτων της μελέτης,

— οι αριθμοί που χρησιμοποιήθηκαν στον υπολογισμό όλων των ποσοστών ή δεικτών,

— κατάλληλη στατιστική ανάλυση των ευρημάτων της μελέτης, όπου είναι σκόπιμο, στην οποία θα πρέπει να περιλαμβάνονται επαρκείς πληροφορίες για τη μέθοδο αναλύσεως, έτσι ώστε να μπορεί να γίνει επαναξιολόγηση και ανασκευή της ανάλυσης από ανεξάρτητο αναθεωρητή/στατιστικολόγο.

Σε κάθε μελέτη που δείχνει απουσία τυχόν τοξικών επιδράσεων, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο διενέργειας περαιτέρω ερευνών για εντοπισμό της απορρόφησης και βιοδιαθεσιμότητας της υπό δοκιμή ουσίας.

2.3 ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η διενέργεια μελέτης προγεννητικής τοξικότητας στην ανάπτυξη παρέχει πληροφορίες για τα αποτελέσματα επανειλημμένης έκθεσης σε μια ουσία κατά τη διάρκεια της κύησης στις μητέρες και στην εντός της μήτρας ανάπτυξη των γόνων τους. Τα αποτελέσματα της μελέτης θα πρέπει να ερμηνεύονται σε συνδυασμό με τα ευρήματα από μελέτες υποχρόνιας τοξικότητας, αναπαραγωγής, τοξικοκινητικής και άλλες μελέτες. Αφού δίνεται έμφαση τόσο στη γενική τοξικότητα από πλευράς μητρικής τοξικότητας όσο και στα τελικά τοξικά αποτελέσματα στην ανάπτυξη, τα αποτελέσματα της μελέτης επιτρέπουν σε ένα ορισμένο βαθμό να γίνει διάκριση μεταξύ των αποτελεσμάτων στην ανάπτυξη που επέρχονται απουσία γενικής τοξικότητας και εκείνων που προκαλούνται μόνον σε επίπεδα τα οποία είναι τοξικά και στη μητέρα (27).

3. **ΑΝΑΦΟΡΑ**

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται οι ακόλουθες ειδικές πληροφορίες:

Υπό δοκιμή ουσία:

— φυσική εμφάνιση και, όπου είναι σκόπιμο, φυσικοχημικές ιδιότητες

— ταυτοποίηση, συμπεριλαμβανομένου του αριθμού CAS, αν είναι γνωστός/υπάρχει

— καθαρότητα

Φορέας (αν χρησιμοποιείται):

— αιτιολόγηση επιλογής του συγκεκριμένου φορέα, αν είναι άλλος από νερό

Υπό δοκιμή ζώα:

— χρησιμοποιούμενο είδος και φυλή

— αριθμός και ηλικία των ζώων

— προέλευση, συνθήκες στέγασης, διαιτολόγιο, κ.λπ.

— επιμέρους βάρη ζώων κατά την έναρξη της δοκιμής

Συνθήκες δοκιμής:

— λογική αιτιολόγηση της επιλογής των επιπέδων δόσεων

— λεπτομέρειες για το παρασκεύασμα της υπό δοκιμή ουσίας/τροφής, επιτυγχανόμενη συγκέντρωση, σταθερότητα και ομοιογένεια του παρασκευάσματος

▼B

— λεπτομέρειες για τη χορήγηση της υπό δοκιμή ουσίας

— αναγωγή από τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στην τροφή/πόσιμο νερό (ppm) στην πραγματική δόση (mg/kg βάρους σώματος/ημέρα), εφόσον γίνεται

— περιβαλλοντικές συνθήκες

— λεπτομέρειες ποιότητας τροφής και νερού.

Αποτελέσματα:

Στοιχεία σχετικά με τη μητρική τοξική απόκριση κατά δόση, στα οποία πρέπει να συμπεριλαμβάνονται, χωρίς αυτό να αποκλείει την αναφορά και άλλων στοιχείων:

— ο αριθμός των ζώων στην έναρξη της δοκιμής, ο αριθμός των επιβιωσάντων ζώων, ο αριθμός των εγγύων και ο αριθμός των αποβολών, καθώς και ο αριθμός των ζώων με πρόωρο τοκετό

— η ημέρα θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης ή αν τα ζώα επέζησαν μέχρι τέλος

— στοιχεία από ζώα που δεν επιβιώνουν μέχρι την προγραμματισμένη θανάτωση θα πρέπει να αναφέρονται αλλά να μην περιλαμβάνονται στις στατιστικές συγκρίσεις μεταξύ ομάδων

— η ημέρα παρατήρησης κάθε μη φυσιολογικού κλινικού σημείου και η εν συνεχεία εξέλιξη

— τα σωματικά βάρη, η μεταβολή των σωματικών βαρών και των βαρών εγγύων μητρών συμπεριλαμβανομένων, ενδεχομένως, και των μεταβολών σωματικών βαρών διορθωμένων βάσει του βάρους των εγγύων μητρών,

— η κατανάλωση τροφής και, εφόσον μετριόταν, και η κατανάλωση νερού

— τα ευρήματα της νεκροψίας, συμπεριλαμβανομένου του βάρους των μητρών

— θα πρέπει να αναφέρονται οι τιμές NOAEL για τη μητρική και αναπτυξιακή τοξικότητα.

Αναπτυξιακά τελικά σημεία κατά δόση για γέννες με εμφυτεύματα, συμπεριλαμβανομένων:

— του αριθμού των ωχρών σωματίων

— του αριθμού των εμφυτεύσεων, του αριθμού και του ποσοστού των ζώντων και νεκρών διαμορφωμένων εμβρύων και απορροφήσεων

— του αριθμού και ποσοστού των προ και μετά εμφύτευση απωλειών

Αναπτυξιακά τελικά σημεία κατά δόση για γέννες με ζώντα διαμορφωμένα έμβρυα, συμπεριλαμβανομένων:

— του αριθμού και ποσοστού των ζώντων γόνων

— της αναλογίας μεταξύ φύλων

— του βάρους του σώματος των διαμορφωμένων εμβρύων, κατά προτίμηση κατά φύλο και ασχέτως φύλου

— των εξωτερικών, σκελετικών και δυσπλασιών του μαλακού ιστού και άλλων σχετικών αλλοιώσεων

— των κριτηρίων κατηγοριοποίησης, αν έγινε

▼B

— του συνολικού αριθμού και ποσοστού διαμορφωμένων εμβρύων και γεννών με εξωτερικές, σκελετικές ή αλλοιώσεις του μαλακού ιστού, καθώς επίσης και των τύπων και συχνότητας επιμέρους ανωμαλιών και άλλων σχετικών αλλοιώσεων.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων.

Συμπεράσματα.

4 **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) Kavlock R.J. et al. (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. *Risk Analysis* 16; 399-410.

(2) Kimmel, C.A. and Francis, E.Z. (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. *Fundamental and Applied Toxicology* 14; 386-398.

(3) Wong, B.A., et al. (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. *CIIT Activities* 17; 1-8.

(4) US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.

(5) Salewski, E. (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterusder Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archiv fur Phannakologie und Experimentelle Pathologie* 247:367.

(6) Edwards, J.A. (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In *Advances in Teratology*. D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.

(7) Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. *Congenital Anomalies* 16; 171-173.

(8) Igarashi, E. et al. (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Techniquefor Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. *Congenital Anomalies* 32; :381-391.

(9) Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology* 47:229-242.

(10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. *Teratology* 37; 476.

(11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. *Journal of Morphology* 127:291-306.

(12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. *Teratology* 11; 313-320.

(13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 9; 398-408.

(14) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? *Teratology* 8; 309-316.

(15) Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. *Teratology* 46; 169-181.

▼B

(16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. *Supplement to Teratology Workshop Manual,* pp. 163-173.

(17) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. *American Journal of Anatomy* 41; 411-445.

(18) Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. *Stain Technology* 39; 61-63.

(19) Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino.Rat (Mus Norvegicus Albinus) Skeleton. *American Journal of Anatomy* 36; 313-355.

(20) Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 4; 181-188.

(21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) *The Genesis of the Rat Skeleton.* Thomas, Springfield, IL.

(22) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In *Teratology: Principles and Techniques,* Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, pp 251-277.

(23) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) *Handbook of Teratology,* Vol. 4. Plenum, NY.

(24) Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 28; 233-239.

(25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. *Teratology* 9; 37-38.

(26) Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: *Methods in Prenatal Toxicology* Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, pp. 126-144.

(27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. *Federal Register* 56; 63798-63826.

(28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) Teratology 55; 249-292.

▼M4

Β.32. ΜΕΛΕΤΕΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 451 του ΟΟΣΑ (2009). Η αρχική TG 451 για τις μελέτες καρκινογενετικότητας εκδόθηκε το 1981. Θεωρήθηκε απαραίτητο να αναπτυχθεί η παρούσα αναθεωρημένη μέθοδος δοκιμών Β.32 ώστε να αντανακλά τις πλέον πρόσφατες εξελίξεις στον τομέα της καλής μεταχείρισης των ζώων και τις κανονιστικές απαιτήσεις (2) (3) (4) (5) (6). Η επικαιροποίηση της παρούσας μεθόδου δοκιμών Β.32 διενεργήθηκε παράλληλα με τις αναθεωρήσεις του κεφαλαίου Β.30 «Μελέτες χρόνιας τοξικότητας» και του κεφαλαίου Β.33 «Συνδυασμένες μελέτες χρόνιας τοξικότητας/καρκινογενετικότητας» του παρόντος παραρτήματος, με στόχο τη λήψη πρόσθετων πληροφοριών από τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και την παροχή περαιτέρω λεπτομερών στοιχείων για την επιλογή των δόσεων. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών Β.32 έχει σχεδιαστεί ώστε να χρησιμοποιείται για τον έλεγχο ενός ευρέος φάσματος χημικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένων φυτοφαρμάκων και βιομηχανικών χημικών ουσιών. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι ορισμένες λεπτομέρειες και απαιτήσεις ενδέχεται να διαφέρουν στην περίπτωση φαρμακευτικών ουσιών (βλέπε καθοδήγηση S1B της Διεθνούς διάσκεψης Εναρμόνισης (ICH) για τον έλεγχο της καρκινογενετικότητας φαρμακευτικών ουσιών).

2. Στην πλειονότητά τους, οι μελέτες καρκινογενετικότητας διεξάγονται σε είδη τρωκτικών. Επομένως και η παρούσα μέθοδος δοκιμών προορίζεται να εφαρμόζεται κυρίως σε μελέτες διεξαγόμενες με αυτά τα είδη. Εάν απαιτείται η διεξαγωγή τέτοιων μελετών σε άλλα είδη εκτός των τρωκτικών, εφαρμόζονται, με κατάλληλες τροποποιήσεις, οι αρχές και οι διαδικασίες που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, μαζί με αυτές που περιγράφονται στο κεφάλαιο Β.27 «Μελέτη τοξικότητας 90 ημερών με επαναλαμβανόμενη δόση από το στόμα σε μη τρωκτικά» του παρόντος παραρτήματος (6). Περαιτέρω κατευθύνσεις περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 του ΟΟΣΑ για τον σχεδιασμό και τη διεξαγωγή μελετών χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας (7).

3. Οι τρεις βασικές οδοί χορήγησης ουσιών που χρησιμοποιούνται σε μελέτες καρκινογενετικότητας είναι μέσω του στόματος, μέσω του δέρματος και μέσω της εισπνοής. Η επιλογή οδού χορήγησης εξαρτάται από τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και την κύρια οδό έκθεσης του ανθρώπου. Πρόσθετες πληροφορίες για την επιλογή οδού έκθεσης παρέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 του ΟΟΣΑ (7).

4. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών εστιάζει στην έκθεση μέσω του στόματος, τη συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη οδό στις μελέτες καρκινογενετικότητας. Παρόλο που οι μελέτες καρκινογενετικότητας που περιλαμβάνουν έκθεση μέσω του δέρματος ή της αναπνευστικής οδού ενδέχεται να είναι επίσης απαραίτητες για την εκτίμηση των κινδύνων για την υγεία και/ή ενδέχεται να απαιτούνται βάσει συγκεκριμένων κανονιστικών καθεστώτων, και οι δύο οδοί έκθεσης είναι τεχνικά πολύπλοκες σε σημαντικό βαθμό. Παρόλο που οι μελέτες αυτές θα πρέπει να σχεδιάζονται κατά περίπτωση, η μέθοδος δοκιμών που περιγράφεται στο κεφάλαιο αυτό για την εκτίμηση και την αξιολόγηση της καρκινογενετικότητας που προκαλείται με χορήγηση από το στόμα θα μπορούσε να αποτελέσει τη βάση ενός πρωτοκόλλου για αναπνευστικές και/ή δερματικές μελέτες όσον αφορά συστάσεις για περιόδους αγωγής, κλινικές και παθολογικές παραμέτρους κ.λπ. Ο ΟΟΣΑ έχει εκδώσει έγγραφα καθοδήγησης σχετικά με τη χορήγηση ελεγχόμενων χημικών ουσιών μέσω μέσω του δέρματος (7) και μέσω της αναπνευστικής οδού (7)(8). Τα κεφάλαια Β.8 (9) και Β.29 (10) του παρόντος παραρτήματος, καθώς και το έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ σχετικά με τις δοκιμές οξείας αναπνευστικής τοξικότητας (8), θα πρέπει να λαμβάνονται ιδιαιτέρως υπόψη κατά τον σχεδιασμό πιο μακροπρόθεσμων μελετών που περιλαμβάνουν έκθεση μέσω της αναπνευστικής οδού. Το κεφάλαιο Β.9 του παρόντος παραρτήματος (11) θα πρέπει να λαμβάνεται ιδιαιτέρως υπόψη στην περίπτωση δοκιμών μέσω του δέρματος.

▼M4

5. Η μελέτη καρκινογενετικότητας παρέχει πληροφορίες σχετικά με τους πιθανούς κινδύνους για την υγεία που ενδέχεται να προκύπτουν από επανειλημμένη έκθεση έως και για ολόκληρη τη διάρκεια ζωής του χρησιμοποιούμενου είδους. Η μελέτη παρέχει πληροφορίες για τις τοξικές επιδράσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, συμπεριλαμβανομένης της πιθανής καρκινογενετικότητας, για ενδεχόμενα όργανα στόχο και για την πιθανότητα συσσώρευσης. Παρέχει εκτίμηση του μέγιστου επιπέδου στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς τοξικές επιδράσεις και, στην περίπτωση μη γονιδιοτοξικών καρκινογόνων, αντιδράσεις εμφάνισης όγκου, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό κριτηρίων ασφαλείας για την έκθεση του ανθρώπου. Τονίζεται επίσης η ανάγκη προσεκτικής κλινικής παρατήρησης των πειραματόζωων προκειμένου να ληφθούν όσο το δυνατόν περισσότερες πληροφορίες.

6. Οι στόχοι των μελετών καρκινογενετικότητας που καλύπτονται από την παρούσα μέθοδο δοκιμών περιλαμβάνουν:

— τον προσδιορισμό των καρκινογόνων ιδιοτήτων μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας οι οποίες προκαλούν αυξημένη συχνότητα νεοπλασμάτων, αυξημένο ποσοστό κακοηθών νεοπλασμάτων ή μείωση του χρόνου που μεσολαβεί έως την εμφάνιση νεοπλασμάτων, σε σύγκριση με δοκιμασίες με παράλληλες ομάδες μαρτύρων,

— τον προσδιορισμό οργάνων-στόχου καρκινογενετικότητας,

— τον προσδιορισμό του χρόνου που μεσολαβεί έως την εμφάνιση νεοπλασμάτων,

— τον χαρακτηρισμό της σχέσης δόσης όγκου-απόκρισης,

— τον προσδιορισμό του επιπέδου στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις (NOAEL) ή της αφετηρίας για τον καθορισμό δόσης αναφοράς (BMD),

— την παρέκταση των καρκινογόνων επιδράσεων στην έκθεση του ανθρώπου σε χαμηλά επίπεδα δόσης,

— την παροχή δεδομένων για τον έλεγχο υποθέσεων σχετικά με τον τρόπο δράσης (2) (7) (12) (13) (14) (15).

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

7. Κατά την εκτίμηση και την αξιολόγηση της ενδεχόμενης καρκινογενετικότητας μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας, το πειραματικό εργαστήριο θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη όλες τις διαθέσιμες πληροφορίες για την ελεγχόμενη χημική ουσία πριν από τη διεξαγωγή της μελέτης, ώστε να εστιάζεται ο σχεδιασμός στον πλέον αποδοτικό έλεγχο του δυναμικού καρκινογενετικότητας και να ελαχιστοποιείται η χρήση των ζώων. Οι πληροφορίες και η μελέτη του τρόπου δράσης μιας ουσίας για την οποία υπάρχουν υπόνοιες ότι είναι καρκινογόνος (2) (7) (12) (13) (14) (15) είναι ιδιαιτέρως σημαντικές, δεδομένου ότι ο βέλτιστος σχεδιασμός ενδέχεται να διαφέρει ανάλογα με το εάν είναι γνωστό ή υπάρχουν υπόνοιες ότι η ελεγχόμενη χημική ουσία είναι γονιδιοτοξική καρκινογόνος ουσία. Περαιτέρω κατευθύνσεις για ζητήματα σχετικά με τον τρόπο δράσης περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (9).

8. Πληροφορίες που θα βοηθήσουν στον σχεδιασμό της μελέτης είναι, μεταξύ άλλων, η ταυτότητα, η χημική δομή και οι φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας· τα αποτελέσματα δοκιμών τοξικότητας *in vitro* ή *in vivo*, συμπεριλαμβανομένων δοκιμών γονιδιοτοξικότητας· οι προβλεπόμενες χρήσεις και η δυνητική έκθεση του ανθρώπου· τα διαθέσιμα δεδομένα (Q)SAR, δεδομένα μεταλλαξιγένεσης/γονιδιοτοξικότητας, καρκινογενετικότητας και άλλα τοξικολογικά δεδομένα για δομικά συγγενείς χημικές ουσίες· διαθέσιμα τοξικοκινητικά δεδομένα (κινητική εφάπαξ δόσης και, επίσης, επαναλαμβανόμενης δόσης, εφόσον υπάρχουν διαθέσιμα τέτοια δεδομένα) και δεδομένα που προέρχονται από άλλες μελέτες επανειλημμένης έκθεσης. Αξιολόγηση της καρκινογενετικότητας πρέπει να πραγματοποιείται μετά τη λήψη αρχικών πληροφοριών για την τοξικότητα

▼M4

μέσω δοκιμών τοξικότητας 28 ημερών και/ή 90 ημερών με επαναλαμβανόμενη δόση. Βραχυπρόθεσμες δοκιμές έναρξης-ανάπτυξης καρκίνου παρέχουν επίσης ενδεχομένως χρήσιμες πληροφορίες. Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο εφαρμογής μιας κλιμακωτής πειραματικής προσέγγισης για τον έλεγχο της καρκινογενετικότητας στο πλαίσιο της συνολικής αξιολόγησης των ενδεχόμενων δυσμενών επιδράσεων μιας συγκεκριμένης ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην υγεία (16) (17) (18) (19).

9. Θα πρέπει να προσδιορίζονται οι πλέον κατάλληλες στατιστικές μέθοδοι για την ανάλυση των αποτελεσμάτων, δεδομένου του σχεδιασμού και των στόχων του πειράματος, πριν από την έναρξη της μελέτης. Στα ζητήματα που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη περιλαμβάνονται τα εξής: εάν τα στατιστικά στοιχεία θα πρέπει να περιλαμβάνουν διορθώσεις βάσει της επιβίωσης, ανάλυση των σωρευτικών κινδύνων όγκου σε σχέση με τη διάρκεια επιβίωσης, ανάλυση του χρονικού διαστήματος έως την εμφάνιση όγκου και ανάλυση στην περίπτωση πρόωρου τερματισμού μιας ή περισσότερων ομάδων. Κατευθύνσεις για τις κατάλληλες στατιστικές αναλύσεις και βασικές παραπομπές σε διεθνώς αποδεκτές στατιστικές μεθόδους περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7) και στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 35 για την ανάλυση και την αξιολόγηση μελετών χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας (20).

10. Κατά τη διεξαγωγή μελέτης καρκινογενετικότητας θα πρέπει να ακολουθούνται πάντα οι κατευθυντήριες αρχές και εκτιμήσεις που περιγράφονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 19 του ΟΟΣΑ για την αναγνώριση, την αξιολόγηση και τη χρήση κλινικών ενδείξεων ως λιγότερο βάναυσα καταληκτικά σημεία για τα χρησιμοποιούμενα πειραματόζωα στην αξιολόγηση ασφαλείας (21), και ιδίως η παράγραφος 62 του εγγράφου αυτού. Η παράγραφος αυτή αναφέρει ότι «Σε μελέτες που περιλαμβάνουν επανειλημμένες χορηγήσεις, όταν ένα ζώο εμφανίζει κλινικές ενδείξεις που είναι προοδευτικές και οδηγούν σε περαιτέρω επιδείνωση της κατάστασής του, θα πρέπει να λαμβάνεται μια τεκμηριωμένη απόφαση σχετικά με το εάν πρέπει να γίνει ευθανασία στο ζώο ή όχι. Η απόφαση θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη ζητήματα σχετικά με την αξία των πληροφοριών που θα ληφθούν από τη συνέχιση της συμμετοχής του ζώου αυτού στη μελέτη σε σχέση με τη συνολική του κατάσταση. Εάν ληφθεί απόφαση να εξακολουθήσει το ζώο να υποβάλλεται σε δοκιμή, θα πρέπει να αυξάνεται η συχνότητα των παρατηρήσεων, ανάλογα με τις ανάγκες. Επίσης ενδέχεται να διακόπτεται προσωρινά η χορήγηση δόσεων, εάν αυτό θα απαλύνει τον πόνο ή τη δυσφορία, ή να μειώνεται η δόση, εφόσον αυτό δεν επηρεάζει αρνητικά τον σκοπό της δοκιμής.».

11. Λεπτομερής καθοδήγηση σχετικά με τις αρχές επιλογής δόσεων για μελέτες χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας και ανάλυση των αρχών αυτών περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7), καθώς και σε δύο δημοσιεύσεις του International Life Sciences Institute (22) (23). Η βασική στρατηγική επιλογής των δόσεων εξαρτάται από τον πρωταρχικό στόχο (ή τους πρωταρχικούς στόχους) της μελέτης (παράγραφος 6). Κατά την επιλογή κατάλληλων επιπέδων δόσης θα πρέπει να επιτυγχάνεται ισορροπία μεταξύ του ελέγχου των κινδύνων αφενός και του χαρακτηρισμού των αποκρίσεων που προκαλούν οι χαμηλές δόσεις και της καταλληλότητάς τους αφετέρου. Αυτό είναι ιδιαιτέρως σημαντικό στην περίπτωση που πρόκειται να διεξαχθεί συνδυασμένη μελέτη χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας (κεφάλαιο Β.33 του παρόντος παραρτήματος) (παράγραφος 12).

12. Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο διεξαγωγής συνδυασμένης μελέτης χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας (κεφάλαιο Β.33 του παρόντος παραρτήματος) αντί μιας μελέτης χρόνιας τοξικότητας (κεφάλαιο Β.30 του παρόντος παραρτήματος) και μιας μελέτης καρκινογενετικότητας (η παρούσα μέθοδος δοκιμών Β.32). Η συνδυασμένη δοκιμή προσφέρει μεγαλύτερη αποδοτικότητα ως προς τον χρόνο και το κόστος σε σύγκριση με τη διεξαγωγή δύο χωριστών μελετών, χωρίς να τίθεται σε κίνδυνο η ποιότητα των δεδομένων ούτε στη φάση χρόνιας τοξικότητας ούτε στη φάση καρκινογενετικότητας. Ωστόσο, ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίδεται στις αρχές επιλογής των δόσεων (παράγραφοι 11 και 22-25) κατά τη διεξαγωγή συνδυασμένης μελέτης χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας (κεφάλαιο Β.33 του παρόντος παραρτήματος), ενώ είναι γνωστό επίσης ότι ενδέχεται να απαιτούνται χωριστές μελέτες βάσει ορισμένων κανονιστικών πλαισίων.

▼M4

13. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών παρέχονται στο τέλος του παρόντος κεφαλαίου και στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7).

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

14. Η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται καθημερινά σε διαβαθμισμένες δόσεις σε αρκετές ομάδες πειραματόζωων για το μεγαλύτερο διάστημα της ζωής τους, συνήθως μέσω της στοματικής οδού. Ενδέχεται να ενδείκνυνται επίσης δοκιμές μέσω της αναπνευστικής οδού ή του δέρματος. Πραγματοποιείται προσεκτική παρατήρηση των ζώων για ενδείξεις τοξικότητας και για την ανάπτυξη νεοπλασματικών αλλοιώσεων. Τα ζώα που πεθαίνουν ή θανατώνονται κατά τη διάρκεια της δοκιμής νεκροτομούνται, και στο τέλος της δοκιμής, αυτά που έχουν επιζήσει θανατώνονται και νεκροτομούνται επίσης.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Επιλογή των ειδών ζώων

15. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών καλύπτει κυρίως την εκτίμηση και την αξιολόγηση της καρκινογενετικότητας σε τρωκτικά (παράγραφος 2). Η χρήση άλλων ειδών εκτός των τρωκτικών μπορεί να εξετάζεται όταν τα διαθέσιμα δεδομένα δείχνουν ότι τα είδη αυτά έχουν μεγαλύτερη σημασία για την πρόβλεψη των επιδράσεων στην ανθρώπινη υγεία. Η επιλογή του είδους πρέπει να αιτιολογείται. Το προτιμότερο είδος είναι ο επίμυς, αν και μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλα είδη τρωκτικών, π.χ. ποντικοί. Παρόλο που η χρήση ποντικών σε δοκιμές καρκινογενετικότητας έχει ενδεχομένως περιορισμένη χρησιμότητα (24) (25) (26), βάσει ορισμένων υφιστάμενων κανονιστικών προγραμμάτων εξακολουθούν να απαιτούνται δοκιμές σε ποντικούς, εκτός εάν προσδιοριστεί ότι μια τέτοια δοκιμή δεν είναι απαραίτητη επιστημονικά. Οι επίμυες και οι ποντικοί είναι προτιμώμενα πειραματικά μοντέλα λόγω της σχετικά μικρής διάρκειας ζωής τους, της εκτεταμένης χρήσης τους σε φαρμακολογικές και τοξικολογικές μελέτες, της ευαισθησίας τους στην ογκογένεση, και της διαθεσιμότητας καταλλήλως χαρακτηρισμένων φυλών. Λόγω των χαρακτηριστικών αυτών, υπάρχουν διαθέσιμες πολλές πληροφορίες για τη φυσιολογία και την παθολογία τους. Πρόσθετες πληροφορίες για την επιλογή είδους και φυλής παρέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 του ΟΟΣΑ (7).

16. Πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή νεαρά ενήλικα ζώα των συνήθων εργαστηριακών φυλών. Κατά προτίμηση, η μελέτη καρκινογενετικότητας θα πρέπει να διεξάγεται σε ζώα της ίδιας φυλής και προέλευσης με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν σε προκαταρκτική(-ές) μελέτη(-ες) τοξικότητας βραχύτερης διάρκειας, εάν είναι γνωστό ότι ζώα της συγκεκριμένης φυλής και προέλευσης εμφανίζουν προβλήματα εκπλήρωσης των γενικά αποδεκτών κριτηρίων επιβίωσης για πιο μακροπρόθεσμες μελέτες [βλέπε έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7)]. Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης μιας φυλής ζώων που διαθέτει αποδεκτό ποσοστό επιβίωσης για τη μακροπρόθεσμη μελέτη. Τα θηλυκά πρέπει να είναι άτοκα και να μη βρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης.

Στέγαση και διατροφή

17. Τα ζώα μπορούν να στεγάζονται ατομικά ή σε κλωβούς σε μικρές ομάδες του ίδιου φύλου· τα ζώα θα πρέπει να στεγάζονται ατομικά μόνο εάν αυτό αιτιολογείται επιστημονικά (27) (28) (29). Οι κλωβοί διευθετούνται με τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται οι οφειλόμενες στη θέση των κλωβών επιδράσεις. Η θερμοκρασία στην αίθουσα πειραματόζωων θα πρέπει να είναι 22 °C (± 3 °C). Παρόλο που η σχετική υγρασία θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, παρά μόνο κατά τη διάρκεια του καθαρισμού της αίθουσας, τα επιδιωκόμενα επίπεδα της υγρασίας θα πρέπει να είναι 50-60 %. Ο φωτισμός πρέπει να είναι τεχνητός και η φωτοπερίοδος να αποτελείται από δώδεκα ώρες φωτός και δώδεκα ώρες σκότους. Όσον αφορά τη διατροφή, μπορούν να χρησιμοποιούνται συμβατικά εργαστηριακά σιτηρέσια με παροχή απεριόριστου πόσιμου νερού. Το σιτηρέσιο θα πρέπει να ανταποκρίνεται σε όλες τις διατροφικές απαιτήσεις των ειδών που υποβάλλονται στη δοκιμή και η περιεκτικότητα σε τροφικές προσμείξεις, συμπεριλαμβανομένων, μεταξύ άλλων, υπολειμμάτων ζιζανιοκτόνων, ανθεκτικών οργανικών ρύπων, φυτοοιστρογόνων, βαρέων μετάλλων και μυκοτοξινών, που θα μπορούσαν να

▼M4

επηρεάσουν το αποτέλεσμα της δοκιμής, θα πρέπει να είναι όσον το δυνατόν μικρότερη. Αναλυτικές πληροφορίες για τα επίπεδα θρεπτικών ουσιών και τροφικών προσμείξεων θα πρέπει να παρέχονται σε περιοδική βάση, τουλάχιστον στην αρχή της μελέτης και όταν υπάρχει αλλαγή στη χρησιμοποιούμενη παρτίδα και θα πρέπει να περιλαμβάνονται στην τελική έκθεση. Θα πρέπει αντίστοιχα να παρέχονται αναλυτικές πληροφορίες για το πόσιμο νερό που χρησιμοποιείται στη μελέτη. Η επιλογή σιτηρεσίου ενδέχεται να επηρεάζεται από την ανάγκη διασφάλισης κατάλληλης πρόσμειξης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και κάλυψης των διατροφικών απαιτήσεων των ζώων, όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται μαζί με την τροφή.

Προετοιμασία των ζώων

18. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή ζώα, εγκλιματισμένα στις εργαστηριακές συνθήκες για τουλάχιστον 7 ημέρες, τα οποία δεν έχουν υποβληθεί σε άλλες πειραματικές διαδικασίες στο παρελθόν. Στην περίπτωση τρωκτικών, η χορήγηση δόσεων στα ζώα θα πρέπει να ξεκινήσει το συντομότερο δυνατό μετά τον απογαλακτισμό και τον εγκλιματισμό και, κατά προτίμηση, πριν από την ηλικία των 8 εβδομάδων. Τα πειραματόζωα θα πρέπει να είναι χαρακτηρισμένα ως προς το είδος, τη φυλή, την προέλευση, το φύλο, το βάρος και την ηλικία τους. Στην αρχή της μελέτης, η διαφορά βάρους των χρησιμοποιούμενων ζώων σε κάθε φύλο θα πρέπει να είναι ελάχιστη και να μην υπερβαίνει το ± 20 % του μέσου βάρους όλων των ζώων της μελέτης, χωριστά για κάθε φύλο. Τα ζώα πρέπει να κατανέμονται τυχαία σε ομάδες μαρτύρων και αγωγής. Μετά την τυχαία κατανομή, δεν πρέπει να υπάρχουν σημαντικές διαφορές στο μέσο σωματικό βάρος μεταξύ των ομάδων σε κάθε φύλο. Εάν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, θα πρέπει να επαναλαμβάνεται, εάν είναι δυνατό, το στάδιο της τυχαίας κατανομής. Κάθε ζώο πρέπει να λαμβάνει έναν μοναδικό αριθμό αναγνώρισης και να φέρει μόνιμη σήμανση με τον αριθμό αυτό μέσω δερματοστηξίας, εμφυτεύματος μικροτσίπ ή άλλης κατάλληλης μεθόδου.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αριθμός και φύλο των ζώων

19. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ζώα και των δύο φύλων. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται επαρκής αριθμός ζώων που να επιτρέπει την ενδελεχή βιολογική και στατιστική αξιολόγηση. Συνεπώς, κάθε ομάδα δόσης και παράλληλη ομάδα-μάρτυρας θα πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 50 ζώα από κάθε φύλο. Ανάλογα με το στόχο της μελέτης, ενδέχεται να είναι δυνατή η αύξηση της στατιστικής ισχύος των βασικών εκτιμήσεων με διαφορική ανισοκατανομή των ζώων στις διάφορες ομάδες δόσεων, περιλαμβάνοντας περισσότερα από 50 ζώα στις ομάδες χαμηλών δόσεων, π.χ. για την εκτίμηση του δυναμικού καρκινογενετικότητας σε χαμηλές δόσεις. Ωστόσο, αναγνωρίζεται ότι μια μέτρια αύξηση στο μέγεθος των ομάδων συνεπάγεται σχετικά μικρή αύξηση στη στατιστική ισχύ της μελέτης. Περαιτέρω πληροφορίες για το στατιστικό σχεδιασμό της μελέτης και την επιλογή επιπέδων δόσης για τη μεγιστοποίηση της στατιστικής ισχύος παρέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7).

Πρόβλεψη για ενδιάμεσες θανατώσεις και δορυφορικές ομάδες (φρουρούς)

20. Η μελέτη ενδέχεται να προβλέπει ενδιάμεσες θανατώσεις, π.χ. τον 12ο μήνα, για την παροχή πληροφοριών σχετικά με την εξέλιξη των νεοπλασματικών αλλοιώσεων και μηχανιστικών πληροφοριών, εφόσον αυτό αιτιολογείται επιστημονικά. Στην περίπτωση που οι πληροφορίες αυτές είναι ήδη διαθέσιμες από προηγούμενες μελέτες τοξικότητας με επαναλαμβανόμενη δόση σχετικά με την ελεγχόμενη χημική ουσία, οι ενδιάμεσες θανατώσεις ενδέχεται να μη δικαιολογούνται επιστημονικά. Εάν ο σχεδιασμός της μελέτης περιλαμβάνει ενδιάμεσες θανατώσεις, ο αριθμός των ζώων σε κάθε ομάδα που προγραμματίζεται να θανατωθούν κατά τη διάρκεια της μελέτης είναι συνήθως 10 ζώα ανά φύλο, ενώ ο συνολικός αριθμός ζώων που περιλαμβάνονται στον σχεδιασμό της μελέτης θα πρέπει να αυξάνεται κατά τον αριθμό των ζώων που προγραμματίζεται να θανατωθούν πριν από την ολοκλήρωση της μελέτης. Είναι επίσης δυνατόν να περιλαμβάνεται μια πρόσθετη ομάδα ζώων-φρουρών (συνήθως 5 ζώα ανά φύλο) για την παρακολούθηση της κατάστασης ασθενείας, εάν είναι απαραίτητο, κατά τη διάρκεια της μελέτης (30). Περαιτέρω κατευθύνσεις περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7).

▼M4

Ομάδες δόσεων και δοσολογία

21. Καθοδήγηση για όλα τα ζητήματα που αφορούν την επιλογή των δόσεων και το διάστημα που πρέπει να παρεμβάλλεται μεταξύ των δόσεων περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7). Χρησιμοποιούνται τρεις τουλάχιστον διαφορετικές δόσεις και μια παράλληλη δοκιμασία με μάρτυρες. Τα επίπεδα δόσης θα βασίζονται γενικά στα αποτελέσματα πιο βραχυχρόνιων μελετών με επαναλαμβανόμενη δόση ή μελετών καθορισμού εύρους και θα πρέπει να λαμβάνουν υπόψη τυχόν υφιστάμενα τοξικολογικά και τοξικοκινητικά δεδομένα που είναι διαθέσιμα για την ελεγχόμενη χημική ουσία ή για σχετικές χημικές ουσίες.

22. Θα πρέπει να επιλέγεται το μέγιστο επίπεδο δόσης για τον προσδιορισμό των κυρίων οργάνων-στόχου και τοξικών επιδράσεων, χωρίς να προκαλείται πόνος, σοβαρή τοξικότητα, νοσηρότητα ή θάνατος, εκτός εάν οι φυσικοχημικές ιδιότητες και οι βιολογικές επιδράσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας θέτουν περιορισμούς. Λαμβάνοντας παράλληλα υπόψη τους παράγοντες που περιγράφονται στην παράγραφο 23 κατωτέρω, το επίπεδο μέγιστης δόσης θα πρέπει να επιλέγεται συνήθως έτσι ώστε να προκαλεί αποδεδειγμένη τοξικότητα, όπως αυτή μαρτυρείται, παραδείγματος χάριν, από τη μείωση της αύξησης του σωματικού βάρους (κατά περίπου 10 %). Ωστόσο, ανάλογα με τους στόχους της μελέτης (βλέπε παράγραφο 6), ενδέχεται να επιλέγεται ένα ανώτατο επίπεδο δόσης χαμηλότερο από τη δόση που παρέχει αποδεικτικά στοιχεία τοξικότητας, π.χ. εάν μια δόση προκαλεί δυσμενείς επιδράσεις που προκαλούν προβληματισμό αλλά που επηρεάζουν ελάχιστα τη διάρκεια ζωής ή το βάρος του σώματος.

23. Ενδέχεται να επιλέγονται επίπεδα δόσης και χρονικά διαστήματα μεταξύ των δόσεων ώστε να προσδιορίζεται σχέση δόσης-απόκρισης και, ανάλογα με τον τρόπο δράσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τιμή NOAEL ή άλλο επιδιωκόμενο αποτέλεσμα της μελέτης, π.χ. δόση αναφοράς (BMD) (βλέπε παράγραφο 25) στο ελάχιστο επίπεδο δόσης. Παράγοντες που θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά τον προσδιορισμό των χαμηλότερων δόσεων είναι, μεταξύ άλλων, η αναμενόμενη κλίση της καμπύλης δόσης-απόκρισης και οι δόσεις στις οποίες ενδέχεται να προκαλούνται σημαντικές αλλαγές στον μεταβολισμό ή στον τρόπο τοξικής δράσης ή οι οποίες αναμένεται να είναι το κατώτατο όριο ή η αφετηρία για παρέκταση σε χαμηλές δόσεις.

24. Το επιλεγόμενο διάστημα μεταξύ των δόσεων εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και δεν μπορεί να προβλεφθεί στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, αλλά υποδιπλάσια ή υποτετραπλάσια διαστήματα εξασφαλίζουν συχνά καλές επιδόσεις στη δοκιμή για τον καθορισμό μειούμενων επιπέδων δόσης και η προσθήκη μιας τέταρτης ομάδας δοκιμής είναι συνήθως προτιμότερη της χρήσης πολύ μεγάλων διαστημάτων (π.χ. μεγαλύτερων ενός συντελεστή της τάξης του 6-10) μεταξύ των δόσεων. Γενικά θα πρέπει να αποφεύγεται η χρήση συντελεστών μεγαλύτερων του 10, ενώ, όταν χρησιμοποιούνται τέτοιοι συντελεστές, η χρήση τους θα πρέπει να αιτιολογείται.

25. Όπως αναφέρεται περαιτέρω στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 παράγραφος 7, τα σημεία που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την επιλογή των δόσεων είναι, μεταξύ άλλων, τα εξής:

— σημεία μη γραμμικότητας ή σημεία κλίσης στην καμπύλη δόσης-απόκρισης που είναι γνωστά ή για τα οποία υπάρχουν υπόνοιες ύπαρξης,

— τοξικοκινητική και ρύθμιση της δοσολογίας, στην περίπτωση που λαμβάνει ή δεν λαμβάνει χώρα μεταβολική επαγωγή, κορεσμός ή μη γραμμικότητα μεταξύ εξωτερικων και εσωτερικών δόσεων,

— πρόδρομες αλλοιώσεις, δείκτες επίδρασης ή δείκτες της λειτουργίας βασικών υποκείμενων βιολογικών διεργασιών,

— βασικές (ή πιθανολογούμενες) πτυχές του τρόπου δράσης, όπως δόσεις στις οποίες αρχίζει να εμφανίζεται κυτταροτοξικότητα, διαταράσσονται τα επίπεδα ορμονών, καταβάλλονται οι ομοιοστατικοί μηχανισμοί κ.λπ.,

▼M4

— περιοχές στην καμπύλη δόσης-απόκρισης στις οποίες απαιτείται μια ιδιαιτέρως αξιόπιστη εκτίμηση, π.χ. στο πεδίο τιμών της αναμενόμενης δόσης αναφοράς ή ενός πιθανολογούμενου κατώτατου ορίου,

— εκτίμηση των αναμενόμενων επιπέδων έκθεσης του ανθρώπου.

26. Οι μάρτυρες είναι ομάδα μη υποβαλλόμενη σε αγωγή ή ομάδα προοριζόμενη για τον έλεγχο του φορέα, εφόσον χρησιμοποιείται φορέας για τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Με εξαίρεση τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τα ζώα της ομάδας μάρτυρα πρέπει να υφίστανται την ίδια ακριβώς μεταχείριση με τα ζώα της ομάδας αγωγής. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται φορέας, ο όγκος φορέα που χορηγείται στους μάρτυρες είναι ο μεγαλύτερος που χρησιμοποιείται στις ομάδες αγωγής. Εάν μια ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με την τροφή και προκαλεί σημαντικά μειωμένη πρόσληψη τροφής λόγω μειωμένης γευστικότητας του σιτηρεσίου, τότε ίσως είναι χρήσιμη ως καταλληλότερος μάρτυρας μια επιπλέον ομάδα-μάρτυρας στην οποία χορηγείται το ίδιο σιτηρέσιο.

Παρασκευή των δόσεων και χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

27. Η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται συνήθως από το στόμα, με την τροφή ή το πόσιμο νερό ή με καθετήρα. Πρόσθετες πληροφορίες για την επιλογή οδών και μεθόδων χορήγησης παρέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 του ΟΟΣΑ (7). Η οδός και η μέθοδος χορήγησης εξαρτώνται από τον σκοπό της μελέτης, τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τη βιοδιαθεσιμότητά της και την κύρια οδό και μέθοδο έκθεσης του ανθρώπου. Θα πρέπει να αιτιολογείται η επιλογή οδού και μεθόδου χορήγησης. Για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων, η χορήγηση μέσω της στοματικής οδού με καθετήρα θα πρέπει να επιλέγεται συνήθως μόνο για τους παράγοντες για τους οποίους η συγκεκριμένη οδός και μέθοδος χορήγησης αναμένεται εύλογα να αποτελούν ενδεχόμενο τρόπο έκθεσης του ανθρώπου (π.χ. φαρμακευτικές ουσίες). Διατροφικές ή περιβαλλοντικές χημικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένων των ζιζανιοκτόνων, χορηγούνται συνήθως με την τροφή ή το πόσιμο νερό. Ωστόσο, βάσει ορισμένων σεναρίων, π.χ. έκθεση κατά την εργασία, ενδέχεται να είναι καταλληλότερη η χορήγηση μέσω άλλων οδών.

28. Εφόσον είναι αναγκαίο, παρασκευάζεται διάλυμα ή εναιώρημα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε κατάλληλο φορέα. Εξετάζονται τα ακόλουθα χαρακτηριστικά του φορέα και άλλων προσθέτων, κατά περίπτωση: επιδράσεις στην απορρόφηση, στην κατανομή, στον μεταβολισμό ή στην κατακράτηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, επιδράσεις στις χημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας οι οποίες μπορούν να μεταβάλουν τα τοξικά χαρακτηριστικά της και επιδράσεις στην κατανάλωση τροφής ή νερού ή στη διατροφική κατάσταση των ζώων. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατόν, η χρήση υδατικού διαλύματος/εναιωρήματος, ως πρώτη επιλογή, διαλύματος/γαλακτώματος σε έλαιο (π.χ. αραβοσιτέλαιο) κατόπιν, και, ως τελευταία επιλογή, η χρήση διαλύματος σε άλλο φορέα. Σε περίπτωση που ο φορέας δεν είναι το νερό, τα τοξικά χαρακτηριστικά του φορέα πρέπει να είναι γνωστά. Πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες για τη σταθερότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και την ομοιογένεια των διαλυμάτων ή σιτηρεσίων δόσης (κατά περίπτωση) στις συνθήκες χορήγησης (π.χ. στο σιτηρέσιο).

29. Για τις χημικές ουσίες που χορηγούνται με την τροφή ή το πόσιμο νερό πρέπει να εξασφαλίζεται ότι οι χορηγούμενες ποσότητες ελεγχόμενης χημικής ουσίας δεν επηρεάζουν το κανονικό διατροφικό ισοζύγιο ή ισοζύγιο νερού. Σε μελέτες μακροπρόθεσμης τοξικότητας με χορήγηση με την τροφή, η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην τροφή δεν θα πρέπει να υπερβαίνει κανονικά ένα ανώτατο όριο 5 % του συνολικού σιτηρεσίου, ώστε να αποφεύγονται διατροφικές ανισορροπίες. Όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με την τροφή, πρέπει να χρησιμοποιείται είτε σταθερή συγκέντρωση στην τροφή (mg/kg σιτηρεσίου ή ppm) είτε σταθερό επίπεδο δόσης ως προς το βάρος του σώματος του ζώου (mg/kg βάρους σώματος), υπολογιζόμενο σε εβδομαδιαία βάση. Η χρησιμοποιούμενη εναλλακτική επιλογή πρέπει να διευκρινίζεται.

▼M4

30. Στην περίπτωση χορήγησης από το στόμα, χορηγούνται στα ζώα δόσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας καθημερινά (επτά ημέρες την εβδομάδα), συνήθως για μια περίοδο 24 μηνών στην περίπτωση τρωκτικών (βλέπε επίσης παράγραφο 32). Θα πρέπει να αιτιολογείται οποιοδήποτε άλλο καθεστώς δοσολογίας που τυχόν χρησιμοποιείται, π.χ. χορήγηση πέντε ημέρες την εβδομάδα. Στην περίπτωση χορήγησης μέσω του δέρματος, τα ζώα εκτίθενται κανονικά στην ελεγχόμενη χημική ουσία για τουλάχιστον 6 ώρες την ημέρα, 7 ημέρες την εβδομάδα, όπως προσδιορίζεται στο κεφάλαιο Β.9 του παρόντος παραρτήματος (11), για μια περίοδο 24 μηνών. Έκθεση μέσω της αναπνευστικής οδού πραγματοποιείται 6 ώρες την ημέρα, 7 ημέρες την εβδομάδα, αλλά ενδέχεται να εφαρμόζεται επίσης έκθεση για 5 ημέρες την εβδομάδα, εφόσον παρέχεται σχετική αιτιολόγηση. Η περίοδος έκθεσης διαρκεί συνήθως 24 μήνες. Σε περίπτωση ρινικής έκθεσης άλλων ειδών τρωκτικών εκτός των επιμύων, οι μέγιστες περίοδοι έκθεσης μπορούν να προσαρμόζονται ώστε να ελαχιστοποιείται η δυσφορία που νιώθει το κάθε είδος. Θα πρέπει να παρέχεται αιτιολόγηση στην περίπτωση που εφαρμόζεται διάρκεια έκθεσης μικρότερη των 6 ωρών ημερησίως. Βλέπε επίσης κεφάλαιο Β.8 του παρόντος παραρτήματος (9).

31. Όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με καθετήρα στα ζώα, η χορήγηση πρέπει να γίνεται με τη βοήθεια καθετήρα στομάχου ή κατάλληλης διασωλήνωσης, την ίδια περίπου ώρα κάθε ημέρα. Συνήθως χορηγείται μία δόση μία φορά την ημέρα, ενώ, στην περίπτωση που μια χημική ουσία έχει τοπική ερεθιστική δράση, μπορεί να διατηρείται η ημερήσια δοσολογία με τη χορήγηση μισών δόσεων (δύο φορές την ημέρα). Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Ο όγκος θα πρέπει να διατηρείται στο ελάχιστο εφικτό επίπεδο και δεν θα πρέπει να υπερβαίνει κανονικά το 1 ml / 100 g βάρους σώματος, στην περίπτωση των τρωκτικών (31). Οι διαφορές του όγκου πρέπει να ελαχιστοποιούνται ρυθμίζοντας τη συγκέντρωση κατά τρόπο ώστε να εξασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλα τα επίπεδα δόσης. Εξαίρεση αποτελούν οι ενδεχομένως διαβρωτικές ή ερεθιστικές χημικές ουσίες, οι οποίες θα πρέπει να αραιώνονται ώστε να αποφεύγονται οι σοβαρές τοπικές επιδράσεις. Θα πρέπει να αποφεύγεται η διεξαγωγή δοκιμών σε συγκεντρώσεις που πιθανόν να αποδειχθούν διαβρωτικές ή ερεθιστικές για το γαστρεντερικό σύστημα.

Διάρκεια της μελέτης

32. Η διάρκεια της μελέτης θα είναι κανονικά 24 μήνες για τα τρωκτικά, ήτοι χρόνος που καλύπτει το μεγαλύτερο μέρος της συνήθους διάρκειας ζωής των χρησιμοποιούμενων ζώων. Ενδέχεται να πραγματοποιούνται μελέτες μικρότερης ή μεγαλύτερης διάρκειας, ανάλογα με τη διάρκεια ζωής της φυλής των χρησιμοποιούμενων ζωικών ειδών, βάσει σχετικής αιτιολόγησης. Στην περίπτωση χρήσης συγκεκριμένων φυλών ποντικών, π.χ. των φυλών AKR/J, C3H/J ή C57BL/6J, ενδέχεται να είναι καταλληλότερο διάστημα μελέτης 18 μηνών. Κατωτέρω παρέχονται ορισμένες κατευθύνσεις σχετικά με τη διάρκεια της μελέτης, τον τερματισμό της και την επιβίωση. Περαιτέρω κατευθύνσεις, συμπεριλαμβανομένων εκτιμήσεων σχετικά με τη δυνατότητα αποδοχής αρνητικής καρκινογενετικότητας σε σχέση με τα δεδομένα επιβίωσης στη μελέτη, περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 του ΟΟΣΑ για τον σχεδιασμό και τη διεξαγωγή μελετών χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας (7).

— Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο τερματισμού της μελέτης όταν ο αριθμός των επιζώντων ζώων στις ομάδες με τις χαμηλότερες δόσεις ή στην ομάδα των μαρτύρων φτάσει σε ποσοστά κατώτερα του 25 %.

— Δεν απαιτείται τερματισμός της μελέτης στην περίπτωση που μόνο τα ζώα της ομάδας υψηλής δόσης πεθάνουν πρόωρα λόγω τοξικότητας.

— Τα δεδομένα επιβίωσης θα πρέπει να εξετάζονται χωριστά για κάθε φύλο.

— Η μελέτη δεν θα πρέπει να επεκτείνεται πέραν του σημείου στο οποίο τα δεδομένα που είναι διαθέσιμα από τη μελέτη δεν επαρκούν πλέον για την πραγματοποίηση μιας στατιστικά έγκυρης αξιολόγησης.

▼M4

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

33. Θα πρέπει να ελέγχονται όλα τα ζώα, συνήθως στην αρχή και το τέλος κάθε ημέρας, καθώς και τα σαββατοκύριακα και τις αργίες, ώστε να διαπιστώνεται τυχόν νοσηρότητα ή θνησιμότητά τους. Επιπλέον, τα ζώα θα πρέπει να ελέγχονται μία φορά την ημέρα ώστε να διαπιστώνονται συγκεκριμένες ενδείξεις τοξικολογικής σημασίας, λαμβάνοντας υπόψη την περίοδο αιχμής των αναμενόμενων επιδράσεων μετά τη χορήγηση των δόσεων, στην περίπτωση χορήγησης με καθετήρα. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίδεται στην ανάπτυξη όγκων. Επίσης, θα πρέπει να καταγράφεται ο χρόνος εμφάνισης, η τοποθεσία, οι διαστάσεις, η μορφή και η πρόοδος κάθε μακροσκοπικά ορατού ή ψηλαφητού όγκου.

Βάρος σώματος, κατανάλωση τροφής και νερού και απόδοση της τροφής

34. Όλα τα ζώα πρέπει να ζυγίζονται κατά την έναρξη της αγωγής, τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα κατά τις πρώτες 13 εβδομάδες και τουλάχιστον μία φορά τον μήνα στη συνέχεια. Η κατανάλωση τροφής και η απόδοση της τροφής θα πρέπει να μετρώνται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα κατά τις πρώτες 13 εβδομάδες και τουλάχιστον μία φορά τον μήνα στη συνέχεια. Η κατανάλωση νερού θα πρέπει να μετράται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα κατά τις πρώτες 13 εβδομάδες και τουλάχιστον μία φορά τον μήνα στη συνέχεια, στην περίπτωση που η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται μέσω του πόσιμου νερού. Μετρήσεις της κατανάλωσης ύδατος πρέπει επίσης να λαμβάνονται υπόψη στις μελέτες κατά τις οποίες η δραστηριότητα πόσης μπορεί να μεταβληθεί.

Αιματολογικές, βιοχημικές και άλλες εξετάσεις

35. Για να μεγιστοποιούνται οι πληροφορίες που λαμβάνονται από τη μελέτη, ιδίως σε σχέση με ζητήματα τρόπου δράσης, είναι δυνατόν να λαμβάνονται δείγματα αίματος για αιματολογικές και βιοχημικές εξετάσεις, επαφιέμενες στη διακριτική ευχέρεια του διευθυντή της μελέτης. Ενδέχεται να ενδείκνυται επίσης ανάλυση ούρων. Περαιτέρω κατευθύνσεις για την αξία λήψης των δειγμάτων αυτών στο πλαίσιο μιας μελέτης καρκινογενετικότητας περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7). Εάν θεωρείται σκόπιμο, ενδέχεται να πραγματοποιείται αιμοληψία για αιματολογικές και κλινικές χημικές εξετάσεις και ανάλυση ούρων στο πλαίσιο ενδιάμεσης θανάτωσης (παράγραφος 20) και στον τερματισμό της μελέτης σε 10 ζώα τουλάχιστον ανά φύλο και ανά ομάδα. Τα δείγματα αίματος λαμβάνονται από ένα συγκεκριμένο σημείο, π.χ. με καρδιακή παρακέντηση ή από τον οφθαλμικό κόγχο, οπισθοβολβικά, υπό αναισθησία, και αποθηκεύονται, εφόσον ενδείκνυται, υπό κατάλληλες συνθήκες. Μπορούν επίσης να παρασκευάζονται επιχρίσματα αίματος για εξέταση, ιδίως εάν ο μυελός των οστών αποτελεί ενδεχομένως όργανο-στόχο, αν και η αξία της εξέτασης αυτής για την αξιολόγηση του δυναμικού καρκινογενετικότητας/ογκογενετικότητας έχει αμφισβητηθεί (32).

ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΑ

Νεκροψία

36. Όλα τα ζώα της μελέτης, εκτός των ζώων-φρουρών (βλέπε παράγραφο 20) και άλλων δορυφορικών ζώων, πρέπει να υποβάλλονται σε πλήρη, λεπτομερή νεκροψία η οποία περιλαμβάνει προσεκτική εξέταση της εξωτερικής επιφάνειας του σώματος, όλων των στομίων, της κρανιακής, θωρακικής και περιτοναϊκής κοιλότητας και του περιεχομένου τους. Ενδέχεται να απαιτείται η διενέργεια νεκροψίας σε ζώα-φρουρούς και άλλα δορυφορικά ζώα κατά περίπτωση, επαφιέμενη στη διακριτική ευχέρεια του διευθυντή της μελέτης. Το βάρος των οργάνων δεν μετράται συνήθως στο πλαίσιο μελετών καρκινογενετικότητας, καθώς οι αλλαγές λόγω γήρανσης και, σε μεταγενέστερα στάδια, η ανάπτυξη όγκων ανατρέπουν τη χρησιμότητα των δεδομένων βάρους των οργάνων. Ωστόσο, το βάρος των οργάνων ενδέχεται να είναι εξαιρετικά σημαντικό για την αξιολόγηση του βάρους της απόδειξης και ιδίως για εκτιμήσεις του τρόπου δράσης. Οι σχετικές μετρήσεις στο πλαίσιο μιας δορυφορικής μελέτης θα πρέπει να εκτελούνται εντός ενός έτους, το αργότερο, από την έναρξη της μελέτης.

▼**M4**

37. Οι ακόλουθοι ιστοί πρέπει να διατηρούνται στο καταλληλότερο μονιμοποιητικό υλικό, τόσο για τον τύπο ιστού όσο και για το είδος ιστοπαθολογικής εξέτασης που πρόκειται να ακολουθήσει (33) (οι ιστοί που αναφέρονται εντός αγκύλων διατηρούνται προαιρετικά):

όλες οι μακροσκοπικές βλάβες	καρδιά	πάγκρεας	στόμαχος (προστόμαχος, αδενικό τμήμα στομάχου)
επινεφρίδιος αδένας	ειλεός	παραθυρεοειδής αδένας	[δόντια]
αορτή	νήστις	περιφερειακό νεύρο	όρχις
εγκέφαλος (συμπεριλαμβανομένων τομών του εγκεφάλου, της παρεγκεφαλίδας και του προμήκη μυελού/της γέφυρας)	νεφρός	υπόφυση	Θύμος αδένας
τυφλό έντερο	δακρυγόνος αδένας (εξωβολβικός)	προστάτης	θυρεοειδής
τράχηλος της μήτρας	ήπαρ	ορθό	[γλώσσα]
πηκτικός αδένας	πνεύμονας	σιελογόνος αδένας	τραχεία
κόλον	λεμφαδένες (επιπολής και εν τω βάθει)	σπερματοδόχος κύστη	ουροδόχος κύστη
δωδεκαδάκτυλο	μαστικός αδένας (υποχρεωτικά για θηλυκά ζώα και, εάν μπορεί ορατά να ανατμηθεί, από αρσενικά ζώα)	σκελετικός μυς	μήτρα (συμπεριλαμβανομένου του τραχήλου της μήτρας)
επιδιδυμίδα	[ανώτερη αναπνευστική οδός, συμπεριλαμβανομένης της μύτης, των κογχών και των παραρρινίων κόλπων]	δέρμα	[ουρητήρας]
οφθαλμός (συμπεριλαμβανομένου του αμφιβληστροειδή)	οισοφάγος	νωτιαίος μυελός (σε τρία επίπεδα: αυχενικός, μεσοθωρακικός και οσφυϊκός)	[ουρήθρα]
[μηριαίο οστό μαζί με την άρθρωση]	[οσφρητικός βολβός]	σπλήνα	κόλπος
χοληδόχος κύστη (για άλλα είδη εκτός του επίμυ)	ωοθήκη	[στέρνο],	τομή του μυελού των οστών και/ή πρόσφατα αναρροφηθείς μυελός των οστών
αδένας Harderian			

Στην περίπτωση οργάνων σε ζεύγη, π.χ. νεφροί, επινεφρίδια, θα πρέπει να διατηρούνται αμφότερα τα όργανα. Βάσει των κλινικών και άλλων ευρημάτων, ενδέχεται να πρέπει να εξεταστούν επιπρόσθετοι ιστοί. Κάθε όργανο που, λόγω των γνωστών ιδιοτήτων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, θεωρείται πιθανό να αποτελεί όργανο-στόχο, πρέπει επίσης να διατηρείται. Σε μελέτες που περιλαμβάνουν χορήγηση μέσω του δέρματος, θα πρέπει να διατηρούνται τα όργανα που αναφέρονται στον κατάλογο οργάνων που πρέπει να διατηρούνται σε μελέτες χορήγησης από το στόμα, ενώ απαιτείται επίσης ειδική δειγματοληψία και διατήρηση δέρματος από το σημείο έκθεσης. Σε αναπνευστικές μελέτες, ο κατάλογος των προς διατήρηση και εξέταση ιστών της αναπνευστικής οδού θα πρέπει να συμμορφώνεται με τις συστάσεις των κεφαλαίων Β.8 και Β.29 του παρόντος παραρτήματος. Στην περίπτωση άλλων οργάνων/ιστών (επιπροσθέτως των συγκεκριμένων ιστών της αναπνευστικής οδού που πρέπει να διατηρούνται), θα πρέπει να εξετάζεται ο κατάλογος οργάνων που παρατίθεται για την περίπτωση μελετών έκθεσης μέσω του στόματος.

▼M4

Ιστοπαθολογία

38. Διατίθεται καθοδήγηση σχετικά με τις βέλτιστες πρακτικές κατά τη διεξαγωγή μελετών τοξικολογικής παθολογίας (33). Εξέταση θα πρέπει να διενεργείται τουλάχιστον στους ακόλουθους ιστούς:

— σε όλους τους ιστούς της ομάδας υψηλής δόσης και της ομάδας των μαρτύρων,

— σε όλους τους ιστούς των ζώων που πέθαναν ή θανατώθηκαν κατά τη διάρκεια της μελέτης,

— σε όλους τους ιστούς που εμφανίζουν μακροσκοπικές ανωμαλίες, συμπεριλαμβανομένων όγκων,

— όταν παρατηρούνται σχετικές με την αγωγή ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις στην ομάδα υψηλής δόσης, πρέπει να εξετάζονται οι ίδιοι ιστοί σε όλα τα ζώα σε όλες τις άλλες ομάδες δόσεων,

— στην περίπτωση οργάνων σε ζεύγη, π.χ. νεφροί, επινεφρίδια, θα πρέπει να εξετάζονται αμφότερα τα όργανα.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Στοιχεία

39. Θα πρέπει να παρέχονται δεδομένα για όλες τις παραμέτρους που αξιολογήθηκαν για κάθε ζώο χωριστά. Επιπλέον, όλα τα στοιχεία πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα ο οποίος περιλαμβάνει, για κάθε ομάδα αγωγής, τον αριθμό των ζώων κατά την έναρξη της αγωγής, τον αριθμό των ζώων που ευρέθησαν νεκρά κατά τη διάρκεια της αγωγής ή θανατώθηκαν για να μην ταλαιπωρηθούν, τον χρόνο θανάτου ή θανάτωσης, τον αριθμό των ζώων που εμφάνισαν εκδηλώσεις τοξικότητας, περιγραφή των παρατηρηθέντων τοξικών συμπτωμάτων, συμπεριλαμβανομένου του χρόνου εμφάνισής τους, της διάρκειας και της σοβαρότητάς τους, τον αριθμό των ζώων που παρουσίασαν αλλοιώσεις, το είδος των αλλοιώσεων και το ποσοστό των ζώων που εμφάνισαν καθέναν από τους τύπους αλλοιώσεων. Συνοπτικοί πίνακες στοιχείων θα πρέπει να αναφέρουν τις μέσες και τυπικές αποκλίσεις (όσον αφορά δεδομένα συνεχούς δοκιμής) που διαπιστώθηκαν σε ζώα που εμφάνισαν τοξικές επιδράσεις ή κακώσεις, καθώς και διαβάθμιση των κακώσεων.

40. Ιστορικά δεδομένα ελέγχου ενδέχεται να αποδειχθούν πολύτιμα για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της μελέτης, π.χ. στην περίπτωση που υπάρχουν ενδείξεις ότι τα δεδομένα που προκύπτουν από παράλληλους μάρτυρες αποκλίνουν σημαντικά σε σύγκριση με πρόσφατα δεδομένα από ζώα-μάρτυρες από την ίδια εγκατάσταση ελέγχου/αποικία. Εφόσον έχουν αξιολογηθεί, θα πρέπει να υποβάλλονται ιστορικά δεδομένα ελέγχου από το ίδιο εργαστήριο και να αφορούν ζώα της ίδιας ηλικίας και φυλής, τα οποία έχουν παραχθεί κατά τη διάρκεια των πέντε ετών που προηγήθηκαν της συγκεκριμένης μελέτης.

41. Όταν είναι δυνατόν, τα αριθμητικά αποτελέσματα αξιολογούνται με τη βοήθεια στατιστικής μεθόδου γενικής αποδοχής. Οι στατιστικές μέθοδοι και τα προς ανάλυση δεδομένα πρέπει να επιλέγονται κατά τον σχεδιασμό της μελέτης (παράγραφος 9). Η επιλογή θα πρέπει να προβλέπει διορθώσεις βάσει της επιβίωσης, εφόσον απαιτούνται.

Έκθεση δοκιμής

42. Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Ελεγχόμενη χημική ουσία:

— φυσική μορφή, καθαρότητα και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά,

— δεδομένα ταυτοποίησης,

▼M4

— πηγή χημικής ουσίας,

— αριθμό παρτίδας,

— πιστοποιητικό χημικής ανάλυσης.

Φορέας (κατά περίπτωση):

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα, (εάν δεν πρόκειται για νερό).

Για τα πειραματόζωα:

— είδος/φυλή που χρησιμοποιήθηκε και αιτιολόγηση της επιλογής,

— αριθμός, ηλικία και φύλο των ζώων στην αρχή της δοκιμής,

— προέλευση, συνθήκες στέγασης, διατροφή κ.λπ.,

— βάρος κάθε ζώου κατά την έναρξη της δοκιμής.

Συνθήκες δοκιμής:

— αιτιολόγηση της οδού χορήγησης και της επιλογής δόσης,

— εφόσον έχουν χρησιμοποιηθεί, στατιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των δεδομένων,

— λεπτομερή στοιχεία για το σκεύασμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας/παρασκεύασμα του σιτηρεσίου,

— αναλυτικά στοιχεία για τη συγκέντρωση, τη σταθερότητα και την ομοιογένεια του παρασκευάσματος,

— οδός χορήγησης και λεπτομέρειες σχετικά με τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας,

— στην περίπτωση αναπνευστικών μελετών, εάν αφορούσαν ρινική ή ολόσωμη έκθεση,

— πραγματικές δόσεις (mg/kg βάρους σώματος/ημέρα) και συντελεστής μετατροπής της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην τροφή ή το πόσιμο νερό (mg/kg ή ppm) σε πραγματική δόση, εφόσον είναι εφικτό,

— λεπτομερή στοιχεία σχετικά με την ποιότητα της τροφής και του νερού.

Αποτελέσματα (θα πρέπει να παρουσιάζονται συνοπτικά δεδομένα σε πίνακα και δεδομένα για το κάθε ζώο)

Γενικά

— δεδομένα επιβίωσης,

— βάρος του σώματος/μεταβολές βάρους σώματος,

— κατανάλωση τροφής, υπολογισμοί απόδοσης τροφής, εάν έχουν γίνει, και κατανάλωση νερού, κατά περίπτωση,

— τοξικοκινητικά δεδομένα (εάν είναι διαθέσιμα),

— οφθαλμοσκοπικά δεδομένα (εάν είναι διαθέσιμα),

— αιματολογικά δεδομένα (εάν είναι διαθέσιμα),

— κλινικά χημικά δεδομένα (εάν είναι διαθέσιμα).

▼**M4**

Κλινικά ευρήματα

— ενδείξεις τοξικότητας,

— συχνότητα (και εάν έχει αξιολογηθεί, σοβαρότητα) τυχόν ανωμαλίας,

— φύση, σοβαρότητα και διάρκεια των κλινικών παρατηρήσεων (εάν είναι παροδικές ή μόνιμες).

Δεδομένα νεκροψίας

— τελικό βάρος σώματος,

— βάρος οργάνων (και λόγος βάρους οργάνων/σώματος, κατά περίπτωση),

— ευρήματα νεκροψίας, συχνότητα και σοβαρότητα ανωμαλιών.

Ιστοπαθολογία

— μη νεοπλασματικά ιστοπαθολογικά ευρήματα,

— νεοπλασματικά ιστοπαθολογικά ευρήματα,

— συσχετισμός μεταξύ των μακροσκοπικών και των μικροσκοπικών ευρημάτων,

— αναλυτική περιγραφή όλων των σχετικών με την αγωγή ιστοπαθολογικών ευρημάτων, συμπεριλαμβανομένων διαβαθμίσεων σοβαρότητας,

— αναφορά τυχόν αξιολόγησης αντικειμενοφόρων από ομοτίμους.

Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, κατά περίπτωση.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων, συμπεριλαμβανομένων των εξής:

— συζήτηση τυχόν προσεγγίσεων μοντελοποίησης,

— σχέσεις δόσης-απόκρισης,

— ιστορικά δεδομένα ελέγχου,

— συνεκτίμηση τυχόν πληροφοριών για τον τρόπο δράσης της ουσίας,

— προσδιορισμό τιμών δόσης αναφοράς, NOAEL ή LOAEL,

— σημασία για τον άνθρωπο.

Συμπεράσματα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) OECD (1995), Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) EPA (2005), Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

(3) Combes R.D., Gaunt I., Balls M. (2004), A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System, *ATLA* 32: 163-208.

(4) Barlow S.M., Greig J.B., Bridges J.W. et al (2002), Hazard identification by methods of animal-based toxicology, *Food. Chem. Toxicol.* 40: 145-191.

(5) Chhabra R.S., Bucher J.R., Wolfe M., Portier C. (2003), Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 206: 437-445.

▼M4

(6) Κεφάλαιο B.27 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμή υποχρόνιας τοξικότητας από το στόμα — Μελέτη τοξικότητας 90 ημερών με επαναλαμβανόμενη δόση από το στόμα σε μη τρωκτικά.

(7) OECD (2012), Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 — Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, διαθέσιμο στον δημόσιο ιστότοπο του ΟΟΣΑ για τις κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών, στη διεύθυνση www.oecd.org/env/testguidelines

(8) OECD (2009), Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(9) Κεφάλαιο B.8 του παρόντος παραρτήματος: Υποξεία αναπνευστική τοξικότητα: μελέτη 28 ημερών.

(10) Κεφάλαιο B.29 του παρόντος παραρτήματος: Υποχρόνια αναπνευστική τοξικότητα: μελέτη 90 ημερών.

(11) Κεφάλαιο B.9 του παρόντος παραρτήματος: Τοξικότητα επαναλαμβανόμενης (28 ημέρες) δόσης (δερματική).

(12) Boobis A.R., Cohen S.M., Dellarco V., McGregor D., Meek M.E., Vickers C., Willcocks D., Farland W. (2006), IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans, *Crit. Rev. in Toxicol.* 36:793-801.

(13) Cohen S.M., Meek M.E., Klaunig J.E., Patton D.E., και Fenner-Crisp P.A. (2003), The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview, *Crit. Rev. Toxicol.* 33:581-589.

(14) Holsapple M.P., Pitot H.C., Cohen S.N., Boobis A.R., Klaunig J.E., Pastoor T., Dellarco V.L., Dragan Y.P. (2006), Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk, *Toxicol. Sci.* 89:51-56.

(15) Meek E.M., Bucher J.R., Cohen S.M., Dellarco V., Hill R.N., Lehman-McKemmon L.D., Longfellow D.G., Pastoor T., Seed J., Patton D.E. (2003), A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action, *Crit. Rev. Toxicol.* 33:591-653.

(16) Carmichael N.G., Barton H.A., Boobis A.R. et al (2006), Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements, *Critical Reviews in Toxicology* 36: 1-7.

(17) Barton H.A., Pastoor T.P., Baetcke T. et al (2006), The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, *Critical Reviews in Toxicology* 36: 9-35.

(18) Doe J.E., Boobis A.R., Blacker A. et al (2006), A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment, *Critical Reviews in Toxicology* 36: 37-68.

(19) Cooper R.L., Lamb J.S., Barlow S.M. et al (2006), A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment, *Critical Reviews in Toxicology* 36: 69-98.

(20) OECD (2002), Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

(21) OECD (2000), Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

▼**M4**

(22) Rhomberg L.R., Baetcke K., Blancato J., Bus J., Cohen S., Conolly R., Dixit R., Doe J., Ekelman K., Fenner-Crisp P., Harvey P., Hattis D., Jacobs A., Jacobson-Kram D., Lewandowski T., Liteplo R., Pelkonen O., Rice J., Somers D., Turturro A., West W., Olin S. (2007), Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection, *Crit Rev. Toxicol.* 37 (9): 729-837.

(23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997), Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays, Foran JA (Ed.), ILSI Press, Washington, DC.

(24) Griffiths S.A., Parkinson C., McAuslane J.A.N. και Lumley C.E. (1994), The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals, *The Toxicologist* 14(1):214.

(25) Usui T., Griffiths S.A. και Lumley C.E. (1996), The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals, στο D'Arcy P.O.F. & Harron D.W.G. (eds), Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation, Queen's University Press, Belfast, pp. 279-284.

(26) Carmichael N.G., Enzmann H., Pate I., Waechter F. (1997), The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry, *Environ Health Perspect.* 105:1196-1203.

(27) Οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 22ας Σεπτεμβρίου 2010, περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς (ΕΕ L 276 της 20.10.2010, σ. 33).

(28) National Research Council (1985), Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington, D.C., US Dept. of Health and Human Services.

(29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988), Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments, ISBN 3-906255-04-2.

(30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006), Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(31) Diehl K.-H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J.-M., van de Vorstenbosch C. (2001), A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes, *Journal of Applied Toxicology* 21:15-23.

(32) Weingand K., et al. (1996), Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies, *Fund. Appl. Toxicol.* 29: 198-201.

(33) Crissman J., Goodman D., Hildebrandt P., et al. (2004), Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology, *Toxicologic Pathology* 32: 126-131.

▼**M4**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΣ

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

▼M4

Β.33. ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ/ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 453 του ΟΟΣΑ (2009). Η αρχική TG 453 εκδόθηκε το 1981. Θεωρήθηκε απαραίτητο να αναπτυχθεί η παρούσα επικαιροποιημένη μέθοδος δοκιμών Β.33 ώστε να αντανακλά τις πλέον πρόσφατες εξελίξεις στον τομέα της καλής μεταχείρισης των ζώων και τις κανονιστικές απαιτήσεις (1) (2) (3) (4) (5). Η επικαιροποίηση της παρούσας μεθόδου δοκιμών Β.33 διενεργήθηκε παράλληλα με τις αναθεωρήσεις του κεφαλαίου Β.32 «Μελέτες καρκινογενετικότητας» και του κεφαλαίου Β.30 «Μελέτες χρόνιας τοξικότητας» του παρόντος παραρτήματος, με στόχο τη λήψη πρόσθετων πληροφοριών από τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και την παροχή περαιτέρω λεπτομερών στοιχείων για την επιλογή των δόσεων. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών έχει σχεδιαστεί ώστε να χρησιμοποιείται για τον έλεγχο ενός ευρέος φάσματος χημικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένων φυτοφαρμάκων και βιομηχανικών χημικών ουσιών. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι ορισμένες λεπτομέρειες και απαιτήσεις ενδέχεται να διαφέρουν στην περίπτωση φαρμακευτικών ουσιών [βλέπε καθοδήγηση S1B της Διεθνούς διάσκεψης Εναρμόνισης (ICH) για τον έλεγχο της καρκινογενετικότητας φαρμακευτικών ουσιών].

2. Στην πλειονότητά τους, οι μελέτες χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας διεξάγονται σε είδη τρωκτικών. Επομένως και η παρούσα μέθοδος δοκιμών προορίζεται να εφαρμόζεται κυρίως σε μελέτες διεξαγόμενες με αυτά τα είδη. Εάν απαιτείται η διεξαγωγή τέτοιων μελετών σε άλλα είδη εκτός των τρωκτικών, μπορούν επίσης να εφαρμόζονται οι περιγραφόμενες αρχές και διαδικασίες, με κατάλληλες τροποποιήσεις, μαζί με αυτές που περιγράφονται στο κεφάλαιο Β.27 «Μελέτη τοξικότητας 90 ημερών με επαναλαμβανόμενη δόση από το στόμα σε μη τρωκτικά» του παρόντος παραρτήματος (6), όπως περιγράφεται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 του ΟΟΣΑ για τον σχεδιασμό και τη διεξαγωγή μελετών χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας (7).

3. Οι τρεις βασικές οδοί χορήγησης ουσιών που χρησιμοποιούνται σε μελέτες χρόνιας τοξικότητας/καρκινογενετικότητας είναι μέσω του στόματος, μέσω του δέρματος και μέσω της εισπνοής. Η επιλογή οδού χορήγησης εξαρτάται από τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και την κύρια οδό έκθεσης του ανθρώπου. Πρόσθετες πληροφορίες για την επιλογή οδού έκθεσης παρέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 του ΟΟΣΑ (7).

4. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών εστιάζει στην έκθεση μέσω της στοματικής οδού, της συνηθέστερα χρησιμοποιούμενης οδού στις μελέτες χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας. Παρόλο που οι μακροπρόθεσμες μελέτες που περιλαμβάνουν έκθεση μέσω του δέρματος ή της αναπνευστικής οδού ενδέχεται να είναι επίσης απαραίτητες για την εκτίμηση των κινδύνων για την ανθρώπινη υγεία και/ή ενδέχεται να απαιτούνται βάσει συγκεκριμένων κανονιστικών καθεστώτων, αμφότερες οι οδοί έκθεσης είναι τεχνικά πολύπλοκες σε σημαντικό βαθμό. Παρόλο που οι μελέτες αυτές θα πρέπει να σχεδιάζονται κατά περίπτωση, η μέθοδος δοκιμών που περιγράφεται στο κεφάλαιο αυτό για την εκτίμηση και την αξιολόγηση της χρόνιας τοξικότητας και της καρκινογενετικότητας που προκαλούνται με χορήγηση από το στόμα θα μπορούσε να αποτελέσει τη βάση ενός πρωτοκόλλου για αναπνευστικές και/ή δερματικές μελέτες όσον αφορά συστάσεις για περιόδους αγωγής, κλινικές και παθολογικές παραμέτρους κ.λπ. Ο ΟΟΣΑ έχει εκδώσει έγγραφα καθοδήγησης σχετικά με τη χορήγηση ελεγχόμενων χημικών ουσιών μέσω της αναπνευστικής οδού (7)(8) και του δέρματος (7). Τα κεφάλαια Β.8 (9) και Β.29 (10) του παρόντος παραρτήματος, καθώς και το έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ σχετικά με τις δοκιμές οξείας αναπνευστικής τοξικότητας (8), θα πρέπει να λαμβάνονται ιδιαιτέρως υπόψη κατά τον σχεδιασμό πιο μακροπρόθεσμων μελετών που περιλαμβάνουν έκθεση μέσω της αναπνευστικής οδού. Το κεφάλαιο Β.9 του παρόντος παραρτήματος (11) θα πρέπει να λαμβάνεται ιδιαιτέρως υπόψη στην περίπτωση δοκιμών μέσω του δέρματος.

▼M4

5. Η συνδυασμένη μελέτη χρόνιας τοξικότητας/καρκινογενετικότητας παρέχει πληροφορίες σχετικά με τους πιθανούς κινδύνους για την υγεία που ενδέχεται να προκύπτουν από επανειλημμένη έκθεση έως και για ολόκληρη τη διάρκεια ζωής του χρησιμοποιούμενου είδους. Η μελέτη παρέχει πληροφορίες για τις τοξικές επιδράσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, συμπεριλαμβανομένης της πιθανής καρκινογενετικότητας, για ενδεχόμενα όργανα στόχο και για την πιθανότητα συσσώρευσης. Παρέχει εκτίμηση του μέγιστου επιπέδου στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς τοξικές επιδράσεις και, στην περίπτωση μη γονιδιοτοξικών καρκινογόνων, αποκρίσεις εμφάνισης όγκου, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό κριτηρίων ασφαλείας για την έκθεση του ανθρώπου. Τονίζεται επίσης η ανάγκη προσεκτικής κλινικής παρατήρησης των πειραματόζωων προκειμένου να ληφθούν όσο το δυνατόν περισσότερες πληροφορίες.

6. Οι στόχοι των μελετών χρόνιας τοξικότητας/καρκινογενετικότητας που καλύπτονται από την παρούσα μέθοδο δοκιμών περιλαμβάνουν:

— τον προσδιορισμό των καρκινογόνων ιδιοτήτων μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας οι οποίες προκαλούν αυξημένη συχνότητα νεοπλασμάτων, αυξημένο ποσοστό κακοηθών νεοπλασμάτων ή μείωση του χρόνου που μεσολαβεί έως την εμφάνιση νεοπλασμάτων, σε σύγκριση με δοκιμασίες με παράλληλες ομάδες-μάρτυρες,

— τον προσδιορισμό του χρόνου που μεσολαβεί έως την εμφάνιση νεοπλασμάτων,

— τον προσδιορισμό της χρόνιας τοξικότητας της ελεγχόμενης χημικής ουσίας,

— τον προσδιορισμό οργάνων-στόχου χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας,

— τον χαρακτηρισμό της σχέσης δόσης-απόκρισης,

— τον προσδιορισμό του επιπέδου στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις (NOAEL) ή της αφετηρίας για τον καθορισμό δόσης αναφοράς (BMD),

— την παρέκταση των καρκινογόνων επιδράσεων στην έκθεση του ανθρώπου σε χαμηλά επίπεδα δόσης,

— την πρόβλεψη επιδράσεων χρόνιας τοξικότητας στα επίπεδα έκθεσης του ανθρώπου,

— την παροχή δεδομένων για τον έλεγχο υποθέσεων σχετικά με τον τρόπο δράσης (2) (7) (12) (13) (14) (15).

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

7. Κατά την εκτίμηση και την αξιολόγηση της ενδεχόμενης καρκινογενετικότητας και χρόνιας τοξικότητας μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας, το πειραματικό εργαστήριο θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη όλες τις διαθέσιμες πληροφορίες για την ελεγχόμενη χημική ουσία πριν από τη διεξαγωγή της μελέτης, ώστε να εστιάζεται ο σχεδιασμός στον πλέον αποδοτικό έλεγχο των τοξικολογικών ιδιοτήτων της ουσίας και να ελαχιστοποιείται η χρήση των ζώων. Οι πληροφορίες και η μελέτη του τρόπου δράσης μιας ουσίας για την οποία υπάρχουν υπόνοιες ότι είναι καρκινογόνος (2) (7) (12) (13) (14) (15) είναι ιδιαιτέρως σημαντικές, δεδομένου ότι ο βέλτιστος σχεδιασμός ενδέχεται να διαφέρει ανάλογα με το εάν είναι γνωστό ή υπάρχουν υπόνοιες ότι η ελεγχόμενη χημική ουσία είναι γονιδιοτοξική καρκινογόνος ουσία. Περαιτέρω κατευθύνσεις για ζητήματα σχετικά με τον τρόπο δράσης περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7).

8. Πληροφορίες που θα βοηθήσουν στον σχεδιασμό της μελέτης είναι, μεταξύ άλλων, η ταυτότητα, η χημική δομή και οι φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας· τυχόν πληροφορίες για τον τρόπο δράσης· τα αποτελέσματα δοκιμών τοξικότητας *in vitro* ή *in vivo*, συμπεριλαμβανομένων δοκιμών γονιδιοτοξικότητας· οι προβλεπόμενες χρήσεις και η δυνητική έκθεση του ανθρώπου· τα διαθέσιμα δεδομένα (Q)SAR, δεδομένα μεταλλαξιγένεσης/γονιδιοτοξικότητας, καρκινογενετικότητας και άλλα τοξικολογικά δεδομένα για δομικά συγγενείς χημικές ουσίες· διαθέσιμα τοξικοκινητικά δεδομένα (κινητική μονής δόσης και επίσης επαναλαμβανόμενης δόσης, εφόσον υπάρχουν διαθέσιμα τέτοια δεδομένα) και δεδομένα

▼M4

που προέρχονται από άλλες μελέτες επανειλημμένης έκθεσης. Ο προσδιορισμός της χρόνιας τοξικότητας/καρκινογενετικότητας πρέπει να πραγματοποιείται μόνο μετά τη λήψη αρχικών πληροφοριών για την τοξικότητα μέσω δοκιμών τοξικότητας 28 ημερών και/ή 90 ημερών με επαναλαμβανόμενη δόση. Βραχυπρόθεσμες δοκιμές έναρξης-ανάπτυξης καρκίνου παρέχουν επίσης ενδεχομένως χρήσιμες πληροφορίες. Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο εφαρμογής μιας κλιμακωτής πειραματικής προσέγγισης για τον έλεγχο της καρκινογενετικότητας στο πλαίσιο της συνολικής αξιολόγησης των ενδεχόμενων δυσμενών επιδράσεων μιας συγκεκριμένης ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην υγεία (16) (17) (18) (19).

9. Θα πρέπει να προσδιορίζονται οι πλέον κατάλληλες στατιστικές μέθοδοι για την ανάλυση των αποτελεσμάτων, δεδομένου του σχεδιασμού και των στόχων του πειράματος, πριν από την έναρξη της μελέτης. Στα ζητήματα που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη περιλαμβάνονται τα εξής: εάν τα στατιστικά στοιχεία θα πρέπει να περιλαμβάνουν διορθώσεις βάσει της επιβίωσης, ανάλυση των σωρευτικών κινδύνων όγκου σε σχέση με τη διάρκεια επιβίωσης, ανάλυση του χρονικού διαστήματος έως την εμφάνιση όγκου και ανάλυση στην περίπτωση πρόωρου τερματισμού μιας ή περισσότερων ομάδων. Κατευθύνσεις για τις κατάλληλες στατιστικές αναλύσεις και βασικές παραπομπές σε διεθνώς αποδεκτές στατιστικές μεθόδους περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7) και στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 35 για την ανάλυση και την αξιολόγηση μελετών χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας (20).

10. Κατά τη διεξαγωγή μελέτης καρκινογενετικότητας θα πρέπει να ακολουθούνται πάντα οι κατευθυντήριες αρχές και εκτιμήσεις που περιγράφονται στο έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ για την αναγνώριση, την αξιολόγηση και τη χρήση κλινικών ενδείξεων ως λιγότερο βάναυσα καταληκτικά σημεία για τα χρησιμοποιούμενα πειραματόζωα στην αξιολόγηση ασφαλείας (21), και ιδίως η παράγραφος 62 του εγγράφου αυτού. Η παράγραφος αυτή αναφέρει ότι «Σε μελέτες που περιλαμβάνουν επανειλημμένες χορηγήσεις, όταν ένα ζώο εμφανίζει κλινικές ενδείξεις που είναι προοδευτικές και οδηγούν σε περαιτέρω επιδείνωση της κατάστασής του, θα πρέπει να λαμβάνεται μια τεκμηριωμένη απόφαση σχετικά με το εάν πρέπει να γίνει ευθανασία στο ζώο ή όχι. Η απόφαση θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη ζητήματα σχετικά με την αξία των πληροφοριών που θα ληφθούν από τη συνέχιση της συμμετοχής του ζώου αυτού στη μελέτη σε σχέση με τη συνολική του κατάσταση. Εάν ληφθεί απόφαση να εξακολουθήσει το ζώο να υποβάλλεται σε δοκιμή, θα πρέπει να αυξάνεται η συχνότητα των παρατηρήσεων, ανάλογα με τις ανάγκες. Επίσης ενδέχεται να διακόπτεται προσωρινά η χορήγηση δόσεων, εάν αυτό θα απαλύνει τον πόνο ή τη δυσφορία, ή να μειώνεται η δόση, εφόσον αυτό δεν επηρεάζει αρνητικά τον σκοπό της δοκιμής.».

11. Λεπτομερής καθοδήγηση σχετικά με τις αρχές επιλογής δόσεων για μελέτες χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας και ανάλυση τνω αρχών αυτών περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7), καθώς και σε δύο δημοσιεύσεις του International Life Sciences Institute (22) (23). Η βασική στρατηγική επιλογής των δόσεων εξαρτάται από τον πρωταρχικό στόχο (ή τους πρωταρχικούς στόχους) της μελέτης (παράγραφος 6). Κατά την επιλογή κατάλληλων επιπέδων δόσης θα πρέπει να επιτυγχάνεται ισορροπία μεταξύ του ελέγχου των κινδύνων αφενός και του χαρακτηρισμού των αποκρίσεων που προκαλούν οι χαμηλές δόσεις και της καταλληλότητάς τους αφετέρου. Αυτό είναι ιδιαιτέρως σημαντικό στην περίπτωση της παρούσας συνδυασμένης μελέτης χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας.

12. Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο διεξαγωγής της παρούσας συνδυασμένης μελέτης χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας αντί μιας μελέτης χρόνιας τοξικότητας (κεφάλαιο B.30 του παρόντος παραρτήματος) και μιας μελέτης καρκινογενετικότητας (κεφάλαιο B.32 του παρόντος παραρτήματος). Η συνδυασμένη δοκιμή προσφέρει μεγαλύτερη αποδοτικότητα ως προς τον χρόνο και το κόστος, καθώς και μείωση του αριθμού των ζώων που χρησιμοποιούνται, σε σύγκριση με τη διεξαγωγή δύο χωριστών μελετών, χωρίς να τίθενται σε κίνδυνο η ποιότητα των δεδομένων ούτε στη φάση χρόνιας τοξικότητας ούτε στη φάση καρκινογενετικότητας. Ωστόσο, ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίδεται στις αρχές επιλογής των δόσεων (παράγραφοι 11 και 22-26) κατά τη διεξαγωγή συνδυασμένης μελέτης χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας, ενώ είναι γνωστό επίσης ότι ενδέχεται να απαιτούνται χωριστές μελέτες βάσει ορισμένων κανονιστικών πλαισίων. Περαιτέρω κατευθύνσεις σχετικά με τον σχεδιασμό της συνδυασμένης μελέτης χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας ώστε να επιτυγχάνεται μέγιστη αποδοτικότητα της μελέτης όσον αφορά τις δυνατότητες μείωσης του αριθμού των χρησιμοποιούμενων ζώων, καθώς και μέσω του εξορθολογισμού των διαφόρων πειραματικών διαδικασιών, περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7).

▼M4

13. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών παρατίθενται στο τέλος του παρόντος κεφαλαίου και στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7).

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

14. Ο σχεδιασμός της μελέτης αποτελείται από δύο παράλληλες φάσεις, μία φάση χρόνιας τοξικότητας και μία φάση καρκινογενετικότητας (όσον αφορά τη διάρκεια κάθε φάσης, βλέπε παραγράφους 34 και 35, αντιστοίχως). Η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται συνήθως από το στόμα, αν και μπορεί να είναι επίσης κατάλληλη η δοκιμή μέσω της αναπνευστικής οδού ή του δέρματος. Κατά τη φάση χρόνιας τοξικότητας, η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται καθημερινά σε διαβαθμισμένες δόσεις σε διάφορες ομάδες πειραματόζωων, με ένα επίπεδο δόσης ανά ομάδα, συνήθως για περίοδο 12 μηνών, αν και μπορούν να επιλεγούν μεγαλύτερες ή μικρότερες περίοδοι, ανάλογα με τις κανονιστικές απαιτήσεις (βλέπε παράγραφο 34). Η διάρκεια αυτή επιλέγεται να είναι αρκετά μεγάλη ώστε να επιτρέπει την εκδήλωση τυχόν επιδράσεων σωρευτικής τοξικότητας, χωρίς να προκαλείται σύγχυση από τυχόν αλλαγές οφειλόμενες στη γήρανση. Ο σχεδιασμός της μελέτης μπορεί να περιλαμβάνει επίσης μία ή περισσότερες ενδιάμεσες θανατώσεις, π.χ. κατά τον 3ο και τον 6ο μήνα, και πρόσθετες ομάδες ζώων για τον σκοπό αυτό (βλέπε παράγραφο 20). Κατά τη φάση καρκινογενετικότητας, η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται καθημερινά σε διάφορες ομάδες πειραματόζωων για ένα σημαντικό διάστημα της διάρκειας ζωής τους. Πραγματοποιείται προσεκτική παρατήρηση των ζώων κατά τη διάρκεια και των δύο φάσεων για ενδείξεις τοξικότητας και για τυχόν ανάπτυξη νεοπλασματικών αλλοιώσεων. Τα ζώα που πεθαίνουν ή θανατώνονται κατά τη διάρκεια της δοκιμής νεκροτομούνται, και στο τέλος της δοκιμής, αυτά που έχουν επιζήσει θανατώνονται και νεκροτομούνται επίσης.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Επιλογή των ειδών ζώων

15. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών καλύπτει κυρίως την εκτίμηση και την αξιολόγηση της χρόνιας τοξικότητας και της καρκινογενετικότητας σε τρωκτικά (παράγραφος 2). Η χρήση άλλων ειδών εκτός των τρωκτικών μπορεί να εξετάζεται όταν τα διαθέσιμα δεδομένα δείχνουν ότι τα είδη αυτά έχουν μεγαλύτερη σημασία για την πρόβλεψη των επιδράσεων στην ανθρώπινη υγεία. Η επιλογή του είδους πρέπει να αιτιολογείται. Το προτιμότερο είδος είναι ο επίμυς, αν και μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλα είδη τρωκτικών, π.χ. ποντικοί. Παρόλο που η χρήση ποντικών σε δοκιμές καρκινογενετικότητας έχει ενδεχομένως περιορισμένη χρησιμότητα (24) (25) (26), βάσει ορισμένων υφιστάμενων κανονιστικών προγραμμάτων εξακολουθούν να απαιτούνται δοκιμές σε ποντικούς, εκτός εάν προσδιοριστεί ότι μια τέτοια δοκιμή δεν είναι απαραίτητη επιστημονικά. Οι επίμυες και οι ποντικοί είναι προτιμώμενα πειραματικά μοντέλα λόγω της σχετικά μικρής διάρκειας ζωής τους, της εκτεταμένης χρήσης τους σε φαρμακολογικές και τοξικολογικές μελέτες, της ευαισθησίας τους στην ογκογένεση και της διαθεσιμότητας καταλλήλως χαρακτηρισμένων φυλών. Λόγω των χαρακτηριστικών αυτών, υπάρχουν διαθέσιμες πολλές πληροφορίες για τη φυσιολογία και την παθολογία τους. Ο σχεδιασμός και η διεξαγωγή μελετών χρόνιας τοξικότητας/καρκινογενετικότητας σε άλλα είδη εκτός των τρωκτικών, όταν απαιτούνται τέτοιες μελέτες, θα πρέπει να βασίζονται στις αρχές που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, καθώς και στις αρχές του κεφαλαίου B.27 «Μελέτη τοξικότητας 90 ημερών με επαναλαμβανόμενη δόση από το στόμα σε μη τρωκτικά» του παρόντος παραρτήματος (6). Πρόσθετες πληροφορίες για την επιλογή είδους και φυλής παρέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 του ΟΟΣΑ (7).

16. Πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή νεαρά ενήλικα ζώα των συνήθων εργαστηριακών φυλών. Κατά προτίμηση, η συνδυασμένη μελέτη χρόνιας τοξικότητας/καρκινογενετικότητας θα πρέπει να διεξάγεται σε ζώα της ίδιας φυλής και προέλευσης με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν σε προκαταρκτική(-ές) μελέτη(-ες) τοξικότητας βραχύτερης διάρκειας, εάν είναι γνωστό ότι ζώα της συγκεκριμένης φυλής και προέλευσης εμφανίζουν προβλήματα εκπλήρωσης των γενικά αποδεκτών κριτηρίων επιβίωσης για πιο μακροπρόθεσμες μελέτες [βλέπε έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7)]. Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης μιας φυλής ζώων που διαθέτει αποδεκτό ποσοστό επιβίωσης για τη μακροπρόθεσμη μελέτη. Τα θηλυκά πρέπει να είναι άτοκα και να μη βρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης.

▼M4

Συνθήκες στέγασης και διατροφής

17. Τα ζώα μπορούν να στεγάζονται ατομικά ή σε κλωβούς σε μικρές ομάδες του ίδιου φύλου· τα ζώα θα πρέπει να στεγάζονται ατομικά μόνο εάν αυτό αιτιολογείται επιστημονικά (27) (28) (29). Οι κλωβοί διευθετούνται με τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται οι οφειλόμενες στη θέση των κλωβών επιδράσεις. Η θερμοκρασία στην αίθουσα πειραματόζωων θα πρέπει να είναι 22 °C (± 3 °C). Παρόλο που η σχετική υγρασία θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, παρά μόνο κατά τη διάρκεια του καθαρισμού της αίθουσας, τα επιδιωκόμενα επίπεδα της υγρασίας θα πρέπει να είναι 50-60 %. Ο φωτισμός πρέπει να είναι τεχνητός και η φωτοπερίοδος να αποτελείται από δώδεκα ώρες φωτός και δώδεκα ώρες σκότους. Όσον αφορά τη διατροφή, μπορούν να χρησιμοποιούνται συμβατικά εργαστηριακά σιτηρέσια με παροχή απεριόριστου πόσιμου νερού. Το σιτηρέσιο θα πρέπει να ανταποκρίνεται σε όλες τις διατροφικές απαιτήσεις των ειδών που υποβάλλονται στη δοκιμή και η περιεκτικότητα σε τροφικές προσμείξεις, συμπεριλαμβανομένων, μεταξύ άλλων, υπολειμμάτων ζιζανιοκτόνων, ανθεκτικών οργανικών ρύπων, φυτοοιστρογόνων, βαρέων μετάλλων και μυκοτοξινών, που θα μπορούσαν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της δοκιμής, θα πρέπει να είναι όσον το δυνατόν μικρότερη. Αναλυτικές πληροφορίες για τα επίπεδα θρεπτικών ουσιών και τροφικών προσμείξεων θα πρέπει να παρέχονται σε περιοδική βάση, τουλάχιστον στην αρχή της μελέτης και όταν υπάρχει αλλαγή στη χρησιμοποιούμενη παρτίδα και θα πρέπει να περιλαμβάνονται στην τελική έκθεση. Θα πρέπει αντίστοιχα να παρέχονται αναλυτικές πληροφορίες για το πόσιμο νερό που χρησιμοποιείται στη μελέτη. Η επιλογή σιτηρεσίου ενδέχεται να επηρεάζεται από την ανάγκη διασφάλισης κατάλληλης πρόσμειξης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και κάλυψης των διατροφικών απαιτήσεων των ζώων, όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται μαζί με την τροφή.

Προετοιμασία των ζώων

18. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή ζώα, εγκλιματισμένα στις εργαστηριακές συνθήκες για τουλάχιστον 7 ημέρες, τα οποία δεν έχουν υποβληθεί σε άλλες πειραματικές διαδικασίες στο παρελθόν. Στην περίπτωση τρωκτικών, η χορήγηση δόσεων στα ζώα θα πρέπει να ξεκινήσει το συντομότερο δυνατό μετά τον απογαλακτισμό και τον εγκλιματισμό και, κατά προτίμηση, πριν από την ηλικία των 8 εβδομάδων. Τα πειραματόζωα θα πρέπει να είναι χαρακτηρισμένα ως προς το είδος, τη φυλή, την προέλευση, το φύλο, το βάρος και την ηλικία τους. Στην αρχή της μελέτης, η διαφορά βάρους των χρησιμοποιούμενων ζώων σε κάθε φύλο θα πρέπει να είναι ελάχιστη και να μην υπερβαίνει το ± 20 % του μέσου βάρους όλων των ζώων της μελέτης, χωριστά για κάθε φύλο. Τα ζώα πρέπει να κατανέμονται τυχαία σε ομάδες μαρτύρων και αγωγής. Μετά την τυχαία κατανομή, δεν πρέπει να υπάρχουν σημαντικές διαφορές στο μέσο σωματικό βάρος μεταξύ των ομάδων σε κάθε φύλο. Εάν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, θα πρέπει να επαναλαμβάνεται, εάν είναι δυνατό, το στάδιο της τυχαίας κατανομής. Κάθε ζώο πρέπει να λαμβάνει έναν μοναδικό αριθμό αναγνώρισης και να φέρει μόνιμη σήμανση με τον αριθμό αυτό μέσω δερματοστηξίας, εμφυτεύματος μικροτσίπ ή άλλης κατάλληλης μεθόδου.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αριθμός και φύλο των ζώων

19. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ζώα και των δύο φύλων. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται επαρκής αριθμός ζώων που να επιτρέπει την ενδελεχή βιολογική και στατιστική αξιολόγηση. Στην περίπτωση τρωκτικών, κάθε ομάδα δόσης (όπως περιγράφεται στην παράγραφο 22) και κάθε παράλληλη ομάδα-μάρτυρας που προορίζεται για τη φάση καρκινογενετικότητας της μελέτης θα πρέπει, επομένως, να περιέχει τουλάχιστον 50 ζώα από κάθε φύλο. Ανάλογα με το στόχο της μελέτης, ενδέχεται να είναι δυνατή η αύξηση της στατιστικής ισχύος των βασικών εκτιμήσεων με διαφορική ανισοκατανομή των ζώων στις διάφορες ομάδες δόσεων, περιλαμβάνοντας περισσότερα από 50 ζώα στις ομάδες χαμηλών δόσεων, π.χ. για την εκτίμηση του δυναμικού καρκινογενετικότητας σε χαμηλές δόσεις. Ωστόσο, αναγνωρίζεται ότι μια μέτρια αύξηση στο μέγεθος των ομάδων συνεπάγεται σχετικά μικρή αύξηση στη στατιστική ισχύ της μελέτης. Κάθε ομάδα δόσης (όπως περιγράφεται στην παράγραφο 22) και κάθε παράλληλη ομάδα-μάρτυρας που προορίζεται για τη φάση χρόνιας τοξικότητας της μελέτης θα

▼M4

πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 10 ζώα από κάθε φύλο, στην περίπτωση που στη μελέτη χρησιμοποιούνται τρωκτικά. Επισημαίνεται ότι ο αριθμός αυτός είναι μικρότερος από τον αριθμό των ζώων στη μελέτη χρόνιας τοξικότητας (κεφάλαιο Β.30 του παρόντος παραρτήματος). Η ερμηνεία των δεδομένων από τον μειωμένο αριθμό ζώων ανά ομάδα στη φάση χρόνιας τοξικότητας της παρούσας συνδυασμένης μελέτης στηρίζεται επίσης στα δεδομένα από τον μεγαλύτερο αριθμό ζώων στη φάση καρκινογενετικότητας της μελέτης. Σε μελέτες με ποντικούς, ενδέχεται να απαιτούνται επιπλέον ζώα σε κάθε ομάδα δόσης, κατά τη φάση χρόνιας τοξικότητας, για τη διεξαγωγή όλων των απαιτούμενων αιματολογικών εξετάσεων. Περαιτέρω πληροφορίες για το στατιστικό σχεδιασμό της μελέτης και την επιλογή επιπέδων δόσης για τη μεγιστοποίηση της στατιστικής ισχύος παρέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7).

Πρόβλεψη για ενδιάμεσες θανατώσεις, δορυφορική ομάδα και ζώα-φρουρούς

20. Η μελέτη ενδέχεται να προβλέπει ενδιάμεσες θανατώσεις, π.χ. τον 6ο μήνα κατά τη φάση χρόνιας τοξικότητας, για την παροχή πληροφοριών σχετικά με την εξέλιξη των μη νεοπλασματικών αλλοιώσεων και μηχανιστικών πληροφοριών, εφόσον αυτό αιτιολογείται επιστημονικά. Στην περίπτωση που οι πληροφορίες αυτές είναι ήδη διαθέσιμες από προηγούμενες μελέτες τοξικότητας με επαναλαμβανόμενη δόση σχετικά με την ελεγχόμενη χημική ουσία, οι ενδιάμεσες θανατώσεις ενδέχεται να μην δικαιολογούνται επιστημονικά. Τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν στη φάση χρόνιας τοξικότητας της μελέτης, συνήθως διάρκειας 12 μηνών (παράγραφος 34), παρέχουν στοιχεία ενδιάμεσης θανάτωσης για τη φάση καρκινογενετικότητας της μελέτης, επιτυγχάνοντας έτσι μείωση στον αριθμό των ζώων που χρησιμοποιούνται συνολικά. Είναι επίσης δυνατόν να περιλαμβάνονται δορυφορικές ομάδες στη φάση χρόνιας τοξικότητας της μελέτης ώστε να παρακολουθείται η αναστρεψιμότητα τυχόν τοξικολογικών αλλαγών που προκαλεί η ελεγχόμενη χημική ουσία. Οι ομάδες αυτές μπορούν να περιορίζονται στο επίπεδο μέγιστης δόσης της μελέτης συν τους μάρτυρες. Είναι επίσης δυνατόν να περιλαμβάνεται μια πρόσθετη ομάδα ζώων-φρουρών (συνήθως 5 ζώα ανά φύλο) για την παρακολούθηση της κατάστασης ασθενείας, εάν είναι απαραίτητο, κατά τη διάρκεια της μελέτης (30). Περαιτέρω καθοδήγηση ώστε ο σχεδιασμός της μελέτης να περιλαμβάνει ενδιάμεσες θανατώσεις ζώων, δορυφορικά ζώα και ζώα-φρουρούς και, παράλληλα να ελαχιστοποιείται ο αριθμός των ζώων που χρησιμοποιούνται συνολικά, περιέχεται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7).

21. Εάν ο σχεδιασμός της μελέτης περιλαμβάνει δορυφορικά ζώα και/ή ενδιάμεσες θανατώσεις, ο αριθμός των ζώων που κάθε ομάδα δόσης περιλαμβάνει για τον σκοπό αυτό είναι συνήθως 10 ζώα ανά φύλο, ενώ ο συνολικός αριθμός ζώων που περιλαμβάνονται στον σχεδιασμό της μελέτης θα πρέπει να αυξάνεται κατά τον αριθμό των ζώων που προγραμματίζεται να θανατωθούν πριν από την ολοκλήρωση της μελέτης. Τα ζώα που θανατώνονται κατά τη διάρκεια της μελέτης και τα δορυφορικά ζώα θα πρέπει να υποβάλλονται κανονικά στις ίδιες παρατηρήσεις σχετικά, μεταξύ άλλων, με το σωματικό βάρος τους, την κατανάλωση τροφής/νερού, αιματολογικές μετρήσεις και μετρήσεις κλινικής βιοχημείας και παθολογικές εξετάσεις με αυτές στις οποίες υποβάλλονται τα ζώα στη φάση χρόνιας τοξικότητας της κυρίως μελέτης. Ωστόσο, ενδέχεται να γίνεται πρόβλεψη (στις ομάδες ενδιάμεσης θανάτωσης) για τον περιορισμό των μετρήσεων σε συγκεκριμένες, βασικές μετρήσεις, όπως σχετικά με τη νευροτοξικότητα ή την ανοσοτοξικότητα.

Ομάδες δόσεων και δοσολογία

22. Κατευθύνσεις για όλα τα ζητήματα που αφορούν την επιλογή των δόσεων και το διάστημα που πρέπει να παρεμβάλλεται μεταξύ των δόσεων περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7). Πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τρία επίπεδα δόσης και μια παράλληλη ομάδα-μάρτυρας, για αμφότερες τις φάσεις χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας. Τα επίπεδα δόσης θα βασίζονται γενικά στα αποτελέσματα πιο βραχυπρόθεσμων μελετών με επαναλαμβανόμενη δόση ή μελετών καθορισμού εύρους και θα πρέπει να λαμβάνουν υπόψη τυχόν υφιστάμενα τοξικολογικά και τοξικοκινητικά δεδομένα που είναι διαθέσιμα για την ελεγχόμενη χημική ουσία ή για σχετικές χημικές ουσίες.

▼M4

23. Για τη φάση χρόνιας τοξικότητας της μελέτης, ενδέχεται να μην θεωρείται απαραίτητη μια πλήρης μελέτη με τρία επίπεδα δόσεων, αν αναμένεται ότι μία δοκιμή σε ένα επίπεδο δόσης, ισοδύναμης με τουλάχιστον 1 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα, δεν είναι πιθανό να προκαλέσει αρνητικές συνέπειες. Η απόφαση αυτή θα πρέπει να βασίζεται σε πληροφορίες από προκαταρκτικές μελέτες και σε εκτίμηση ότι δεν αναμένεται να προκληθεί τοξικότητα, βάσει δεδομένων από χημικές ουσίες παρόμοιας δομής. Μπορεί να εφαρμόζεται όριο 1 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα, εκτός εάν από την έκθεση του ανθρώπου προκύψει ανάγκη χρησιμοποίησης υψηλοτέρου επίπεδου δόσης.

24. Θα πρέπει να επιλέγεται το μέγιστο επίπεδο δόσης για τον προσδιορισμό των κυρίων οργάνων-στόχου και τοξικών επιδράσεων, χωρίς να προκαλείται πόνος, σοβαρή τοξικότητα, νοσηρότητα ή θάνατος, εκτός εάν οι φυσικοχημικές ιδιότητες και οι βιολογικές επιδράσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας θέτουν περιορισμούς. Το επίπεδο μέγιστης δόσης θα πρέπει να επιλέγεται συνήθως έτσι ώστε να προκαλεί αποδεδειγμένη τοξικότητα, όπως αυτή μαρτυρείται, παραδείγματος χάριν, από τη μείωση της αύξησης του σωματικού βάρους (κατά περίπου 10 %). Ωστόσο, ανάλογα με τους στόχους της μελέτης (βλέπε παράγραφο 6), ενδέχεται να επιλέγεται ένα ανώτατο επίπεδο δόσης χαμηλότερο από τη δόση που παρέχει αποδεικτικά στοιχεία τοξικότητας, π.χ. εάν μια δόση προκαλεί δυσμενείς επιδράσεις που προκαλούν προβληματισμό αλλά που επηρεάζουν ελάχιστα τη διάρκεια ζωής ή το βάρος του σώματος.

25. Ενδέχεται να επιλέγονται επίπεδα δόσης και χρονικά διαστήματα μεταξύ των δόσεων ώστε να προσδιορίζεται σχέση δόσης-απόκρισης και, ανάλογα με τον τρόπο δράσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τιμή NOAEL ή άλλο επιδιωκόμενο αποτέλεσμα της μελέτης, π.χ. δόση αναφοράς (BMD) (βλέπε παράγραφο 27). Παράγοντες που θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά τον προσδιορισμό των χαμηλότερων δόσεων είναι, μεταξύ άλλων, η αναμενόμενη κλίση της καμπύλης δόσης-απόκρισης και οι δόσεις στις οποίες ενδέχεται να προκαλούνται σημαντικές αλλαγές στον μεταβολισμό ή στον τρόπο τοξικής δράσης ή οι οποίες αναμένεται να είναι το κατώτατο όριο ή η αφετηρία για παρέκταση σε χαμηλές δόσεις. Κατά τη διεξαγωγή συνδυασμένης μελέτης καρκινογενετικότητας/χρόνιας τοξικότητας, κύριος στόχος είναι η λήψη πληροφοριών για την εκτίμηση του κινδύνου καρκινογενετικότητας, ενώ η λήψη πληροφοριών για τη χρόνια τοξικότητα αποτελεί συνήθως δευτερεύοντα στόχο. Αυτό θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά την επιλογή επιπέδων δόσεων και χρονικών διαστημάτων μεταξύ των δόσεων για τη μελέτη.

26. Το επιλεγόμενο διάστημα μεταξύ των δόσεων εξαρτάται από τους στόχους της μελέτης και τα χαρακτηριστικά της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και δεν μπορεί να προβλεφθεί λεπτομερώς στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, αλλά υποδιπλάσια ή υποτετραπλάσια διαστήματα εξασφαλίζουν συχνά καλές επιδόσεις στη δοκιμή όταν χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό μειούμενων επιπέδων δόσης και η προσθήκη μιας τέταρτης ομάδας δοκιμής είναι συνήθως προτιμότερη της χρήσης πολύ μεγάλων διαστημάτων (π.χ. μεγαλύτερων ενός συντελεστή της τάξης του 6-10) μεταξύ των δόσεων. Γενικά θα πρέπει να αποφεύγεται η χρήση συντελεστών μεγαλύτερων του 10, ενώ, όταν χρησιμοποιούνται τέτοιοι συντελεστές, η χρήση τους θα πρέπει να αιτιολογείται.

27. Όπως περιγράφεται περαιτέρω στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7), τα σημεία που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την επιλογή των δόσεων είναι, μεταξύ άλλων, τα εξής:

— σημεία μη γραμμικότητας ή σημεία κλίσης στην καμπύλη δόσης-απόκρισης που είναι γνωστά ή για τα οποία υπάρχουν υπόνοιες ύπαρξης,

— τοξικοκινητική και ρύθμιση της δοσολογίας, στην περίπτωση που λαμβάνει ή δεν λαμβάνει χώρα μεταβολική επαγωγή, κορεσμός ή μη γραμμικότητα μεταξύ εξωτερικων και εσωτερικών δόσεων,

— πρόδρομες αλλοιώσεις, δείκτες επίδρασης ή δείκτες της λειτουργίας βασικών υποκείμενων βιολογικών διεργασιών,

▼M4

— βασικές (ή πιθανολογούμενες) πτυχές του τρόπου δράσης, όπως δόσεις στις οποίες αρχίζει να εμφανίζεται κυτταροτοξικότητα, διαταράσσονται τα επίπεδα ορμονών, καταβάλλονται οι ομοιοστατικοί μηχανισμοί κ.λπ.,

— περιοχές στην καμπύλη δόσης-απόκρισης στις οποίες απαιτείται μια ιδιαιτέρως αξιόπιστη εκτίμηση, π.χ. στο πεδίο τιμών της αναμενόμενης δόσης αναφοράς ή ενός πιθανολογούμενου κατώτατου ορίου,

— εκτίμηση των αναμενόμενων επιπέδων έκθεσης του ανθρώπου, ιδίως κατά την επιλογή μεσαίων και χαμηλών δόσεων.

28. Οι μάρτυρες είναι ομάδα μη υποβαλλόμενη σε αγωγή ή ομάδα προοριζόμενη για τον έλεγχο του φορέα, εφόσον χρησιμοποιείται φορέας για τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Με εξαίρεση τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τα ζώα της ομάδας μάρτυρα πρέπει να υφίστανται την ίδια ακριβώς μεταχείριση με τα ζώα της ομάδας αγωγής. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται φορέας, ο όγκος φορέα που χορηγείται στους μάρτυρες είναι ο μεγαλύτερος που χρησιμοποιείται στις ομάδες αγωγής. Εάν μια ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με την τροφή και προκαλεί σημαντικά μειωμένη πρόσληψη τροφής λόγω μειωμένης γευστικότητας του σιτηρεσίου, τότε ίσως είναι χρήσιμη ως καταλληλότερος μάρτυρας μια επιπλέον ομάδα-μάρτυρας στην οποία χορηγείται το ίδιο σιτηρέσιο.

Παρασκευή των δόσεων και χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

29. Η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται συνήθως από το στόμα, με την τροφή ή το πόσιμο νερό ή με καθετήρα. Πρόσθετες πληροφορίες για την επιλογή οδών και μεθόδων χορήγησης παρέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 του ΟΟΣΑ (7). Η οδός και η μέθοδος χορήγησης εξαρτώνται από τον σκοπό της μελέτης, τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τη βιοδιαθεσιμότητά της και την κύρια οδό και μέθοδο έκθεσης του ανθρώπου. Θα πρέπει να αιτιολογείται η επιλογή οδού και μεθόδου χορήγησης. Για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων, η χορήγηση μέσω της στοματικής οδού με καθετήρα θα πρέπει να επιλέγεται συνήθως μόνο για τους παράγοντες για τους οποίους η συγκεκριμένη οδός και μέθοδος χορήγησης αναμένεται εύλογα να αποτελούν ενδεχόμενο τρόπο έκθεσης του ανθρώπου (π.χ. φαρμακευτικές ουσίες). Διατροφικές ή περιβαλλοντικές χημικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένων των ζιζανιοκτόνων, χορηγούνται συνήθως με την τροφή ή το πόσιμο νερό. Ωστόσο, βάσει ορισμένων σεναρίων, π.χ. έκθεση κατά την εργασία, ενδέχεται να είναι καταλληλότερη η χορήγηση μέσω άλλων οδών.

30. Εφόσον είναι αναγκαίο, παρασκευάζεται διάλυμα ή εναιώρημα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε κατάλληλο φορέα. Εξετάζονται τα ακόλουθα χαρακτηριστικά του φορέα και άλλων προσθέτων, κατά περίπτωση: επιδράσεις στην απορρόφηση, στην κατανομή, στον μεταβολισμό ή στην κατακράτηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, επιδράσεις στις χημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας οι οποίες μπορούν να μεταβάλουν τα τοξικά χαρακτηριστικά της και επιδράσεις στην κατανάλωση τροφής ή νερού ή στη διατροφική κατάσταση των ζώων. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατόν, η χρήση υδατικού διαλύματος/εναιωρήματος, ως πρώτη επιλογή, διαλύματος/γαλακτώματος σε έλαιο (π.χ. αραβοσιτέλαιο) κατόπιν, και, ως τελευταία επιλογή, η χρήση διαλύματος σε άλλο φορέα. Σε περίπτωση που ο φορέας δεν είναι το νερό, τα τοξικά χαρακτηριστικά του φορέα πρέπει να είναι γνωστά. Πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες για τη σταθερότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και την ομοιογένεια των διαλυμάτων ή σιτηρεσίων δόσης (κατά περίπτωση) στις συνθήκες χορήγησης (π.χ. στο σιτηρέσιο).

31. Για τις χημικές ουσίες που χορηγούνται με την τροφή ή το πόσιμο νερό πρέπει να εξασφαλίζεται ότι οι χορηγούμενες ποσότητες ελεγχόμενης χημικής ουσίας δεν επηρεάζουν το κανονικό διατροφικό ισοζύγιο ή ισοζύγιο νερού. Σε μελέτες μακροπρόθεσμης τοξικότητας με χορήγηση με την τροφή, η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην τροφή δεν θα πρέπει να υπερβαίνει κανονικά ένα ανώτατο όριο 5 % του συνολικού σιτηρεσίου, ώστε να αποφεύγονται διατροφικές ανισορροπίες. Όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με την τροφή, πρέπει να χρησιμοποιείται είτε σταθερή συγκέντρωση στην τροφή (mg/kg σιτηρεσίου ή ppm) είτε σταθερό επίπεδο δόσης ως προς το βάρος του σώματος του ζώου (mg/kg βάρους σώματος), υπολογιζόμενο σε εβδομαδιαία βάση. Η χρησιμοποιούμενη εναλλακτική επιλογή πρέπει να διευκρινίζεται.

▼M4

32. Στην περίπτωση χορήγησης από το στόμα, χορηγούνται στα ζώα δόσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας καθημερινά (επτά ημέρες την εβδομάδα) για μια περίοδο 12 μηνών (φάση χρόνιας τοξικότητας) ή 24 μηνών (φάση καρκινογενετικότητας), βλέπε επίσης παραγράφους 33 και 34. Θα πρέπει να αιτιολογείται οποιοδήποτε άλλο καθεστώς δοσολογίας που τυχόν χρησιμοποιείται, π.χ. χορήγηση πέντε ημέρες την εβδομάδα. Στην περίπτωση χορήγησης μέσω του δέρματος, τα ζώα εκτίθενται κανονικά στην ελεγχόμενη χημική ουσία για τουλάχιστον 6 ώρες την ημέρα, 7 ημέρες την εβδομάδα, όπως προσδιορίζεται στο κεφάλαιο Β.9 του παρόντος παραρτήματος (11), για μια περίοδο 12 μηνών (φάση χρόνιας τοξικότητας) ή 24 μηνών (φάση καρκινογενετικότητας). Έκθεση μέσω της αναπνευστικής οδού πραγματοποιείται 6 ώρες την ημέρα, 7 ημέρες την εβδομάδα, αλλά ενδέχεται να εφαρμόζεται επίσης έκθεση για 5 ημέρες την εβδομάδα, εφόσον παρέχεται σχετική αιτιολόγηση. Η περίοδος έκθεσης είναι συνήθως μια περίοδος 12 μηνών (φάση χρόνιας τοξικότητας) ή 24 μηνών (φάση καρκινογενετικότητας). Σε περίπτωση ρινικής έκθεσης άλλων ειδών τρωκτικών εκτός των επιμύων, οι μέγιστες περίοδοι έκθεσης μπορούν να προσαρμόζονται ώστε να ελαχιστοποιείται η δυσφορία που νιώθει το κάθε είδος. Θα πρέπει να παρέχεται αιτιολόγηση στην περίπτωση που εφαρμόζεται διάρκεια έκθεσης μικρότερη των 6 ωρών ημερησίως. Βλέπε επίσης κεφάλαιο Β.8 του παρόντος παραρτήματος (9).

33. Όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με καθετήρα στα ζώα, η χορήγηση πρέπει να γίνεται με τη βοήθεια καθετήρα στομάχου ή κατάλληλης διασωλήνωσης, την ίδια περίπου ώρα κάθε ημέρα. Συνήθως χορηγείται μία δόση μία φορά την ημέρα, ενώ, στην περίπτωση που μια χημική ουσία έχει τοπική ερεθιστική δράση, μπορεί να διατηρείται η ημερήσια δοσολογία με τη χορήγηση μισών δόσεων (δύο φορές την ημέρα). Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Ο όγκος θα πρέπει να διατηρείται στο ελάχιστο εφικτό επίπεδο και δεν θα πρέπει να υπερβαίνει κανονικά το 1 ml/100 g βάρους σώματος, στην περίπτωση των τρωκτικών (31). Οι διαφορές του όγκου πρέπει να ελαχιστοποιούνται ρυθμίζοντας τη συγκέντρωση κατά τρόπο ώστε να εξασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλα τα επίπεδα δόσης. Εξαίρεση αποτελούν οι ενδεχομένως διαβρωτικές ή ερεθιστικές χημικές ουσίες, οι οποίες θα πρέπει να αραιώνονται ώστε να αποφεύγονται οι σοβαρές τοπικές επιδράσεις. Θα πρέπει να αποφεύγεται η διεξαγωγή δοκιμών σε συγκεντρώσεις που πιθανόν να αποδειχθούν διαβρωτικές ή ερεθιστικές για το γαστρεντερικό σύστημα.

Διάρκεια της μελέτης

34. Η περίοδος χορήγησης δόσεων και η διάρκεια της φάσης χρόνιας τοξικότητας της παρούσας μελέτης είναι συνήθως 12 μήνες. Ωστόσο, ο σχεδιασμός της μελέτης επιτρέπει επίσης την εφαρμογή της ως μελέτη είτε μικρότερης διάρκειας (π.χ. για 6 ή 9 μήνες) είτε μεγαλύτερης (π.χ. για 18 ή 24 μήνες), ανάλογα με τις απαιτήσεις συγκεκριμένων κανονιστικών καθεστώτων ή ανάλογα με συγκεκριμένους μηχανιστικούς σκοπούς. Θα πρέπει να αιτιολογείται οποιαδήποτε απόκλιση από τη διάρκεια έκθεσης των 12 μηνών, ιδίως στην περίπτωση βραχύτερων περιόδων. Όλες οι ομάδες δόσεων που κατανέμονται στη φάση αυτή θα τερματίζονται κατά τον προσδιορισθέντα χρόνο ώστε να αξιολογείται η χρόνια τοξικότητα και η μη νεοπλασματική παθολογία. Στις δορυφορικές ομάδες που περιλαμβάνονται στη μελέτη για την παρακολούθηση της αναστρεψιμότητας τυχόν τοξικολογικών αλλαγών προκαλούμενων από την ελεγχόμενη χημική ουσία θα πρέπει να μην χορηγούνται δόσεις για μια περίοδο τουλάχιστον 4 εβδομάδων, η οποία, ωστόσο, δεν θα υπερβαίνει το ένα τρίτο της συνολικής διάρκειας της μελέτης μετά την παύση της έκθεσης.

35. Η διάρκεια της φάσης καρκινογενετικότητας της μελέτης θα είναι κανονικά 24 μήνες για τα τρωκτικά, ήτοι χρόνος που καλύπτει το μεγαλύτερο μέρος της συνήθους διάρκειας ζωής των χρησιμοποιούμενων ζώων. Ενδέχεται να πραγματοποιούνται μελέτες μικρότερης ή μεγαλύτερης διάρκειας, ανάλογα με τη διάρκεια ζωής της φυλής των χρησιμοποιούμενων ζωικών ειδών, βάσει σχετικής αιτιολόγησης. Στην περίπτωση χρήσης συγκεκριμένων φυλών ποντικών, π.χ. των φυλών AKR/J, C3H/J ή C57BL/6J, ενδέχεται να είναι καταλληλότερο διάστημα μελέτης 18 μηνών. Κατωτέρω παρέχονται ορισμένες κατευθύνσεις σχετικά με τη διάρκεια της μελέτης, τον τερματισμό της και την επιβίωση. Περαιτέρω κατευθύνσεις, συμπεριλαμβανομένων εκτιμήσεων σχετικά με τη δυνατότητα αποδοχής μιας μελέτης αρνητικής καρκινογενετικότητας σε σχέση με τα δεδομένα επιβίωσης στη μελέτη, περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 του ΟΟΣΑ (7).

▼M4

— Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο τερματισμού της μελέτης όταν ο αριθμός των επιζώντων ζώων στις ομάδες με τις χαμηλότερες δόσεις ή στην ομάδα των μαρτύρων φτάσει σε ποσοστά κατώτερα του 25 %.

— Δεν απαιτείται τερματισμός της μελέτης στην περίπτωση που μόνο τα ζώα της ομάδας υψηλής δόσης πεθάνουν πρόωρα λόγω τοξικότητας.

— Τα δεδομένα επιβίωσης θα πρέπει να εξετάζονται χωριστά για κάθε φύλο.

— Η μελέτη δεν θα πρέπει να επεκτείνεται πέραν του σημείου στο οποίο τα δεδομένα που είναι διαθέσιμα από τη μελέτη δεν επαρκούν πλέον για την πραγματοποίηση μιας στατιστικά έγκυρης αξιολόγησης.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ (ΦΑΣΗ ΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ)

36. Θα πρέπει να ελέγχονται όλα τα ζώα, συνήθως στην αρχή και το τέλος κάθε ημέρας, καθώς και τα Σαββατοκύριακα και τις αργίες, ώστε να διαπιστώνεται τυχόν νοσηρότητα ή θνησιμότητά τους. Γενικές κλινικές παρατηρήσεις πρέπει να διεξάγονται τουλάχιστον μια φορά την ημέρα, κατά προτίμηση την (τις) ίδια(-ες) ώρα(-ες) κάθε μέρα και λαμβάνοντας υπόψη τον χρόνο κορυφώσεως των αναμενόμενων επιδράσεων μετά τη χορήγηση της δόσης, στην περίπτωση χορήγησης με καθετήρα.

37. Όλα τα ζώα πρέπει να υποβληθούν σε λεπτομερή κλινική παρατήρηση τουλάχιστον μία φορά πριν από την πρώτη έκθεση (προκειμένου να γίνουν συγκρίσεις μεταξύ των διαφόρων ζώων), στο τέλος της πρώτης εβδομάδας της μελέτης και, στη συνέχεια, σε μηνιαία βάση. Το πρωτόκολλο παρατήρησης θα πρέπει να είναι καθορισμένο έτσι ώστε να ελαχιστοποιούνται τυχόν αποκλίσεις μεταξύ των επιμέρους προσώπων που διενεργούν την παρατήρηση και να είναι ανεξάρτητες της ομάδας αγωγής. Οι παρατηρήσεις αυτές πρέπει να διενεργούνται έξω από τους κλωβούς, κατά προτίμηση σ' έναν τυποποιημένο χώρο και σε διάφορες χρονικές στιγμές σε κάθε περίπτωση. Καταγράφονται προσεκτικά, κατά προτίμηση με συστήματα βαθμολόγησης καθορισμένα σαφώς από το εργαστήριο. Καταβάλλεται προσπάθεια ώστε να είναι ελάχιστες οι διαφορές στις συνθήκες παρατήρησης. Καταγράφονται, μεταξύ άλλων, μεταβολές στο δέρμα, στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς, στους βλεννογόνους, εκκρίσεις και απεκκρίσεις καθώς και αυτόνομες ενέργειες (όπως δακρύρροια, ανόρθωση τριχών, μεταβολή της διαμέτρου της κόρης του οφθαλμού, του ρυθμού της αναπνοής). Καταγράφονται επίσης μεταβολές στο βάδισμα, στη στάση και στην απόκριση κατά τη μεταχείριση καθώς και η εμφάνιση κλονικών ή τονικών κινήσεων, στερεότυπων κινήσεων (όπως υπερβολική περιποίηση του εαυτού τους, συνεχείς περιστροφές) ή περίεργη συμπεριφορά (όπως αυτοακρωτηριασμός, βάδισμα προς τα πίσω) (32).

38. Η οφθαλμολογική εξέταση, με χρήση οφθαλμοσκοπίου ή ισοδύναμου κατάλληλου εξοπλισμού, πρέπει να διενεργείται σε όλα τα ζώα πριν από την πρώτη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Στο τέλος της μελέτης, η εξέταση πρέπει να διενεργείται, κατά προτίμηση σε όλα τα ζώα, τουλάχιστον όμως στις ομάδες υψηλής δόσης και στις ομάδες των μαρτύρων. Εάν διαπιστωθούν μεταβολές στους οφθαλμούς που σχετίζονται με την αγωγή, πρέπει να εξετάζονται όλα τα ζώα. Εάν η ανάλυση της δομής ή άλλες πληροφορίες καταδεικνύουν πρόκληση οφθαλμικής τοξικότητας, θα πρέπει να αυξηθεί η συχνότητα της οφθαλμικής εξέτασης.

39. Στην περίπτωση χημικών ουσιών οι οποίες, βάσει προηγούμενων μελετών τοξικότητας 28 ημερών και/ή 90 ημερών με επαναλαμβανόμενη δόση, μπορούν να προκαλέσουν νευροτοξικές επιδράσεις, ενδέχεται να διενεργούνται προαιρετικά πριν από την έναρξη της μελέτης και, μετά την έναρξη, ανά 3 μήνες έως και τη συμπλήρωση 12 μηνών, καθώς και στο τέλος της μελέτης (εάν η μελέτη διαρκεί περισσότερο από 12 μήνες), αξιολόγηση της αισθητηριακής ανταπόκρισης σε διαφορετικών ειδών ερεθίσματα (32) (π.χ. ακουστικά, οπτικά και ιδιοδεκτικά) (33), (34), (35), αξιολόγηση της δύναμης λαβής (36) και αξιολόγηση της μυϊκής δραστηριότητας (37). Λεπτομέρειες σχετικά με τις διαδικασίες που μπορούν να ακολουθηθούν παρέχονται στις σχετικές βιβλιογραφικές παραπομπές. Ωστόσο, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν επίσης εναλλακτικές διαδικασίες από αυτές που αναφέρονται στις παραπομπές.

▼M4

40. Στην περίπτωση χημικών ουσιών οι οποίες, βάσει προηγούμενων μελετών τοξικότητας 28 ημερών και/ή 90 ημερών με επαναλαμβανόμενη δόση, μπορούν να προκαλέσουν ανοσοτοξικές επιδράσεις, ενδέχεται να διενεργούνται προαιρετικά περαιτέρω έρευνες για το συγκεκριμένο καταληκτικό σημείο στο τέλος της μελέτης.

Βάρος σώματος, κατανάλωση τροφής και νερού και απόδοση της τροφής

41. Όλα τα ζώα πρέπει να ζυγίζονται κατά την έναρξη της αγωγής, τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα κατά τις πρώτες 13 εβδομάδες και τουλάχιστον μία φορά τον μήνα στη συνέχεια. Η κατανάλωση τροφής και η απόδοση της τροφής θα πρέπει να μετρώνται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα κατά τις πρώτες 13 εβδομάδες και τουλάχιστον μία φορά τον μήνα στη συνέχεια. Η κατανάλωση νερού θα πρέπει να μετράται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα κατά τις πρώτες 13 εβδομάδες και τουλάχιστον μία φορά τον μήνα στη συνέχεια, στην περίπτωση που η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται μέσω του πόσιμου νερού. Μετρήσεις της κατανάλωσης ύδατος πρέπει επίσης να λαμβάνονται υπόψη στις μελέτες κατά τις οποίες η δραστηριότητα πόσης μπορεί να μεταβληθεί.

Αιματολογικές εξετάσεις και κλινική βιοχημεία

42. Σε μελέτες που περιλαμβάνουν τρωκτικά, πρέπει να διενεργούνται αιματολογικές εξετάσεις σε όλα τα ζώα της μελέτης (10 αρσενικά και 10 θηλυκά ζώα ανά ομάδα), κατά τον 3ο, τον 6ο και το 12ο μήνα, καθώς και στο τέλος της μελέτης (αν διαρκεί περισσότερο από 12 μήνες). Στην περίπτωση χρήσης ποντικών, ενδέχεται να απαιτούνται δορυφορικά ζώα για τη διενέργεια όλων των απαιτούμενων αιματολογικών εξετάσεων (βλέπε παράγραφο 19). Σε μελέτες που διεξάγονται σε άλλα είδη εκτός των τρωκτικών, λαμβάνονται δείγματα από μικρότερο αριθμό ζώων (π.χ. 4 ζώα ανά φύλο και ανά ομάδα, στην περίπτωση μελετών σε σκύλους), σε ενδιάμεσες χρονικές στιγμές δειγματοληψίας και στο τέλος της μελέτης, όπως προβλέπεται και για τα τρωκτικά. Ενδέχεται να μη χρειάζεται να διενεργηθούν μετρήσεις τον 3ο μήνα, είτε σε τρωκτικά είτε σε άλλα είδη, εάν δεν έχει διαπιστωθεί επίδραση στις αιματολογικές παραμέτρους σε προηγούμενη μελέτη 90 ημερών που έχει διεξαχθεί με τη χρήση συγκρίσιμων επιπέδων δόσης. Τα δείγματα αίματος λαμβάνονται από ένα συγκεκριμένο σημείο, π.χ. με καρδιακή παρακέντηση ή από τον οφθαλμικό κόγχο, οπισθοβολβικά, υπό αναισθησία.

43. Πρέπει να εξετάζονται οι ακόλουθες παράμετροι (38): συνολικός αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων και διαφορικός λευκοκυτταρικός τύπος, αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων, αριθμός αιμοπεταλίων, αιματοκρίτης (HCT), μέσος όγκος ερυθρών αιμοσφαιρίων (MCV), μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης (MCH), μέση πυκνότητα αιμοσφαιρίνης (MCHC), χρόνος προθρομβίνης και ενεργός μερικός χρόνος θρομβοπλαστίνης. Άλλες αιματολογικές παράμετροι, όπως τα σωμάτια Heinz ή άλλη άτυπη μορφολογία ερυθρών αιμοσφαιρίων ή μεθαιμοσφαιρίνης ενδέχεται να μετρώνται κατά περίπτωση, ανάλογα με την τοξικότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Θα πρέπει να επιλεγεί συνολικά μια ευέλικτη προσέγγιση, ανάλογα με τις παρατηρούμενες και/ή αναμενόμενες επιδράσεις μιας δεδομένης ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία επηρεάζει το αιμοποιητικό σύστημα, ενδέχεται να ενδείκνυται εξέταση του αριθμού των δικτυοερυθροκυττάρων και της κυτταρολογίας του μυελού των οστών, αν και οι εξετάσεις αυτές δεν χρειάζεται να διενεργούνται συχνά.

44. Διενεργούνται βιοχημικές εξετάσεις για τη διερεύνηση κύριων τοξικών επιδράσεων στους ιστούς και, ειδικότερα, στους νεφρούς και στο ήπαρ, σε δείγματα αίματος που λαμβάνονται από όλα τα ζώα της μελέτης (10 αρσενικά και 10 θηλυκά ζώα ανά ομάδα), κατά τα ίδια χρονικά διαστήματα που προβλέπονται για τις αιματολογικές εξετάσεις. Στην περίπτωση χρήσης ποντικών, ενδέχεται να απαιτούνται δορυφορικά ζώα για τη διενέργεια όλων των απαιτούμενων εξετάσεων κλινικής βιοχημείας. Σε μελέτες που διεξάγονται σε άλλα είδη εκτός των τρωκτικών, λαμβάνονται δείγματα από μικρότερο αριθμό ζώων (π.χ. 4 ζώα ανά φύλο και ανά ομάδα, στην περίπτωση μελετών σε σκύλους), σε ενδιάμεσες χρονικές στιγμές δειγματοληψίας και στο τέλος της μελέτης, όπως προβλέπεται και για τα τρωκτικά. Ενδέχεται να μη χρειάζονται μετρήσεις τον 3ο μήνα, είτε σε τρωκτικά είτε

▼M4

σε άλλα είδη, εάν δεν έχει διαπιστωθεί επίδραση στις βιοχημικές παραμέτρους σε προηγούμενη μελέτη 90 ημερών που έχει διεξαχθεί με τη χρήση συγκρίσιμων επιπέδων δόσης. Συνιστάται να παραμένουν νηστικά τα ζώα (με την εξαίρεση των ποντικών) τη νύχτα που προηγείται της αιμοληψίας ([1]). Θα πρέπει να εξετάζονται οι ακόλουθες παράμετροι (38): γλυκόζη, ουρία (άζωτο ουρίας), κρεατινίνη, ολικές πρωτεΐνες, αλβουμίνη, ασβέστιο, νάτριο, κάλιο, ολική χοληστερόλη, τουλάχιστον δύο κατάλληλες εξετάσεις για την αξιολόγηση της ηπατοκυτταρικής επίδρασης (αλανινο-αμινοτρανσφεράση, ασπαραγινική αμινοτρασφεράση, γλουταμική αφυδρογονάση, ολικά χολικά οξέα) (39) και τουλάχιστον δύο κατάλληλες εξετάσεις για την αξιολόγηση της επίδρασης στο ηπατοχολικό σύστημα (αλκαλική φωσφατάση, γ-γλουταμυλοτρανσφεράση, 5-νουκλεοτιδάση, ολική χολερυθρίνη, ολικά χολικά οξέα) (39). Μπορούν να μετρώνται, κατά περίπτωση, και άλλες παράμετροι κλινικής χημείας, όπως τα τριγλυκερίδια μετά από νηστεία, ειδικές ορμόνες και η χολινεστεράση, ανάλογα με την τοξικότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Γενικά πρέπει να ακολουθείται ευέλικτη προσέγγιση, ανάλογα με τις παρατηρούμενες και/ή αναμενόμενες επιδράσεις από μια συγκεκριμένη ελεγχόμενη χημική ουσία.

45. Θα πρέπει να διενεργούνται αναλύσεις ούρων σε όλα τα ζώα της μελέτης (10 αρσενικά και 10 θηλυκά ζώα ανά ομάδα), σε δείγματα που συλλέγονται κατά τα ίδια διαστήματα με αυτά που προβλέπονται για τις αιματολογικές εξετάσεις και τις εξετάσεις κλινικής χημείας. Ενδέχεται να μη χρειάζονται μετρήσεις τον 3ο μήνα, εάν δεν έχει διαπιστωθεί επίδραση στις αναλύσεις ούρων σε προηγούμενη μελέτη 90 ημερών που έχει διεξαχθεί με τη χρήση συγκρίσιμων επιπέδων δόσης. Οι ακόλουθες παράμετροι περιλαμβάνονται σε μια σύσταση εμπειρογνωμόνων για τις μελέτες κλινικής παθολογίας (38): εμφάνιση, όγκος, οσμωτική ικανότητα ή ειδικό βάρος, pH, ολικές πρωτεΐνες και γλυκόζη. Άλλες εξετάσεις περιλαμβάνουν την κετόνη, το ουροχολιγόνο, τη χολερυθρίνη και τη μικροσκοπική αιμορραγία. Πρόσθετες παράμετροι μπορεί να χρησιμοποιηθούν όταν υπάρχει ανάγκη επέκτασης της έρευνας των παρατηρηθεισών επιδράσεων.

46. Γενικά θεωρείται ότι απαιτείται προσδιορισμός αιματολογικών και κλινικών βιοχημικών μεταβλητών αναφοράς πριν από μελέτες αγωγής σε σκύλους, αλλά όχι πριν από μελέτες σε τρωκτικά (38). Ωστόσο, εάν τα ιστορικά δεδομένα αναφοράς (βλέπε παράγραφο 58) είναι ανεπαρκή, εξετάζεται κατά πόσον θα πρέπει να προσδιοριστούν τα δεδομένα αυτά.

ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΑ

Νεκροψία

47. Όλα τα ζώα της μελέτης πρέπει κανονικά να υποβάλλονται σε πλήρη, λεπτομερή νεκροψία η οποία περιλαμβάνει προσεκτική εξέταση της εξωτερικής επιφάνειας του σώματος, όλων των στομίων, της κρανιακής, θωρακικής και περιτοναϊκής κοιλότητας και του περιεχομένου τους. Ωστόσο, ενδέχεται να προβλέπεται (στις ομάδες ενδιάμεσης θανάτωσης ή στις δορυφορικές ομάδες) περιορισμός των μετρήσεων αυτών σε συγκεκριμένες βασικές μετρήσεις σχετικά, παραδείγματος χάριν, με τη νευροτοξικότητα ή την ανοσοτοξικότητα (βλέπε παράγραφο 21). Δεν απαιτείται νεκροψία και διεξαγωγή των επακόλουθων διαδικασιών που περιγράφονται στις επόμενες παραγράφους στα ζώα αυτά. Ενδέχεται να απαιτείται η διενέργεια νεκροψίας σε ζώα-φρουρούς κατά περίπτωση, επαφιέμενη στη διακριτική ευχέρεια του διευθυντή της μελέτης.

([1]) Για ορισμένες μετρήσεις στον ορό και στο πλάσμα του αίματος και ιδίως της γλυκόζης, προτιμάται τα ζώα να έχουν υποβληθεί σε ολονύκτια νηστεία. Ο κυριότερος λόγος για την προτίμηση αυτή είναι ότι οι διακυμάνσεις που είναι αναπόφευκτες σε περίπτωση μη υποβολής τους σε νηστεία, τείνουν να συγκαλύψουν ορισμένες ανεπαίσθητες επιδράσεις δυσκολεύοντας την ερμηνεία. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι η νηστεία αυτή μπορεί να επηρεάσει τον γενικό μεταβολισμό των ζώων και, ιδίως στις μελέτες διατροφής, να διαταράξει την καθημερινή έκθεση στην ελεγχόμενη χημική ουσία. Όλα τα ζώα θα πρέπει να αξιολογούνται στην ίδια φυσιολογική κατάσταση και, κατά προτίμηση, η διενέργεια αναλυτικών ή νευρολογικών εκτιμήσεων θα πρέπει να προγραμματίζεται κάποια ημέρα διαφορετική από την ημέρα δειγματοληψίας για την κλινική βιοχημεία.

▼**M4**

48. Θα πρέπει να μετράται το βάρος των οργάνων όλων των ζωών, εκτός αυτών που εξαιρούνται βάσει του τελευταίου μέρους της παραγράφου 47. Τα επινεφρίδια, ο εγκέφαλος, οι επιδιδυμίδες, η καρδιά, οι νεφροί, το ήπαρ, οι ωοθήκες, η σπλήνα, οι όρχεις, ο θυρεοειδής (ζυγίζεται μετά τη μονιμοποίηση μαζί με τους παραθυρεοειδείς) και η μήτρα όλων των ζώων (εξαιρούνται τα ετοιμοθάνατα και/ή όσα έχουν στο μεταξύ πεθάνει) καθαρίζονται από τυχόν άλλους προσκολλημένους ιστούς, όπως ενδείκνυται, και ζυγίζονται υγράκαι/ή αμέσως μετά την ανατομή ώστε να αποφεύγεται η ξήρανση.

49. Οι ακόλουθοι ιστοί πρέπει να διατηρούνται στο καταλληλότερο μονιμοποιητικό υλικό, τόσο για τον τύπο του ιστού όσο και για το είδος της ιστοπαθολογικής εξέτασης που πρόκειται να ακολουθήσει (40) (οι ιστοί που αναφέρονται εντός αγκυλών διατηρούνται προαιρετικά):

όλες οι μακροσκοπικές βλάβες	καρδιά	πάγκρεας	στόμαχος (προστόμαχος, αδενικό τμήμα στομάχου)
επινεφρίδιος αδένας	ειλεός	παραθυρεοειδής αδένας	[δόντια]
αορτή	νήστις	περιφερειακό νεύρο	όρχις
εγκέφαλος (συμπεριλαμβανομένων τομών του εγκεφάλου, της παρεγκεφαλίδας και του προμήκη μυελού/της γέφυρας)	νεφρός	υπόφυση	θύμος
τυφλό έντερο	δακρυγόνος αδένας (εξωβολβικός)	προστάτης	θυρεοειδής
τράχηλος της μήτρας	ήπαρ	ορθό	[γλώσσα]
πηκτικός αδένας	πνεύμονας	σιελογόνος αδένας	τραχεία
κόλον	λεμφαδένες (επιπολής και εν τω βάθει)	σπερματοδόχος κύστη	ουροδόχος κύστη
δωδεκαδάκτυλο	μαστικός αδένας (υποχρεωτικά για θηλυκά ζώα και, εάν μπορεί ορατά να ανατμηθεί, από αρσενικά ζώα)	σκελετικός μυς	μήτρα (συμπεριλαμβανομένου του τραχήλου)
επιδιδυμίδα	[ανώτερη αναπνευστική οδός, συμπεριλαμβανομένης της μύτης, των κογχών και των παραρρινίων κόλπων]	δέρμα	[ουρητήρας]
οφθαλμός (συμπεριλαμβανομένου του αμφιβληστροειδή)	οισοφάγος	νωτιαίος μυελός (σε τρία επίπεδα: αυχενικός, μεσοθωρακικός και οσφυϊκός)	[ουρήθρα]
[μηριαίο οστό μαζί με την άρθρωση]	[οσφρητικός βολβός]	σπλήνα	κόλπος
χοληδόχος κύστη (για άλλα είδη εκτός του επίμυ)	ωοθήκη	[στέρνο],	τομή του μυελού των οστών και/ή πρόσφατα αναρροφηθείς μυελός των οστών
αδένας Harderian			

▼M4

Στην περίπτωση οργάνων σε ζεύγη, π.χ. νεφροί, επινεφρίδια, θα πρέπει να διατηρούνται αμφότερα τα όργανα. Βάσει των κλινικών και άλλων ευρημάτων, ενδέχεται να πρέπει να εξεταστούν επιπρόσθετοι ιστοί. Κάθε όργανο που, λόγω των γνωστών ιδιοτήτων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, θεωρείται πιθανό να αποτελεί όργανο-στόχο, πρέπει επίσης να διατηρείται. Σε μελέτες που περιλαμβάνουν χορήγηση μέσω του δέρματος, θα πρέπει να εξετάζονται τα όργανα που αναφέρονται στον κατάλογο οργάνων που πρέπει να εξετάζονται σε μελέτες χορήγησης από το στόμα, ενώ απαιτείται επίσης ειδική δειγματοληψία και διατήρηση δέρματος από το σημείο έκθεσης. Σε αναπνευστικές μελέτες, ο κατάλογος των προς διατήρηση και εξέταση ιστών της αναπνευστικής οδού θα πρέπει να συμμορφώνεται με τις συστάσεις του κεφαλαίου B.8 (9) και του κεφαλαίου B.29 (10) του παρόντος παραρτήματος. Στην περίπτωση άλλων οργάνων/ιστών (επιπροσθέτως των συγκεκριμένων ιστών της αναπνευστικής οδού που πρέπει να διατηρούνται), θα πρέπει να εξετάζεται ο κατάλογος οργάνων που αναφέρεται στην περίπτωση μελετών έκθεσης μέσω του στόματος.

Ιστοπαθολογία

50. Διατίθεται καθοδήγηση σχετικά με τις βέλτιστες πρακτικές κατά τη διεξαγωγή μελετών τοξικολογικής παθολογίας (40). Ιστοπαθολογικές εξετάσεις πρέπει να διενεργούνται τουλάχιστον:

— σε όλους τους ιστούς της ομάδας υψηλής δόσης και της ομάδας των μαρτύρων,

— σε όλους τους ιστούς των ζώων που πέθαναν ή θανατώθηκαν κατά τη διάρκεια της μελέτης,

— σε όλους τους ιστούς που εμφανίζουν μακροσκοπικές ανωμαλίες,

— σε ιστούς-στόχο ή ιστούς που εμφάνισαν σχετικές με την αγωγή αλλοιώσεις στην ομάδα υψηλής δόσης, από όλα τα ζώα σε όλες τις άλλες ομάδες δόσεων,

— στην περίπτωση οργάνων σε ζεύγη, π.χ. νεφροί, επινεφρίδια, θα πρέπει να εξετάζονται αμφότερα τα όργανα.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ (ΦΑΣΗ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΤΙΚΟΤΗΤΑΣ)

51. Θα πρέπει να ελέγχονται όλα τα ζώα, συνήθως στην αρχή και το τέλος κάθε ημέρας, καθώς και τα σαββατοκύριακα και τις αργίες, ώστε να διαπιστώνεται τυχόν νοσηρότητα ή θνησιμότητά τους. Τα ζώα θα πρέπει να ελέγχονται επίσης μία φορά την ημέρα ώστε να διαπιστώνονται συγκεκριμένες ενδείξεις τοξικολογικής σημασίας. Στην περίπτωση μελετών με καθετήρα, τα ζώα θα πρέπει να ελέγχονται αμέσως μετά τη χορήγηση των δόσεων. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίδεται στην ανάπτυξη όγκων. Επίσης, θα πρέπει να καταγράφεται ο χρόνος εμφάνισης, η τοποθεσία, οι διαστάσεις, η μορφή και η πρόοδος κάθε μακροσκοπικά ορατού ή ψηλαφητού όγκου.

52. Όλα τα ζώα πρέπει να ζυγίζονται κατά την έναρξη της αγωγής, τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα κατά τις πρώτες 13 εβδομάδες και τουλάχιστον μία φορά τον μήνα στη συνέχεια. Η κατανάλωση τροφής και η απόδοση της τροφής θα πρέπει να μετρώνται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα κατά τις πρώτες 13 εβδομάδες και τουλάχιστον μία φορά τον μήνα στη συνέχεια. Η κατανάλωση νερού θα πρέπει να μετράται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα κατά τις πρώτες 13 εβδομάδες και τουλάχιστον μία φορά τον μήνα στη συνέχεια, στην περίπτωση που η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται μέσω του πόσιμου νερού. Μετρήσεις της κατανάλωσης ύδατος πρέπει επίσης να λαμβάνονται υπόψη στις μελέτες κατά τις οποίες η δραστηριότητα πόσης μπορεί να μεταβληθεί.

▼**M4**

Αιματολογικές, βιοχημικές και άλλες εξετάσεις

53. Για να μεγιστοποιούνται οι πληροφορίες που λαμβάνονται από τη μελέτη, ιδίως σε σχέση με ζητήματα τρόπου δράσης, μπορούν να λαμβάνονται δείγματα αίματος για αιματολογικές και βιοχημικές εξετάσεις, αν και αυτό επαφίεται στη διακριτική ευχέρεια του διευθυντή της μελέτης. Ενδέχεται να ενδείκνυται επίσης ανάλυση ούρων. Δεδομένα για τα ζώα που χρησιμοποιούνται στη φάση χρόνιας τοξικότητας της μελέτης, συνήθως διάρκειας 12 μηνών (παράγραφος 34), παρέχουν πληροφορίες για τις παραμέτρους αυτές. Περαιτέρω κατευθύνσεις για την αξία λήψης των δειγμάτων αυτών στο πλαίσιο μιας μελέτης καρκινογενετικότητας περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7). Εάν λαμβάνονται δείγματα αίματος, αυτά πρέπει να λαμβάνονται στο τέλος της περιόδου δοκιμής, αμέσως πριν από τη διαδικασία θανάτωσης των ζώων ή στο πλαίσιο αυτής. Πρέπει να λαμβάνονται από ένα συγκεκριμένο σημείο, π.χ. με καρδιακή παρακέντηση ή από τον οφθαλμικό κόγχο, οπισθοβολβικά, υπό αναισθησία. Μπορούν επίσης να παρασκευάζονται επιχρίσματα αίματος για εξέταση, ιδίως εάν ο μυελός των οστών αποτελεί ενδεχομένως όργανο-στόχο, αν και η αξία της εξέτασης επιχρισμάτων αίματος στη φάση καρκινογενετικότητας για την αξιολόγηση του δυναμικού καρκινογενετικότητας/ογκογενετικότητας έχει αμφισβητηθεί (38).

ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΑ

Νεκροψία

54. Όλα τα ζώα της μελέτης, εκτός των ζώων-φρουρών και άλλων δορυφορικών ζώων (βλέπε παράγραφο 20), πρέπει να υποβάλλονται σε πλήρη, λεπτομερή νεκροψία η οποία περιλαμβάνει προσεκτική εξέταση της εξωτερικής επιφάνειας του σώματος, όλων των στομίων, της κρανιακής, θωρακικής και περιτοναϊκής κοιλότητας και του περιεχομένου τους. Ενδέχεται να απαιτείται η διενέργεια νεκροψίας σε ζώα-φρουρούς και άλλα δορυφορικά ζώα κατά περίπτωση, επαφιέμενη στη διακριτική ευχέρεια του διευθυντή της μελέτης. Το βάρος των οργάνων δεν μετράται συνήθως στο πλαίσιο μελετών καρκινογενετικότητας, καθώς οι αλλαγές λόγω γήρανσης και, σε μεταγενέστερα στάδια, η ανάπτυξη όγκων ανατρέπουν τη χρησιμότητα των δεδομένων βάρους των οργάνων. Ωστόσο, το βάρος των οργάνων ενδέχεται να είναι εξαιρετικά σημαντικό για την αξιολόγηση του βάρους της απόδειξης και ιδίως για εκτιμήσεις του τρόπου δράσης. Οι σχετικές μετρήσεις στο πλαίσιο μιας δορυφορικής μελέτης θα πρέπει να εκτελούνται εντός ενός έτους, το αργότερο, από την έναρξη της μελέτης.

55. Οι ακόλουθοι ιστοί διατηρούνται στο καταλληλότερο μονιμοποιητικό υλικό, τόσο για τον τύπο ιστού όσο και για το είδος ιστοπαθολογικής εξέτασης που πρόκειται να ακολουθήσει (40) (οι ιστοί που αναφέρονται εντός αγκυλών διατηρούνται προαιρετικά):

όλες οι μακροσκοπικές βλάβες	καρδιά	πάγκρεας	στόμαχος (προστόμαχος, αδενικό τμήμα στομάχου)
επινεφρίδιος αδένας	ειλεός	παραθυρεοειδής αδένας	[δόντια]
αορτή	νήστις	περιφερειακό νεύρο	όρχις
εγκέφαλος (συμπεριλαμβανομένων τομών του εγκεφάλου, της παρεγκεφαλίδας και του προμήκη μυελού/της γέφυρας)	νεφρός	υπόφυση	θύμος
τυφλό έντερο	δακρυγόνος αδένας (εξωβολβικός)	προστάτης	θυρεοειδής
τράχηλος της μήτρας	ήπαρ	ορθό	[γλώσσα]
πηκτικός αδένας	πνεύμονας	σιελογόνος αδένας	τραχεία
κόλον	λεμφαδένες (επιπολής και εν τω βάθει)	σπερματοδόχος κύστη	ουροδόχος κύστη

▼M4

δωδεκαδάκτυλο	μαστικός αδένας (υποχρεωτικά για θηλυκά ζώα και, εάν μπορεί ορατά να ανατμηθεί, από αρσενικά ζώα)	σκελετικός μυς	μήτρα (συμπεριλαμβανομένου του τραχήλου της μήτρας)
επιδιδυμίδα	[ανώτερη αναπνευστική οδός, συμπεριλαμβανομένης της μύτης, των κογχών και των παραρρινίων κόλπων]	δέρμα	[ουρητήρας]
οφθαλμός (συμπεριλαμβανομένου του αμφιβληστροειδή)	οισοφάγος	νωτιαίος μυελός (σε τρία επίπεδα: αυχενικός, μεσοθωρακικός και οσφυϊκός)	[ουρήθρα]
[μηριαίο οστό μαζί με την άρθρωση]	[οσφρητικός βολβός]	σπλήνα	κόλπος
χοληδόχος κύστη (για άλλα είδη εκτός του επίμυ)	ωοθήκη	[στέρνο],	τομή του μυελού των οστών και/ή πρόσφατα αναρροφηθείς μυελός των οστών
αδένας Harderian			

Στην περίπτωση οργάνων σε ζεύγη, π.χ. νεφροί, επινεφρίδια, θα πρέπει να διατηρούνται αμφότερα τα όργανα. Βάσει των κλινικών και άλλων ευρημάτων, ενδέχεται να πρέπει να εξεταστούν επιπρόσθετοι ιστοί. Κάθε όργανο που, λόγω των γνωστών ιδιοτήτων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, θεωρείται πιθανό να αποτελεί όργανο-στόχο, πρέπει επίσης να διατηρείται. Σε μελέτες που περιλαμβάνουν χορήγηση μέσω του δέρματος, θα πρέπει να εξετάζονται τα όργανα που αναφέρονται στον κατάλογο οργάνων που πρέπει να εξετάζονται σε μελέτες χορήγησης από το στόμα, ενώ απαιτείται επίσης ειδική δειγματοληψία και διατήρηση δέρματος από το σημείο έκθεσης. Σε αναπνευστικές μελέτες, ο κατάλογος των προς διατήρηση και εξέταση ιστών της αναπνευστικής οδού θα πρέπει να συμμορφώνεται με τις συστάσεις του κεφαλαίου B.8 (8) και του κεφαλαίου B.29 (9) του παρόντος παραρτήματος. Στην περίπτωση άλλων οργάνων/ιστών (επιπροσθέτως των συγκεκριμένων ιστών της αναπνευστικής οδού που πρέπει να διατηρούνται), θα πρέπει να εξετάζεται ο κατάλογος οργάνων που παρατίθεται για την περίπτωση των μελετών έκθεσης μέσω του στόματος.

Ιστοπαθολογία

56. Διατίθεται καθοδήγηση σχετικά με τις βέλτιστες πρακτικές κατά τη διεξαγωγή μελετών τοξικολογικής παθολογίας (40). Εξέταση θα πρέπει να διενεργείται τουλάχιστον στους ακόλουθους ιστούς:

— σε όλους τους ιστούς της ομάδας υψηλής δόσης και της ομάδας των μαρτύρων,

— σε όλους τους ιστούς των ζώων που πέθαναν ή θανατώθηκαν κατά τη διάρκεια της μελέτης,

— σε όλους τους ιστούς που εμφανίζουν μακροσκοπικές ανωμαλίες, συμπεριλαμβανομένων όγκων,

— όταν παρατηρούνται σχετικές με την αγωγή ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις στην ομάδα υψηλής δόσης, πρέπει να εξετάζονται οι ίδιοι ιστοί σε όλα τα ζώα σε όλες τις άλλες ομάδες δόσεων,

— στην περίπτωση οργάνων σε ζεύγη, π.χ. νεφροί, επινεφρίδια, θα πρέπει να εξετάζονται αμφότερα τα όργανα.

▼**M4**

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ (ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ)

Στοιχεία

57. Θα πρέπει να παρέχονται στοιχεία για όλες τις παραμέτρους που αξιολογήθηκαν για κάθε ζώο χωριστά. Επιπλέον, όλα τα στοιχεία πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα ο οποίος περιλαμβάνει, για κάθε ομάδα αγωγής, τον αριθμό των ζώων κατά την έναρξη της αγωγής, τον αριθμό των ζώων που ευρέθησαν νεκρά κατά τη διάρκεια της αγωγής ή θανατώθηκαν για να μην ταλαιπωρηθούν, τον χρόνο θανάτου ή ευθανασίας, τον αριθμό των ζώων που εμφάνισαν εκδηλώσεις τοξικότητας, περιγραφή των παρατηρηθέντων τοξικών συμπτωμάτων, συμπεριλαμβανομένου του χρόνου εμφάνισής τους, της διάρκειας και της σοβαρότητάς τους, τον αριθμό των ζώων που παρουσίασαν αλλοιώσεις, το είδος των αλλοιώσεων και το ποσοστό των ζώων που εμφάνισαν καθέναν από τους τύπους αλλοιώσεων. Συνοπτικοί πίνακες στοιχείων θα πρέπει να αναφέρουν τις μέσες και τυπικές αποκλίσεις (όσον αφορά δεδομένα συνεχούς δοκιμής) που διαπιστώθηκαν σε ζώα που εμφάνισαν τοξικές επιδράσεις ή κακώσεις, καθώς και διαβάθμιση των κακώσεων.

58. Ιστορικά δεδομένα για μάρτυρες ενδέχεται να αποδειχθούν πολύτιμα για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της μελέτης, π.χ. στην περίπτωση που υπάρχουν ενδείξεις ότι τα δεδομένα που προκύπτουν από παράλληλους μάρτυρες αποκλίνουν σημαντικά σε σύγκριση με πρόσφατα δεδομένα από ζώα-μάρτυρες από την ίδια εγκατάσταση ελέγχου/αποικία. Εφόσον έχουν αξιολογηθεί, θα πρέπει να υποβάλλονται ιστορικά δεδομένα για μάρτυρες από το ίδιο εργαστήριο και να αφορούν ζώα της ίδιας ηλικίας και φυλής, τα οποία έχουν παραχθεί κατά τη διάρκεια των πέντε ετών που προηγήθηκαν της συγκεκριμένης μελέτης.

59. Όταν είναι δυνατόν, τα αριθμητικά αποτελέσματα αξιολογούνται με τη βοήθεια στατιστικής μεθόδου γενικής αποδοχής. Οι στατιστικές μέθοδοι και τα προς ανάλυση δεδομένα πρέπει να επιλέγονται κατά τον σχεδιασμό της μελέτης (παράγραφος 9). Η επιλογή θα πρέπει να προβλέπει διορθώσεις βάσει της επιβίωσης, εφόσον απαιτούνται.

60. Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Ελεγχόμενη χημική ουσία:

— φυσική μορφή, καθαρότητα και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά,

— δεδομένα ταυτοποίησης,

— πηγή χημικής ουσίας,

— αριθμό παρτίδας,

— πιστοποιητικό χημικής ανάλυσης.

Φορέας (κατά περίπτωση):

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα, (εάν δεν πρόκειται για νερό).

Για τα πειραματόζωα:

— είδος/φυλή που χρησιμοποιήθηκε και αιτιολόγηση της επιλογής,

— αριθμός, ηλικία και φύλο των ζώων στην αρχή της δοκιμής,

— προέλευση, συνθήκες στέγασης, διατροφή κ.λπ.,

— βάρος κάθε ζώου κατά την έναρξη της δοκιμής.

▼**M4**

Συνθήκες δοκιμής:

— αιτιολόγηση της οδού χορήγησης και της επιλογής δόσης,

— εφόσον έχουν χρησιμοποιηθεί, στατιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των δεδομένων,

— λεπτομερή στοιχεία για το σκεύασμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας/παρασκεύασμα του σιτηρεσίου,

— αναλυτικά στοιχεία για τη συγκέντρωση, τη σταθερότητα και την ομοιογένεια του παρασκευάσματος,

— οδός χορήγησης και λεπτομέρειες σχετικά με τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας,

— στην περίπτωση αναπνευστικών μελετών, εάν αφορούσαν ρινική ή ολόσωμη έκθεση,

— πραγματικές δόσεις (mg/kg βάρους σώματος/ημέρα) και συντελεστής μετατροπής της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην τροφή ή το πόσιμο νερό (mg/kg ή ppm) σε πραγματική δόση, εφόσον είναι εφικτό,

— λεπτομέρειες σχετικά με την ποιότητα της τροφής και του νερού.

Αποτελέσματα (θα πρέπει να παρουσιάζονται συνοπτικά δεδομένα σε πίνακα και δεδομένα για το κάθε ζώο):

Γενικά

— δεδομένα επιβίωσης,

— βάρος του σώματος/μεταβολές βάρους σώματος,

— κατανάλωση τροφής, υπολογισμοί απόδοσης τροφής, εάν έχουν γίνει, και κατανάλωση νερού, κατά περίπτωση,

— τοξικοκινητικά δεδομένα, εάν είναι διαθέσιμα,

— οφθαλμοσκοπικά δεδομένα (εάν είναι διαθέσιμα),

— αιματολογικά δεδομένα (εάν είναι διαθέσιμα),

— κλινικά χημικά δεδομένα (εάν είναι διαθέσιμα).

Κλινικά ευρήματα

— ενδείξεις τοξικότητας,

— συχνότητα (και εάν έχει αξιολογηθεί, σοβαρότητα) τυχόν ανωμαλίας,

— φύση, σοβαρότητα και διάρκεια των κλινικών παρατηρήσεων (εάν είναι παροδικές ή μόνιμες).

Δεδομένα νεκροψίας

— τελικό βάρος σώματος,

— βάρος οργάνων (και λόγος βάρους οργάνων/σώματος, κατά περίπτωση),

— ευρήματα νεκροψίας, συχνότητα και σοβαρότητα ανωμαλιών.

Ιστοπαθολογία

— μη νεοπλασματικά ιστοπαθολογικά ευρήματα,

— νεοπλασματικά ιστοπαθολογικά ευρήματα,

▼**M4**

— συσχετισμός μεταξύ των μακροσκοπικών και των μικροσκοπικών ευρημάτων,

— αναλυτική περιγραφή όλων των σχετικών με την αγωγή ιστοπαθολογικών ευρημάτων, συμπεριλαμβανομένων διαβαθμίσεων σοβαρότητας,

— αναφορά τυχόν αξιολόγησης αντικειμενοφόρων από ομοτίμους.

Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, κατά περίπτωση.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων, συμπεριλαμβανομένων των εξής:

— συζήτηση τυχόν προσεγγίσεων μοντελοποίησης,

— σχέσεις δόσης-απόκρισης,

— ιστορικά δεδομένα για μάρτυρες,

— συνεκτίμηση τυχόν πληροφοριών για τον τρόπο δράσης της ουσίας,

— προσδιορισμός τιμών δόσης αναφοράς, NOAEL ή LOAEL,

— σημασία για τον άνθρωπο.

Συμπεράσματα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) OECD (1995), Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) EPA (2005), Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

(3) Combes R.D., Gaunt I., Balls M. (2004), A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System, *ATLA* 32: 163-208.

(4) Barlow S.M., Greig J.B., Bridges J.W. et al (2002), Hazard identification by methods of animal-based toxicology, *Food. Chem. Toxicol.* 40: 145-191.

(5) Chhabra R.S., Bucher J.R., Wolfe M., Portier C. (2003), Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 206: 437-445.

(6) Κεφάλαιο B.27 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμή υποχρόνιας τοξικότητας από το στόμα — Μελέτη τοξικότητας 90 ημερών με επαναλαμβανόμενη δόση από το στόμα σε μη τρωκτικά.

(7) OECD (2012), Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, διαθέσιμο στον δημόσιο ιστότοπο του ΟΟΣΑ για τις κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών, στη διεύθυνση www.oecd.org/env/testguidelines.

(8) OECD (2009), Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(9) Κεφάλαιο B.8 του παρόντος παραρτήματος: Υποξεία αναπνευστική τοξικότητα: μελέτη 28 ημερών.

(10) Κεφάλαιο B.29 του παρόντος παραρτήματος: Υποχρόνια αναπνευστική τοξικότητα: μελέτη 90 ημερών.

(11) Κεφάλαιο B.9 του παρόντος παραρτήματος: Τοξικότητα επαναλαμβανόμενης (28 ημέρες) δόσης (δερματική).

▼**M4**

(12) Boobis A.R., Cohen S.M., Dellarco V., McGregor D., Meek M.E., Vickers C., Willcocks D., Farland W. (2006), IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans, *Crit. Rev. in Toxicol.* 36: 793-801.

(13) Cohen S.M., Meek M.E., Klaunig J.E., Patton D.E., Fenner-Crisp P.A. (2003), The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview, *Crit. Rev. Toxicol.* 33: 581-589.

(14) Holsapple M.P., Pitot H.C., Cohen S.N., Boobis A.R., Klaunig J.E., Pastoor T., Dellarco V.L., Dragan Y.P. (2006), Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk, *Toxicol. Sci.* 89: 51-56.

(15) Meek E.M., Bucher J.R., Cohen S.M., Dellarco V., Hill R.N., Lehman-McKemmon L.D., Longfellow D.G., Pastoor T., Seed J., Patton D.E. (2003), A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action, *Crit. Rev. Toxicol.* 33: 591-653.

(16) Carmichael N.G., Barton H.A., Boobis A.R. et al. (2006), Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements, *Crit. Rev. Toxicol.* 36, 1-7.

(17) Barton H.A., Pastoor T.P., Baetcke T. et al. (2006), The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, *Crit. Rev. Toxicol.* 36: 9-35.

(18) Doe J.E., Boobis A.R., Blacker A. et al. (2006), A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment, *Crit. Rev. Toxicol.* 36: 37-68.

(19) Cooper R.L., Lamb J.S., Barlow S.M. et al. (2006), A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment, *Crit. Rev. Toxicol.* 36: 69-98.

(20) OECD (2002), Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

(21) OECD (2000), Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(22) Rhomberg L.R., Baetcke K., Blancato J., Bus J., Cohen S., Conolly R., Dixit R., Doe J., Ekelman K., Fenner-Crisp P., Harvey P., Hattis D., Jacobs A., Jacobson-Kram D., Lewandowski T., Liteplo R., Pelkonen O., Rice J., Somers D., Turturro A., West W., Olin S. (2007), Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection, *Crit Rev. Toxicol.* 37 (9): 729-837.

(23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997), Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays, Foran JA (Ed.), ILSI Press, Washington, DC.

(24) Griffiths S.A., Parkinson C., McAuslane J.A.N. και Lumley C.E. (1994), The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals, *The Toxicologist* 14(1): 214.

(25) Usui T., Griffiths S.A. και Lumley C.E. (1996), The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals, In D'Arcy P.O.F. & Harron D.W.G. (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation, Queen's University Press, Belfast, pp. 279-284.

(26) Carmichael N.G., Enzmann H., Pate I., Waechter F. (1997), The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry, *Environ Health Perspect* 105: 1196-1203.

▼**M4**

(27) Οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 22ας Σεπτεμβρίου 2010, περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς (ΕΕ L 276 της 20.10.2010, σ. 33).

(28) National Research Council (1985), Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23, Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

(29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989), Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.

(30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006), Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(31) Diehl K.-H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J.-M., van de Vorstenbosch C. (2001), A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes, *Journal of Applied Toxicology* 21: 15-23.

(32) IPCS (1986), Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals, Environmental Health Criteria Document No. 60.

(33) Tupper D.E., Wallace R.B. (1980), Utility of the Neurologic Examination in Rats, *Acta Neurobiol. Exp.* 40: 999-1003.

(34) Gad S.C. (1982), A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology, *J. Toxicol. Environ. Health* 9: 691-704.

(35) Moser V.C., McDaniel K.M., Phillips P.M. (1991), Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108: 267-283.

(36) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979), A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

(37) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991), Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments, *Neurotoxicol. Teratol.* 13: 599-609.

(38) Weingand K., Brown G., Hall R. et al. (1996), Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies, *Fundam. & Appl. Toxicol.* 29: 198-201.

(39) EMEA (draft) document «Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity» (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(40) Crissman J.W., Goodman D.G., Hildebrandt P.K. et al. (2004), Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology, *Toxicologic Pathology* 32: 126-131.

▼**M4**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΣ

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών..

▼B

B.34 **ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΜΙΑΣ ΓΕΝΕΑΣ**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Καμία.

1.4. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται σε κλιμακωτά αυξανόμενες δόσεις σε αρκετές ομάδες αρσενικών και θηλυκών ζώων. Τα αρσενικά πρέπει να λαμβάνουν δόσεις κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και για ένα τουλάχιστον πλήρη σπερματογενετικό κύκλο περίπου (56 ημέρες για τον ποντικό και 70 ημέρες για τον αρουραίο), έτσι ώστε να προκληθούν τυχόν επιπλοκές στη σπερματογένεση από τη δοκιμαζόμενη ουσία.

Τα θηλυκά της γενεάς Γ (Γ = γονείς) πρέπει να λαμβάνουν δόσεις επί δύο τουλάχιστον πλήρεις κύκλους οργασμού ώστε να προκληθούν επιπλοκές στον οργασμό από τη δοκιμαζόμενη ουσία. Κατόπιν, τα ζώα ζευγαρώνονται. Η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται και στα δύο φύλα κατά τη διάρκεια της περιόδου του ζευγαρώματος και μετέπειτα μόνο στα θηλυκά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και κατά τη διάρκεια της περιόδου της γαλουχίας.

Για τη λήψη της ουσίας με την εισπνοή, η μέθοδος αυτή θα απαιτήσει τροποποιήσεις.

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Κανένα.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Προπαρασκευή

Πριν από δοκιμασία, υγιή νεαρά ζώα πλήρους ανάπτυξης ξεχωρίζονται με τυχαία επιλογή και κατανέμονται σε ομάδες αγωγής και ομάδες μάρτυρες. Τα ζώα διατηρούνται κάτω από τις πειραματικές συνθήκες κατοικίας και διατροφής επί πέντε τουλάχιστον ημέρες πριν από το πείραμα.

Συνιστάται η δοκιμαζόμενη ουσία να χορηγείται μέσα στη δίαιτα ή στο πόσιμο νερό. Άλλες οδοί λήψης είναι επίσης αποδεκτές. Όλα τα ζώα πρέπει να λαμβάνουν τις δόσεις τους με την ίδια μέθοδο κατά τη διάρκεια της σχετικής περιόδου του πειράματος. Εάν χρησιμοποιηθεί έκδοχο ή άλλα πρόσθετα για τη διευκόλυνση της χορήγησης των δόσεων. πρέπει να είναι γνωστό ότι δεν προκαλούν τοξικές επιδράσεις. Η χορήγηση δόσεων θα γίνεται επί επτά ημέρες την εβδομάδα.

▼B

Πειραματόζωα

Επιλογή του είδους

Ο αρουραίος ή ο ποντικός είναι το προτιμώμενο είδος. Δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται είδη ζώων με χαμηλή γονιμότητα παρά μόνο υγιή ζώα που δεν έχουν υποβληθεί προηγουμένως σε πειραματικές διαδικασίες. Τα πειραματόζωα θα πρέπει να χαρακτηρίζονται ως προς το είδος, στέλεχος, φύλο, βάρος ή/και ηλικία.

Για μια επαρκή εκτίμηση της γονιμότητας, πρέπει να μελετηθούν τόσο τα αρσενικά όσο και τα θηλυκά. Όλα τα ζώα που υποβάλλονται σε αγωγή, καθώς επίσης και τα ζώα μάρτυρες, πρέπει να απογαλακτισθούν πριν από την έναρξη χορήγησης των δόσεων.

Αριθμός και φύλο

Κάθε ομάδα ζώων που υποβάλλονται σε αγωγή, καθώς επίσης και των ζώων μαρτύρων πρέπει να περιλαμβάνει επαρκή αριθμό ζώων που να αποδίδει 20 περίπου έγκυα θηλυκά σε περίοδο τοκετού η που να μην απέχουν πολύ από την περίοδο αυτή. Αυτό έχει σαν σκοπό να δημιουργηθούν αρκετές εγκυμοσύνες και απόγονοι για την εξασφάλιση μιας ουσιαστικής αξιολόγησης της ικανότητας της ουσίας να επιδρά στη γονιμότητα, στην εγκυμοσύνη και στη μητρική συμπεριφορά στα ζώα της γενεάς Γ, καθώς επίσης και στον θηλασμό, στην ανάπτυξη και στην εξέλιξη των απογόνων (Α 1) (Α 1 = απόγονοι πρώτης γενεάς) από τη σύλληψη ως τον απογαλακτισμό.

Συνθήκες δοκιμασίας

Η τροφή και το νερό πρέπει να παρέχονται κατά βούληση. Όταν πλησιάζει η περίοδος του τοκετού, τα έγκυα θηλυκά πρέπει να τοποθετούνται χωριστά σε ειδικά κλουβιά τοκετού, και μπορούν να τους παρέχονται υλικά κατασκευής φωλιάς.

Επίπεδα δόσεων

Πρέπει να χρησιμοποιούνται τρεις τουλάχιστον ομάδες αγωγής και μία ομάδα μάρτυρας. Εάν χρησιμοποιείται έκδοχο για τη χορήγηση της δοκιμαζόμενης ουσίας, η ομάδα μάρτυρας πρέπει να λαμβάνει το έκδοχο στην ποσότητα που χρησιμοποιείται στο υψηλότερο επίπεδο δόσης. Εάν μια δοκιμαζόμενη ουσία προκαλεί μειωμένη διαιτητική λήψη ή χρήση, τότε πιθανό να θεωρηθεί αναγκαία η χρησιμοποίηση μιας ομάδας μάρτυρα διατροφής κατά ζεύγη. Το καλύτερο είναι, εάν το υψηλότερο επίπεδο δόσης δεν περιοριστεί από τη φυσικοχημική φύση ή τις βιολογικές επιδράσεις της δοκιμαζόμενης ουσίας, να προκαλεί τοξικότητα αλλά όχι θνησιμότητα στους γονείς (Γ). Η ενδιάμεση δόση ή δόσεις πρέπει να προκαλούν ελάχιστες τοξικές επιδράσεις, που να μπορούν να αποδοθούν στην δοκιμαζόμενη ουσία, και η χαμηλή δόση δεν θα πρέπει να προκαλεί οποιεσδήποτε παρατηρήσιμες επιπλοκές στους γονείς ή στους απογόνους. Όταν χορηγείται με καθετήρα στομάχου ή κάψουλα, η δόση κάθε ζώου πρέπει να βασίζεται στο ιδιαίτερο βάρος του σώματος κάθε ζώου και να προσαρμόζεται κάθε εβδομάδα ανάλογα με τις μεταβολές του βάρους του σώματος. Για τα θηλυκά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, οι δόσεις μπορούν να βασίζονται στο βάρος του σώματος κατά την ημέρα 0 ή 6 της εγκυμοσύνης, εφόσον αυτό είναι επιθυμητό.

Οριακή δοκιμασία

Στην περίπτωση ουσίας χαμηλής τοξικότητας, εάν ένα επίπεδο δόσης 1 000 mg/kg τουλάχιστον δεν παράγει οποιαδήποτε ένδειξη επιπλοκής στην αναπαραγωγική λειτουργία, οι μελέτες σε άλλα επίπεδα δόσεων μπορούν να θεωρηθούν ότι δεν είναι αναγκαίες. Εάν μία προκαταρκτική μελέτη σε υψηλό επίπεδο δόσης, με σαφείς ενδείξεις μητρικής τοξικότητας, δεν παρουσιάζει επιπλοκές στη γονιμότητα, οι μελέτες σε άλλα επίπεδα δόσεων μπορούν να θεωρηθούν ότι δεν είναι αναγκαίες.

▼B

Εκτέλεση της δοκιμασίας

Πειραματικά προγράμματα

Η καθημερινή χορήγηση δόσης στους αρσενικούς γονείς (Γ) πρέπει να αρχίσει όταν έχουν ηλικία πέντε έως εννέα εβδομάδων περίπου, αφού ήδη έχουν απογαλακτισθεί και εγκλιματισθεί επί πέντε τουλάχιστον ημέρες. Στους αρουραίους, η χορήγηση δόσεων συνεχίζεται επί δέκα εβδομάδες πριν από την περίοδο του ζευγαρώματος (για τους ποντικούς οκτώ εβδομάδες). Τα αρσενικά θα πρέπει να θανατωθούν και να εξετασθούν είτε στο τέλος της περιόδου του ζευγαρώματος ή, εναλλακτικά, μπορούν να διατηρηθούν με πειραματική δίαιτα για την ενδεχόμενη παραγωγή δεύτερης ομάδας νεογνών και να θανατωθούν και να εξετασθούν σε κάποιο χρονικό σημείο πριν από το τέλος της μελέτης. Για τους θηλυκούς γονείς (Γ), η χορήγηση δόσεων πρέπει να αρχίζει πέντε ημέρες τουλάχιστον μετά τον εγκλιματισμό, και να συνεχίζεται επί δύο εβδομάδες τουλάχιστον πριν από το ζευγάρωμα. Η καθημερινή χορήγηση δόσεων στα θηλυκά (Γ) πρέπει να συνεχίζεται καθόλη την περίοδο ζευγαρώματος των τριών εβδομάδων, κατά την περίοδο εγκυμοσύνης και μέχρι τον απογαλακτισμό των απογόνων (Α1). Πρέπει να ληφθούν υπόψη οι τροποποιήσεις του προγράμματος χορήγησης δόσεων με βάση άλλες διαθέσιμες πληροφορίες για τη δοκιμαζόμενη ουσία, όπως είναι η επαγωγή μεταβολισμού ή βιοσυσσώρευσης.

Διαδικασία ζευγαρώματος

Στις μελέτες τοξικότητας αναπαραγωγής μπορούν να εφαρμοσθούν είτε ζευγαρώματα τύπου V, (ένα αρσενικό προς ένα θηλυκό) ή $^{1}/_{2}$ (ένα αρσενικό προς δύο θηλυκά).

Με βάση τον τύπο ζευγαρώματος $^{1}/_{1}$, ένα θηλυκό πρέπει να τοποθετηθεί με το ίδιο αρσενικό μέχρι ότου επέλθει η εγκυμοσύνη ή μέχρις ότου περάσουν τρεις εβδομάδες. Κάθε πρωί, τα θηλυκά πρέπει να εξετάζονται για την παρουσία σπέρματος ή βύσματος από πηγμένο σπέρμα μέσα στον κόλπο. Η ημέρα 0 της εγκυμοσύνης ορίζεται, λαμβανομένης υπόψη της σπερματογένεσης, σαν ημέρα της ανεύρεσης πηγμένου σπέρματος ή σπέρματος.

Τα ζευγάρια εκείνα που δεν ζευγαρώνουν, πρέπει να εξετασθούν για να προσδιορισθεί η αιτία της φαινομενικής στειρότητας. Στην έρευνα αυτή περιλαμβάνονται διαδικασίες, όπως είναι η παροχή πρόσθετων ευκαιριών για ζευγάρωμα με άλλους αποδεδειγμένους πατέρες ή μητέρες, η μικροσκοπική εξέταση των αναπαραγωγικών οργάνων και η εξέταση του κύκλου οργασμού ή της σπερματογένεσης.

Αριθμός νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα

Τα ζώα που λαμβάνουν δόσεις κατά τη διάρκεια της μελέτης γονιμότητας επιτρέπεται να γεννήσουν κανονικά και να μεγαλώσουν τα παιδιά τους μέχρι το στάδιο του απογαλακτισμού χωρίς ιδιαίτερη προτυποποίηση των νεογνών.

Εάν ακολουθηθεί η προτυποποίηση, προτείνεται η παρακάτω διαδικασία:

Μεταξύ της πρώτης και της τέταρτης ημέρας μετά τη γέννηση, ο αριθμός των νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα μπορεί να διορθωθεί με την αφαίρεση των πλεοναζόντων νεογνών με επιλογή, έτσι ώστε να δημιουργηθούν όσο το δυνατόν πλησιέστερα τέσσερα αρσενικά και τέσσερα θηλυκά ανά ομάδα νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα. Όταν α αριθμός των αρσενικών ή θηλυκών νεογνών δεν επιτρέπει την ύπαρξη τεσσάρων νεογνών ανά φύλο σε κάθε ομάδα νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα, είναι αποδεκτή η μερική διόρθωση (π.χ. 5 αρσενικά και 3 θηλυκά). Δεν γίνονται δεκτές διορθώσεις για ομάδες νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα και που περιλαμβάνουν λιγότερα από οκτώ νεογνά.

▼B

Παρατηρήσεις

Καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου δοκιμασίας, κάθε ζώο πρέπει να παρατηρείται τουλάχιστον μία φορά την ημέρα. Σχετικές μεταβολές στη συμπεριφορά, σημεία δύσκολου ή παρατεταμένου τοκετού και όλα τα σημεία τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένης της θνησιμότητας, πρέπει να καταγράφονται. Κατά τη διάρκεια των περιόδων πριν από το ζευγάρωμα και κατά το ζευγάρωμα, η κατανάλωση τροφής πρέπει να μετράται κάθε εβδομάδα. Μετά τον τοκετό, και κατά τη διάρκεια του θηλασμού, πρέπει να διενεργούνται μετρήσεις κατανάλωσης τροφής καθώς επίσης και κατανάλωσης νερού, όταν η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται μέσα στο πόσιμο νερό, την ίδια ημέρα με τη ζύγιση των ομάδων νεογνών κάθε μητέρας. Οι αρσενικοί και θηλυκοί γονείς (Γ) θα πρέπει να ζυγίζονται κατά την πρώτη ημέρα της χορήγησης δόσεων και μετέπειτα κάθε εβδομάδα. Οι παρατηρήσεις πρέπει να καταγράφονται χωριστά για κάθε ενήλικο ζώο,

Η διάρκεια κυήσεως πρέπει να υπολογίζεται από την ημέρα 0 της εγκυμοσύνης. Κάθε ομάδα νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα πρέπει να εξετάζεται το συντομότερο δυνατόν μετά τη γέννηση για να βρεθεί ο αριθμός και το φύλο των νεογνών, ο αριθμός των θνησιγενών, ο αριθμός των ζωντανών και η παρουσία μακροσκοπικών ανωμαλιών.

Τα νεκρά νεογνά και τα νεογνά που θανατώθηκαν την τέταρτη ημέρα πρέπει να διατηρηθούν και να μελετηθούν για ενδεχόμενα ελαττώματα. Τα ζωντανά νεογνά θα πρέπει να μετρηθούν και οι ομάδες των νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα να ζυγιστούν το επόμενο πρωί μετά τη γέννησή τους, καθώς επίσης την τέταρτη και έβδομη ημέρα, και μετέπειτα κάθε εβδομάδα μέχρι το τέλος της μελέτης, οπότε τα ζώα πρέπει να ζυγίζονται χωριστά. Πρέπει να καταγράφονται οι φυσικές ανωμαλίες ή οι ανωμαλίες συμπεριφοράς που παρατηρούνται στις μητέρες ή στους απογόνους.

Παθολογική εξέταση

Νεκροψία

Κατά το χρόνο της θανάτωσης ή του θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης, τα ζώα της γενεάς Γ θα πρέπει να εξετάζονται μακροσκοπικά για οποιεσδήποτε δομικές ανωμαλίες ή παθολογικές μεταβολές, με ιδιαίτερη έμφαση στα όργανα του αναπαραγωγικού συστήματος. Τα νεκρά ή ετοιμοθάνατα νεογνά θα πρέπει να εξετάζονται για ελαττώματα.

Ιστοπαθολογική εξέταση

Οι ωοθήκες, η μήτρα, ο τράχηλος, ο κόλπος, οι όρχεις, η επιδιδυμίδα, η σπερματοδόχος κύστη, ο προστάτης, ο πηκτικός αδένας, η υπόφυση και τα όργανα που αποτελούν αντικείμενο της μελέτης όλων των ζώων της γενεάς Γ, πρέπει να διατηρηθούν για μικροσκοπική εξέταση. Στη σπάνια περίπτωση που τα όργανα αυτά δεν έχουν εξετασθεί σε άλλες μελέτες πολλαπλών δόσεων, πρέπει να εξετασθούν μικροσκοπικά σε όλα τα ζώα της ομάδας υψηλής δόσης και ομάδας μάρτυρα και, εφόσον είναι δυνατόν, στα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της μελέτης.

Τα όργανα που παρουσιάζουν ανωμαλίες στα ζώα αυτά πρέπει εν συνεχεία να εξετασθούν σε όλα τα ζώα της γενεάς Γ. Στις περιπτώσεις αυτές, πρέπει να γίνει μικροσκοπική εξέταση σε όλους τους ιστούς που παρουσιάζουν μακροσκοπικές παθολογικές μεταβολές. Όπως προτάθηκε στις διαδικασίες ζευγαρώματος, τα αναπαραγωγικά όργανα των ζώων που είναι ύποπτα στειρότητας, μπορεί να υποβληθούν σε μικροσκοπική εξέταση.

▼B

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα μπορούν να συνοψίζονται με τη μορφή πίνακα, που παρουσιάζει για κάθε ομάδα δοκιμασίας τον αριθμό των ζώων κατά την αρχή της δοκιμασίας, τον αριθμό των γόνιμων αρσενικών, Τον αριθμό των έγκυων θηλυκών, τον τύπο των μεταβολών και το ποσοστό των ζώων ανά τύπο μεταβολής. Εφόσον είναι δυνατόν, τα αριθμητικά αποτελέσματα πρέπει να αξιολογούνται με κατάλληλη στατιστική μέθοδο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε αναγνωρισμένη στατιστική μέθοδος.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

ΕΚΘΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Η έκθεση της δοκιμασίας πρέπει επίσης να περιλαμβάνει τις παρακάτω πληροφορίες:

— είδος/ποικιλία ζώου που χρησιμοποιήθηκε,

— δεδομένα τοξικής αντίδρασης ανά φύλο και δόση, συμπεριλαμβανομένης της γονιμότητας, κυοφορίας και βιωσιμότητας,

— χρόνο θανάτου κατά τη διάρκεια τη; μελέτης ή, αν τα ζώα επέζησαν, χρόνο προγραμματισμένης θανάτωσης για τον τερματισμό της μελέτης,

— πίνακα που παρουσιάζει το βάρος κάθε ομάδας νεογνών που γεννήθηκαν από κάθε μητέρα, το μέσο βάρος νεογνών, και το ατομικό βάρος των νεογνών κατά το τέλος της μελέτης,

— τοξικέ ή άλλες επιδράσεις στην αναπαραγωγή, στους απογόνους, στην ανάπτυξη μετά τη γέννηση κ.λπ.,

— ημέρα παρατήρησης κάθε ανωμαλίας και μετέπειτα πορεία της,

— στοιχεία βάρους του σώματος για τα ζώα της γενεάς Γ,

— ευρήματα νεκροψίας,

— λεπτομερή περιγραφή των μικροσκοπικών ευρημάτων,

— στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, εφόσον χρειάζεται,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

▼B

B.35. **ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΔΥΟ ΓΕΝΕΩΝ**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

Η παρούσα μέθοδος αποτελεί αναπαραγωγή της OECD TG 416 (2001).

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμής στην αναπαραγωγή δύο γενεών σχεδιάστηκε για την παροχή γενικών πληροφοριών σχετικά με τα αποτελέσματα μιας υπό δοκιμή ουσίας στην ακεραιότητα και συμπεριφορά των αναπαραγωγικών συστημάτων αρσενικών και θηλυκών, συμπεριλαμβανομένης της λειτουργίας των γονάδων, του κύκλου του οίστρου, των επιδόσεων στο ζευγάρωμα, της σύλληψης, της κύησης, του τοκετού, της γαλουχίας και του απογαλακτισμού, καθώς και της αύξησης και ανάπτυξης των γόνων. Η μελέτη μπορεί επίσης να παράσχει πληροφορίες και για τις επιδράσεις της υπό δοκιμή ουσίας στη νοσηρότητα των νεογνών, τη θνησιμότητα, καθώς και προκαταρκτικά στοιχεία για την προ- και μεταγεννητική τοξικότητα στην ανάπτυξη και να χρησιμεύσει ως οδηγός για μεταγενέστερες δοκιμές. Εκτός από τη μελέτη της αύξησης και ανάπτυξης της γενεάς F1, η παρούσα μέθοδος δοκιμής αποσκοπεί και στην αξιολόγηση της ακεραιότητας και συμπεριφοράς των αρσενικών και θηλυκών συστημάτων αναπαραγωγής, καθώς και της αύξησης και ανάπτυξης της γενεάς F2. Για περαιτέρω πληροφορίες σχετικά με την τοξικότητα στην ανάπτυξη και τις λειτουργικές ανεπάρκειες μπορεί, ή στο παρόν πρωτόκολλο να ενταχθούν πρόσθετα τμήματα μελέτης, στηριζόμενα, ανάλογα, στις μεθόδους για την τοξικότητα και/ή την νευροτοξικότητα στην ανάπτυξη, ή τα τελικά αυτά σημεία μπορούν να μελετηθούν σε ξεχωριστές μελέτες, χρησιμοποιώντας τις κατάλληλες μεθόδους δοκιμής.

1.2 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται σε διαβαθμισμένες δόσεις σε ορισμένες ομάδες αρσενικών και θηλυκών. Στα αρσενικά της γενεάς P η χορήγηση θα πρέπει να γίνεται κατά τη διάρκεια της αύξησης και για ένα τουλάχιστον πλήρη σπερματογενετικό κύκλο (περίπου 56 ημέρες στους ποντικούς και 70 ημέρες στους επίμυες) για τη διαπίστωση τυχόν δυσμενών επιδράσεων στη σπερματογένεση. Οι επιδράσεις στο σπέρμα προσδιορίζονται από έναν αριθμό παραμέτρων του σπέρματος (π.χ., μορφολογία και κινητικότητα του σπέρματος) και στην παρασκευή και λεπτομερή ιστοπαθολογία του ιστού. Εάν, από προηγούμενη μελέτη επαναλαμβανόμενων δόσεων ικανής διάρκειας, υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία για τη σπερματογένεση, π.χ. κάποια μελέτη 90 ημερών, τα αρσενικά της γενεάς P δεν χρειάζεται να περιληφθούν στην αξιολόγηση. Συνιστάται, ωστόσο, δείγματα ή ψηφιακές καταγραφές σπέρματος της γενεάς P να φυλάσσονται, για να μπορεί να γίνει αργότερα αξιολόγηση. Στα θηλυκά της γενεάς P θα πρέπει να γίνεται χορήγηση κατά τη διάρκεια της αύξησης και για μερικούς πλήρεις κύκλους οίστρου για τον εντοπισμό τυχόν δυσμενών επιδράσεων στην κανονικότητα του κύκλου από την υπό δοκιμή ουσία. Η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται σε γονικά ζώα (P) κατά τη διάρκεια του ζευγαρώματός τους, κατά τη διάρκεια της επακολουθούσης κυήσεως και μέχρι τον απογαλακτισμό των γόνων τους F1. Στον απογαλακτισμό, η χορήγηση της ουσίας συνεχίζεται στους γόνους F1 κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους σε ενήλικα άτομα, στο ζευγάρωμα και στην παραγωγή της γενεάς F2, μέχρις ότου η γενεά F2 απογαλακτιστεί.

Σε όλα τα ζώα γίνονται κλινικές παρατηρήσεις και παθολογικές εξετάσεις για τυχόν σημεία τοξικότητας με ιδιαίτερη έμφαση σε επιδράσεις στην ακεραιότητα και επιδόσεις των αρσενικών και θηλυκών αναπαραγωγικών συστημάτων και στην αύξηση και ανάπτυξη των γόνων.

▼B

1.3 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.3.1 **Επιλογή του είδους του ζώου**

Για τις δοκιμές προτιμώνται οι επίμυες. Εφόσον χρησιμοποιηθεί άλλο είδος, θα πρέπει να δίδεται σχετική αιτιολόγηση και να επιφέρονται οι κατάλληλες αναγκαίες τροποποιήσεις. Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. φυλές με χαμηλή γονιμότητα ή γνωστή υψηλή συχνότητα εμφάνισης αναπτυξιακών ελαττωμάτων. Κατά την έναρξη της μελέτης, οι διακυμάνσεις στα βάρη των χρησιμοποιούμενων ζώων θα πρέπει να είναι ελάχιστες και να μην υπερβαίνουν το 20 % του μέσου βάρους κάθε φύλου.

1.3.2 **Συνθήκες στέγασης και διατροφής**

Η θερμοκρασία στο θάλαμο πειραματισμού των ζώων θα πρέπει να είναι 22 ^{o}C (± 3^{o}). Αν και η σχετική υγρασία θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 % εκτός κατά τη διάρκεια του καθαρισμού του θαλάμου, στόχος θα πρέπει να είναι μια υγρασία 50-60 %. Ο φωτισμός θα πρέπει να είναι τεχνητός, με εναλλαγή 12 ωρών φωτός και 12 ωρών σκότους. Για τη διατροφή, μπορούν να χρησιμοποιούνται συνήθη εργαστηριακά διαιτολόγια με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού. Η επιλογή του διαιτολογίου μπορεί να εξαρτηθεί από την ανάγκη διασφάλισης κατάλληλου προσμείγματος της υπό δοκιμή ουσίας όταν χορηγείται με τη μέθοδο αυτή.

Τα ζώα μπορούν να στεγάζονται κατ' άτομο ή να είναι σε κλουβιά σε μικρές ομάδες του ίδιου φύλου. Οι διαδικασίες του ζευγαρώματος θα πρέπει να γίνονται σε κλουβιά κατάλληλα για το σκοπό αυτό. Μετά τη συνουσία, τα ζευγαρωμένα θηλυκά πρέπει να τοποθετούνται μόνα τους σε κλουβιά τοκετού ή μητρότητας. Οι ζευγαρωμένοι επίμυες μπορούν, επίσης, να στεγάζονται σε μικρές ομάδες και να χωρίζονται μια ή δύο ημέρες πριν από τον τοκετό. Στα ζευγαρωμένα ζώα πρέπει να παρέχονται κατάλληλα και καθορισμένα υλικά δημιουργίας φωλιών όταν πλησιάζει ο τοκετός.

1.3.3 **Προετοιμασία των ζώων**

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή νεαρά ζώα, τα οποία να έχουν εγκλιματιστεί στις εργαστηριακές συνθήκες για 5 ημέρες τουλάχιστον και να μην έχουν υποβληθεί σε προηγούμενες πειραματικές διαδικασίες. Τα υπό δοκιμή ζώα θα πρέπει να χαρακτηρίζονται ως προς το είδος, τη φυλή, την προέλευση, το φύλο, το βάρος και/ή την ηλικία. Αν κάποια από τα ζώα είναι αμφιθαλή, αυτό θα πρέπει να είναι γνωστό για να αποφεύγεται το ζευγάρωμα αμφιθαλών ατόμων. Τα ζώα θα πρέπει να εντάσσονται με τυχαίο τρόπο στις ομάδες μαρτυρίας και δοκιμής (συνιστάται η διαβάθμιση κατά σωματικό βάρος). Τα κλουβιά θα πρέπει να τοποθετούνται με τέτοιο τρόπο ώστε να ελαχιστοποιείται το ενδεχόμενο επιδράσεων λόγω της θέσης των κλουβιών. Σε κάθε ζώο θα πρέπει να δίνεται ένας αποκλειστικός αριθμός αναγνώρισης. Για τη γενεά P, αυτό θα πρέπει να γίνεται πριν από την έναρξη της χορήγησης. Για τη γενεά F1, αυτό θα πρέπει να γίνεται στον απογαλακτισμό σε ζώα που επιλέγονται για ζευγάρωμα. Για όλα τα επιλεγόμενα ζώα F1, θα πρέπει να τηρούνται αρχεία εμφαίνοντα τη γέννα προέλευσης. Επιπλέον, συνιστάται η κατ' άτομο αναγνώριση των νεογνών αμέσως μετά τη γέννηση, εφόσον προβλέπεται το ατομικό ζύγισμα των νεογνών ή τυχόν λειτουργικές δοκιμές.

Τα γονικά (P) ζώα πρέπει να είναι ηλικίας περίπου 5 έως 9 εβδομάδων κατά την έναρξη της χορήγησης. Τα ζώα όλων των ομάδων δοκιμής πρέπει, κατά το δυνατόν, να έχουν ομοιόμορφο βάρος και ηλικία.

▼B

1.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.4.1 **Αριθμός και φύλο των ζώων**

Κάθε ομάδα δοκιμής και μαρτυρίας θα πρέπει να περιλαμβάνει ικανό αριθμό ζώων ώστε τα έγγυα θηλυκά ζώα που θα φθάσουν σε τοκετό ή πλησίον του τοκετού να μην είναι, κατά προτίμηση, λιγότερα από 20. Στην περίπτωση ουσιών που προκαλούν ανεπιθύμητα αποτελέσματα σχετιζόμενα με την αγωγή (π.χ. στειρότητα, υπερβολική τοξικότητα στην υψηλή δόση), αυτό μπορεί να μην είναι δυνατόν. Στόχος είναι η επίτευξη Ικανού αριθμού κυήσεων ώστε να διασφαλιστεί η με σημαντικότητα αξιολόγηση των δυνατοτήτων της ουσίας να επηρεάσει τη γονιμότητα, την κύηση και τη μητρική συμπεριφορά και θηλασμό, την αύξηση και ανάπτυξη των γόνων F1 από τη σύλληψη μέχρι την ωριμότητα, και την ανάπτυξη των γόνων τους (F2) μέχρι τον απογαλακτισμό. Συνεπώς, τυχόν αδυναμία επίτευξης του επιθυμητού αριθμού εγγύων ζώων (δηλαδή 20) δεν ακυρώνει, κατ' ανάγκη, τη μελέτη και θα πρέπει να αξιολογείται κατά περίπτωση.

1.4.2 **Ετοιμασία των δόσεων**

Συνιστάται η υπό δοκιμή ουσία να χορηγείται από το στόμα (με την τροφή, το πόσιμο νερό ή με διασωλήνωση), εκτός κι αν θεωρείται ως καταλληλότερη κάποια άλλη οδός χορήγησης (π.χ. από το δέρμα ή με εισπνοή).

Όταν είναι αναγκαίο, η υπό δοκιμή ουσία διαλύεται ή λαμβάνει τη μορφή εναιωρήματος σε κατάλληλο φορέα. Συνιστάται, οσάκις είναι δυνατό, να εξετάζεται πρώτα η δυνατότητα χρήσης υδατικού διαλύματος/εναιωρήματος, κατόπιν το ενδεχόμενο διαλύματος/γαλακτώματος σε λάδι (π.χ. αραβοσιτέλαιο) και, τέλος, η χρήση διαλύματος σε άλλους φορείς. Για φορείς άλλους εκτός από το νερό, πρέπει να είναι γνωστά τα τοξικά χαρακτηριστικά του φορέα. Θα πρέπει να προσδιορίζεται η σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας στο φορέα.

1.4.3 **Δοσολογία**

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τρία τουλάχιστον επίπεδα δόσεων και ένας συντρέχων μάρτυρας. Εκτός κι αν υπάρχουν περιορισμοί λόγω της φυσικής/χημικής φύσεως ή των βιολογικών ιδιοτήτων της υπό δοκιμή ουσίας, η μέγιστη δόση θα πρέπει να επιλέγεται με στόχο να προκαλεί κάποια τοξική δράση αλλά όχι θάνατο ή σοβαρή ταλαιπωρία. Σε περίπτωση μη αναμενόμενης θνησιμότητας, μελέτες με δείκτη θνησιμότητας μικρότερο από το 10 % περίπου στα γονικά (P) ζώα είναι κανονικά αποδεκτές. Θα πρέπει να επιλέγεται μια φθίνουσα σειρά επιπέδων δόσεων με σκοπό την κατάδειξη κάθε απόκρισης σχετικής με τη δοσολογία και του επιπέδου μη παρατήρησης δυσμενών επιδράσεων (NOAEL). Για τη διαμόρφωση της φθίνουσας σειράς επιπέδων δόσεων, ο καλύτερος συχνά τρόπος είναι η χρησιμοποίηση διπλών ή τετραπλών διαστημάτων, ενώ η προσθήκη μιας τέταρτης ομάδας δοκιμής είναι συχνά προτιμότερη από τη χρησιμοποίηση πολύ μεγάλων διαστημάτων (π.χ. με συντελεστή άνω του 10) μεταξύ των δόσεων. Για τις μελέτες διατροφής, το μεταξύ των δόσεων διάστημα δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το τριπλάσιο. Τα επίπεδα των δόσεων θα πρέπει να επιλέγονται λαμβάνοντας υπόψη όλα τα υφιστάμενα δεδομένα τοξικότητας, ιδιαίτερα αποτελέσματα από μελέτες επαναλαμβανόμενης δοσολογίας. Θα πρέπει, επίσης, να εξετάζεται κάθε διαθέσιμη πληροφορία για το μεταβολισμό και την κινητική της υπό δοκιμή ουσίας ή συναφών ουσιών. Επιπλέον, οι πληροφορίες αυτές βοηθούν και στην κατάδειξη της καταλληλότητας της δοσολογικής αγωγής.

▼B

Η ομάδα μαρτυρίας πρέπει να είναι ομάδα ζώων μη υποβληθέντων σε αγωγή ή ομάδα ζώων που υποβλήθηκαν σε αγωγή με φορέα εφόσον, για τη χορήγηση της υπό δοκιμή ουσίας, χρησιμοποιείται φορέας. Πλην της αγωγής με την υπό δοκιμή ουσία, τα ζώα στην ομάδα μαρτυρίας θα πρέπει να έχουν την ίδια ακριβώς μεταχείριση με εκείνη των ζώων της ομάδας δοκιμής. Εάν χρησιμοποιείται φορέας, η χορήγηση του φορέα θα πρέπει να γίνεται στο μέγιστο χρησιμοποιούμενο όγκο. Εάν μια υπό δοκιμή ουσία χορηγείται με την τροφή και προκαλεί μειωμένη λήψη ή χρήση τροφής, τότε μπορεί να κριθεί ως αναγκαία η χρήση ομάδας μαρτύρων διατρεφομένων σε ζεύγη. Εναλλακτικώς, αντί της χρησιμοποίησης συντρέχουσας ομάδας μαρτύρων διατροφής σε ζεύγη, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στοιχεία από μελέτες μαρτυρίας σχεδιασμένες για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της μειωμένης κατανάλωσης τροφής στις παραμέτρους της αναπαραγωγής.

Θα πρέπει να δίδεται προσοχή στα ακόλουθα χαρακτηριστικά του φορέα και άλλων προσθέτων: επιδράσεις στην απορρόφηση, την κατανομή, το μεταβολισμό ή την κατακράτηση της υπό δοκιμή ουσίας, επιδράσεις στις χημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή ουσίας που μπορεί να μεταβάλουν τις τοξικές της ιδιότητες και επιδράσεις στην κατανάλωση τροφής ή νερού ή της διατροφικής κατάστασης των ζώων.

1.4.4 **Δοκιμή ορίου**

Εάν δοκιμή με-ένα μοναδικό επίπεδο δόσης τουλάχιστον 1 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα από το στόμα ή, στην περίπτωση χορήγησης με την τροφή ή το πόσιμο νερό, με ισοδύναμο ποσοστό ουσίας στην τροφή ή στο πόσιμο νερό και χρησιμοποιώντας τις διαδικασίες που περιγράφονται για την παρούσα μελέτη, δεν εμφανίζει κάποια αντιληπτή τοξική δράση στα γονικά ζώα ή στους γόνους τους και εφόσον, από τα υφιστάμενα δεδομένα από ουσίες με παρόμοια δομή και/ή μεταβολισμό, δεν αναμένεται η εμφάνιση τέτοιας δράσης, τότε μπορεί να κριθεί ως μη αναγκαία η διενέργεια πλήρους μελέτης με διάφορα επίπεδα δόσεων. Η δοκιμή ορίου εφαρμόζεται εκτός όταν, από την έκθεση του ανθρώπου, διαφαίνεται η ανάγκη χρησιμοποίησης υψηλότερου επιπέδου δόσης από το στόμα. Σε άλλους τρόπους χορήγησης, όπως η εισπνοή ή η δερματική επίθεση, από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή ουσίας όπως π.χ. η διαλυτότητα μπορεί, συχνά, να υπάρχουν κάποιες ενδείξεις ή περιορισμοί ως προς το μέγιστο εφικτό επίπεδο έκθεσης.

1.4.5 **Χορήγηση δόσεων**

Η χορήγηση της υπό δοκιμή ουσίας στα ζώα θα πρέπει να γίνεται σε επταήμερη βάση εβδομαδιαίως. Ως οδός χορήγησης προτιμάται η χορήγηση από το στόμα (τροφή, πόσιμο νερό ή διασωλήνωση). Εάν χρησιμοποιηθεί κάποια άλλη οδός χορήγησης, θα πρέπει να παρέχεται σχετική αιτιολόγηση και να επιφέρονται οι αναγκαίες κατάλληλες τροποποιήσεις. Κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου, η χορήγηση, σε όλα τα ζώα θα πρέπει να γίνεται με την ίδια μέθοδο. Οταν η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται με διασωλήνωση, αυτό θα πρέπει να γίνεται χρησιμοποιώντας στομαχικό σωλήνα. Ο όγκος του υγρού που χορηγείται κάθε φορά δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 1 ml/100 g βάρους σώματος (στην περίπτωση του αραβοσιτελαίου, το μέγιστο είναι 0,4 ml/100 g βάρους σώματος), εκτός στην περίπτωση υδατικών διαλυμάτων όπου μπορεί να χρησιμοποιηθούν 2 ml/100 g βάρους σώματος. Εκτός στην περίπτωση ερεθιστικών ή διαβρωτικών ουσιών, οι οποίες κανονικά εμφανίζουν αυξημένη δράση σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, οι διακυμάνσεις στον όγκο δοκιμής θα πρέπει να ελαχιστοποιούνται ρυθμίζοντας τη συγκέντρωση έτσι ώστε να διασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλα τα επίπεδα δόσεων. Σε μελέτες με διασωλήνωση, τα νεογνά λαμβάνουν κανονικά υπό δοκιμή ουσία μόνον εμμέσως μέσω του γάλακτος, μέχρις ότου αρχίσει η απευθείας χορήγηση γι' αυτά στον απογαλακτισμό. Σε μελέτες με τροφή ή πόσιμο νερό, τα νεογνά λαμβάνουν επιπροσθέτως υπό δοκιμή ουσία απευθείας όταν αρχίζουν να τρώνε μόνα τους κατά τη διάρκεια της τελευταίας εβδομάδας της περιόδου της γαλουχίας.

▼B

Για ουσίες που χορηγούνται μέσω της τροφής ή του πόσιμου νερού, είναι σημαντικό να διασφαλίζεται οι ποσότητες της χορηγούμενης υπό δοκιμή ουσίας να μη παρεμβαίνουν στο κανονικό ισοζύγιο διατροφής ή νερού. Όταν η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται με την τροφή, μπορεί να χρησιμοποιείται είτε μια σταθερή συγκέντρωση στην τροφή (ppm) είτε ένα σταθερό επίπεδο δόσης βάσει σωματικού βάρους του ζώου. Τυχόν χρησιμοποιούμενος εναλλακτικός τρόπος πρέπει να προσδιορίζεται. Στην περίπτωση ουσίας που χορηγείται με διασωλήνωση, η δόση θα πρέπει να δίνεται τις ίδιες ώρες κάθε μέρα και να προσαρμόζεται τουλάχιστον κάθε εβδομάδα ώστε να διατηρείται ένα σταθερό επίπεδο δόσης βάσει του σωματικού βάρους του ζώου. Κατά την προσαρμογή της με διασωλήνωση δόσεως με βάση το βάρος, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τυχόν στοιχεία σχετικά με την κατανομή στον πλακούντα.

1.4.6 **Χρονοδιαγράμματα πειραμάτων**

Η καθημερινή χορήγηση στα γονικά (P) αρσενικά και θηλυκά πρέπει να αρχίζει όταν είναι ηλικίας 5 έως 9 εβδομάδων. Η καθημερινή χορήγηση στα αρσενικά και θηλυκά F1 πρέπει να αρχίζει στον απογαλακτισμό. Πρέπει να έχουμε κατά νου ότι στις περιπτώσεις χορήγησης της υπό δοκιμή ουσίας μέσω της τροφής ή του πόσιμου νερού, ενδέχεται να συμβαίνει ήδη κατά τη διάρκεια της περιόδου της γαλουχίας απευθείας έκθεση των νεογνών F1 στην υπό δοκιμή ουσία. Και για τα δύο φύλα (P και F1), η χορήγηση πρέπει να συνεχίζεται για 10 τουλάχιστον εβδομάδες πριν από την περίοδο του ζευγαρώματος. Η χορήγηση συνεχίζεται και στα δύο φύλα κατά τη διάρκεια της περιόδου των 2 εβδομάδων του ζευγαρώματος. Τα αρσενικά θα πρέπει να θανατώνονται ανθρωπιστικά και να εξετάζονται όταν δεν χρειάζονται πλέον για εκτίμηση των επιδράσεων στην αναπαραγωγή. Για τα γονικά (P) θηλυκά, η χορήγηση θα πρέπει να συνεχίζεται καθ' όλη την κύηση και μέχρι τον απογαλακτισμό των γόνων F1. Θα πρέπει να εξετάζεται η τυχόν πραγματοποίηση τροποποιήσεων στο χρονοδιάγραμμα χορήγησης με βάση διαθέσιμες πληροφορίες για την υπό δοκιμή ουσία, συμπεριλαμβανομένων των υφισταμένων δεδομένων τοξικότητας, μεταβολισμού ή βιοσυσσώρευσης. Η δόση σε κάθε ζώο θα πρέπει κανονικά να βασίζεται στον πλέον πρόσφατο κατ' άτομο προσδιορισμό του σωματικού βάρους. Ωστόσο, θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή όταν η δόση προσαρμόζεται κατά τη διάρκεια του τελευταίου τριμήνου της κυήσεως.

Η χορήγηση στα αρσενικά και θηλυκά P και F1 πρέπει να συνεχίζεται μέχρι τέλους. Όλα τα ενήλικα αρσενικά και θηλυκά P και F1 θα πρέπει να θανατώνονται ανθρωπιστικά όταν δεν χρειάζονται πλέον για εκτίμηση των αποτελεσμάτων στην αναπαραγωγή. Οι γόνοι F1 που δεν επιλέγονται για ζευγάρωμα και όλοι οι γόνοι F2 θα πρέπει να θανατώνονται ανθρωπιστικά μετά τον απογαλακτισμό.

1.4.7 **Διαδικασία ζευγαρώματος**

1.4.7.1 *Ζευγάρωμα γονικών ατόμων (P)*

Σε κάθε ζευγάρωμα, κάθε θηλυκό πρέπει να τοποθετείται μαζί με ένα μόνο αρσενικό από το ίδιο επίπεδο δόσεως (ζευγάρωμα 1:1) μέχρι να υπάρξει συνουσία ή μέχρι να περάσουν 2 εβδομάδες. Κάθε μέρα, τα θηλυκά πρέπει να εξετάζονται για παρουσία σπέρματος ή κολπικών βυσμάτων. Ως ημέρα 0 της κυήσεως ορίζεται η ημέρα κατά την οποία θα βρεθεί κολπικό βύσμα ή σπέρμα. Σε περίπτωση που το ζευγάρωμα αποδειχθεί ανεπιτυχές, πρέπει να εξετάζεται το ξαναζευγάρωμα των θηλυκών με ελεγμένα αρσενικά της ίδιας ομάδας. Στα δεδομένα, τα ζεύγη που ζευγάρωσαν θα πρέπει να αναγνωρίζονται σαφώς. Θα πρέπει να αποφεύγεται το ζευγάρωμα αμφιθαλών ατόμων.

▼B

1.4.7.2 *Ζευγάρωμα F1*

Για το ζευγάρωμα των γόνων F1, θα πρέπει να επιλέγονται τουλάχιστον ένα αρσενικό και ένα θηλυκό στον απογαλακτισμό από κάθε γέννα για ζευγάρωμα με άλλα νεογνά του ίδιου επιπέδου δόσεως αλλά διαφορετικής γέννας, για τη λήψη της γενεάς F2. Η επιλογή νεογνών από κάθε γέννα θα πρέπει να είναι τυχαία όταν δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στο βάρος του σώματος ή στην εμφάνιση μεταξύ των ατόμων της γέννας. Στην περίπτωση που παρατηρούνται τέτοιες διαφορές, θα πρέπει να επιλέγονται οι καλύτεροι εκπρόσωποι κάθε γέννας. Αντικειμενικά, αυτό επιτυγχάνεται καλύτερα με βάση το βάρος του σώματος, μπορεί όμως να είναι σκοπιμότερο να γίνεται βάσει εμφανίσεως. Οι γόνοι F1 δεν θα πρέπει να ζευγαρώνονται μέχρι να έλθουν σε πλήρη σεξουαλική ωρίμανση.

Τα χωρίς απογόνους ζεύγη θα πρέπει να αξιολογούνται για να προσδιορίζεται η προφανής αιτία της μη γονιμότητας. Αυτό μπορεί να γίνει με διαδικασίες όπως η παροχή πρόσθετων ευκαιριών για ζευγάρωμα με άλλα αρσενικά ή θηλυκά, μικροσκοπική εξέταση των οργάνων αναπαραγωγής και εξέταση των κύκλων οίστρου ή σπερματογένεσης.

1.4.7.3 *Δεύτερο ζευγάρωμα*

Σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως στην περίπτωση αλλαγών στο μέγεθος της γέννας λόγω της αγωγής ή παρατήρησης διφορούμενου αποτελέσματος στο πρώτο ζευγάρωμα, συνιστάται τα ενήλικα P ή F1 να ξαναζευγαρώνονται για τη λήψη δεύτερης γέννας. Συνιστάται να ξαναζευγαρώνονται θηλυκά ή αρσενικά, τα οποία να μην έχουν δώσει γέννα με αποδεδειγμένους γεννήτορες του αντίθετου φύλου. Εάν και στις δύο γενεές κριθεί αναγκαία η λήψη δεύτερης γέννας, τα ζώα θα πρέπει να ξαναζευγαρώνονται περίπου μια εβδομάδα μετά τον απογαλακτισμό της τελευταίας γέννας.

1.4.7.4 *Μέγεθος γέννας*

Τα ζώα πρέπει να αφήνονται να γεννούν κανονικά και να μεγαλώνουν τους γόνους τους μέχρι τον απογαλακτισμό. Η τυποποίηση των μεγεθών των γεννών είναι προαιρετική. Όταν πραγματοποιείται τυποποίηση, η χρησιμοποιούμενη μέθοδος θα πρέπει να περιγράφεται λεπτομερώς.

1.5 ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

1.5.1 **Κλινικές παρατηρήσεις**

Κάθε μέρα θα πρέπει να πραγματοποιείται γενική κλινική παρατήρηση ενώ, στην περίπτωση χορήγησης με διασωλήνωση, για το χρόνο πραγματοποίησής της θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η προβλεπόμενη περίοδος κορύφωσης των επιδράσεων μετά τη χορήγηση. Θα πρέπει να καταγράφονται τυχόν αλλαγές στη συμπεριφορά, σημεία δύσκολου ή παρατεταμένου τοκετού και κάθε σημάδι τοξικότητας. Σε εβδομαδιαία, τουλάχιστον, βάση θα πρέπει να διεξάγεται μια πρόσθετη, λεπτομερέστερη εξέταση κάθε ζώου, η οποία μπορεί να γίνεται για ευκολία με την ευκαιρία της ζύγισης του ζώου. Δύο φορές ημερησίως και κατά τη διάρκεια του σαββατοκύριακου άπαξ ημερησίως εφόσον δεν τίθεται πρόβλημα, όλα τα ζώα θα πρέπει να παρατηρούνται για νοσηρότητα και θνησιμότητα.

▼B

1.5.2 **Βάρος σώματος και κατανάλωση τροφής/νερού από τους γονείς**

Τα γονικά ζώα (P και F1) πρέπει να ζυγίζονται την πρώτη ημέρα της χορήγησης και κάθε εβδομάδα τουλάχιστον στη συνέχεια. Τα γονικά θηλυκά (P και F1) πρέπει να ζυγίζονται τουλάχιστον κατά τις ημέρες 0, 7, 14 και 20 ή 21 της κυήσεως και κατά τη διάρκεια της γαλουχίας τις ίδιες ημέρες με το ζύγισμα των νεογνών και κατά την ημέρα που θανατώνονται τα ζώα. Οι παρατηρήσεις αυτές θα πρέπει να αναφέρονται ξεχωριστά για κάθε ενήλικο ζώο. Κατά τη διάρκεια των περιόδων πριν από το ζευγάρωμα και κατά την κύηση θα πρέπει να μετριέται τουλάχιστον κάθε εβδομάδα η κατανάλωση τροφής. Η κατανάλωση νερού πρέπει να μετριέται κάθε βδομάδα τουλάχιστον εάν η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται με το νερό.

1.5.3 **Κύκλος οίστρου**

Το μήκος και η κανονικότητα του κύκλου του οίστρου αξιολογούνται στα θηλυκά P και F1 από τα κολπικά επιχρίσματα πριν από το ζευγάρωμα και, προαιρετικώς, κατά τη διάρκεια του ζευγαρώματος μέχρι να βρεθεί ότι έγινε το ζευγάρωμα. Όταν λαμβάνονται κολπικά/τραχηλικά κύτταρα, θα πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια να αποφεύγεται τυχόν διαταραχή στους βλεννογόνους και η πρόκληση, κατά συνέπεια, ψευδοκυήσεως (1).

1.5.4 **Παράμετροι σπέρματος**

Για όλα τα αρσενικά P και F1 στο τέλος της μελέτης, πρέπει να καταγράφεται το βάρος των όρχεων και των επιδιδυμίδων και ένα από κάθε όργανο να κρατιέται για ιστοπαθολογική εξέταση (βλέπε τμήμα 1.5.7, 1.5.8.1). Από υποσύνολο δέκα τουλάχιστον αρσενικών από κάθε ομάδα P και F1 αρσενικών, οι απομένοντες όρχεις και επιδιδυμίδες θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για την καταμέτρηση των ανθεκτικών στην ομοιογενοποίηση σπερμοβλαστών και σπερματικού αποθέματος της ουράς της επιδιδυμίδας, αντίστοιχα. Από το ίδιο υποσύνολο αρσενικών, θα πρέπει να συλλέγεται για εκτίμηση της κινητικότητας και μορφολογίας των σπερματοζωαρίων, σπέρμα από την ουρά της επιδιδυμίδος ή από τον σπερματικό πόρο. Εάν παρατηρούνται επιδράσεις σχετικές με την αγωγή ή όταν υπάρχουν ενδείξεις από άλλες μελέτες για πιθανές επιδράσεις στη σπερματογένεση, θα πρέπει να διεξάγεται αξιολόγηση σπέρματος σε όλα τα αρσενικά σε κάθε ομάδα δόσης. Άλλως, η καταμέτρηση μπορεί να περιοριστεί στα αρσενικά P και F1 των ομάδων μαρτυρίας και υψηλής δόσης.

Θα πρέπει να μετριέται ο συνολικός αριθμός των ανθεκτικών σε ομοιογενοποίηση ορχικών σπερματιδών και σπερματοζωαρίων της ουράς της επιδιδυμίδος (2)(3). Τα αποθέματα σπέρματος της ουράς μπορεί να προέρχονται από τη συγκέντρωση και όγκο σπέρματος στο εναιώρημα που χρησιμοποιείται για την ολοκλήρωση των ποιοτικών αξιολογήσεων και από τον αριθμό των σπερματοζωαρίων που ανακτώνται από εν συνεχεία κατατεμαχισμό και/ή ομοιογενοποίηση του παραμένοντος ιστού ουράς. Η καταμέτρηση θα πρέπει να γίνεται στο επιλεγμένο υποσύνολο αρσενικών όλων των δοσολογικών ομάδων αμέσως μετά τη θανάτωση των ζώων εκτός κι αν γίνουν οπτικές ή ψηφιακές καταγραφές ή αν τα δοκίμια καταψυχθούν και αναλυθούν αργότερα. Στις περιπτώσεις αυτές, οι μάρτυρες και η ομάδα υψηλής δόσης μπορεί να αναλυθούν πρώτα. Εάν δεν εντοπιστούν φαινόμενα επιδράσεων προερχομένων από την αγωγή (π.χ. επιδράσεις στον αριθμό των σπερματοζωαρίων, στην κινητικότητα ή στη μορφολογία), οι υπόλοιπες δοσολογικές ομάδες δεν χρειάζεται να αναλυθούν. Όταν στην ομάδα υψηλής δόσης εντοπίζονται σημεία επιδράσεων σχετικών με την αγωγή, τότε θα πρέπει να αξιολογούνται και οι ομάδες με χαμηλότερη δόση.

▼B

Αμέσως μετά τη θυσία θα πρέπει να αξιολογείται ή να βιντεοσκοπείται η κινητικότητα του σπέρματος της επιδιδυμίδος (ή του σπερματικού πόρου). Το σπέρμα θα πρέπει να ανακτάται με τις μικρότερες δυνατές ζημιές και να αραιώνεται για ανάλυση κινητικότητας χρησιμοποιώντας αποδεκτές μεθόδους (4). Θα πρέπει να προσδιορίζεται, είτε υποκειμενικώς είτε αντικειμενικώς, το ποσοστό των προοδευτικώς αυθορμήτως κινουμένων σπερματοζωαρίων. Οταν εκτελείται υποβοηθούμενη από υπολογιστή ανάλυση κινήσεως (5)(6)(7)(8)(9)(10), η παραγωγοποίηση της προοδευτικής κινητικότητας εξαρτάται από τα καθοριζόμενα από το χρήστη κατώφλια μέσης ταχύτητας διαδρομής και ευθύτητας ή γραμμικού δείκτη. Εάν τα δείγματα βιντεοσκοπηθούν (11) ή οι εικόνες καταγραφούν με κάποιον άλλο τρόπο κατά το χρόνο της νεκροψίας, μπορεί στη συνέχεια να πραγματοποιηθεί ανάλυση μόνον των ομάδων μαρτυρίας και υψηλής δόσεως των αρσενικών P και F1 εκτός κι αν παρατηρηθούν σχετικές με την αγωγή επιδράσεις. Στην τελευταία περίπτωση, θα πρέπει να αξιολογηθούν και οι ομάδες με χαμηλότερη δόση. Αν δεν υπάρχει βιντεοσκοπημένη ή ψηφιακή εικόνα, όλα τα δείγματα σε όλες τις ομάδες αγωγής θα πρέπει να αναλυθούν στη νεκροψία.

Θα πρέπει να εκτελείται μορφολογική αξιολόγηση δείγματος σπέρματος της επιδιδυμίδος (ή του σπερματικού πόρου). Το σπέρμα (200 τουλάχιστον σπερματοζωάρια ανά δείγμα) θα πρέπει να εξετάζεται ως σταθεροποιημένο, υγρό παρασκεύασμα (12) και να ταξινομείται ως κανονικό ή μη κανονικό. Παραδείγματα μορφολογικών ανωμαλιών των σπερματοζωαρίων είναι η σύντηξη, η ύπαρξη απομονωμένων κεφαλών και η ύπαρξη παραμορφωμένων κεφαλών και/ή ουρών. Η αξιολόγηση θα πρέπει να γίνεται στο επιλεγμένουποσύνολο αρσενικών όλων των δοσολογίκών ομάδων είτε αμέσως μετά τη θανάτωση των ζώων, είτε με βάση τις βιντεοσκοπημένες ή ψηφιακές καταγραφές σε κάποιο μεταγενέστερο χρόνο. Επιχρίσματα, εφόσον στερεωθούν, μπορούν και αυτά να εξεταστούν σε κάποιο μεταγενέστερο χρόνο. Στις περιπτώσεις αυτές, οι μάρτυρες και η ομάδα υψηλής δόσης μπορούν να αναλυθούν πρώτα. Εάν δεν εντοπιστούν επιδράσεις σχετικές με την αγωγή (π.χ. επιδράσεις στη μορφολογία των σπερματοζωαρίων), δεν χρειάζεται να αναλυθούν οι υπόλοιπες δοσολογικές ομάδες. Όταν στην ομάδα υψηλής δόσης εντοπιστούν επιδράσεις σχετιζόμενες με την αγωγή, τότε θα πρέπει να αξιολογούνται και οι ομάδες με χαμηλότερη δόση.

Εάν οποιαδήποτε από τις ανωτέρω παραμέτρους αξιολόγησης του σπέρματος έχουν ήδη εξεταστεί ως τμήμα μελέτης συστεμικής τοξικότητας τουλάχιστον 90 ημερών, δεν χρειάζεται κατ' ανάγκη να επαναληφθούν στη μελέτη δύο γενεών. Συνιστάται, ωστόσο, να φυλαχθούν δείγματα ή ψηφιακές καταγραφές σπέρματος της γενεάς P, για να μπορεί να γίνει αργότερα, αν χρειάζεται, αξιολόγηση.

1.5.5 **Γόνοι**

Κάθε γέννα θα πρέπει να εξετάζεται το συντομότερο δυνατό μετά τον τοκετό (ημέρα γαλουχίας 0) για να προσδιορίζεται ο αριθμός και το φύλο των νεογνών, τα γεννηθέντα νεκρά, τα γεννηθέντα ζώντα και αν υπάρχουν μακροσκοπικές ανωμαλίες. Τα νεογνά που βρέθηκαν νεκρά την ημέρα 0, αν δεν βραχούν, θα πρέπει κατά προτίμηση να εξετάζονται για πιθανά ελαττώματα και για την αιτία θανάτου και να συντηρούνται. Τα ζώντα νεογνά θα πρέπει να καταμετρώνται και να ζυγίζονται κατ' άτομο με τη γέννηση (ημέρα γαλουχίας 0) ή την 1η ημέρα, και στη συνέχεια σε τακτές ημέρες ζύγισης, π.χ., τις ημέρες 4, 7, 14 και 21 της γαλουχίας. Τυχόν παρατηρούμενες φυσικές ανωμαλίες ή ανωμαλίες στη συμπεριφορά των μητέρων ή των γόνων τους, θα πρέπει να καταγράφονται.

▼B

Η φυσική ανάπτυξη των γόνων θα πρέπει να παρακολουθείται μέσω, κυρίως, της καταγραφής της αύξησης του σωματικού βάρους. Ορισμένες άλλες φυσικές παράμετροι (π.χ. το άνοιγμα των αυτιών και των ματιών, η έκφυση των δοντιών, η αύξηση του τριχώματος) μπορούν να δώσουν συμπληρωματικές πληροφορίες, τα στοιχεία όμως αυτά θα πρέπει, κατά προτίμηση, να αξιολογούνται στα πλαίσια στοιχείων για τη σεξουαλική ωρίμανση (π.χ. ηλικία και σωματικό βάρος στο κολπικό άνοιγμα ή στο βαλανοποσθικό διαχωρισμό) (13). Εάν δεν προβλέπεται η διενέργεια λειτουργικών ερευνών (π.χ. κινητικότητα, αισθητήριος λειτουργία, οντογονία ανακλαστικών) σε ξεχωριστές μελέτες, συνιστάται η διενέργεια τέτοιων ερευνών στους γόνους F1 πριν και/ή μετά τον απογαλακτισμό, ιδιαίτερα για λειτουργίες που αφορούν τη σεξουαλική ωρίμανση. Στα απογαλακτισμένα άτομα F1 που επιλέγονται για ζευγάρωμα θα πρέπει να προσδιορίζεται η ηλικία του κολπικού ανοίγματος και του ποσθικού διαχωρισμού. Την ημέρα 0 μετά τη γέννηση στα νεογνά F2 θα πρέπει να μετριέται η πρωκτογεννητική απόσταση, εάν επηρεάζεται από διαφοροποιήσεις στη αναλογία φύλων ή το χρόνο σεξουαλικής ωρίμανσης των ατόμων F1.

Οι παρατηρήσεις σχετικά με τις λειτουργίες μπορούν να παραλείπονται σε ομάδες οι οποίες, ούτως ή άλλως, εμφανίζουν σαφή δείγματα δυσμενών αποτελεσμάτων (π.χ., ομάδες που κερδίζουν βάρος με σημαντική καθυστέρηση, κ.λπ.). Εάν πραγματοποιηθούν λειτουργικές έρευνες, αυτές δεν θα πρέπει να γίνονται σε νεογνά που έχουν επιλεγεί για ζευγάρωμα.

1.5.6 **Μακροσκοπική νεκροψία**

Με τον τερματισμό ή σε περίπτωση θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης, όλα τα γονικά ζώα (P και F1), όλα τα νεογνά με εξωτερικές ανωμαλίες ή κλινικά σημεία, καθώς επίσης και ένα τυχαίως επιλεγόμενο νεογνό/φύλο/γέννα και από τις δύο γενεές F1 και F2, πρέπει να εξετάζονται μακροσκοπικώς για τυχόν ανατομικές ανωμαλίες ή παθολογικές διαφορές. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίδεται στα όργανα του αναπαραγωγικού συστήματος. Τα νεογνά που θανατώνονται ανθρωπιστικά επειδή είναι ετοιμοθάνατα και τα νεκρά νεογνά, όταν δεν βραχούν, θα πρέπει να εξετάζονται για πιθανά ελαττώματα και/ή την αιτία θανάτου και να συντηρούνται.

Οι μήτρες όλων των πρωτοτόκων θηλυκών θα πρέπει να εξετάζονται, κατά τρόπο που να μη διακυβεύεται η ιστοπαθολογική αξιολόγηση, ως προς την ύπαρξη και τον αριθμό εμφυτεύσεων.

1.5.7 **Βάρη οργάνων**

Κατά το πέρας της μελέτης, θα πρέπει να προσδιορίζονται το βάρος σώματος και το βάρος των ακόλουθων οργάνων όλων των P και F1 γονικών ζώων (τα όργανα που είναι σε ζεύγη θα πρέπει να ζυγίζονται ξεχωριστά):

— Μήτρα, ωοθήκες

— Όρχεις, επιδιδυμίδες (σύνολο και ουρά)

— Προστάτης

— Σπερματοδόχοι κύστεις με πηκτικούς αδένες και τα υγρά τους και τον προστάτη (ως μία μονάδα)

— Εγκέφαλος, συκώτι, νεφρά, σπλήνα, υπόφυση, θυρεοειδής αδένας και επινεφρίδια και γνωστά όργανα στόχοι.

Θα πρέπει να προσδιορίζονται τα τελικά βάρη σώματος των νεογνών F1 και F2 που επιλέγονται για νεκροψία ενώ, από το ένα τυχαίως επιλεγόμενο νεογνό/φύλο/γέννα (βλέπε τμήμα 1.5.6) πρέπει να ζυγίζονται τα ακόλουθα όργανα: εγκέφαλος, σπλήνα και θύμος αδένας.

▼B

Εφόσον είναι εφικτό, τα αποτελέσματα της μακροσκοπικής νεκροψίας και των βαρών των οργάνων θα πρέπει να αξιολογούνται στα πλαίσια παρατηρήσεων από άλλες μελέτες επανειλημμένων δόσεων.

1.5.8 **Ιστοπαθολογία**

1.5.8.1 *Γονικά ζώα*

Τα ακόλουθα όργανα και ιστοί γονικών (P και F1) ζώων, ή αντιπροσωπευτικά δείγματά τους, πρέπει να στερεώνονται και να φυλάσσονται σε κατάλληλο μέσο για ιστοπαθολογική εξέταση.

— Κόλπος, μήτρα με τράχηλο και ωοθήκες (διατηρούμενα σε κατάλληλο στερεωτικό)

— Ένας όρχις (διατηρούμενος σε υγρό Bouin ή παρόμοιο στερεωτικό), μια επιδιδυμίδα, σπερματοδόχοι κύστεις, προστάτης και πηκτικός αδένας

— Προηγουμένως ταυτοποιημένα όργανα στόχοι από όλα τα P και F1 ζώα, που επιλέγηκαν για ζευγάρωμα.

Θα πρέπει να εκτελείται πλήρης ιστοπαθολογική εξέταση των διατηρουμένων οργάνων και ιστών που αναφέρονται παραπάνω για όλα τα ζώα, μάρτυρες και ομάδας υψηλής δόσης, P και F1 που επελέγησαν για ζευγάρωμα. Η εξέταση των ωοθηκών των ζώων P είναι προαιρετική. Όργανα που εμφανίζουν αλλοιώσεις σχετιζόμενες με την αγωγή θα πρέπει να εξετάζονται και στις ομάδες χαμηλής και μεσαίας δόσης για να υποβοηθείται η εύρεση του NOAEL. Επιπλέον, αναπαραγωγικά όργανα των ζώων των ομάδων χαμηλής και μεσαίας δόσης, για τα οποία υπάρχουν υπόνοιες μειωμένης γονιμότητας, π.χ., εκείνα τα οποία απέτυχαν να ζευγαρώσουν, να συλλάβουν, να γεννήσουν ή να παράσχουν υγιείς απογόνους, ή στα οποία επηρεάστηκε ο κύκλος του οίστρου ή ο αριθμός, η κινητικότητα ή η μορφολογία των σπερματοζωαρίων, θα πρέπει να υποβάλλονται σε ιστοπαθολογική αξιολόγηση. Πρέπει να εξετάζονται όλες οι μακροσκοπικές αλλοιώσεις όπως ατροφία ή όγκοι.

Θα πρέπει να πραγματοποιείται λεπτομερής ιστοπαθολογική εξέταση των όρχεων (π.χ. χρησιμοποιώντας στερεωτικό Bouin, ενσωμάτωση σε παραφίνη και εγκάρσιες τομές πάχους 4-5μm) για τον εντοπισμό επιδράσεων σχετιζόμενων με την αγωγή όπως κατακρατούμενες σπερματίδες, ελλείπουσες στιβάδες ή τύποι γεννητικών κυττάρων, πολυπυρηνικά γιγαντοκύτταρα ή εσχάρωση σπερμογενών κυττάρων στον αυλό (14). Στην εξέταση της άθικτης επιδιδυμίδος θα πρέπει να περιλαμβάνεται η κεφαλή, το σώμα και η ουρά, εξέταση η οποία μπορεί να συμπληρώνεται με αξιολόγηση μιας διαμήκους τομής. Η επιδιδυμίδα θα πρέπει να εξετάζεται ως προς τη διείσδυση λευκοκυττάρων, τυχόν μεταβολές ως προς τους επικρατούντες κυτταρικούς τύπους, διαμαρτούντες τύπους κυττάρων και φαγοκυττάρωση των σπερματοζωαρίων. Για την εξέταση των αρσενικών αναπαραγωγικών οργάνων μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι μέθοδοι PAS και χρώσης αιματοξυλίνης.

Η μετά την γαλουχία ωοθήκη θα πρέπει να περιέχει αρχέγονα και αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια, καθώς και τα μεγάλα ωχρά σωμάτια της γαλουχίας. Ιστοπαθολογική εξέταση θα πρέπει να ανιχνεύει ποιοτική μείωση του αρχέγονου πληθυσμού ωοθυλακίων. Στα θηλυκά F1 θα πρέπει να διεξάγεται ποσοτική αξιολόγηση των αρχέγονων ωοθυλακίων. Ο αριθμός των ζώων, η επιλογή ωοθηκικής τομής και το μέγεθος του δείγματος τομής θα πρέπει να είναι στατιστικώς κατάλληλα για τη χρησιμοποιούμενη διαδικασία αξιολόγησης. Στην εξέταση θα πρέπει να περιλαμβάνεται καταμέτρηση του αριθμού των αρχέγονων ωοθυλακίων, στα οποία μπορούν να προστίθενται τα μικρά αναπτυσσόμενα θυλάκια, για σύγκριση των ωοθηκών ζώων αγωγής και μαρτυρίας (15)(16)(17)(18)(19).

▼B

1.5.8.2 *Απογαλακτιζόμενα ζώα*

Μακροσκοπικώς μη φυσιολογικός ιστός και όργανα στόχοι από όλα τα νεογνά με εξωτερικές ανωμαλίες ή κλινικά σημεία, καθώς και από το ένα τυχαίως επιλεγμένο νεογνό/φύλο/γέννα από αμφότερες τις γενεές F1 και F2 που έχουν επιλεγεί για ζευγάρωμα, πρέπει να στερεώνονται και να φυλάσσονται σε κατάλληλο μέσο για ιστοπαθολογική εξέταση. Θα πρέπει να διεξάγεται πλήρης ιστοπαθολογικός χαρακτηρισμός του διατηρημένου ιστού με ιδιαίτερη έμφαση στα όργανα του αναπαραγωγικού συστήματος.

2 **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα δεδομένα θα αναφέρονται κατ' άτομο και θα συνοψίζονται σε μορφή πινάκων, εμφαίνοντας για κάθε ομάδα δοκιμής και για κάθε γενεά τον αριθμό των ζώων στην αρχή της δοκιμής, τον αριθμό των ζώων που βρέθηκαν νεκρά κατά τη διάρκεια της δοκιμής ή θανατώθηκαν για ανθρωπιστικούς λόγους, τη χρονική στιγμή κάθε θανάτου ή ανθρωπιστικής θανάτωσης, τον αριθμό των γόνιμων ζώων, τον αριθμό των εγγύων θηλυκών, τον αριθμό των ζώων που εμφάνισαν σημεία τοξικότητας, μια περιγραφή των παρατηρηθέντων σημείων τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένης της χρονικής στιγμής εμφάνισης, της διάρκειας και της σοβαρότητας κάθε τοξικού αποτελέσματος, τους τύπους των παρατηρήσεων στα γονικά άτομα και στους απογόνους, τους τύπους των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων και κάθε σχετικό στοιχείο για τις γέννες.

Τα αριθμητικά αποτελέσματα θα πρέπει να αξιολογούνται με κατάλληλη, γενικώς αποδεκτή, στατιστική μέθοδο. Οι στατιστικές μέθοδοι θα πρέπει να επιλέγονται ως τμήμα του σχεδιασμού της μελέτης και θα πρέπει να αιτιολογούνται. Για ανάλυση των στοιχείων μπορεί να αποδειχθούν χρήσιμα στατιστικά μοντέλα δόσης-απόκρισης. Η έκθεση θα πρέπει να περιλαμβάνει επαρκείς πληροφορίες για τη μέθοδο ανάλυσης και το χρησιμοποιηθέν πρόγραμμα στον υπολογιστή, έτσι ώστε ένας ανεξάρτητος αναθεωρητής/στατιστικολόγος να μπορεί να επαναξιολογήσει και να ανασκευάσει την ανάλυση

2.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα ευρήματα αυτής της μελέτης τοξικότητας στην αναπαραγωγή δύο γενεών θα πρέπει να αξιολογούνται όσον αφορά τις παρατηρούμενες επιδράσεις, συμπεριλαμβανομένων των ευρημάτων της νεκροψίας και της μικροσκοπικής εξέτασης. Στην αξιολόγηση περιλαμβάνεται η σχέση, ή η ανυπαρξία σχέσης, μεταξύ της δόσης της υπό δοκιμή ουσίας και της παρουσίας ή απουσίας, της συχνότητας εμφάνισης και της σοβαρότητας ανωμαλιών, συμπεριλαμβανομένων των μακροσκοπικών αλλοιώσεων, ταυτοποιημένων οργάνων στόχων, επιδράσεων στη γονιμότητα, κλινικών μη φυσιολογικών συμπτωμάτων, επιδράσεων στις επιδόσεις στην αναπαραγωγή και στις γέννες, διαφορών στα σωματικά βάρη, επιδράσεων στη θνησιμότητα και κάθε άλλου τοξικού φαινομένου. Κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των δοκιμών, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι φυσικοχημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή ουσίας και, όταν υπάρχουν διαθέσιμα, δεδομένα τοξικοκινητικής.

Μια σωστά διεξαχθείσα δοκιμή τοξικότητας στην αναπαραγωγή θα πρέπει να προσφέρει μια ικανοποιητική εκτίμηση του επιπέδου μη επίδρασης και κατανόηση των δυσμενών επιδράσεων στην αναπαραγωγή, στον τοκετό, στη γαλουχία και στη μεταγεννητική ανάπτυξη, συμπεριλαμβανομένης της αύξησης και της σεξουαλικής ανάπτυξης.

▼B

2.3 ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η μελέτη τοξικότητας στην αναπαραγωγή δύο γενεών παρέχει πληροφορίες για τις επιπτώσης της επανειλημμένης έκθεσης σε μια ουσία κατά τη διάρκεια όλων των φάσεων του αναπαραγωγικού κύκλου. Ειδικότερα, η μελέτη παρέχει πληροφορίες για τις παραμέτρους της αναπαραγωγής και για την ανάπτυξη, αύξηση, ωρίμανση και επιβίωση των γόνων. Τα αποτέλεσματα της μελέτης θα πρέπει να ερμηνεύονται σε συνδυασμό με τα ευρήματα μελετών υποχρόνιας τοξικότητας, προγεννητικής τοξικότητας στην ανάπτυξη και τοξικοκινητικής, καθώς και άλλων διαθέσιμων μελετών. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην εκτίμηση της ανάγκης διεξαγωγής περαιτέρω δοκιμών για μια χημική ουσία. Η παρέκταση των αποτελεσμάτων της μελέτης στον άνθρωπο ισχύει σε περιορισμένο βαθμό. Τα αποτελέσματα χρησιμοποιούνται άριστα ως πληροφορίες σχετικά με τα επίπεδα μη επίδρασης και την επιτρεπτή έκθεση του ανθρώπου (20)(21)(22)(23).

3. **ΑΝΑΦΟΡΑ**

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Στην έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνονται οι ακόλουθες πληροφορίες:

Υπό δοκιμή ουσία:

— φυσική εμφάνιση και, όπου είναι σκόπιμο, φυσικοχημικές ιδιότητες

— στοιχεία ταυτοποίησης

— καθαρότητα

Φορέας (αν χρησιμοποιείται):

— αιτιολόγηση επιλογής του συγκεκριμένου φορέα, αν είναι άλλος από νερό.

Υπό δοκιμή ζώα:

— χρησιμοποιούμενο είδος/φυλή

— αριθμός, ηλικία και φύλο των ζώων

— προέλευση, συνθήκες στέγασης, διαιτολόγιο, υλικά δημιουργίας φωλιάς, κ.λπ.

— επιμέρους βάρη των ζώων κατά την έναρξη της δοκιμής

Συνθήκες δοκιμής:

— λογική αιτιολόγηση της επιλογής των επιπέδων δόσεων,

— λεπτομέρειες για το παρασκεύασμα της υπό δοκιμή ουσίας/τροφής, επιτυγχανόμενη συγκέντρωση, σταθερότητα και ομοιογένεια του παρασκευάσματος,

— λεπτομέρειες για τη χορήγηση της υπό δοκιμή ουσίας,

— αναγωγή από τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στην τροφή/πόσιμο νερό (ppm) στην πραγματική δόση (mg/kg βάρους σώματος/ημέρα), εφόσον γίνεται,

— λεπτομέρειες ποιότητας τροφής και νερού.

▼B

Αποτελέσματα:

— κατανάλωση τροφής, και κατανάλωση νερού εφόσον υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία, αποτελεσματικότητα διατροφής (αύξηση σωματικού βάρους ανά γραμμάριο καταναλισκόμενης τροφής) και κατανάλωση ουσίας δοκιμής από ζώα P και F1, εκτός της περιόδου συνοίκησης και του τελευταίου τρίτου τουλάχιστον της γαλουχίας,

— δεδομένα απορρόφησης (εάν υπάρχουν διαθέσιμα),

— δεδομένα σωματικού βάρους για ζώα P και F1, που επιλέγονται για ζευγάρωμα

— στοιχεία βάρους γέννας και νεογνών,

— σωματικό βάρος κατά τη θυσία και δεδομένα απόλυτου και σχετικού βάρους οργάνων για τα γονικά ζώα,

— είδος, σοβαρότητα και διάρκεια κλινικών παρατηρήσεων (αναστρέψιμων ή μη),

— χρονική στιγμή θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης ή αν τα ζώα επέζησαν μέχρι τέλους,

— δεδομένα τοξικής απόκρισης κατά φύλο και δόση, συμπεριλαμβανομένων δεικτών ζευγαρώματος, γονιμότητας, κυήσεως, γέννησης, βιωσιμότητας και γαλουχίας στην έκθεση θα πρέπει να αναφέρονται οι αριθμοί που χρησιμοποιήθηκαν στον υπολογισμό αυτών των δεικτών,

— τοξικές ή άλλες επιδράσεις στην αναπαραγωγή, στους γόνους, στη μεταγεννητική αύξηση, κ.λπ.,

— ευρήματα νεκροψίας,

— λεπτομερής περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών ευρημάτων,

— αριθμός P και F1 ζώων με κανονικό κύκλο και μήκος του κύκλου,

— συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων ουράς επιδιδυμίδος, ποσοστό προοδευτικώς αυθορμήτως κινουμένων σπερματοζωαρίων, ποσοστό μορφολογικώς φυσιολογικών σπερματοζωαρίων και ποσοστό σπερματοζωαρίων με κάθε ταυτοποιούμενη ανωμαλία,

— χρόνος για ζευγάρωμα, συμπεριλαμβανομένου του αριθμού των ημερών μέχρι το ζευγάρωμα,

— μήκος κυήσεως,

— αριθμός εμφυτεύσεων, ωχρά σωμάτια, μέγεθος γέννας,

— αριθμός γεννήσεων εν ζωή και μετά την εμφύτευση απώλειες,

— αριθμός νεογνών με μακροσκοπικώς ορατές ανωμαλίες εφόσον εντοπιστούν, θα πρέπει να αναφέρεται ο αριθμός των καχεκτικών νεογνών,

— δεδομένα για φυσικά επιπολής ορόσημα σε νεογνά και άλλα δεδομένα για τη μεταγεννητική ανάπτυξη αξιολογούμενα φυσικά επιπολής ορόσημα θα πρέπει να αιτιολογούνται,

— δεδομένα για λειτουργικές παρατηρήσεις σε νεογνά και ενήλικα, αναλόγως,

— στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, όπου είναι σκόπιμο.

▼B

Συζήτηση αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα, συμπεριλαμβανομένων τιμών NOAEL για τις επιδράσεις στις μητέρες και στους απογόνους.

4 **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, In: *Reproduction in Mammals:* I. Germ Cells and Fertilization, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.

(2) Gray, L.E. et al., (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 12:92-108.

(3) Robb, G.W. et al., (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54:103-107.

(4) Klinefelter, G.R. et al., (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology* 5:39 44

(5) Seed, J. et al. (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. *Reproductive Toxicology* 10(3):237- 244.

(6) Chapin, R.E. et al., (1992).Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology* 6:267-273

(7) Klinefelter, G.R. et al., (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration. *Journal of Andrology* 13:409-421.

(8) Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. *Reproductive Toxicology* 5:449-458.

(9) Slott, V.L. and Perreault, S.D., (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thom Motility Analyzer. In: *Methods in Toxicology,* Part A., Academic, Orlando, Florida. pp. 319-333.

(10) Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. Journal of Andrology 10: 401-415.

(11) Working, P.K. and M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. Journal of Andrology 8:330-337.

(12) Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. Reproductive Toxicology 6:491-505.

(13) Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. Biological Reproduction 17:298303.

(14) Russell, L.D. et al., (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.

(15) Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, Methods in Toxicology, Academic, Orlando, Florida.

(16) Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: Growth Factors and the Ovary, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, pp. 421-26.

(17) Manson, J.M. and Y.J. Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.

▼B

(18) Smith, B.J. et al,. (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. Reproductive Toxicology 5:379-383.

(19) Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment, G. Daston,. and C.A. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.

(20) Thomas, J. A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. In: Casarett and Doull's Toxicology, M.O. Amdur, J. Doull, and CD. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.

(21) Zenick, H. and E.D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.

(22) Palmer, A.K. (1981). In: Developmental Toxicology, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.

(23) Palmer, A.K. (1978). In Handbook of Teratology, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.

▼M4

Β.36. **ΤΟΞΙΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος είναι ισοδύναμη με την TG 417 (2010) του ΟΟΣΑ. Μελέτες που εξετάζουν την τοξικοκινητική (ΤΚ) μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας διεξάγονται για τη λήψη κατάλληλων πληροφοριών σχετικά με την απορρόφηση, την κατανομή, τον βιομετασχηματισμό (ήτοι, τον μεταβολισμό) και την απέκκρισή της, για την υποστήριξη του συσχετισμού της συγκέντρωσης ή δόσης με την παρατηρούμενη τοξικότητα, καθώς και την κατανόηση του μηχανισμού τοξικότητάς της. Η ΤΚ βοηθά στην κατανόηση των τοξικολογικών μελετών καταδεικνύοντας ότι τα πειραματόζωα εκτίθενται συστημικά στην ελεγχόμενη χημική ουσία και αποκαλύπτοντας ποια είναι τα κυκλοφορούντα τμήματα (μητρική χημική ένωση/μεταβολίτες). Οι βασικές τοξικοκινητικές παράμετροι που προσδιορίζονται μέσω των μελετών αυτών παρέχουν επίσης πληροφορίες για το δυναμικό συσσώρευσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε ιστούς και/ή όργανα και το δυναμικό επαγωγής του βιομετασχηματισμού ως αποτέλεσμα της έκθεσης στην ελεγχόμενη χημική ουσία.

2. Τα τοξικοκινητικά δεδομένα μπορούν να συμβάλουν στην αξιολόγηση της επάρκειας και της σημασίας δεδομένων τοξικότητας στα ζώα, με σκοπό την παρέκταση για την εκτίμηση των κινδύνων για τον άνθρωπο. Επιπροσθέτως, οι τοξικοκινητικές μελέτες ενδέχεται να παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για τον προσδιορισμό επιπέδων δόσεων για μελέτες τοξικότητας (γραμμική έναντι μη γραμμικής κινητικής), για επιδράσεις στις οδούς χορήγησης, για τη βιοδιαθεσιμότητα και για ζητήματα σχετικά με τον σχεδιασμό της μελέτης. Ορισμένοι τύποι τοξικοκινητικών δεδομένων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη φυσιολογικά βασισμένων μοντέλων τοξικοκινητικής.

3. Τα δεδομένα για τους μεταβολίτες/την τοξικοκινητική έχουν σημαντικές χρήσεις, όπως είναι η υπόδειξη πιθανής τοξικότητας και τρόπων δράσης και της σχέσης τους με το επίπεδο δόσης και την οδό έκθεσης. Επιπροσθέτως, τα δεδομένα μεταβολισμού μπορούν να παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για την αξιολόγηση της τοξικολογικής σημασίας που έχουν οι εκθέσεις σε εξωγενώς παραγόμενους μεταβολίτες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

4. Κατάλληλα τοξικοκινητικά δεδομένα μπορούν να υποστηρίξουν την περαιτέρω δυνατότητα αποδοχής και εφαρμογής ποσοτικών σχέσεων δομής-δραστηριότητας, συγκριτικών ή ομαδοποιημένων προσεγγίσεων για την αξιολόγηση της ασφάλειας χημικών ουσιών. Τα δεδομένα κινητικής ενδέχεται να είναι επίσης χρήσιμα για την αξιολόγηση της τοξικολογικής σημασίας άλλων μελετών (π.χ. in vivo/in vitro).

5. Εάν δεν αναφέρεται άλλη οδός χορήγησης (βλέπε ιδίως παραγράφους 74-78), η παρούσα μέθοδος δοκιμών εφαρμόζεται για τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας από το στόμα.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

6. Τα κανονιστικά συστήματα έχουν διαφορετικές απαιτήσεις και ανάγκες σχετικά με τη μέτρηση καταληκτικών σημείων και παραμέτρων σχετικών με την τοξικοκινητική για τις διάφορες κατηγορίες χημικών ουσιών (π.χ. ζιζανιοκτόνα, βιοκτόνα, βιομηχανικά χημικά). Σε αντίθεση με τις περισσότερες μεθόδους δοκιμών, η παρούσα μέθοδος δοκιμών περιγράφει τον έλεγχο της τοξικοκινητικής, ο οποίος περιλαμβάνει πολλαπλές μετρήσεις και καταληκτικά σημεία. Στο μέλλον ενδέχεται να αναπτυχθούν αρκετές νέες μέθοδοι δοκιμών και/ή έγγραφα καθοδήγησης για την περιγραφή κάθε καταληκτικού σημείου χωριστά και με περισσότερες λεπτομέρειες. Στην περίπτωση της παρούσας μεθόδου δοκιμών, οι διεξαγόμενες δοκιμές ή αξιολογήσεις καθορίζονται από τις απαιτήσεις και/ή τις ανάγκες κάθε κανονιστικού συστήματος.

▼M4

7. Υπάρχουν αρκετές μελέτες που μπορούν να διεξαχθούν για την αξιολόγηση της τοξικοκινητικής συμπεριφοράς μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας για κανονιστικούς σκοπούς. Ωστόσο, ανάλογα με τις συγκεκριμένες κανονιστικές ανάγκες ή καταστάσεις, ενδέχεται να μην είναι απαραίτητες όλες αυτές οι πιθανές μελέτες για την αξιολόγηση μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Απαιτείται ευελιξία στον σχεδιασμό μελετών τοξικοκινητικής, λαμβάνοντας υπόψη τα χαρακτηριστικά της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που διερευνάται. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ενδέχεται να απαιτείται διερεύνηση μόνο ενός συγκεκριμένου συνόλου ερωτημάτων για την αντιμετώπιση ζητημάτων κινδύνου που συνδέονται με την ελεγχόμενη χημική ουσία. Επίσης, σε κάποιες περιπτώσεις, είναι δυνατόν να συλλεγούν τοξικοκινητικά δεδομένα στο πλαίσιο της αξιολόγησης άλλων τοξικολογικών μελετών. Σε άλλες περιπτώσεις, ενδέχεται να απαιτούνται πρόσθετες και/ή περισσότερο εκτεταμένες μελέτες τοξικοκινητικής, ανάλογα με τις κανονιστικές ανάγκες και/ή εάν ανακύπτουν νέα ερωτήματα στο πλαίσιο της αξιολόγησης μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

8. Θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη από το πειραματικό εργαστήριο όλες οι διαθέσιμες πληροφορίες για την ελεγχόμενη χημική ουσία και τους σχετικούς μεταβολίτες και ανάλογα πριν από τη διεξαγωγή της μελέτης ώστε να βελτιώνεται η ποιότητα της μελέτης και να αποφεύγεται η περιττή χρήση των ζώων. Οι πληροφορίες αυτές θα μπορούσαν να περιλαμβάνουν δεδομένα από άλλες σχετικές μεθόδους δοκιμών (μελέτες in vivo, μελέτες in vitro και/ή αξιολογήσεις in silico). Οι φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως ο συντελεστής κατανομής σε μείγμα οκτανόλης και νερού (εκφραζόμενος ως λογάριθμος P_{OW}), η σταθερά pKa, η υδατοδιαλυτότητα, η τάση ατμών και το μοριακό βάρος μιας χημικής ουσίας, ενδέχεται να είναι χρήσιμες για τον σχεδιασμό της μελέτης και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Μπορούν να προσδιοριστούν με κατάλληλες μεθόδους, που περιγράφονται στις σχετικές μεθόδους δοκιμών.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

9. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν έχει σχεδιαστεί για την αντιμετώπιση ειδικών περιστάσεων, όπως ζώων που βρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης ή θηλασμού και των απογόνων τους, ή για την αξιολόγηση ενδεχόμενων καταλοίπων σε εκτεθειμένα ζώα που παράγουν τροφή. Ωστόσο, τα δεδομένα που λαμβάνονται από μελέτη προβλεπόμενη στο κεφάλαιο B.36 παρέχουν γενικές πληροφορίες που καθοδηγούν τον σχεδιασμό συγκεκριμένων μελετών για τις έρευνες αυτές. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν έχει σχεδιαστεί για τον έλεγχο νανοϋλικών. Μια έκθεση σχετικά με την προκαταρκτική αναθεώρηση των κατευθυντήριων γραμμών δοκιμών του ΟΟΣΑ σχετικά με τη δυνατότητα εφαρμογής τους σε νανοϋλικά καταδεικνύει ότι η TG 417 (ισοδύναμη της παρούσας μεθόδου δοκιμών B.36) δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε νανοϋλικά (1).

ΟΡΙΣΜΟΙ

10. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται για τον σκοπό της παρούσας μεθόδου δοκιμών παρέχονται στο προσάρτημα.

ΖΗΤΗΜΑΤΑ ΚΑΛΗΣ ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΤΩΝ ΖΩΩΝ

11. Κατευθύνσεις για τη μη βάναυση μεταχείριση των ζώων περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 19 του ΟΟΣΑ (2). Συνιστάται να λαμβάνεται υπόψη το έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 19 του ΟΟΣΑ σε όλες τις μελέτες in vivo και in vitro που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

Πιλοτικές μελέτες

12. Η χρήση πιλοτικών μελετών συνιστάται και ενθαρρύνεται για την επιλογή πειραματικών παραμέτρων για τις μελέτες τοξικοκινητικής (π.χ. μεταβολισμού, ισοζυγίου μάζας, αναλυτικών διαδικασιών, εύρεσης του πεδίου τιμών δόσης, αποβολής CO_2 κ.λπ. Για τον χαρακτηρισμό ορισμένων από τις παραμέτρους αυτές ενδέχεται να μην απαιτείται η χρήση ραδιοσημασμένων χημικών ουσιών.

▼M4

Επιλογή των ζώων

Είδος

13. Το είδος (και η φυλή) των ζώων που χρησιμοποιούνται σε δοκιμές τοξικοκινητικής θα πρέπει, κατά προτίμηση, να είναι το ίδιο με το είδος που χρησιμοποιείται σε άλλες τοξικολογικές μελέτες εκτελούμενες με τη συγκεκριμένη ελεγχόμενη χημική ουσία. Συνήθως, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται επίμυες, καθώς αυτοί έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα στις τοξικολογικές μελέτες. Η χρήση άλλων ή πρόσθετων ειδών μπορεί να δικαιολογείται, εάν κρίσιμες τοξικολογικές μελέτες καταδεικνύουν στοιχεία σημαντικής τοξικότητας στα είδη αυτά ή εάν η τοξικότητα/τοξικοκινητική σε αυτά τα είδη φαίνεται να έχει μεγαλύτερη σημασία για τον άνθρωπο. Θα πρέπει να αιτιολογείται το είδος των ζώων που έχουν επιλεγεί και η φυλή τους.

14. Εκτός εάν αναφέρεται κάτι διαφορετικό, στην παρούσα μέθοδο δοκιμών ελεγχόμενο είδος θεωρείται ο επίμυς (αρουραίος). Ορισμένες πτυχές της μεθόδου ενδέχεται να πρέπει να τροποποιηθούν στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται άλλα είδη στη δοκιμή.

Ηλικία και φυλή

15. Πρέπει να χρησιμοποιούνται νεαρά, υγιή, ενήλικα ζώα (συνήθως ηλικίας 6-12 εβδομάδων κατά τον χρόνο χορήγησης των δόσεων) (βλέπε επίσης παραγράφους 13 και 14). Θα πρέπει να αιτιολογείται τυχόν χρήση ζώων που δεν είναι νεαρά ενήλικα ζώα. Όλα τα ζώα θα πρέπει να έχουν παρόμοια ηλικία κατά την έναρξη της μελέτης. Το εύρος διακύμανσης βαρών των ζώων δεν πρέπει να υπερβαίνει το ± 20 % του μέσου βάρους της ομάδας πειραματισμού. Σε ιδανικές συνθήκες, η χρησιμοποιούμενη φυλή θα πρέπει να είναι η ίδια με τη φυλή που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία της τοξικολογικής βάσης δεδομένων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

Αριθμός και φύλο των ζώων

16. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατ' ελάχιστον τέσσερα ζώα του ενός φύλου για κάθε ελεγχόμενη δόση. Αιτιολόγηση πρέπει να παρέχεται για το φύλο των χρησιμοποιούμενων ζώων. Θα πρέπει να εξετάζεται η χρήση και των δύο φύλων (τέσσερα αρσενικά και τέσσερα θηλυκά ζώα), εάν υπάρχουν στοιχεία που καταδεικνύουν σημαντικές διαφορές στην τοξικότητα οι οποίες συνδέονται με το φύλο.

Συνθήκες στέγασης και διατροφής

17. Τα ζώα πρέπει γενικά να στεγάζονται κατ' άτομο κατά τη διάρκεια της περιόδου δοκιμής. Η στέγαση σε ομάδες ενδέχεται να είναι δικαιολογημένη σε συγκεκριμένες περιπτώσεις. Ο φωτισμός πρέπει να είναι τεχνητός και η φωτοπερίοδος να αποτελείται από δώδεκα ώρες φωτός και δώδεκα ώρες σκότους. Η θερμοκρασία στην αίθουσα πειραματόζωων πρέπει να είναι 22 °C (± 3 °C) και η σχετική υγρασία να κυμαίνεται μεταξύ 30-70 %. Όσον αφορά τη διατροφή, μπορούν να χρησιμοποιούνται συμβατικά εργαστηριακά σιτηρέσια με παροχή απεριόριστου πόσιμου νερού.

Ελεγχόμενη χημική ουσία

18. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται ελεγχόμενη χημική ουσία ραδιοσημασμένη με ^{14}C για όλες τις πτυχές της μελέτης που συνδέονται με το ισοζύγιο μάζας και τον προσδιορισμό των μεταβολιτών. Ωστόσο, εάν μπορεί να καταδειχθεί ότι:

— το ισοζύγιο μάζας και ο προσδιορισμός των μεταβολιτών μπορούν να εκτιμηθούν καταλλήλως με τη μη σημασμένη ελεγχόμενη χημική ουσία,

— η αναλυτική εξειδίκευση και ευαισθησία της μεθόδου που χρησιμοποιείται με τη μη ραδιενεργή ελεγχόμενη χημική ουσία ισούται ή είναι μεγαλύτερη αυτής που θα μπορούσε να επιτευχθεί με τη ραδιοσημασμένη ελεγχόμενη χημική ουσία,

▼M4

δεν χρειάζεται να χρησιμοποιηθεί ραδιοσημασμένη ελεγχόμενη χημική ουσία. Επιπροσθέτως, ενδέχεται να χρησιμοποιούνται άλλα ραδιενεργά ή σταθερά ισότοπα, ιδίως εάν το στοιχείο είναι υπεύθυνο για το τοξικό τμήμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας ή είναι μέρος αυτού. Εάν είναι δυνατό, η ραδιοσήμανση θα πρέπει να εντοπίζεται σε κεντρικό τμήμα του μορίου που είναι μεταβολικά σταθερό [δεν είναι ανταλλάξιμο, δεν απομακρύνεται μεταβολικά ως CO_2 και δεν καθίσταται μέρος του αποθέματος ενός ατόμου άνθρακα (one-carbon pool) του οργανισμού]. Η σήμανση πολλαπλών σημείων ή συγκεκριένων περιοχών του μορίου ενδέχεται να είναι απαραίτητη για την παρακολούθηση της μεταβολικής πορείας της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

19. Η ραδιοσημασμένη και η μη ραδιοσημασμένη ελεγχόμενη χημική ουσία θα πρέπει να αναλύονται με τη χρήση κατάλληλων μεθόδων ώστε να προσδιορίζεται η καθαρότητα και η ταυτότητά τους. Η ραδιοκαθαρότητα της ραδιενεργού ελεγχόμενης χημικής ουσίας θα πρέπει να είναι η υψηλότερη δυνατή για τη συγκεκριμένη ελεγχόμενη χημική ουσία (σε ιδανικές συνθήκες, θα πρέπει να είναι υψηλότερη του 95 %), ενώ θα πρέπει να καταβάλλονται εύλογες προσπάθειες για τον εντοπισμό τυχόν προσμείξεων που υπάρχουν σε ποσοστό 2 % ή υψηλότερο. Η καθαρότητα, καθώς και η ταυτότητα και η αναλογία τυχόν προσμείξεων που έχουν προσδιοριστεί, θα πρέπει να αναφέρονται. Τα επιμέρους κανονιστικά προγράμματα ενδέχεται να επιλέγουν να παρέχουν πρόσθετη καθοδήγηση για την υποστήριξη του ορισμού και των προδιαγραφών ελεγχόμενων χημικών ουσιών αποτελούμενων από μείγματα και των μεθόδων για τον προσδιορισμό της καθαρότητας.

Επιλογή των δόσεων

Πιλοτική μελέτη

20. Συνήθως μια μεμονωμένη δόση χορηγούμενη από το στόμα επαρκεί για την πιλοτική μελέτη. Η δόση θα πρέπει να είναι μη τοξική, αλλά αρκετά υψηλή ώστε να επιτρέπει τον προσδιορισμό μεταβολιτών στα απεκκρίματα (και στο πλάσμα, εάν ενδείκνυται), καθώς και να εκπληρώνει τον δηλωθέντα σκοπό της πιλοτικής μελέτης, όπως αναφέρεται στην παράγραφο 12 της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Κυρίως μελέτες

21. Για τις κυρίως μελέτες, προτιμάται ελάχιστος αριθμός δύο δόσεων, καθώς οι πληροφορίες που συγκεντρώνονται από τουλάχιστον δύο ομάδες δόσεων μπορούν να βοηθήσουν στον καθορισμό των δόσεων σε άλλες μελέτες τοξικότητας και στην αξιολόγηση της σχέσης δόσης-απόκρισης σε δοκιμές τοξικότητας που είναι ήδη διαθέσιμες.

22. Στην περίπτωση χορήγησης δύο δόσεων, αμφότερες οι δόσεις θα πρέπει να είναι αρκετά υψηλές ώστε να επιτρέπουν τον προσδιορισμό μεταβολιτών στα απεκκρίματα (και στο πλάσμα, εφόσον ενδείκνυται). Θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την επιλογή των δόσεων τυχόν πληροφορίες από διαθέσιμα δεδομένα τοξικότητας. Εάν δεν υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες (π.χ. από μελέτες οξείας τοξικότητας μέσω της στοματικής οδού που καταγράφουν κλινικές εκδηλώσεις τοξικότητας ή από μελέτες τοξικότητας με επαναλαμβανόμενη δόση), ενδέχεται να εξετάζεται η χρήση μια τιμής για την υψηλότερη δόση η οποία είναι κατώτερη της εκτίμησης της LD_{50} (έκθεση μέσω του στόματος και μέσω του δέρματος) ή της LC_{50} (αναπνευστική έκθεση) ή κατώτερη της χαμηλότερης τιμής της εκτίμησης του πεδίου τιμών οξείας τοξικότητας. Η χαμηλότερη δόση θα πρέπει να είναι κάποιο κλάσμα της υψηλότερης δόσης.

23. Εάν διερευνάται μόνο μία δόση, η δόση θα πρέπει, ιδανικά, να είναι αρκετά υψηλή ώστε να επιτρέπει τον προσδιορισμό μεταβολιτών στα απεκκρίματα (και στο πλάσμα, εάν ενδείκνυται) χωρίς να παράγει εμφανείς εκδηλώσεις τοξικότητας. Θα πρέπει να αιτιολογείται η επιλογή μη χρήσης δεύτερου επιπέδου δόσης.

24. Εάν πρέπει να προσδιοριστεί η επίδραση της δόσης στις κινητικές διεργασίες, ενδέχεται να μην επαρκούν οι δύο δόσεις, ενώ τουλάχιστον μία δόση θα πρέπει να είναι αρκετά υψηλή ώστε να προκαλείται κορεσμός των διεργασιών αυτών. Εάν η περιοχή κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης στο πλάσμα-χρόνου (AUC) δεν είναι γραμμική μεταξύ δύο επιπέδων δόσης χρησιμοποιούμενων στην κυρίως μελέτη, πιθανότατα πραγματοποιείται κορεσμός μιας ή περισσότερων κινητικών διεργασιών κάπου ανάμεσα στα δύο επίπεδα δόσης.

▼M4

25. Στην περίπτωση ελεγχόμενων χημικών ουσιών χαμηλής τοξικότητας, θα πρέπει να χρησιμοποιείται μέγιστη δόση 1 000 mg/kg βάρους σώματος (έκθεση μέσω του στόματος και μέσω του δέρματος) (για την έκθεση μέσω της αναπνευστικής οδού, βλέπε καθοδήγηση στο κεφάλαιο B.2 του παρόντος παραρτήματος· συνήθως, η δόση αυτή δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 2 mg/l). Λόγω ζητημάτων σχετικών με τη συγκεκριμένη χημική ουσία, ενδέχεται να απαιτείται υψηλότερη δόση ανάλογα με τις κανονιστικές ανάγκες. Θα πρέπει να αιτιολογείται πάντα η επιλογή των δόσεων.

26. Δεδομένα τοξικοκινητικής και ιστικής κατανομής μονής δόσης ενδέχεται να επαρκούν για τον προσδιορισμό του δυναμικού συσσώρευσης και/ή παραμονής. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, ενδέχεται να απαιτείται επαναλαμβανόμενη δόση i) για να αντιμετωπιστεί πληρέστερα το δυναμικό συσσώρευσης και/ή παραμονής ή μεταβολές στην τοξικοκινητική (ήτοι, παραδείγματος χάριν, ενζυμική επαγωγή και παρεμπόδιση) ή ii) λόγω απαιτήσεων του ισχύοντος κανονιστικού συστήματος. Σε μελέτες που περιλαμβάνουν επαναλαμβανόμενη δόση, παρόλο που συνήθως επαρκεί η επανειλημμένη χορήγηση μικρών δόσεων, ενδέχεται να απαιτείται υπό ορισμένες συνθήκες επανειλημμένη χορήγηση υψηλών δόσεων (βλέπε επίσης παράγραφο 57).

Χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας

27. Η ελεγχόμενη χημική ουσία πρέπει να μετατρέπεται σε ομοιογενές διάλυμα ή εναιώρημα στον ίδιο φορέα που χρησιμοποιήθηκε για της άλλες μελέτες τοξικότητας με καθετήρα που εκτελέστηκαν με την ελεγχόμενη χημική ουσία, εάν υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες για τον συγκεκριμένο φορέα. Θα πρέπει να αιτιολογείται η επιλογή του φορέα. Η επιλογή φορέα και ο όγκος των δόσεων θα πρέπει να εξετάζονται κατά τον σχεδιασμό της μελέτης. Η συνήθης μέθοδος χορήγησης είναι χορήγηση με καθετήρα. Ωστόσο, η χορήγηση με ζελατινούχα κάψουλα ή με ανάμειξη στην τροφή ενδέχεται να έχει πλεονεκτήματα σε συγκεκριμένες περιπτώσεις (και στις δύο περιπτώσεις θα πρέπει να αιτιολογείται η επιλεγμένη μέθοδος). Θα πρέπει να επαληθεύεται η πραγματική δόση που έχει χορηγηθεί σε κάθε ζώο.

28. Ο μέγιστος όγκος υγρού που πρέπει να χορηγείται μέσω καθετήρα κάθε φορά εξαρτάται από το μέγεθος των πειραματόζωων, τον τύπο του φορέα των δόσεων και το εάν το ζώο στερείται τροφής πριν από τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας ή όχι. Θα πρέπει να αιτιολογείται η επιλογή χορήγησης τροφής ή στέρησης τροφής πριν από τη χορήγηση των δόσεων. Συνήθως, ο όγκος θα πρέπει να διατηρείται σε όσο το δυνατόν χαμηλό επίπεδο, τόσο στην περίπτωση υδατικών φορέων όσο και στην περίπτωση μη υδατικών φορέων. Οι όγκοι δόσης δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν κανονικά τα 10 ml/kg βάρους σώματος στην περίπτωση των τρωκτικών. Οι όγκοι των φορέων που χρησιμοποιούνται για περισσότερο λιπόφιλες ελεγχόμενες χημικές ουσίες μπορούν να αρχίζουν από 4 ml/kg βάρος σώματος. Σε περίπτωση επαναλαμβανόμενης δόσης, όταν αντενδείκνυται η καθημερινή στέρηση τροφής, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης μικρότερων όγκων δόσης (π.χ. 2-4 ml/kg βάρους σώματος). Εάν είναι δυνατό, θα πρέπει να μελετάται το ενδεχόμενο χρήσης όγκου δόσης αντίστοιχου του όγκου που δόσης που χορηγήθηκε σε άλλες μελέτες με καθετήρα για τη συγκεκριμένη ελεγχόμενη χημική ουσία.

29. Ενδοφλέβια χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και μέτρησή της στο αίμα και/ή τα απεκκρίματα ενδέχεται να χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της βιοδιαθεσιμότητας ή της σχετικής απορρόφησης μέσω του στόματος. Στην περίπτωση μελέτης με ενδοφλέβια χορήγηση, χορηγείται μία δόση (συνήθως ισοδύναμη της χαμηλότερης δόσης που χορηγείται από το στόμα, χωρίς ωστόσο να την υπερβαίνει —βλέπε επιλογή των δόσεων) με τη χρήση κατάλληλου φορέα. Το υλικό αυτό θα πρέπει να χορηγείται σε κατάλληλο όγκο (π.χ. 1 ml/kg βάρους σώματος) στο επιλεγμένο σημείο χορήγησης σε τουλάχιστον τέσσερα ζώα του κατάλληλου φύλου (εφόσον δικαιολογείται, ενδέχεται να χρησιμοποιούνται αμφότερα τα φύλα, βλέπε παράγραφο 16). Απαιτείται παρασκεύασμα δόσης σε μορφή πλήρους διαλύματος ή εναιωρήματος για την ενδοφλέβια χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Ο φορέας ενδοφλέβιας χορήγησης δεν θα πρέπει να επηρεάζει την ακεραιότητα ή τη ροή του αίματος. Εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με έγχυση, ο ρυθμός έγχυσης θα πρέπει να αναφέρεται και να είναι τυποποιημένος μεταξύ των ζώων, εφόσον χρησιμοποιείται αντλία έγχυσης. Θα πρέπει να εφαρμόζεται αναισθησία εάν διασωληνώνεται η σφαγίτιδα φλέβα (για τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και/ή αιμοληψία) ή εάν χρησιμοποιείται η μηριαία αρτηρία για

▼M4

τη χορήγηση. Θα πρέπει να δίδεται δέουσα προσοχή στον τύπο αναισθησίας, καθώς ενδέχεται να προκαλέσει τοξικοκινητικές επιδράσεις. Θα πρέπει να δίδεται αρκετός χρόνος για την κατάλληλη ανάρρωση των ζώων πριν από τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και του φορέα.

30. Ενδέχεται να είναι κατάλληλες και άλλες οδοί χορήγησης, όπως χορήγηση μέσω του δέρματος ή της εισπνοής (βλέπε παραγράφους 74-78), για ορισμένες ελεγχόμενες χημικές ουσίες, λαμβάνοντας υπόψη τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες και την αναμενόμενη χρήση ή έκθεση του ανθρώπου.

Μετρήσεις

Ισοζύγιο μάζας

31. Το ισοζύγιο μάζας προσδιορίζεται μέσω άθροισης του ποσοστού της χορηγούμενης (ραδιενεργού) δόσης που απεκκρίνεται στα ούρα, τα κόπρανα και τον εκπνεόμενο αέρα και του ποσοστού που υπάρχει στους ιστούς, το υπόλοιπο του πτώματος του ζώου και τα υγρά έκπλυσης του κλωβού (βλέπε παράγραφο 46). Γενικά, συνολική ανάκτηση της χορηγούμενης ελεγχόμενης χημικής ουσίας (ραδιενέργεια) μεγαλύτερη του 90 % θεωρείται ότι είναι επαρκής.

Απορρόφηση

32. Μπορεί να πραγματοποιηθεί αρχική εκτίμηση της απορρόφησης με την εξαίρεση του ποσοστού της δόσης στο γαστρεντερικό σύστημα και/ή τα κόπρανα από το προσδιορισθέν ισοζύγιο μάζας. Για τον υπολογισμό της ποσοστιαίας απορρόφησης, βλέπε παράγραφο 33. Για τη διερεύνηση των απεκκριμάτων, βλέπε παραγράφους 44-49. Εάν δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστεί επακριβώς ο βαθμός απορρόφησης κατόπιν χορήγησης δόσης από το στόμα μέσω μελετών ισοζυγίου μάζας (π.χ., όταν υπάρχει στα κόπρανα ποσοστό μεγαλύτερο του 20 % της χορηγούμενης δόσης), ενδέχεται να απαιτούνται περαιτέρω έρευνες. Οι μελέτες αυτές ενδεχομένως να περιλαμβάνουν είτε 1) χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας από το στόμα και μέτρησή της στη χολή ή 2) χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας από το στόμα και ενδοφλεβίως και μέτρηση της καθαρής ελεγχόμενης χημικής ουσίας στα ούρα, στον εκπνεόμενο αέρα και στο πτώμα του ζώου σε καθεμιά από τις δύο μεθόδους χορήγησης. Όπως και εάν έχει σχεδιαστεί η μελέτη, η μέτρηση της ραδιενέργειας εκτελείται ως υποκατάστατη μέθοδος για την ανάλυση της συγκεκριμένης ελεγχόμενης χημικής ουσίας και των σχετικών μεταβολιτών.

33. Εάν διεξάγεται μελέτη των χολικών απεκκριμάτων, χρησιμοποιείται συνήθως χορήγηση από το στόμα. Στη συγκεκριμένη μελέτη, θα πρέπει να διασωληνώνονται οι χοληδόχοι πόροι τουλάχιστον τεσσάρων ζώων του κατάλληλου φύλου (ή και των δύο φύλων, εάν δικαιολογείται) και να χορηγείται μία δόση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Μετά τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, θα πρέπει να παρακολουθείται η απέκκριση ραδιενέργειας/ελεγχόμενης χημικής ουσίας στη χολή για όσο διάστημα είναι απαραίτητο ώστε να εκτιμηθεί το ποσοστό της χορηγούμενης δόσης που απεκκρίνεται μέσω της οδού αυτής, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον απευθείας υπολογισμό του βαθμού απορρόφησης από το στόμα, ως εξής:

$$\text{Ποσοστιαία απορρόφηση} = \frac{(\text{ποσότητα σε χολή} + \text{ούρα} + \text{εκπνεόμενο αέρα} + \text{σφάγιο χωρίς τα περιεχόμενα του γαστρεντερικού συστήματος})}{\text{χορηγηθείσα ποσότητα}} \times 100$$

34. Σε ορισμένες κατηγορίες ελεγχόμενης χημικής ουσίας ενδέχεται να προκύψει άμεση απέκκριση της απορροφώμενης δόσης από τις εντερικές μεμβράνες. Στις περιπτώσεις αυτές, η μέτρηση της ποσοστιαίας δόσης στα κόπρανα κατόπιν χορήγησης δόσης από το στόμα σε επίμυ διασωληνωμένο στο χοληδόχο πόρο δεν θεωρείται αντιπροσωπευτική της μη απορροφώμενης δόσης. Συνιστάται, στην περίπτωση που θεωρείται πιθανόν να προκύψει απέκκριση στα έντερα, το ποσοστό της απορροφώμενης δόσης να βασίζεται στην απορρόφηση που υπολογίζεται μέσω σύγκρισης της απέκκρισης μετά τη χορήγηση δόσης από το στόμα έναντι της απέκκρισης μετά από ενδοφλέβια χορήγηση (άθικτος ή διασωληνωμένος στο χοληδόχο πόρο επίμυς) (βλέπε παράγραφο 35). Συνιστάται επίσης, στην περίπτωση που θεωρείται απαραίτητος ο ποσοτικός προσδιορισμός της απέκκρισης στα έντερα, να μετράται η απέκκριση σε διασωληνωμένο στο χοληδόχο πόρο επίμυ μετά από χορήγηση ενδοφλέβιας δόσης.

▼M4

Βιοδιαθεσιμότητα

35. Η βιοδιαθεσιμότητα μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της κινητικής του πλάσματος/αίματος των ομάδων στις οποίες έχει χορηγηθεί δόση από το στόμα και ενδοφλεβίως, όπως περιγράφεται στις παραγράφους 50-52, με συγκεκριμένη χημική ανάλυση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και/ή του σχετικού μεταβολίτη (των σχετικών μεταβολιτών), χωρίς να απαιτείται, επομένως, ραδιοσημασμένη ελεγχόμενη χημική ουσία. Ο υπολογισμός της βιοδιαθεσιμότητας (F) της ελεγχόμενης χημικής ουσίας ή του σχετικού μεταβολίτη (των σχετικών μεταβολιτών) πραγματοποιείται ως εξής:

$$F = (AUC_{exp}/AUC_{IV}) \times (\Delta\text{όση}_{IV}/\Delta\text{όση}_{exp})$$

όπου AUC είναι το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης στο πλάσμα-χρόνου, exp είναι η πειραματική οδός (μέσω του στόματος, του δέρματος ή της εισπνοής) και IV είναι η ενδοφλέβια χορήγηση.

36. Για την εκτίμηση των κινδύνων συστημικών επιδράσεων, η βιοδιαθεσιμότητα του τοξικού μέρους είναι γενικά προτιμότερη της ποσοστιαίας απορρόφησης όταν πραγματοποιείται σύγκριση των συστημικών συγκεντρώσεων που προκύπτουν από μελέτες σε ζώα με ανάλογα δεδομένα βιοπαρακολούθησης από μελέτες έκθεσης των εργαζομένων. Η κατάσταση μπορεί να περιπλακεί, εάν οι δόσεις βρίσκονται εντός μη γραμμικού πεδίου τιμών, οπότε είναι σημαντικό να καθοριστούν μέσω του τοξικοκινητικού ελέγχου δόσεις στο γραμμικό πεδίο τιμών.

Ιστική κατανομή

37. Η γνώση της ιστικής κατανομής μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας και/ή των μεταβολιτών της είναι σημαντική για τον προσδιορισμό των ιστών στόχου και την κατανόηση των υποκείμενων μηχανισμών τοξικότητας, καθώς και για τη λήψη πληροφοριών σχετικά με το δυναμικό συσσώρευσης και παραμονής της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και των μεταβολιτών. Το ποσοστό της ολικής (ραδιενεργού) δόσης στους ιστούς, καθώς και στο υπόλοιπο σφάγιο θα πρέπει να μετράται τουλάχιστον κατά τον τερματισμό του πειράματος απέκκρισης (π.χ. συνήθως 7 ημέρες μετά τη δόση ή λιγότερο, ανάλογα με τη συμπεριφορά της συγκεκριμένης ελεγχόμενης χημικής ουσίας). Στην περίπτωση που δεν εντοπίζεται η ελεγχόμενη χημική ουσία σε ιστούς κατά τον τερματισμό της μελέτης (π.χ. διότι η ελεγχόμενη χημική ουσία ενδέχεται να έχει εξαλειφθεί πριν από τον τερματισμό της μελέτης λόγω μικρού χρόνου υποδιπλασιασμού), θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μην γίνεται παρερμηνεία των δεδομένων. Εάν προκύψει μια τέτοια κατάσταση, η ιστική κατανομή θα πρέπει να ερευνάται κατά τον χρόνο μέγιστης συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο πλάσμα/αίμα (T_{max}) ή κατά τον χρόνο του μέγιστου ποσοστού απέκκρισης στα ούρα, κατά περίπτωση (βλέπε παράγραφο 38). Επιπροσθέτως, ενδέχεται να απαιτείται συλλογή ιστών και σε άλλες χρονικές στιγμές ώστε να προσδιορίζεται η ιστική κατανομή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και/ή των μεταβολιτών της, να αξιολογείται η εξάρτηση από τον χρόνο (κατά περίπτωση), να υποστηρίζεται ο προσδιορισμός του ισοζυγίου μάζας και/ή να πληρούνται οι απαιτήσεις των αρμόδιων αρχών. Στους ιστούς που θα πρέπει να συλλέγονται περιλαμβάνονται οι εξής: ήπαρ, λίπος, γαστρεντερικό σύστημα, νεφρός, σπλήνα, πλήρες αίμα, υπόλοιπο σφάγιο, ιστοί οργάνων στόχου και οποιοιδήποτε άλλοι ιστοί (π.χ. θυρεοειδής, ερυθρά αιμοσφαίρια, αναπαραγωγικά όργανα, δέρμα, οφθαλμοί [ιδίως σε ζώα που εμφανίζουν κηλίδες)] που είναι ενδεχομένως σημαντικοί για την τοξικολογική αξιολόγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο ανάλυσης πρόσθετων ιστών κατά τις ίδιες χρονικές στιγμές ώστε να μεγιστοποιείται η χρήση των ζώων και στην περίπτωση που παρατηρείται τοξικότητα του οργάνου στόχου σε μελέτες υποχρόνιας ή χρόνιας τοξικότητας. Θα πρέπει να αναφέρονται επίσης η συγκέντρωση (ραδιενεργών) καταλοίπων και οι λόγοι ιστών-πλάσματος (αίματος).

38. Αξιολόγηση της ιστικής κατανομής σε πρόσθετες χρονικές στιγμές, όπως κατά τον χρόνο μέγιστης συγκέντρωσης πλάσματος/αίματος (π.χ. T_{max}) ή κατά τον χρόνο του μέγιστου ποσοστού απέκκρισης στα ούρα, που πραγματοποιείται μέσω αντίστοιχων πειραμάτων κινητικής πλάσματος/αίματος ή απέκκρισης, ενδέχεται να είναι επίσης απαραίτητη ή να απαιτείται από τις αρμόδιες αρχές. Οι πληροφορίες αυτές μπορούν να είναι χρήσιμες για την κατανόηση της τοξικότητας και του δυναμικού συσσώρευσης και παραμονής της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και των μεταβολιτών. Θα πρέπει να αιτιολογείται η επιλογή των δειγμάτων. Τα δείγματα ανάλυσης θα πρέπει γενικά να είναι τα ίδια με αυτά που αναφέρονται παραπάνω (βλέπε παράγραφο 37).

▼**M4**

39. Είναι δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός της ραδιενέργειας σε μελέτες ιστικής κατανομής, με ανατομή οργάνων, ομοιογενοποίηση, καύση και/ή διαλυτοποίηση, συνοδευόμενη από μέτρηση των παγιδευμένων καταλοίπων με απαριθμητή σπινθηρισμού υγρών (LSC). Ορισμένες τεχνικές οι οποίες βρίσκονται σήμερα σε διάφορα στάδια ανάπτυξης, π.χ. ποσοτική ολόσωμη αυτοραδιογραφία και μικροσκοπική αυτοραδιογραφία υποδοχέων, ενδέχεται να αποδειχθούν χρήσιμες για τον προσδιορισμό της κατανομής μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας στα όργανα και/ή τους ιστούς (3) (4).

40. Στην περίπτωση οδών έκθεσης εκτός της στοματικής οδού, θα πρέπει να συλλέγονται και να αναλύονται συγκεκριμένοι ιστοί, όπως οι πνεύμονες στις αναπνευστικές μελέτες και το δέρμα στις δερματικές μελέτες. Βλέπε παραγράφους 74-78.

Μεταβολισμός

41. Πρέπει να συλλέγονται απεκκρίματα (και πλάσμα, εάν ενδείκνυται) για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό αμετάβλητης ελεγχόμενης χημικής ουσίας και μεταβολιτών, όπως περιγράφεται στις παραγράφους 44-49. Η ομαδοποίηση απεκκριμάτων για τη διευκόλυνση της ταυτοποίησης μεταβολιτών σε μια δεδομένη ομάδα δόσης είναι αποδεκτή. Συνιστάται να καθορίζεται το προφίλ των μεταβολιτών κάθε χρονικής περιόδου. Ωστόσο, εάν αυτό δεν είναι δυνατό λόγω έλλειψης δειγμάτων και/ή ραδιενέργειας, είναι αποδεκτή η ομαδοποίηση ούρων και κοπράνων που έχουν ληφθεί σε διάφορες χρονικές στιγμές, αλλά δεν είναι αποδεκτή η ομαδοποίηση δειγμάτων από διαφορετικά φύλα ή δόσεις. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες ποιοτικές και ποσοτικές μέθοδοι για τον έλεγχο ούρων, κοπράνων, ραδιενέργειας στον αέρα που εκπνέουν τα ζώα που έχουν υποβληθεί στο πείραμα και χολής, εάν ενδείκνυται.

42. Θα πρέπει να καταβάλλονται εύλογες προσπάθειες για την ταυτοποίηση όλων των μεταβολιτών που υπάρχουν σε ποσοστό 5 % ή υψηλότερο της χορηγούμενης δόσης και για την παροχή ενός μεταβολικού συστήματος για την ελεγχόμενη χημική ουσία. Θα πρέπει να ταυτοποιούνται οι ελεγχόμενες χημικές ουσίες που έχουν χαρακτηριστεί ότι βρίσκονται σε ποσοστό 5 % ή μεγαλύτερο της χορηγούμενης δόσης στα απεκκρίματα. Η ταυτοποίηση αφορά τον ακριβή δομικό προσδιορισμό των στοιχείων. Συνήθως, η ταυτοποίηση επιτυγχάνεται είτε μέσω συγχρωματογραφίας του μεταβολίτη με γνωστά πρότυπα με τη χρήση δύο διαφορετικών συστημάτων ή μέσω τεχνικών που επιτρέπουν θετική δομική ταυτοποίηση, όπως φασματομετρίας μάζας, πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) κ.λπ. Στην περίπτωση συγχρωματογραφίας, οι τεχνικές χρωματογραφίας που χρησιμοποιούν την ίδια στατική φάση με δύο διαφορετικά συστήματα διαλύτη δεν θεωρείται ότι αποτελούν κατάλληλη επαλήθευση της ταυτότητας των μεταβολιτών μέσω δύο μεθόδων, καθώς οι μέθοδοι δεν είναι ανεξάρτητες. Η ταυτοποίηση με συγχρωματογραφία θα πρέπει να πραγματοποιείται με δύο διαφορετικά, ανεξάρτητα αναλυτικά συστήματα, όπως χρωματογραφία λεπτής στιβάδος αντίστροφης και κανονικής φάσης (TLC) και υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Εφόσον ο χρωματογραφικός διαχωρισμός είναι κατάλληλης ποιότητας, δεν είναι απαραίτητη η πρόσθετη επαλήθευση με φασματοσκοπικά μέσα. Εναλλακτικά, μπορεί να επιτευχθεί σαφής ταυτοποίηση με τη χρήση μεθόδων που παρέχουν πληροφορίες για τη δομή, όπως οι εξής: υγροχρωματογραφία/φασματομετρία μάζας (LC-MS) ή υγροχρωματογραφία/δίδυμη φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS), αεριοχρωματογραφία/φασματομετρία μάζας (GC-MS) και φασματομετρία NMR.

43. Εάν δεν είναι δυνατή η ταυτοποίηση μεταβολιτών σε ποσοστό 5 % ή μεγαλύτερο της χορηγούμενης δόσης, πρέπει να παρέχεται σχετική αιτιολόγηση/επεξήγηση στην τελική έκθεση. Ενδέχεται να ενδείκνυται η ταυτοποίηση μεταβολιτών που αντιστοιχούν σε ποσοστό μικρότερο του 5 % της χορηγούμενης δόσης ώστε να επιτυγχάνεται καλύτερη κατανόηση της μεταβολικής οδού για την εκτίμηση των κινδύνων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Όπου είναι δυνατόν, θα πρέπει να αναφέρεται η επαλήθευση της δομής. Η διαδικασία αυτή μπορεί να περιλαμβάνει προσδιορισμό των χαρακτηριστικών στο πλάσμα ή το αίμα ή σε άλλους ιστούς.

▼M4

Απέκκριση

44. Ο ρυθμός και ο βαθμός απέκκρισης της χορηγούμενης δόσης θα πρέπει να προσδιορίζεται μετρώντας το ποσοστό της (ραδιενεργού) δόσης που ανακτάται από τα ούρα, τα κόπρανα και τον εκπνεόμενο αέρα. Τα δεδομένα αυτά βοηθούν επίσης στον προσδιορισμό του ισοζυγίου μάζας. Οι ποσότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας (ραδιενέργειας) που αποικοδομείται στα ούρα, τα κόπρανα και τον εκπνεόμενο αέρα θα πρέπει να προσδιορίζονται ανά κατάλληλα διαστήματα (βλέπε παραγράφους 47-49). Τα πειράματα επαναλαμβανόμενης δόσης πρέπει να σχεδιάζονται κατάλληλα ώστε να επιτρέπουν τη συλλογή δεδομένων απέκκρισης για την εκπλήρωση των στόχων που περιγράφονται στην παράγραφο 26. Με τον τρόπο αυτόν, είναι δυνατή η σύγκριση με πειράματα μονής δόσης.

45. Εάν έχει καταδειχθεί σε πιλοτική μελέτη ότι δεν απεκκρίνεται σημαντική ποσότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας (ραδιενέργειας) (σύμφωνα με την παράγραφο 49) στον εκπνεόμενο αέρα, τότε δεν χρειάζεται να συλλεχθεί ο εκπνεόμενος αέρας στην οριστική μελέτη.

46. Κάθε ζώο πρέπει να τοποθετείται σε χωριστή μεταβολική μονάδα για τη συλλογή απεκκριμάτων (στα ούρα, τα κόπρανα και τον εκπνεόμενο αέρα). Στο τέλος κάθε περιόδου συλλογής (βλέπε παραγράφους 47-49), οι μεταβολικές μονάδες θα πρέπει να διαβρέχονται με κατάλληλο διαλύτη (διαδικασία γνωστή ως «έκπλυση των κλωβών») ώστε να εξασφαλίζεται η μέγιστη ανάκτηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας (ραδιενέργειας). Η συλλογή των απεκκριμάτων θα πρέπει να τερματίζεται την 7η ημέρα ή αφού έχει ανακτηθεί τουλάχιστον το 90 % της χορηγούμενης δόσης, ανάλογα με το ποιο από τα δύο λαμβάνει χώρα πρώτο.

47. Οι συνολικές ποσότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας (ραδιενέργειας) στα ούρα πρέπει να προσδιορίζονται τουλάχιστον δύο χρονικές στιγμές την 1η ημέρα συλλογής, μία εκ των οποίων θα πρέπει να είναι 24 ώρες μετά τη χορήγηση της δόσης, και καθημερινά στη συνέχεια, έως τον τερματισμό της μελέτης. Ενθαρρύνεται η επιλογή περισσότερων από δύο χρονικών στιγμών δειγματοληψίας την 1η ημέρα (π.χ. την 6η, τη 12η και την 24η ώρα). Τα αποτελέσματα πιλοτικών μελετών θα πρέπει να αναλύονται για τη λήψη πληροφοριών σχετικά με εναλλακτικές ή πρόσθετες χρονικές στιγμές συλλογής. Το χρονοδιάγραμμα συλλογής θα πρέπει να αιτιολογείται.

48. Οι συνολικές ποσότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας (ραδιενέργειας) στα κόπρανα πρέπει να προσδιορίζονται καθημερινά, ξεκινώντας 24 ώρες μετά τη χορήγηση της δόσης, έως τον τερματισμό της μελέτης, εκτός εάν εναλλακτικές ή πρόσθετες στιγμές συλλογής καταδεικνύονται από πιλοτικές μελέτες. Τυχόν εφαρμογή εναλλακτικών χρονοδιαγραμμάτων συλλογής θα πρέπει να αιτιολογείται.

49. Η συλλογή εκπνεόμενου CO_2 και άλλων πτητικών υλικών ενδέχεται να διακόπτεται σε μια δεδομένη πειραματική μελέτη στην περίπτωση που εντοπίζεται ποσοστό μικρότερο του 1 % της χορηγούμενης δόσης στον εκπνεόμενο αέρα κατά τη διάρκεια μιας περιόδου συλλογής 24 ωρών.

Μελέτες χρονικής πορείας

Κινητική πλάσματος/αίματος

50. Σκοπός των μελετών αυτών είναι η λήψη εκτιμήσεων των βασικών τοξικοκινητικών παραμέτρων [π.χ. C_{max}, T_{max}, χρόνος υποδιπλασιασμού ($t_{1/2}$), AUC] της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Οι μελέτες αυτές μπορούν να διεξάγονται με μία δόση ή, πιθανότερα, με δύο ή περισσότερες δόσεις. Ο καθορισμός των δόσεων θα πρέπει να προσδιορίζεται βάσει της φύσης του πειράματος και/ή του θέματος που αντιμετωπίζεται. Ενδέχεται να απαιτούνται κινητικά δεδομένα για την επίλυση ζητημάτων όπως η βιοδιαθεσιμότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και/ή για τη διασαφήνιση της επίδρασης της δόσης στην κάθαρση (π.χ. για να διασαφηνιστεί εάν η κάθαρση έχει κορεστεί κατά τρόπο εξαρτώμενο από τη δόση).

51. Στις μελέτες αυτές θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τέσσερα ζώα του ενός φύλου ανά ομάδα δόσης. Αιτιολόγηση πρέπει να παρέχεται για το φύλο των χρησιμοποιούμενων ζώων. Θα πρέπει να εξετάζεται η χρήση και των δύο φύλων (τέσσερα αρσενικά και τέσσερα θηλυκά ζώα), εάν υπάρχουν στοιχεία που καταδεικνύουν σημαντικές διαφορές στην τοξικότητα οι οποίες συνδέονται με το φύλο.

▼M4

52. Μετά τη χορήγηση της ελεγχόμενης (ραδιοσημασμένης) χημικής ουσίας, λαμβάνονται δείγματα αίματος από κάθε ζώο σε κατάλληλες χρονικές στιγμές με τη χρήση κατάλληλης μεθοδολογίας δειγματοληψίας. Ο όγκος και ο αριθμός των δειγμάτων αίματος που μπορούν να ληφθούν ανά ζώο ενδέχεται να περιορίζονται από τις ενδεχόμενες επιδράσεις της επανειλημμένης δειγματοληψίας στην υγεία/φυσιολογία του ζώου και/ή στην ευαισθησία της αναλυτικής μεθόδου. Τα δείγματα αναλύονται χωριστά για κάθε ζώο. Σε ορισμένες περιπτώσεις (π.χ. χαρακτηρισμός μεταβολιτών), ενδέχεται να είναι απαραίτητη η ομαδοποίηση δειγμάτων από περισσότερα του ενός ζώα. Τα ομαδοποιημένα δείγματα πρέπει να ταυτοποιούνται με σαφήνεια, ενώ η ομαδοποίηση πρέπει να αιτιολογείται. Εάν χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένη ελεγχόμενη χημική ουσία, ενδέχεται να επαρκεί η ανάλυση της ολικής ραδιενέργειας που υπάρχει. Στην περίπτωση αυτή, η ολική ραδιενέργεια πρέπει να αναλύεται στο πλήρες αίμα και στο πλάσμα ή στο πλάσμα και στα ερυθρά αιμοσφαίρια ώστε να υπολογίζεται ο λόγος αίματος/πλάσματος. Σε άλλες περιπτώσεις, ενδέχεται να είναι απαραίτητες πιο συγκεκριμένες έρευνες που απαιτούν την ταυτοποίηση της μητρικής ένωσης και/ή των μεταβολιτών ή για την αξιολόγηση της δέσμευσης πρωτεϊνών.

Κινητική άλλων ιστών

53. Σκοπός των μελετών αυτών είναι η λήψη πληροφοριών χρονικής πορείας για την απάντηση ερωτημάτων σχετικών με θέματα όπως ο τοξικός τρόπος δράσης, η βιοσυσσώρευση και η βιοπαραμονή μέσω του προσδιορισμού των επιπέδων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στους διάφορους ιστούς. Η επιλογή των ιστών και ο αριθμός των χρονικών στιγμών που αξιολογούνται εξαρτώνται από το ζήτημα που πρόκειται να αντιμετωπιστεί και την τοξικολογική βάση δεδομένων για την ελεγχόμενη χημική ουσία. Ο σχεδιασμός αυτών των πρόσθετων μελετών κινητικής ιστών θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη πληροφορίες που συλλέγονται όπως περιγράφεται στις παραγράφους 37-40. Οι μελέτες αυτές ενδέχεται να περιλαμβάνουν μία δόση ή επανειλημμένες δόσεις. Πρέπει να παρέχεται αναλυτική αιτιολόγηση της χρησιμοποιούμενης προσέγγισης.

54. Στους λόγους διεξαγωγής μελετών κινητικής άλλων ιστών ενδέχεται να περιλαμβάνονται οι εξής:

— αποδεικτικά στοιχεία εκτεταμένου χρόνου υποδιπλασιασμού στο αίμα, γεγονός που υποδηλώνει πιθανή συσσώρευση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε διάφορους ιστούς ή

— ενδιαφέρον να διαπιστωθεί εάν έχει επιτευχθεί επίπεδο σταθερής κατάστασης σε συγκεκριμένους ιστούς (π.χ. σε μελέτες με επαναλαμβανόμενη δόση, παρόλο που ενδέχεται να έχει επιτευχθεί ένα φαινόμενο επίπεδο σταθερής κατάστασης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο αίμα, ενδέχεται να υπάρχει ενδιαφέρον να διαπιστωθεί εάν έχει επιτευχθεί επίσης σταθερή κατάσταση και σε ιστούς-στόχους).

55. Για αυτού του είδους τις μελέτες χρονικής πορείας, χορηγείται κατάλληλη δόση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας από το στόμα σε τουλάχιστον τέσσερα ζώα ανά δόση ανά χρονική στιγμή και παρακολουθείται η χρονική πορεία κατανομής σε επιλεγμένους ιστούς. Μπορεί να χρησιμοποιείται μόνο ένα φύλο, εκτός εάν παρατηρείται φυλοσύνδετη τοξικότητα. Η απόφαση σχετικά με το εάν θα αναλυθεί η ολική ραδιενέργεια ή η μητρική χημική ένωση και/ή οι μεταβολίτες εξαρτάται από το ζήτημα που καλείται να αντιμετωπίσει η μελέτη. Η αξιολόγηση της ιστικής κατανομής πραγματοποιείται με τη χρήση κατάλληλων τεχνικών.

Ενζυμική επαγωγή/παρεμπόδιση

56. Ενδέχεται να απαιτούνται μελέτες που αντιμετωπίζουν τις πιθανές επιδράσεις ενζυμικής επαγωγής/παρεμπόδισης ή βιομετασχηματισμού της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε μία ή περισσότερες από τις ακόλουθες περιπτώσεις:

1) εάν διαθέσιμα στοιχεία υποδηλώνουν σχέση μεταξύ του βιομετασχηματισμού της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και της ενισχυμένης τοξικότητας·

2) εάν τα διαθέσιμα τοξικολογικά δεδομένα υποδηλώνουν μη γραμμική σχέση μεταξύ δόσης και μεταβολισμού·

▼M4

3) εάν τα αποτελέσματα μελετών ταυτοποίησης μεταβολιτών καταδεικνύουν ταυτοποίηση ενός δυνητικά τοξικού μεταβολίτη που ενδέχεται να έχει παραχθεί από ενζυμική οδό προκαλούμενη από την ελεγχόμενη χημική ουσία·

4) κατά την επεξήγηση επιδράσεων που θεωρείται ότι συνδέονται με φαινόμενα ενζυμικής επαγωγής·

5) εάν παρατηρούνται τοξικολογικά σημαντικές αλλοιώσεις στο μεταβολικό προφίλ της ελεγχόμενης χημικής ουσίας μέσω πειραμάτων *in vitro* ή *in vivo* σε διάφορα ειδή ζώων ή υπό διάφορες συνθήκες, ενδέχεται να απαιτείται χαρακτηρισμός του εμπλεκόμενου ενζύμου (των εμπλεκόμενων ενζύμων) (π.χ. ένζυμα φάσης I, όπως ισοένζυμα του εξαρτώμενου από το κυτοχρωμικό P450 συστήματος μονοοξυγενάσης, ένζυμα φάσης II, όπως ισοένζυμα φωσφοτρανσφεράσης ή γλυκουρονοσυλ-τρανσφεράσης φωσφορικής ουριδίνης, ή οποιαδήποτε άλλα σχετικά ένζυμα). Οι πληροφορίες αυτές ενδέχεται να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση της σημασίας των ειδών για την παρέκταση στα είδη.

57. Πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλα πρωτόκολλα μελέτης για την αξιολόγηση τοξικοκινητικών αλλαγών που συνδέονται με την ελεγχόμενη χημική ουσία, τα οποία θα είναι καταλλήλως επικυρωμένα και αιτιολογημένα. Παραδείγματα σχεδιασμού μελέτης περιλαμβάνουν επαναλαμβανόμενη δόση μη ραδιοσημασμένη ελεγχόμενης χημικής ουσίας, συνοδευόμενη από εφάπαξ δόση ραδιοσημασμένης ουσίας τη 14η ημέρα ή επαναλαμβανόμενη δόση ραδιοσημασμένης ελεγχόμενης χημικής ουσίας και δειγματοληψία την 1η, την 7η και τη 14η ημέρα για τον προσδιορισμό των προφίλ των μεταβολιτών. Η επανειλημμένη χορήγηση ραδιοσημασμένης ελεγχόμενης χημικής ουσίας μπορεί να παρέχει επίσης πληροφορίες σχετικά με τη βιοσυσσώρευση (βλέπε παράγραφο 26).

ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

58. Χρήσιμες πληροφορίες για την απορρόφηση, την κατανομή, τον μεταβολισμό ή την αποικοδόμηση μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε ορισμένα είδη είναι δυνατόν να παρέχονται μέσω συμπληρωματικών προσεγγίσεων πέραν των *in vivo* πειραμάτων που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών.

Χρήση πληροφοριών από *in vitro* διαδικασίες

59. Ορισμένα ερωτήματα σχετικά με τον μεταβολισμό της ελεγχόμενης χημικής ουσίας είναι δυνατόν να απαντηθούν σε μελέτες *in vitro* με τη χρήση κατάλληλων συστημάτων δοκιμής. Προσφάτως απομονωμένα ή καλλιεργημένα ηπατοκύτταρα ή υποκυτταρικά κλάσματα (π.χ. μικροσωμάτια και ενδοκυττάριο υγρό ή κλάσμα S9) από το ήπαρ μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη πιθανών μεταβολιτών. Ο τοπικός μεταβολισμός στο όργανο στόχο, π.χ. στους πνεύμονες, ενδέχεται να είναι σημαντικός για την εκτίμηση των κινδύνων. Για τους σκοπούς αυτούς, κλάσματα μικροσωματίων των ιστών στόχου ενδέχεται να αποδειχθούν χρήσιμα. Οι μελέτες που περιλαμβάνουν μικροσωμάτια ενδέχεται να είναι χρήσιμες για την αντιμετώπιση ενδεχόμενων διαφορών μεταξύ των φύλων και των σταδίων ζωής και για τον χαρακτηρισμό ενζυμικών παραμέτρων (K_m και V_{max}) που μπορούν να βοηθήσουν στην αξιολόγηση της εξάρτησης του μεταβολισμού από τη δόση σε σχέση με τα επίπεδα έκθεσης. Επιπλέον, τα μικροσωμάτια ενδέχεται να είναι χρήσιμα για τον προσδιορισμό των ειδικών μικροσωματικών ενζύμων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και ενδέχεται να είναι σημαντικά για την παρέκταση στα είδη (βλέπε επίσης παράγραφο 56). Το δυναμικό επαγωγής βιομετασχηματισμού μπορεί επίσης να εξεταστεί με τη χρήση ηπατικών υποκυτταρικών κλασμάτων (π.χ. μικροσωματίων και ενδοκυττάριου υγρού) ζώων στα οποία έχει χορηγηθεί προηγουμένως η ελεγχόμενη χημική ουσία, in vitro μέσω μελετών ηπατοκυτταρικής επαγωγής ή από συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές που εκφράζουν τα σχετικά ένζυμα. Σε ορισμένες περιπτώσεις και υπό κατάλληλες συνθήκες, ενδέχεται να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης υποκυτταρικών κλασμάτων από ανθρώπινους ιστούς για τον προσδιορισμό ενδεχόμενων διαφορών στον βιομετασχηματισμό μεταξύ των ειδών. Τα αποτελέσματα ερευνών in vitro ενδέχεται να είναι επίσης χρήσιμα για την ανάπτυξη μοντέλων PBTK (5).

▼M4

60. Μελέτες δερματικής απορρόφησης in vitro μπορούν να παρέχουν συμπληρωματικές πληροφορίες για τον χαρακτηρισμό της απορρόφησης (6).

61. Μπορούν να χρησιμοποιούνται πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων από ηπατικά κύτταρα και προσφάτως ληφθέντα τμήματα ιστών για την απάντηση παρόμοιων ερωτημάτων με αυτά για τα οποία χρησιμοποιούνται μικροσωμάτια του ήπατος. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ενδέχεται να μπορεί να δοθεί απάντηση σε συγκεκριμένα ερωτήματα με τη χρήση κυτταρικών σειρών που εκφράζουν συγκεκριμένα το σχετικό ένζυμο ή τεχνητών κυτταρικών σειρών. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ενδέχεται να είναι χρήσιμη η μελέτη της παρεμπόδισης και της επαγωγής συγκεκριμένων κυτοχρωμικών P 450 ισοενζύμων (π.χ. CYP1A1, 2E1, 1A2 και άλλων) και/ή ενζύμων φάσης II από τη μητρική ένωση με τη χρήση μελετών in vitro. Οι λαμβανόμενες πληροφορίες ενδέχεται να είναι χρήσιμες για άλλες ουσίες με παρόμοια δομή.

Χρήση τοξικοκινητικών δεδομένων από μελέτες τοξικότητας ως συμπληρωματικών πληροφοριών

62. Η ανάλυση δειγμάτων αίματος, ιστών και/ή απεκκριμάτων που λαμβάνονται κατά τη διεξαγωγή οποιωνδήποτε άλλων μελετών τοξικότητας μπορεί να παράσχει δεδομένα για τη βιοδιαθεσιμότητα, τις αλλαγές στη συγκέντρωση στο πλάσμα μέσα στον χρόνο (AUC, C_{max}), το δυναμικό βιοσυσσώρευσης, τους ρυθμούς κάθαρσης και αλλαγές στον μεταβολισμό και την κινητική που συνδέονται με το φύλο ή το στάδιο ζωής.

63. Εξετάζοντας τον σχεδιασμό της μελέτης μπορούν να απαντηθούν ερωτήματα σχετικά με: τον κορεσμό απορρόφησης, τον βιομετασχηματισμό ή οδούς απέκκρισης σε υψηλότερα επίπεδα δόσης· τη λειτουργία νέων μεταβολικών οδών σε υψηλότερες δόσεις και τον περιορισμό των τοξικών μεταβολιτών σε υψηλότερες δόσεις.

64. Άλλα σχετικά με την εκτίμηση των κινδύνων ζητήματα θα μπορούσαν να περιλαμβάνουν τα εξής:

— σχετική με την ηλικία ευαισθησία λόγω διαφορών στην κατάσταση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, των νεφρών και/ή των δυνατοτήτων αποτοξίνωσης,

— ευαισθησία επιμέρους ομάδων του πληθυσμού λόγω διαφορών στις δυνατότητες βιομετασχηματισμού ή άλλων διαφορών τοξικοκινητικής,

— βαθμός έκθεσης του εμβρύου μέσω διαπλακούντιας μεταφοράς χημικών ουσιών ή του νεογνού μέσω του θηλασμού.

Χρήση τοξικοκινητικής μοντελοποίησης

65. Τα τοξικοκινητικά μοντέλα ενδέχεται να είναι χρήσιμα σε διάφορες πτυχές της εκτίμησης κινδύνων, όπως παραδείγματος χάριν στην πρόβλεψη της συστημικής έκθεσης και της δόσης στους εσωτερικούς ιστούς. Επιπροσθέτως, είναι δυνατόν να απαντηθούν συγκεκριμένα ερωτήματα σχετικά με τον τρόπο δράσης και τα μοντέλα αυτά παρέχουν μια βάση για την παρέκταση μεταξύ των ειδών, τις οδούς έκθεσης, τα μοντέλα χορήγησης δόσεων και την αξιολόγηση του κινδύνου για τον άνθρωπο. Στα δεδομένα που είναι χρήσιμα για την ανάπτυξη μοντέλων PBTK για μια ελεγχόμενη χημική ουσία σε οποιοδήποτε δεδομένο είδος ζώων περιλαμβάνονται 1) οι συντελεστές κατανομής, 2) οι βιοχημικές σταθερές και οι φυσιολογικές παράμετροι, 3) παράμετροι απορρόφησης που συνδέονται με την οδό έκθεσης, 4) κινητικά δεδομένα *in vivo* για την αξιολόγηση των μοντέλων [π.χ. παράμετροι κάθαρσης για σχετικές (> 10 %) οδούς απέκκρισης, K_m και V_{max} για τον μεταβολισμό]. Τα πειραματικά δεδομένα που χρησιμοποιούνται στην ανάπτυξη μοντέλων θα πρέπει να παράγονται με επιστημονικά αξιόπιστες μεθόδους, ενώ τα αποτελέσματα των μοντέλων πρέπει να επικυρώνονται. Παράμετροι που συνδέονται με την ελεγχόμενη χημική ουσία και το είδος, όπως τα ποσοστά απορρόφησης, η κατανομή στο πλάσμα και το αίμα και οι σταθερές μεταβολισμού προσδιορίζονται συχνά για τη διευκόλυνση της ανάπτυξης μοντέλων που δεν αφορούν συγκεκριμένα διαμερίσματα ή μοντέλων που βασίζονται στη φυσιολογία (7).

▼M4

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

66. Συνιστάται η έκθεση της μελέτης να περιλαμβάνει πίνακα περιεχομένων.

Κυρίως μέρος της έκθεσης

67. Το κυρίως μέρος της έκθεσης πρέπει να περιλαμβάνει πληροφορίες παρεχόμενες μέσω της παρούσας μεθόδου δοκιμών, οργανωμένες σε ενότητες και παραγράφους ως εξής:

Σύνοψη

68. Η συγκεκριμένη ενότητα της έκθεσης της μελέτης πρέπει να περιλαμβάνει σύνοψη του σχεδιασμού της μελέτης και περιγραφή των χρησιμοποιούμενων μεθόδων. Θα πρέπει επίσης να υπογραμμίζει τα βασικά ευρήματα σχετικά με το ισοζύγιο μάζας, τη φύση και το μέγεθος των μεταβολιτών, τα κατάλοιπα στους ιστούς, τον ρυθμό κάθαρσης, το δυναμικό βιοσυσσώρευσης, διαφορές μεταξύ των δύο φύλων κ.λπ. Η σύνοψη θα πρέπει να είναι αρκετά αναλυτική ώστε να επιτρέπει την αξιολόγηση των ευρημάτων.

Εισαγωγή

69. Η συγκεκριμένη ενότητα της έκθεσης πρέπει να περιλαμβάνει τους στόχους, την αιτιολογία και τον σχεδιασμό της μελέτης, καθώς και κατάλληλες παραπομπές και το ιστορικό πλαίσιο.

Υλικά και μέθοδοι

70. Η συγκεκριμένη ενότητα της έκθεσης πρέπει να περιλαμβάνει λεπτομερείς περιγραφές όλων των σχετικών πληροφοριών, συμπεριλαμβανομένων των εξής:

α) Ελεγχόμενη χημική ουσία

Η συγκεκριμένη υπο-ενότητα πρέπει να περιλαμβάνει την ταυτοποίηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας: χημική ονομασία, μοριακή δομή, ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό της χημικής της σύνθεσης, χημική καθαρότητα και, εάν είναι δυνατό, τύπο και ποσότητες τυχόν προσμείξεων. Πρέπει να περιλαμβάνει επίσης πληροφορίες για τις φυσικοχημικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένης της φυσικής κατάστασης, του χρώματος, της μακροσκοπικής διαλυτότητας και/ή του συντελεστή κατανομής, της σταθερότητας και, εάν ενδείκνυται, της διαβρωτικότητας. Εφόσον ενδείκνυται, πρέπει να παρέχονται πληροφορίες για ισομερή. Εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία είναι ραδιοσημασμένη, η συγκεκριμένη υποενότητα πρέπει να περιλαμβάνει πληροφορίες για τα εξής: τον τύπο του ραδιονουκλιδίου, τη θέση της επισήμανσης, την ειδική ραδιενέργεια και τη ραδιοχημική καθαρότητα.

Θα πρέπει να αναφέρεται ο τύπος ή περιγραφή οποιουδήποτε φορέα, αραιωτικών, εναιωρητικών μέσων και γαλακτοματοποιητών ή άλλων υλικών που χρησιμοποιούνται κατά τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

β) Πειραματόζωα

Η συγκεκριμένη υπο-ενότητα πρέπει να περιλαμβάνει πληροφορίες για τα πειραματόζωα, συμπεριλαμβανομένης της επιλογής και της αιτιολόγησης του είδους, της φυλής και της ηλικίας κατά την έναρξη της μελέτης, του φύλου, καθώς και του βάρους σώματος, της κατάστασης της υγείας και των συνθηκών μεταχείρισης των ζώων.

γ) Μέθοδοι

Η υπο-ενότητα αυτή πρέπει να περιλαμβάνει λεπτομερή στοιχεία για τον σχεδιασμό της μελέτης και τη χρησιμοποιούμενη μεθοδολογία. Πρέπει να περιλαμβάνει περιγραφή των εξής:

1) αιτιολόγηση οποιασδήποτε τροποποίησης της οδού έκθεσης και των συνθηκών έκθεσης, κατά περίπτωση·

▼M4

2) αιτιολόγηση των επιλεγμένων επιπέδων δόσης·

3) περιγραφή πιλοτικών μελετών που χρησιμοποιήθηκαν στον πειραματικό σχεδιασμό των μελετών παρακολούθησης, κατά περίπτωση. Θα πρέπει να αναφέρονται στοιχεία τεκμηρίωσης των πιλοτικών μελετών·

4) πώς παρασκευάστηκε το διάλυμα δόσης και ο τύπος του διαλύτη ή του φορέα που χρησιμοποιήθηκε, εάν χρησιμοποιήθηκε·

5) αριθμός ομάδων αγωγής και αριθμός ζώων ανά ομάδα·

6) επίπεδα δοσολογίας και όγκος (και ειδική ραδιενέργεια της δόσης, στην περίπτωση που χρησιμοποιείται ραδιενέργεια)·

7) οδός (οδοί) και μέθοδοι χορήγησης·

8) συχνότητα χορήγησης δόσεων·

9) περίοδος νηστείας (εάν εφαρμόστηκε)·

10) ολική ραδιενέργεια ανά ζώο·

11) συνθήκες μεταχείρισης των ζώων·

12) συλλογή και διαχείριση δειγμάτων·

13) αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον διαχωρισμό, τον ποσοτικό προσδιορισμό και την ταυτοποίηση των μεταβολιτών·

14) όριο ανίχνευσης των χρησιμοποιούμενων μεθόδων·

15) άλλες πειραματικές μετρήσεις και διαδικασίες που χρησιμοποιήθηκαν (συμπεριλαμβανομένης επικύρωσης των μεθόδων ανάλυσης των μεταβολιτών).

δ) Στατιστική ανάλυση

Εάν χρησιμοποιήθηκε στατιστική ανάλυση για την ανάλυση των ευρημάτων της μελέτης, θα πρέπει να περιλαμβάνονται η μέθοδος ανάλυσης και το υπολογιστικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκαν, έτσι ώστε η ανάλυση να μπορεί να επαναξιολογηθεί και να ανακατασκευαστεί από ανεξάρτητους ελεγκτές/στατιστικούς αναλυτές.

Στην περίπτωση μελετών μοντελοποίησης συστημάτων, όπως της μελέτης PBTK, η παρουσίαση των μοντέλων πρέπει να περιλαμβάνει πλήρη περιγραφή του μοντέλου ώστε να είναι δυνατή η ανεξάρτητη ανακατασκευή και επικύρωση του μοντέλου (βλέπε παράγραφο 65 και προσάρτημα: Ορισμοί).

Αποτελέσματα

71. Όλα τα δεδομένα θα πρέπει να συνοψίζονται και να αναφέρονται σε μορφή πίνακα με κατάλληλη στατιστική αξιολόγηση και να περιγράφονται στο κείμενο της ενότητας αυτής. Τα δεδομένα μέτρησης ραδιενέργειας πρέπει να συνοψίζονται και να παρουσιάζονται όπως ενδείκνυται για τη μελέτη, συνήθως ως ισοδύναμα μικρογραμμαρίων ή χιλιοστόγραμμων ανά μάζα δείγματος, αν και μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες μονάδες. Η ενότητα αυτή πρέπει να περιλαμβάνει γραφικές απεικονίσεις των ευρημάτων, αναπαραγωγή αντιπροσωπευτικών δεδομένων χρωματογραφίας και φασματομετρίας, ταυτοποίηση/ποσοτικός προσδιορισμός των μεταβολιτών και προτεινόμενες μεταβολικές οδούς, συμπεριλαμβανομένης της μοριακής δομής των μεταβολιτών. Επιπροσθέτως, η συγκεκριμένη ενότητα πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες, εφόσον ενδείκνυται:

1) Ποσότητα και ποσοστιαία ανάκτηση ραδιενέργειας στα ούρα, τα κόπρανα, τον εκπνεόμενο αέρα και τα υγρά έκπλυσης των ούρων και των κοπράνων από τους κλωβούς.

— Στην περίπτωση δερματικών μελετών, περιλαμβάνει επίσης δεδομένα για την ανάκτηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας από το εκτεθειμένο δέρμα, τα υγρά έκπλυσης του δέρματος και την εναπομένουσα ραδιενέργεια στο δέρμα που καλύπτει τον εξοπλισμό και τη μεταβολική μονάδα, καθώς τα αποτελέσματα της μελέτης έκπλυσης του δέρματος. Για περισσότερες πληροφορίες, βλέπε παραγράφους 74-77.

▼M4

— Στην περίπτωση αναπνευστικών μελετών, περιλαμβάνει επίσης δεδομένα ανάκτησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας από τους πνεύμονες και τους ρινικούς ιστούς (8). Για περισσότερες πληροφορίες, βλέπε παράγραφο 78.

2) Ιστική κατανομή αναφερόμενη ως ποσοστό χορηγούμενης δόσης και συγκέντρωση (ισοδύναμα μικρογραμμαρίων ανά γραμμάριο ιστού) και λόγοι ιστών-αίματος ή ιστών-πλάσματος·

3) Ισοζύγιο ύλης που έχει αναπτυχθεί από κάθε μελέτη που περιλαμβάνει έλεγχο των ιστών και των απεκκριμάτων του σώματος·

4) Συγκεντρώσεις στο πλάσμα και τοξικοκινητικές παράμετροι (βιοδιαθεσιμότητα, AUC, Cmax, Tmax, κάθαρση, χρόνος υποδιπλασιασμού) κατόπιν χορήγησης μέσω της αντίστοιχης οδού (των αντίστοιχων οδών) έκθεσης·

5) Ρυθμός και βαθμός απορρόφησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας κατόπιν χορήγησης μέσω της αντίστοιχης οδού (των αντίστοιχων οδών) έκθεσης·

6) Ποσότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και των μεταβολιτών (αναφερόμενες ως ποσοστό της χορηγούμενης δόσης) που έχουν συλλεχθεί στα απεκκρίματα·

7) Αναφορά σε δεδομένα του προσαρτήματος που περιέχουν στοιχεία για τα επιμέρους ζώα για όλα τα καταληκτικά σημεία μέτρησης (π.χ. χορήγηση δόσεων, ποσοστιαία ανάκτηση, συγκεντρώσεις, τοξικοκινητικές παράμετροι κ.λπ.)·

8) Σχέδιο των προτεινόμενων μεταβολικών οδών και των μοριακών δομών των μεταβολιτών.

Συζήτηση και συμπεράσματα

72. Στην ενότητα αυτή, ο (οι) συντάκτης(-ες) θα πρέπει:

1) να αναφέρει μια προτεινόμενη μεταβολική οδό βάσει των αποτελεσμάτων του μεταβολισμού και της κατανομής της ελεγχόμενης χημικής ουσίας·

2) να συζητά οποιεσδήποτε ενδεχόμενες διαφορές που συνδέονται με το είδος και το φύλο σχετικά με την κατανομή και/ή τον βιομετασχηματισμό της ελεγχόμενης χημικής ουσίας·

3) να καταρτίσει πίνακα και να αναλύσει την ταυτοποίηση και το μέγεθος των μεταβολιτών, τον ρυθμό κάθαρσης, το δυναμικό βιοσυσσώρευσης και το επίπεδο καταλοίπων της μητρικής ένωσης και/ή των μεταβολιτών στους ιστούς, καθώς και πιθανές δοσοεξαρτώμενες αλλαγές στις τοξικοκινητικές παραμέτρους, κατά περίπτωση·

4) να ενσωματώσει στην ενότητα αυτή τυχόν τοξικοκινητικά δεδομένα που έχουν ληφθεί κατά τη διεξαγωγή μελετών τοξικότητας·

5) να παράσχει ένα περιεκτικό συμπέρασμα το οποίο υποστηρίζεται από τα ευρήματα της μελέτης·

6) να προσθέσει ενότητες (όπως χρειάζεται ή ενδείκνυται).

73. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσθετες ενότητες ώστε να περιλαμβάνονται στην έκθεση βιβλιογραφικές πληροφορίες, πίνακες, σχήματα, προσαρτήματα κ.λπ.

▼**M4**

ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΕΣ ΟΔΟΙ ΕΚΘΕΣΗΣ

Μέσω του δέρματος

Δερματική έκθεση

74. Η συγκεκριμένη ενότητα παρέχει συγκεκριμένες πληροφορίες σχετικά με τη διερεύνηση της τοξικοκινητικής της ελεγχόμενης χημικής ουσίας μέσω του δέρματος. Όσον αφορά τη δερματική απορρόφηση, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το κεφάλαιο Β.44 του παρόντος παραρτήματος [Δερματική απορρόφηση: μέθοδος *in vivo* (9)]. Για άλλα καταληκτικά σημεία, όπως η κατανομή και ο μεταβολισμός, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η παρούσα μέθοδος δοκιμών Β.36. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται ένα ή περισσότερα επίπεδα δόσης κατά τη δερματική έκθεση. Η ελεγχόμενη χημική ουσία (π.χ. αναραίωτο, αραιωμένο ή μορφοποιημένο υλικό, το οποίο περιέχει την ελεγχόμενη χημική ουσία και εφαρμόζεται στο δέρμα) θα πρέπει να είναι το ίδιο (ή ρεαλιστικό υποκατάστατο) με εκείνο στο οποίο μπορεί να εκτεθούν άνθρωποι ή άλλα πιθανά είδη στόχου. Το επίπεδο (τα επίπεδα) δόσης πρέπει να επιλέγεται(-ονται) σύμφωνα με τις παραγράφους 20-26 της παρούσας μεθόδου δοκιμών. Παράγοντες που θα μπορούσαν να λαμβάνονται υπόψη κατά την επιλογή δόσης στο δέρμα περιλαμβάνουν την αναμενόμενη έκθεση του ανθρώπου και/ή τις δόσεις στις οποίες παρατηρήθηκε τοξικότητα σε άλλες μελέτες δερματικής τοξικότητας. Οι δόσεις στο δέρμα πρέπει να αραιώνονται, εάν είναι απαραίτητο, σε κατάλληλο φορέα και να εφαρμόζονται σε όγκο κατάλληλο για τη χορήγηση των δόσεων. Λίγο πριν αρχίσει η δοκιμή το τρίχωμα πρέπει να ψαλιδίζεται από την περιοχή της ράχης του κορμού των πειραματόζωων. Μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθεί ξύρισμα για την απομάκρυνση του τριχώματος, αλλά αυτό πρέπει να γίνεται 24 ώρες περίπου πριν από τη δοκιμή. Κατά το κούρεμα ή ξύρισμα του τριχώματος, προσοχή πρέπει να δίνεται ώστε να αποφεύγεται η απόξεση του δέρματος, πράγμα το οποίο μπορεί να μεταβάλει τη διαπερατότητά του. Θα πρέπει να καθαρίζεται περίπου το 10 % της επιφάνειας του σώματος για την εφαρμογή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Στην περίπτωση ουσιών υψηλής τοξικότητας, η καλυπτόμενη επιφάνεια μπορεί να είναι μικρότερη, αλλά θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε όσο το δυνατόν περισσότερη επιφάνεια να καλύπτεται με όσο το δυνατόν πιο λεπτό και ομοιόμορφο στρώμα. Η ίδια επιφάνεια έκθεσης θα πρέπει να χρησιμοποιείται σε όλες τις πειραματικές ομάδες δερματικής έκθεσης. Οι περιοχές στις οποίες χορηγούνται οι δόσεις πρέπει να προστατεύονται με κατάλληλο κάλυμμα, το οποίο ασφαλίζεται στη θέση του. Τα ζώα πρέπει να στεγάζονται ατομικά.

75. Πρέπει να διεξάγεται μελέτη έκπλυσης του δέρματος ώστε να αξιολογείται η ποσότητα της εφαρμοζόμενης δόσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που μπορεί να απομακρυνθεί από το δέρμα μέσω έκπλυσης της εκτεθειμένης περιοχής του δέρματος με μαλακό σαπούνι και νερό. Η μελέτη αυτή μπορεί να βοηθήσει επίσης στον καθορισμό του ισοζυγίου μάζας όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται μέσω του δέρματος. Για τη συγκεκριμένη μελέτη έκπλυσης του δέρματος, πρέπει να εφαρμόζεται μία δόση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε δύο ζώα. Τα επίπεδα δόσης επιλέγονται σύμφωνα με την παράγραφο 23 της παρούσας μεθόδου δοκιμών (βλέπε επίσης παράγραφο 76 σχετικά με τον χρόνο επαφής με το δέρμα). Οι ποσότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που ανακτώνται στα υγρά έκπλυσης θα πρέπει να προσδιορίζονται ώστε να αξιολογείται η αποτελεσματικότητα απομάκρυνσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας μέσω της διαδικασίας έκπλυσης.

76. Η ελεγχόμενη χημική ουσία θα πρέπει να εφαρμόζεται και να παραμένει στο δέρμα για τουλάχιστον 6 ώρες, εκτός εάν αυτό δεν είναι δυνατό για λόγους διαβρωτικότητας. Κατά τον χρόνο απομάκρυνσης του καλύμματος, η εκτεθειμένη περιοχή θα πρέπει να εκπλένεται ακολουθώντας τη διαδικασία που περιγράφεται στη μελέτη έκπλυσης του δέρματος (βλέπε παράγραφο 75). Τόσο το κάλυμμα όσο και τα υγρά έκπλυσης θα πρέπει να αναλύονται για τον εντοπισμό καταλοίπων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Κατά τον τερματισμό των μελετών, κάθε ζώο θα πρέπει να θανατώνεται κατά τρόπο μη βάναυσο σύμφωνα με τη βιβλιογραφική παραπομπή (2), ενώ το εκτεθειμένο δέρμα πρέπει να αφαιρείται. Θα πρέπει να αναλύεται κατάλληλο τμήμα του εκτεθειμένου δέρματος ώστε να προσδιορίζεται τυχόν υπολειπόμενη ελεγχόμενη χημική ουσία (ραδιενέργεια).

77. Για την τοξικοκινητική αξιολόγηση φαρμακευτικών ουσιών, ενδέχεται να απαιτούνται διαφορετικές διαδικασίες, σύμφωνα με το κατάλληλο κανονιστικό σύστημα.

▼M4

Εισπνοή

78. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται μία συγκέντρωση (ή περισσότερες, εάν χρειάζεται) της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Η συγκέντρωση (οι συγκεντρώσεις) θα πρέπει να επιλέγεται(-ονται) σύμφωνα με τις παραγράφους 20-26 της παρούσας μεθόδου δοκιμών. Οι αναπνευστικές μελέτες πρέπει να διεξάγονται με εξοπλισμό «ρινικού κώνου» ή «κεφαλής» ώστε να αποφεύγεται η απορρόφηση μέσω εναλλακτικών οδών έκθεσης (8). Εάν χρησιμοποιούνται άλλες συνθήκες αναπνευστικής έκθεσης, θα πρέπει να τεκμηριώνεται η συγκεκριμένη τροποποίηση. Η διάρκεια της έκθεσης μέσω της εισπνοής πρέπει να καθορίζεται· μια τυπική έκθεση διαρκεί 4-6 ώρες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) OECD (2009), Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OECD, Paris.

(2) OECD (2000), Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation; Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment N°19, ENV/JM/MONO(2000), OECD, Paris.

(3) Solon E.G., Kraus L. (2002), Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry, Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, *J. Pharm and Tox Methods* 46: 73-81.

(4) Stumpf W.E. (2005), Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography, *J. Pharmacological and Toxicological Methods* 51: 25-40.

(5) Loizou G., Spendiff M., Barton H.A., Bessems J., Bois F.Y., d'Yvoire M.B., Buist H., Clewell H.J. 3rd, Meek B., Gundert-Remy U., Goerlitz G., Schmitt W. (2008), Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 50: 400-411.

(6) Κεφάλαιο B.45 του παρόντος παραρτήματος: Δερματική απορρόφηση: Μέθοδος in vitro.

(7) IPCS (2010), Characterization and application of Physiologically-BasedPharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No 9, Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.

(8) OECD (2009), Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(9) Κεφάλαιο B.44 του παρόντος παραρτήματος: Δερματική απορρόφηση: Μέθοδος in vivo.

(10) Barton H.A. et al. (2006), The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, *Critical Reviews in Toxicology* 36: 9-35.

(11) Gibaldi M. και Perrier D., (1982), Pharmacokinetics, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.

▼M4

Προσάρτημα

ΟΡΙΣΜΟΙ

ADME: Ακρωνύμιο των όρων «Απορρόφηση, Κατανομή, Μεταβολισμός και Απέκκριση».

AUC (Εμβαδόν κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης στο πλάσμα-χρόνου): Εμβαδόν κάτω από την καμπύλη σε γραφική παράσταση της συγκέντρωσης μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο πλάσμα συναρτήσει του χρόνου. Αντιπροσωπεύει τη συνολική ποσότητα ελεγχόμενης χημικής ουσίας που απορροφάται από το σώμα εντός προκαθορισμένης χρονικής περιόδου. Υπό γραμμικές συνθήκες, η AUC (από χρόνο 0 έως άπειρο) είναι ανάλογη της συνολικής ποσότητας μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας που απορροφάται από το σώμα, ανεξαρτήτως του ρυθμού απορρόφησης.

C_{max}: Η μέγιστη συγκέντρωση (αιχμής) στο αίμα (πλάσμα/ορό) μετά τη χορήγηση ή η μέγιστη απέκκριση (αιχμής) (στα ούρα ή τα κόπρανα) μετά τη χορήγηση.

T_{max}: Χρόνος που απαιτείται για την επίτευξη της τιμής C_{max}.

Απέκκριση: Διεργασίες με τις οποίες η χορηγούμενη χημική ουσία και/ή οι μεταβολίτες της απομακρύνονται από το σώμα.

Απορρόφηση από το στόμα: Το ποσοστό της δόσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που απορροφάται από το σημείο χορήγησης (ήτοι, το γαστρεντερικό σύστημα). Αυτή η κρίσιμη παράμετρος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κατανόηση του κλάσματος της χορηγούμενης χημικής ουσίας που φθάνει στην πυλαία φλέβα και, εν συνεχεία, στο ήπαρ.

Απορρόφηση: Διεργασίες πρόσληψης χημικών ουσιών από τους ιστούς ή μεταξύ των ιστών. Η απορρόφηση αναφέρεται στη μητρική ένωση και στο σύνολο των μεταβολιτών της. Δεν πρέπει να συγχέεται με τον όρο «βιοδιαθεσιμότητα».

Αυτοραδιογραφία (ολόσωμη αυτοραδιογραφία): Χρησιμοποιούμενη για τον ποιοτικό και/ή ποσοτικό προσδιορισμό της θέσης μιας ραδιενεργού ελεγχόμενης χημικής ουσίας στους ιστούς, η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιεί φιλμ ακτίνων Χ ή, προσφάτως, ψηφιακό σύστημα απεικόνισης με φωσφόρους για την απεικόνιση ραδιοσημασμένων μορίων ή τμημάτων μορίων, καταγράφοντας τη ραδιενέργεια που εκπέμπεται στο μελετώμενο αντικείμενο. Η ποσοτική ολόσωμη αυτοραδιογραφία, σε σύγκριση με την ανατομή των οργάνων, ενδέχεται να έχει ορισμένα πλεονεκτήματα για την αξιολόγηση της κατανομής της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και την εκτίμηση της συνολικής ανάκτησης και του διαχωρισμού του ραδιενεργού υλικού στους ιστούς. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα, παραδείγματος χάριν, είναι ότι η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μοντέλο ζώων που φέρουν κηλίδες για την εκτίμηση της πιθανής σύνδεσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας με τη μελανίνη, η οποία μπορεί να δεσμεύει ορισμένα μόρια. Ωστόσο, παρόλο που προσφέρει εύκολη επισκόπηση των θέσεων σύνδεσης υψηλής χωρητικότητας αλλά χαμηλής συγγένειας σε ολόκληρο το σώμα, η τεχνική αυτή ενδέχεται να υπόκειται σε περιορισμούς όσον αφορά την αναγνώριση συγκεκριμένων θέσεων στόχου, όπως οι θέσεις σύνδεσης με υποδοχείς, όταν απαιτείται σχετικά υψηλή ανάλυση και υψηλή ευαισθησία για την ανίχνευση. Όταν χρησιμοποιείται αυτοραδιογραφία, πρέπει να εκτελούνται πειράματα με σκοπό τον προσδιορισμό του ισοζυγίου μάζας της χορηγούμενης ουσίας, ως χωριστή ομάδα ή σε μελέτη χωριστή από το πείραμα ιστικής κατανομής, όπου όλα τα απεκκρίματα (ενδεχομένως συμπεριλαμβανομένου του εκπνεόμενου αέρα) και ολόκληρα τα σφάγια ομογενοποιούνται και υποβάλλονται σε δοκιμασία με μέτρηση σπινθηρισμού υγρών.

Βιοδιαθεσιμότητα: Κλάσμα της χορηγούμενης δόσης που φθάνει στη συστημική κυκλοφορία ή είναι διαθέσιμο στην περιοχή φυσιολογικής δραστηριότητας. Συνήθως, η βιοδιαθεσιμότητα μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας αναφέρεται στη μητρική ένωση, αλλά μπορεί να αναφέρεται επίσης στους μεταβολίτες της. Αφορά μόνο μία χημική μορφή. *Σημείωση:* Η βιοδιαθεσιμότητα δεν ταυτίζεται με την απορρόφηση. Η διαφορά μεταξύ, π.χ., της απορρόφησης από το στόμα (ήτοι, παρουσία στο τοίχωμα του εντέρου και πυλαία κυκλοφορία) και της βιοδιαθεσιμότητας (ήτοι, παρουσία στο συστημικό αίμα και στους ιστούς) μπορεί να προκύψει από χημική αποδόμηση, λόγω μεταβολισμού στο τοίχωμα του εντέρου

▼M4

ή επαναφοράς εκροής στην εντερική κοιλότητα ή προσυστημικού μεταβολισμού στο ήπαρ, μεταξύ άλλων παραγόντων (10). Η βιοδιαθεσιμότητα του τοξικού στοιχείου (μητρική ένωση ή μεταβολίτης) αποτελεί κρίσιμη παράμετρο κατά την εκτίμηση των κινδύνων για τον άνθρωπο (παρέκταση από την υψηλή δόση σε χαμηλή, παρέκταση από μια οδό σε άλλη) για τον προσδιορισμό εσωτερικής τιμής από την εξωτερική τιμή NOAEL ή BMD (εφαρμοζόμενη δόση). Για την αξιολόγηση των επιδράσεων στο ήπαρ μετά από χορήγηση από το στόμα, αρκεί η απορρόφηση από το στόμα. Ωστόσο, για την αξιολόγηση οποιασδήποτε άλλης επίδρασης πέραν του σημείου εισόδου, η βιοδιαθεσιμότητα και όχι η απορρόφηση αποτελεί γενικά πιο αξιόπιστη παράμετρο για περαιτέρω χρήση στην εκτίμηση των κινδύνων.

Βιομετασχηματισμός: (Συνήθως ενζυματική) χημική μετατροπή μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας που ενδιαφέρει σε διαφορετική χημική ουσία μέσα στο σώμα. Συνώνυμο του όρου «μεταβολισμός».

Βιοεμμονή: Βλέπε «Εμμονή».

Βιοσυσσώρευση: Βλέπε «Συσσώρευση».

Γραμμικότητα/γραμμική κινητική: Μια διεργασία είναι γραμμική από πλευράς κινητικής, όταν όλα τα ποσοστά μεταφοράς μεταξύ διαμερισμάτων είναι ανάλογα με τις παρούσες ποσότητες ή συγκεντρώσεις, δηλαδή κινητική πρώτης τάξεως. Επομένως, οι όγκοι κάθαρσης και κατανομής, όπως και ο χρόνος υποδιπλασιασμού, είναι σταθεροί. Οι συγκεντρώσεις που προκύπτουν είναι ανάλογες της δοσολογίας (έκθεση) και η συσσώρευση είναι ευκολότερα προβλέψιμη. Η γραμμικότητα/μη γραμμικότητα μπορεί να εκτιμηθεί με σύγκριση των σχετικών παραμέτρων, π.χ. της AUC, μετά από χορήγηση διαφορετικών δόσεων ή από εφάπαξ ή επανειλημμένη έκθεση. Η απουσία εξάρτησης από τη δόση μπορεί να είναι ενδεικτική κορεσμού των ενζύμων που συμμετέχουν στον μεταβολισμό της ένωσης, η αύξηση της AUC μετά από επανειλημμένη έκθεση σε σύγκριση με την εφάπαξ έκθεση μπορεί να αποτελεί ένδειξη παρεμπόδισης του μεταβολισμού, ενώ η μείωση της AUC μπορεί να αποτελεί ένδειξη επαγωγής του μεταβολισμού [βλέπε επίσης (11)].

Διαμέρισμα: Δομικό ή βιοχημικό τμήμα (ή μονάδα) ενός σώματος, ιστού ή κυττάρου, το οποίο είναι διαχωρισμένο από το υπόλοιπο σώμα, ιστό ή κύτταρο.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε χημική ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Εμμονή (βιοεμμονή): Μακρόχρονη παρουσία μιας χημικής ουσίας (σε ένα βιολογικό σύστημα) λόγω της ανθεκτικότητάς της στην αποδόμηση/αποβολή.

Ένζυμα/Ισοένζυμα: Πρωτεΐνες που καταλύουν χημικές αντιδράσεις. Τα ισοένζυμα είναι ένζυμα που καταλύουν ομοειδείς χημικές αντιδράσεις, αλλά διαφέρουν ως προς την αλληλουχία των αμινοξέων τους.

Ενζυμικές παράμετροι: K_m: σταθερά Michaelis και V_{max}: μέγιστη ταχύτητα

Εξωγενώς: Εισάγεται από το εξωτερικό του οργανισμού ή συστήματος ή παράγεται εκτός αυτού.

Επαγωγή/Ενζυμική επαγωγή: Σύνθεση ενζύμων ως αντίδραση σε περιβαλλοντικό ερέθισμα ή επαγωγικό μόριο.

Επικύρωση μοντέλων: Διαδικασία αξιολόγησης της καταλληλότητας ενός μοντέλου για την περιγραφή των διαθέσιμων τοξικοκινητικών δεδομένων με συνέπεια. Τα μοντέλα μπορούν να αξιολογηθούν με στατιστική και οπτική σύγκριση των προβλέψεών τους με τις πειραματικές τιμές έναντι μιας κοινής ανεξάρτητης μεταβλητής (π.χ. χρόνος). Ο βαθμός αξιολόγησης θα πρέπει να αιτιολογείται σε σχέση με τη σκοπούμενη χρήση του μοντέλου.

Επίπεδα αιχμής στο αίμα (πλάσμα/ορό): Μέγιστη συγκέντρωση (αιχμής) στο αίμα (πλάσμα/ορό) μετά τη χορήγηση (βλ επίσης «C_{max}»).

Επίπεδα σταθερής κατάστασης στο αίμα (πλάσμα): Κατάσταση μη ισορροπίας ενός ανοικτού συστήματος, κατά την οποία όλες οι δυνάμεις που επενεργούν στο σύστημα εξουδετερώνονται από τις αντίρροπες δυνάμεις, κατά τρόπο ώστε όλα τα στοιχεία του να είναι στατικά ως προς τη συγκέντρωση, παρόλο που ρέει ύλη μέσω του συστήματος.

▼M4

Ευαισθησία: Ικανότητα μιας μεθόδου ή ενός οργάνου να κάνει διάκριση μεταξύ αποκρίσεων μέτρησης που αντιπροσωπεύουν διαφορετικά επίπεδα της εξεταζόμενης μεταβλητής.

Ισοζύγιο μάζας: Λογιστική απεικόνιση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που εισέρχεται στο σύστημα και αυτής που εξέρχεται από αυτό.

Ισοζύγιο ύλης: Βλέπε «ισοζύγιο μάζας».

Ιστική κατανομή: Αναστρέψιμη κίνηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας από μια θέση στο σώμα σε μια άλλη. Η ιστική κατανομή μπορεί να μελετηθεί με ανατομή οργάνων, ομογενοποίηση, καύση και μέτρηση σπινθηρισμού υγρών ή με ποιοτική και/ή ποσοτική ολόσωμη αυτοραδιογραφία. Η πρώτη μέθοδος είναι χρήσιμη για τη λήψη στοιχείων σχετικά με τη συγκέντρωση και το ποσοστό ανάκτησης από τους ιστούς και το υπόλοιπο πτώμα των ίδιων ζώων, αλλά δεν προσφέρει ανάλυση όλων των ιστών και ενδέχεται να επιτυγχάνει ποσοστό συνολικής ανάκτησης μικρότερο του ιδανικού (< 90 %). Βλέπε ορισμό της δεύτερης μεθόδου ανωτέρω.

Ιστός-στόχος: Ιστός στον οποίο εκδηλώνεται η κύρια δυσμενής επίδραση μιας τοξικής ουσίας.

Κατανομή: Διασπορά της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και των παραγώγων της σε έναν οργανισμό.

Κορεσμός: Κατάσταση στην οποία μια ή περισσότερες κινητικές διεργασίες (π.χ. απορρόφηση, μεταβολισμός ή κάθαρση) βρίσκονται σε μέγιστο επίπεδο («έχουν κορεσθεί»).

Μεταβολισμός: Συνώνυμο του όρου «βιομετασχηματισμός».

Μεταβολίτες: Προϊόντα μεταβολισμού ή μεταβολικών διεργασιών.

Μηχανισμός (τρόπος) τοξικότητας/Μηχανισμός (τρόπος) δράσης: Ο μηχανισμός δράσης αναφέρεται στις συγκεκριμένες βιοχημικές αλληλεπιδράσεις μέσω των οποίων μια ελεγχόμενη χημική ουσία προκαλεί τις επιδράσεις της. Ο τρόπος δράσης αναφέρεται σε γενικότερες οδούς που οδηγούν στην τοξικότητα μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

Μικροσκοπική αυτοραδιογραφία υποδοχέων (ή μικροαυτοραδιογραφία υποδοχέων): Η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση της ξενοβιοτικής αλληλεπίδρασης με συγκεκριμένες θέσεις των ιστών ή πληθυσμούς κυττάρων, όπως π.χ. στις μελέτες με αντικείμενο τη σύνδεση υποδοχέων ή συγκεκριμένους τρόπους δράσης, οι οποίες ενδέχεται να απαιτούν υψηλή ανάλυση και υψηλή ευαισθησία που πιθανόν να μην είναι εφικτές με άλλες τεχνικές, όπως η ολόσωμη αυτοραδιογραφία.

Μοντελοποίηση συστημάτων (βασιζόμενη στη φυσιολογία τοξικοκινητική, βασιζόμενη στη φαρμακοκινητική, βασιζόμενη στη φυσιολογία φαρμακοκινητική, βασιζόμενη στη βιολογία κ.λπ.). Θεωρητικό μοντέλο που χρησιμοποιεί μαθηματική γλώσσα για να περιγράψει τη συμπεριφορά ενός συστήματος.

Οδοί αποτοξίνωσης: Σειρά σταδίων που οδηγούν στην αποβολή των τοξικών χημικών ουσιών από το σώμα, είτε μέσω μεταβολικής αλλαγής είτε μέσω απέκκρισης.

Οδός χορήγησης: (από το στόμα, ενδοφλεβίως, μέσω του δέρματος, μέσω της εισπνοής): Αναφέρεται στα μέσα με τα οποία οι χημικές ουσίες χορηγούνται στο σώμα (π.χ. από το πεπτικό σύστημα με καθετήρα, από το στόμα με την τροφή, μέσω του δέρματος, μέσω της εισπνοής, ενδοφλεβίως κ.λπ.).

Παρέκταση: Συναγωγή μιας ή περισσότερων άγνωστων τιμών βάσει των τιμών που είναι γνωστές ή έχουν παρατηρηθεί.

Ρυθμός κάθαρσης: Ποσοτικό μέτρο του ρυθμού με τον οποίο μια ελεγχόμενη χημική ουσία απομακρύνεται από το αίμα, το πλάσμα ή έναν ορισμένο ιστό ανά μονάδα χρόνου.

Συγκριτική προσέγγιση: Οι πληροφορίες καταληκτικού σημείου για μία ή περισσότερες χημικές ουσίες χρησιμοποιούνται για την πρόβλεψη του καταληκτικού σημείου της στοχευόμενηςχημικής ουσίας.

▼**M4**

Συντελεστής κατανομής: Γνωστός και ως συντελεστής μερισμού, αποτελεί μέτρο της διαφορικής διαλυτότητας μιας χημικής ουσίας σε δύο διαλύτες.

Συσσώρευση (Βιοσυσσώρευση): Αύξηση της ποσότητας της ελεγχόμενης χημικής ουσίας με την πάροδο του χρόνου στους ιστούς (συνήθως στους λιπώδεις ιστούς, μετά από επανειλημμένη έκθεση). Εάν η εισροή μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο σώμα είναι μεγαλύτερη από τον ρυθμό αποδόμησής της, ο οργανισμός συσσωρεύει την ελεγχόμενη χημική ουσία και ενδέχεται να σημειωθούν τοξικές συγκεντρώσεις της.

Τοξικοκινητική (φαρμακοκινητική): Μελέτη της απορρόφησης, της κατανομής, του μεταβολισμού και της απέκκρισης χημικών ουσιών με την πάροδο του χρόνου.

Χολική απέκκριση: Απέκκριση μέσω των χοληδόχων πόρων.

Χρόνος υποδιπλασιασμού ($t_{1/2}$): Ο χρόνος που απαιτείται για τη μείωση της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας κατά το ήμισυ σε ένα διαμέρισμα. Αναφέρεται συνήθως στη συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο πλάσμα ή στην ποσότητά της σε ολόκληρο το σώμα.

▼B

B.37 **ΕΚ ΤΩΝ ΥΣΤΕΡΩΝ ΕΜΦΑΝΙΖΟΜΕΝΗ ΝΕΥΡΟΤΟΞΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΟΞΕΙΑ ΕΚΘΕΣΗ**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κατά την εκτίμηση και αξιολόγηση των τοξικών επιδράσεων των ουσιών, είναι σκόπιμο να εξεταστεί η ικανότητα ορισμένων κατηγοριών ουσιών να προκαλούν ειδικές μορφές νευροτοξικότητας μη δυνάμενες να ανιχνευθούν με άλλες τοξικολογικές μελέτες. Ορισμένες οργανοφωσφορικές ουσίες οι οποίες έχει παρατηρηθεί ότι προκαλούν εκ των υστέρων εμφάνιση νευροτοξικότητας πρέπει να θεωρηθούν υποψήφιες για μια τέτοια αξιολόγηση.

Για τον εντοπισμό των ουσιών που δύνανται να προκαλέσουν εκ των υστέρων εμφάνιση πολυνευροπάθειας μπορούν να χρησιμοποιηθούν διερευνητικές δοκιμές *in vitro*. Ωστόσο, αρνητικά αποτελέσματα από τις μελέτες αυτές δεν αποδεικνύουν ότι η ελεγχόμενη ουσία στερείται νευροτοξικής δράσης.

Βλέπε επίσης γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Ως οργανοφωσφορικές ουσίες νοούνται οι χωρίς φορτίο οργανοφωσφορικοί εστέρες, θειοεστέρες ή ανυδρίτες οργανοφωσφορικών, οργανοφωσφονικών, ή οργανοφωσφοραμιδικών οξέων ή ανάλογων φωσφονοθειϊκών, φωσφονοθειικών ή φωσφοροθειοαμιδικών οξέων ή άλλες ουσίες δυνάμενες να προκαλέσουν την εκ των υστέρων νευροτοξική επίδραση που παρατηρείται ορισμένες φορές με αυτή την κατηγορία ουσιών.

Ως εκ των υστέρων εμφανιζόμενη νευροτοξικότητα νοείται σύνδρομο το οποίο εκδηλώνεται με παρατεταμένη εκ των υστέρων εμφάνιση αταξίας, περιφερικών αξονοπαθειών του νωτιαίου μυελού και των περιφερικών νεύρων και με αναστολή και γήρανση της εστεράσης του νευρικού ιστού που προσβάλλεται κατά τη νευροπάθεια (neuropathy target esterase — NTE).

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Μια ουσία αναφοράς μπορεί να δοκιμαστεί σε μία θετική ομάδα μάρτυρα προκειμένου να καταδειχθεί ότι η απόκριση των ζώων της δοκιμής δεν μεταβλήθηκε σημαντικά υπό τις εργαστηριακές συνθήκες δοκιμής.

Μία ευρέως χρησιμοποιούμενη νευροτοξική ουσία είναι το φωσφορικό τρι-ο-τολουόλιο (αριθ. CAS 78-30-8, αριθ. EINECS 201-103-5, ονοματολογία CAS: τρις (2-μεθυλο-φαινυλ)εστέρας του φωσφορικού οξέος) γνωστή επίσης ως τρις-ο-φωσφορικός κρεσυλεστέρας.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται σε μια μόνο δόση από το στόμα σε κατοικίδιες όρνιθες που έχουν προστατευθεί εάν είναι αναγκαίο, από οξείες χολινεργικές επιδράσεις. Τα ζώα παρατηρούνται επί 21 ημέρες για ανωμαλίες στη συμπεριφορά, αταξία και παράλυση, 24 και 48 ώρες μετά τη χορήγηση της ουσίας, λαμβάνονται τυχαία ορισμένες όρνιθες από κάθε ομάδα και διενεργούνται βιοχημικές μετρήσεις ιδίως για τον προσδιορισμό της εστεράσης του νευρικού ιστού που προσβάλλεται κατά τη νευροπάθεια (NTE). 21 ημέρες μετά την έκθεση, οι υπόλοιπες όρνιθες θανατώνονται και διενεργείται ιστοπαθολογική εξέταση ορισμένων επιλεγμένων νευρικών ιστών.

▼B

1.5. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.5.1. **Προετοιμασίες**

Λαμβάνονται τυχαία υγιείς νεαρές ενήλικες όρνιθες οι οποίες δεν πάσχουν από ιογενείς νόσους, δεν βρίσκονται υπό φαρμακευτική αγωγή και δεν παρουσιάζουν

ανωμαλίες στο βάδισμα, και χωρίζονται σε ομάδες αγωγής και ομάδες μάρτυρες. Εγκλιματίζονται στις συνθήκες του εργαστηρίου επί 5 τουλάχιστον ημέρες πριν από την έναρξη της μελέτης.

Χρησιμοποιούνται ευρύχωρα κλουβιά, ή περιφράγματα ώστε οι όρνιθες να μπορούν να κινούνται ελεύθερα και να είναι εύκολη η παρατήρηση του βηματισμού. Η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται κανονικά από το στόμα με αναγκαστική θρέψη, ζελατινούχες κάψουλες ή ανάλογη μέθοδο. Οι υγρές ουσίες μπορούν να χορηγούνται χωρίς προηγούμενη αραίωση ή διαλελυμένες σε κατάλληλο φορέα όπως το αραβοσιτέλαιο. Οι στερεές ουσίες πρέπει να διαλύονται, αν είναι δυνατόν, δεδομένου ότι μεγάλες δόσεις στερεών ουσιών σε ζελατινούχες κάψουλες δεν απορροφώνται πάντα ικανοποιητικά. Όταν χρησιμοποιούνται μη υδατικοί φορείς, τα τοξικά χαρακτηριστικά τους πρέπει να είναι γνωστά, και, σε αντίθετη περίπτωση, να προσδιορίζονται πριν από τη δοκιμή.

1.5.2. **Συνθήκες δοκιμής**

1.5.2.1. *Πειραματόζωα*

Συνιστάται να χρησιμοποιούνται νεαρές ενήλικες κατοικίδιες ωοτόκες όρνιθες (Gallus gallus domesticus), ηλικίας 8 έως 12 μηνών, τυποποιημένου μεγέθους, ποικιλίας και φυλής. Οι όρνιθες πρέπει να έχουν εκτραφεί υπό συνθήκες που επιτρέπουν να κινούνται ελεύθερα.

1.5.2.2. *Αριθμός και φύλο*

Εκτός από την ομάδα αγωγής, πρέπει να χρησιμοποιηθεί μια ομάδα μάρτυρας στην οποία χορηγείται μόνο φορέας και μία ομάδα θετικού μάρτυρα. Η ομάδα μάρτυρας που λαμβάνει μόνο φορέα πρέπει να υποβάλλεται στην ίδια ακριβώς διαδικασία με την ομάδα αγωγής παραλείποντας όμως τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας. Ο αριθμός των ζώων που θα χρησιμοποιηθεί σε κάθε ομάδα πρέπει να επαρκεί ώστε να είναι δυνατή η θανάτωση έξι τουλάχιστον ζώων για τη βιοχημική εξέταση (τρία σε καθένα από τα δύο χρονικά σημεία) και η επιβίωση έξι ζώων κατά την περίοδο των 21 ημερών για την παρατήρηση παθολογικών καταστάσεων.

Η ομάδα θετικού μάρτυρα μπορεί να υποβληθεί στη διαδικασία παράλληλα με τις άλλες ομάδες ή να χρησιμοποιηθούν ιστορικά δεδομένα πρόσφατης δοκιμής. Πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον έξι όρνιθες στις οποίες χορηγείται γνωστή ουσία που προκαλεί εκ των υστέρων εμφάνιση νευροτοξικότητας, τρεις όρνιθες για βιοχημική εξέταση και τρεις όρνιθες για παθολογοανατομική εξέταση. Συνιστάται περιοδική ενημέρωση των δεδομένων του ιστορικού. Όταν το εργαστήριο που εκτελεί τη δοκιμή επιφέρει ουσιαστική αλλαγή στον τρόπο διεξαγωγής της (όσον αφορά επί παραδείγματι τη φυλή των ζώων, τη διατροφή τους, τις συνθήκες στέγασης) πρέπει να αναπαράγονται νέα δεδομένα για την ομάδα θετικού μάρτυρα.

▼B

1.5.2.3. *Επίπεδα δοκιμής*

Διεξάγεται προκαταρκτική μελέτη με κατάλληλο αριθμό ζώων και ομάδων επιπέδων δόσης προκειμένου να καθοριστεί το επίπεδο που θα χρησιμοποιηθεί στην κυρίως μελέτη. Στην προκαταρκτική αυτή μελέτη είναι επιδιωκόμενη μερική θνησιμότητα προκειμένου να προσδιοριστεί κατάλληλη δόση για την κυρίως μελέτη. Ωστόσο, για να αποφευχθούν θάνατοι οφειλόμενοι σε οξείες χολινεργικές επιδράσεις, μπορεί να χορηγηθεί ατροπίνη ή άλλος προστατευτικός παράγων γνωστός ότι δεν επηρεάζει την εκ των υστέρων εμφάνιση νευροτοξικών φαινομένων. Για τον υπολογισμό της μέγιστης μη θανατηφόρου δόσης των ελεγχόμενων ουσιών είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν διάφορες μέθοδοι (βλέπε μέθοδο Β.1α). Ιστορικά δεδομένα για τις όρνιθες ή άλλα τοξικολογικά στοιχεία μπορούν να είναι επίσης χρήσιμα για την επιλογή της κατάλληλης δόσης. Το επίπεδο δόσης της ελεγχόμενης ουσίας στην κυρίως μελέτη θα πρέπει να είναι το

υψηλότερο δυνατό λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής μελέτης για την επιλογή της δόσης καθώς και το ανώτερο όριο των 2 000 mg/kg βάρους σώματος. Το ποσοστό θνησιμότητας πρέπει να είναι τέτοιο ώστε να επιβιώσει επαρκής αριθμός ζώων για τη διεξαγωγή των βιοχημικών (έξι) και ιστολογικών (έξι) εξετάσεων την 21η ημέρα. Για την αποφυγή θανάτων οφειλομένων σε οξείες χολινεργικές επιδράσεις χορηγείται ατροπίνη ή άλλος προστατευτικός παράγων που δεν επηρεάζει τις εκ των υστέρων εμφανιζόμενες νευροτοξικές αντιδράσεις.

1.5.2.4. *Οριακή δοκιμή*

Εάν μια δοκιμή που έχει πραγματοποιηθεί σύμφωνα με τις περιγραφόμενες για την παρούσα μελέτη διαδικασίες, με επίπεδο δόσης τουλάχιστον 2 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα, δεν οδηγήσει στην παρατήρηση τοξικών εκδηλώσεων και εάν, βάσει των στοιχείων που διατίθενται για ουσίες ανάλογης δομής δεν αναμένεται εμφάνιση τοξικότητας, είναι δυνατόν να μην απαιτείται μελέτη με υψηλότερη δόση. Η οριακή δοκιμή εφαρμόζεται εφ' όσον από την έκθεση του ανθρώπου δεν προκύψει ανάγκη χρησιμοποίησης υψηλότερου επίπεδου δόσης.

1.5.2.5. *Περίοδος παρατήρησης*

Η περίοδος παρατήρησης διαρκεί 21 ημέρες.

1.5.3. **Διαδικασία**

Μετά τη χορήγηση προστατευτικού παράγοντα για την αποφυγή θανάτων οφειλομένων σε οξεία χολινεργική δράση, η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται σε μία εφ' άπαξ δόση.

1.5.3.1. Γενική παρατήρηση

Η παρατήρηση αρχίζει αμέσως μετά την έκθεση. Όλες οι όρνιθες παρατηρούνται προσεκτικά πολλές φορές ημερησίως τις 2 πρώτες ημέρες και, στη συνέχεια, τουλάχιστον μια φορά την ημέρα επί 21 ημέρες ή μέχρι την προγραμματισμένη θανάτωσή τους. Καταγράφονται όλες οι εκδηλώσεις τοξικότητας καθώς και ο χρόνος ενάρξεως, ο τύπος, η σοβαρότητα και η διάρκεια των παρατηρούμενων ανωμαλιών στη συμπεριφορά. Η αταξία μετράται βάσει τακτικής βαθμολογικής κλίμακας αποτελούμενης από τέσσερις τουλάχιστον διαβαθμίσεις. Σημειώνεται η εμφάνιση παράλυσης. Τουλάχιστον δύο φορές την εβδομάδα οι όρνιθες που έχουν επιλεγεί για την αναζήτηση παθολογικών καταστάσεων απομακρύνονται από τα κλουβιά τους και ακολουθεί περίοδος αναγκαστικής κινητικότητας, όπως το ανέβασμα σκάλας, με σκοπό τη διευκόλυνση της παρατήρησης ανεπαίσθητων τοξικών επιδράσεων. Τα ετοιμοθάνατα ζώα καθώς και εκείνα που παρουσιάζουν δυσφορία ή πόνο πρέπει να απομακρύνονται, μόλις αυτό γίνει αντιληπτό, να θανατώνονται με ανώδυνο τρόπο και να νεκροτομούνται.

▼B

1.5.3.2. Βάρος σώματος

Όλες οι όρνιθες πρέπει να ζυγίζονται αμέσως πριν από τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας και, στη συνέχεια, τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα,

1.5.3.3. Βιοχημικές εξετάσεις

Επιλέγονται τυχαία έξι όρνιθες από καθεμία από τις ομάδες αγωγής και μάρτυρα που λαμβάνει μόνο φορέα και τρεις όρνιθες από την ομάδα θετικού μάρτυρα, και θανατώνονται λίγες ημέρες μετά την έκθεσή τους. Ο εγκέφαλος και ο οσφυϊκός νωτιαίος μυελός προετοιμάζονται και εξετάζονται για την αναστολή της δράσης της εστεράσης του νευρικού ιστού που προσβάλλεται κατά τη νευροπάθεια. Η εξέταση της αναστολής της εστεράσης αυτής σε ισχιακό νευρικό ιστό μπορεί να είναι επίσης χρήσιμη. Κανονικά, τρία ζώα από την ομάδα μάρτυρα και από καθεμία από τις ομάδες αγωγής θανατώνονται μετά την πάροδο 24 ωρών και τρία ακόμη μετά την πάροδο 48 ωρών, ενώ οι τρεις όρνιθες από την ομάδα θετικού μάρτυρα θανατώνονται έπειτα από 24 ώρες. Εάν, από την παρατήρηση των κλινικών συμπτωμάτων δηλητηρίασης (συνήθως τη στιγμή της εμφάνισης των χολινεργικών δράσεων) προκύψει ότι η αποβολή του τοξικού παράγοντα είναι αργή, είναι προτιμότερο να ληφθούν δείγματα ιστών από τρία ζώα σε δύο χρονικές στιγμές μεταξύ 24 και 72 ωρών μετά τη χορήγηση.

Εάν θεωρείται σκόπιμο, στα δείγματα αυτά μπορεί να προσδιοριστεί και η ακετυλοχολινεστεράση (AChE). Ωστόσο, μπορεί να συμβεί αυτόματη επαναδραστηριοποίηση της AChE *in vivo*, και να οδηγήσει σε υποεκτίμηση της δυνατότητας της ουσίας να δρα ως αναστολέας της AChE.

1.5.3.4. Νεκροψία

Η γενική νεκροψία όλων των ζώων (προγραμματισμένη θανάτωση και θανάτωση ετοιμοθάνατων ζώων) πρέπει να περιλαμβάνει παρατήρηση της όψης του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού.

1.5.3.5. Ιστοπαθολογική εξέταση

Από τα ζώα που επέζησαν μετά την περίοδο παρατήρησης και δεν χρησιμοποιήθηκαν για βιοχημικές μελέτες λαμβάνονται νευρικοί ιστοί και υποβάλλονται σε μικροσκοπική εξέταση. Οι ιστοί στερεώνονται in situ με τεχνικές έγχυσης. Λαμβάνονται τομές από την παρεγκεφαλίδα (στο μέσο του διαμήκους άξονα) από τον προμήκη μυελό, τον νωτιαίο μυελό και τα περιφερικά νεύρα. Οι τομές νωτιαίου μυελού πρέπει να προέρχονται από την άνω αυχενική μοίρα, τη μεσοθωρακική και την οσφυοϊερή χώρα. Επίσης πρέπει να λαμβάνονται τομές από την περιφερική περιοχή του κνημιαίου νεύρου και των διακλαδώσεών του στο γαστροκνήμιο μυ καθώς και από το ισχιακό νεύρο. Οι τομές χρώννυνται με κατάλληλες ειδικές για τη μυελίνη και τους νευράξονες χρωστικές.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Κατά κανόνα, αν τα ληφθέντα αποτελέσματα στα τελικά σημεία ελέγχου που επελέγησαν για την παρούσα μέθοδο (βιομηχανικές εξετάσεις, ιστοπαθολογική εξέταση, παρατήρηση της συμπεριφοράς) είναι αρνητικά, δεν απαιτείται συνέχιση των δοκιμών για την εκ των υστέρων εμφάνιση νευροτοξικότητας. Σε περίπτωση όμως που τα αποτελέσματα είναι ασαφή ή αβέβαια μπορεί να απαιτηθεί περαιτέρω αξιολόγηση.

Πρέπει να παρέχονται δεδομένα για κάθε ζώο. Επιπλέον, όλα τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα ο οποίος περιλαμβάνει, για κάθε ομάδα δοκιμής, τον αριθμό των ζώων κατά την έναρξη της δοκιμής, τον αριθμό των ζώων που εμφάνισαν αλλοιώσεις, αλλαγές στη συμπεριφορά ή βιοχημικές μεταβολές, τον τύπο και τη σοβαρότητα των αλλοιώσεων ή μεταβολών, το ποσοστό των ζώων που εμφάνισαν τις κάθε τύπου και σοβαρότητας αλλοιώσεις ή μεταβολές.

▼B

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης πρέπει να αξιολογούνται βάσει της συχνότητας εμφανίσεώς τους, της σοβαρότητας, και της συσχέτισης των επιδράσεων στη συμπεριφορά, των βιοχημικών και ιστοπαθολογικών επιδράσεων καθώς και όλων των άλλων επιδράσεων που παρατηρήθηκαν στις ομάδες αγωγής και τις ομάδες μάρτυρες.

Τα αριθμητικά αποτελέσματα αξιολογούνται με κατάλληλες στατιστικές μεθόδους γενικής αποδοχής οι οποίες επιλέγονται κατά το σχεδιασμό της μελέτης.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει, εάν είναι δυνατόν, τις ακόλουθες πληροφορίες:

Για τα πειραματόζωα:

— φυλή,

— αριθμός και ηλικία,

— προέλευση, συνθήκες στέγασης, κ.λπ.,

— βάρος κάθε ζώου κατά την έναρξη της δοκιμής.

Για τις συνθήκες δοκιμής:

— λεπτομέρειες σχετικά με το παρασκεύασμα, τη σταθερότητα και την ομοιογένεια της ελεγχόμενης ουσίας, κατά περίπτωση,

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα,

— λεπτομέρειες σχετικά με τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας,

— λεπτομέρειες σχετικά με την ποιότητα της τροφής και του νερού,

— αιτιολόγηση της επιλογής της δόσης,

— λεπτομερής περιγραφή των δόσεων που χορηγήθηκαν, με στοιχεία για το φορέα, τον όγκο και τη φυσική κατάσταση του χορηγηθέντος προϊόντος,

— ταυτότητα του προστατευτικού παράγοντα που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκε και λεπτομέρειες για τον τρόπο χορήγησής του.

Για τα αποτελέσματα:

— δεδομένα για το βάρος του σώματος,

— δεδομένα για την τοξική αντίδραση ανά ομάδα, συμπεριλαμβανομένης της θνησιμότητας,

— φύση, σοβαρότητα και διάρκεια των κλινικών παρατηρήσεων (αναστρέψιμων ή μη),

— αναλυτική περιγραφή των βιοχημικών μεθόδων και των ευρημάτων,

— ευρήματα νεκροψίας,

— αναλυτική περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών ευρημάτων,

— στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, όπου απαιτείται.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Η παρούσα μέθοδος είναι παραπλήσια της TG 418 του ΟΟΣΑ.

▼B

B.38 **ΕΚ ΤΩΝ ΥΣΤΕΡΩΝ ΕΜΦΑΝΙΖΟΜΕΝΗ ΝΕΥΡΟΤΟΞΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗΣ ΔΟΣΗΣ 28 ΗΜΕΡΩΝ**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κατά την εκτίμηση και αξιολόγηση των τοξικών επιδράσεων των ουσιών, είναι σκόπιμο να εξεταστεί η πιθανότητα ορισμένων κατηγοριών ουσιών να προκαλούν ειδικές μορφές νευροτοξικότητας μη δυνάμενες να ανιχνευθούν με άλλες τοξικολογικές μελέτες. Ορισμένες οργανοφωσφορικές ουσίες οι οποίες έχει παρατηρηθεί ότι προκαλούν εκ των υστέρων εμφάνιση νευροτοξικότητας πρέπει να θεωρηθούν υποψήφιες για μια τέτοια αξιολόγηση.

Για τον εντοπισμό των ουσιών που δύνανται να προκαλέσουν εκ των υστέρων εμφάνιση πολυνευροπάθειας μπορούν να χρησιμοποιηθούν διερευνητικές δοκιμές *in vitro*. Ωστόσο, αρνητικά αποτελέσματα από τις μελέτες αυτές δεν αποδεικνύουν ότι η ελεγχόμενη ουσία στερείται νευροτοξικής δράσης.

Η δοκιμή εκ των υστέρων εμφανιζόμενης νευροτοξικής επίδρασης 28 ημερών παρέχει πληροφορίες για τους κινδύνους που είναι δυνατόν να προκύψουν για την υγεία μετά από επανειλημμένη έκθεση για ένα περιορισμένο χρονικό διάστημα. Παρέχει πληροφορίες για τη σχέση δόσης-απόκρισης και εκτίμηση για το επίπεδο στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις, δυνάμενες να χρησιμοποιηθούν στον καθορισμό κριτηρίων ασφαλείας για την έκθεση.

Βλέπε επίσης γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Ως οργανοφωσφορικές ουσίες νοούνται οι χωρίς φορτίο οργανοφωσφορικοί εστέρες, θειοεστέρες ή ανυδρίτες οργανοφωσφορικών οργανοφωσφονικών ή οργανοφωσφοραμιδικών οξέων ή ανάλογων φωσφοροθειϊκών, φωσφονοθειϊκών ή φωσφοροθειοαμιδικών οξέων ή άλλες ουσίες δυνάμενες να προκαλέσουν την εκ υστέρων νευροτοξική επίδραση που παρατηρείται ορισμένες φορές με αυτή την κατηγορία ουσιών.

Ως εκ των υστέρων εμφανιζόμενη νευροτοξικότητα νοείται σύνδρομο το οποίο εκδηλώνεται με παρατεταμένη εκ των υστέρων εμφάνιση αταξίας, περιφερικών αξονοπαθειών του νωτιαίου μυελού και των περιφερικών νεύρων και με αναστολή και γήρανση της εστεράσης του νευρικού ιστού που προσβάλλεται κατά τη νευροπάθεια (neuropathy target esterase-NTE).

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ημερήσιες δόσης της ελεγχόμενης ουσίας χορηγούνται από το στόμα σε κατοικίδιες όρνιθες επί 28 ημέρες. Τα ζώα παρατηρούνται μια φορά την ημέρα τουλάχιστον, μέχρι την 14η ημέρα μετά τη χορήγηση της τελευταίας δόσης, για ανωμαλίες στη συμπεριφορά, αταξία και παράλυση. 24 και 48 ώρες μετά τη χορήγηση της τελευταίας δόσης, λαμβάνονται τυχαία ορισμένες όρνιθες από κάθε ομάδα και διενεργούνται βιοχημικές μετρήσεις, ιδίως για τον προσδιορισμό της αναστολής της δράσης της εστεράσης του νευρικού ιστού που προσβάλλεται κατά τη νευροπάθεια (NTE). Δύο εβδομάδες μετά τη χορήγηση της τελευταίας δόσης, οι υπόλοιπες όρνιθες θανατώνονται και διενεργείται ιστοπαθολογική εξέταση επιλεγμένων νευρικών ιστών.

▼B

1.4. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.4.1. **Προετοιμασίες**

Λαμβάνονται τυχαία υγιείς νεαρές ενήλικες όρνιθες οι οποίες δεν πάσχουν από ιογενείς νόσους, δεν βρίσκονται υπό φαρμακευτική αγωγή και δεν παρουσιάζουν ανωμαλίες στο βάδισμα και χωρίζονται σε ομάδες αγωγής και ομάδες μάρτυρες. Εγκλιματίζονται στις συνθήκες του εργαστηρίου επί 5 τουλάχιστον ημέρες πριν από την έναρξη της μελέτης.

Χρησιμοποιούνται ευρύχωρα κλουβιά, ή περιφράγματα ώστε οι όρνιθες να μπορούν να κινούνται ελεύθερα και να είναι εύκολη η παρατήρηση του βηματισμού.

Η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται από το στόμα σε ημερήσιες δόσεις, 7 ημέρες την εβδομάδα, κατά προτίμηση με αναγκαστική θρέψη ή με ζελατινούχες κάψουλες. Οι υγρές ουσίες μπορούν να χορηγούνταν χωρίς προηγούμενη αραίωση ή διαλελυμένες σε κατάλληλο φορέα όπως το αραβοσιτέλαιο. Οι στερεές ουσίες πρέπει να διαλύονται, αν είναι δυνατόν, δεδομένου ότι μεγάλες δόσεις στερεών ουσιών σε ζελατινούχες κάψουλες δεν απορροφώνται πάντα ικανοποιητικά. Όταν χρησιμοποιούνται μη υδατικοί φορείς, τα τοξικά χαρακτηριστικά τους πρέπει να είναι γνωστά, και, σε αντίθετη περίπτωση, να προσδιορίζονται πριν από τη δοκιμή.

1.4.2. **Συνθήκες δοκιμής**

1.4.2.1. *Πειραματόζωα*

Συνιστάται να χρησιμοποιούνται νεαρές ενήλικες κατοικίδιες ωοτόκες όρνιθες (Gallus gallus domesticus), 8 έως 12 μηνών, τυποποιημένου μεγέθους, ποικιλίας και φυλής. Οι όρνιθες πρέπει να έχουν εκτραφεί υπό συνθήκες που τις επιτρέπουν να κινούνται ελεύθερα.

1.4.2.2. *Αριθμός και φύλο*

Γενικά πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τρεις ομάδες αγωγής και μια ομάδα μάρτυρας στην οποία χορηγείται μόνο φορέας. Η ομάδα μάρτυρας που λαμβάνει μόνο φορέα πρέπει να υποβάλλεται στην ίδια ακριβώς διαδικασία με την ομάδα αγωγής παραλείποντας όμως τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας.

Ο αριθμός των ζώων που θα χρησιμοποιηθεί σε κάθε ομάδα πρέπει να επαρκεί ώστε να είναι δυνατή η θανάτωση έξι τουλάχιστον ζώων για τη βιοχημική εξέταση (τρία σε καθένα από τα δύο χρονικά σημεία) και η επιβίωση έξι ζώων κατά την περίοδο των 14 ημερών για την παρατήρηση παθολογικών καταστάσεων.

1.4.2.3. *Επίπεδα δόσεων*

Τα επίπεδα δόσεων πρέπει να επιλέγονται λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα δοκιμής για εκ των υστέρων εμφάνιση νευροτοξικής επίδρασης μετά από οξεία έκθεση καθώς και τυχόν άλλα διαθέσιμα δεδομένα για την τοξικότητα και την κινητική της ελεγχόμενης ένωσης. Το υψηλότερο επίπεδο δόσης πρέπει να επιλέγεται με στόχο την πρόκληση τοξικών επιδράσεων και κατά προτίμηση εκ των υστέρων εμφανιζόμενων νευροτοξικών επιδράσεων αλλά όχι θανάτου ή έκδηλης δυσφορίας. Στην συνέχεια, επιλέγεται φθίνουσα σειρά επιπέδων δόσεων με σκοπό να καταδειχθεί τυχόν συνδεόμενη με τη δόση απόκριση και το χαμηλότερο επίπεδο δόσης για το οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιπτώσεις.

▼B

1.4.2.4. *Οριακή δοκιμή*

Εάν μια δοκιμή που έχει πραγματοποιηθεί σύμφωνα με τις περιγραφόμενες για την παρούσα μελέτη διαδικασίες, με επίπεδο δόσης τουλάχιστον 1 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα, δεν οδηγήσει στην παρατήρηση τοξικών εκδηλώσεων και εάν, βάσει των στοιχείων που διατίθενται για ουσίες ανάλογης δομής, δεν αναμένεται εμφάνιση τοξικότητας, είναι δυνατόν να μην απαιτείται μελέτη με υψηλότερη δόση. Η οριακή δοκιμή εφαρμόζεται εφόσον από την έκθεση του ανθρώπου δεν προκύψει ανάγκη χρησιμοποίησης υψηλότερου επιπέδου δόσης.

1.4.2.5. *Περίοδος παρατήρησης*

Όλα τα ζώα υποβάλλονται σε καθημερινή τουλάχιστον παρατήρηση κατά την περίοδο της έκθεσής τους και στη συνέχεια, 14 ημέρες ακόμη, εκτός εάν έχει προγραμματιστεί νεκροψία.

1.4.3. **Διαδικασία**

Η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται σε ημερήσιες δόσεις, επτά ημέρες την εβδομάδα επί 28 ημέρες.

1.4.3.1. *Γενική παρατήρηση*

Η παρατήρηση αρχίζει αμέσως μετά την έναρξη της αγωγής. Όλες οι όρνιθες παρατηρούνται προσεκτικά τουλάχιστον μια φορά την ημέρα κατά τη διάρκεια των 28 ημερών της αγωγής και επί 14 ημέρες στη συνέχεια ή μέχρι την προγραμματισμένη θανάτωσή τους. Καταγράφονται όλες οι εκδηλώσεις τοξικότητας καθώς και ο χρόνος έναρξης, ο τύπος, η σοβαρότητα και η διάρκειά τους. Οι παρατηρήσεις περιλαμβάνουν τις ανωμαλίες στη συμπεριφορά αλλά δεν περιορίζονται σ' αυτές. Η αταξία μετράται βάσει τακτικής βαθμολογικής κλίμακας αποτελούμενης από τέσσερις τουλάχιστον διαβαθμίσεις. Σημειώνεται η εμφάνιση παράλυσης. Τουλάχιστον δύο φορές την εβδομάδα οι όρνιθες απομακρύνονται από τα κλουβιά τους και ακολουθεί περίοδος αναγκαστικής κινητικότητας, όπως το ανέβασμα σκάλας, με σκοπό τη διευκόλυνση της παρατήρησης ανεπαίσθητων τοξικών επιδράσεων. Τα ετοιμοθάνατα ζώα καθώς και εκείνα που παρουσιάζουν έντονη δυσφορία ή πόνο πρέπει να απομακρύνονται, μόλις αυτό γίνει αντιληπτό, να θανατώνονται με ανώδυνο τρόπο και να νεκροτομούνται.

1.4.3.2. *Βάρος σώματος*

Όλες οι όρνιθες πρέπει να ζυγίζονται αμέσως πριν από τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας και, στη συνέχεια, τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα.

1.4.3.3. *Βιοχημικές εξετάσεις*

Επιλέγονται τυχαία έξι όρνιθες από καθεμία από τις ομάδες αγωγής και μάρτυρα που λαμβάνει μόνο φορέα και θανατώνονται λίγες μέρες μετά τη χορήγηση της τελευταίας δόσης, Ο εγκέφαλος και ο οσφυϊκός νωτιαίος μυελός προετοιμάζονται και εξετάζονται για την αναστολή της δράσης της εστεράσης του νευρικού ιστού που προσβάλλεται κατά τη νευροπάθεια. Η εξέταση της αναστολής της εστεράσης αυτής σε ισχιακό νευρικό ιστό μπορεί να είναι επίσης χρήσιμη. Κανονικά, τρία ζώα από την ομάδα μάρτυρα και από καθεμία από τις ομάδες αγωγής θανατώνονται μετά την πάροδο 24 ωρών και τρία ακόμη μετά την πάροδο 48 ωρών από τη χορήγηση της τελευταίας δόσης. Εάν από μελέτες οξείας έκθεσης ή από άλλες μελέτες (τοξικοκινητικής, επί παραδείγματι) προκύπτει ότι είναι προτιμότερο η θανάτωση να πραγματοποιηθεί σε άλλη χρονική στιγμή μετά τη χορήγηση της τελευταίας δόσης, τότε οι προαναφερόμενοι χρόνοι μεταβάλλονται ανάλογα και η νέα επιλογή αιτιολογείται. Εάν θεωρείται σκόπιμο, στα δείγματα αυτά μπορεί να προσδιοριστεί και η ακετυλοχολινεστεράση (AChE). Ωστόσο, μπορεί να συμβεί αυτόματη επαναδραστηριοποίηση της AChE *in vivo*, και να οδηγήσει σε υποεκτίμηση της δυνατότητας της ουσίας να δρα ως αναστολέας της AChE.

▼B

1.4.3.4. *Νεκροψία*

Η γενική νεκροψία όλων των ζώων (προγραμματισμένη θανάτωση και θανάτωση ετοιμοθανάτων ζώων) πρέπει να περιλαμβάνει παρατήρηση της όψης του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού.

1.4.3.5. *Ιστοπαθολογική εξέταση*

Από τα ζώα που επέζησαν μετά την περίοδο παρατήρησης και δεν χρησιμοποιήθηκαν για βιοχημικές μελέτες λαμβάνονται νευρικοί ιστοί και υποβάλλονται σε μικροσκοπική εξέταση. Οι ιστοί στερεώνονται in situ με τεχνικές έγχυσης. Λαμβάνονται τομές από την παρεγκεφαλίδα (στο μέσο του διαμήκους άξονα) από τον προμήκη μυελό, τον νωτιαίο μυελό και τα περιφερικά νεύρα. Οι τομές νωτιαίου μυελού πρέπει να προέρχονται από την άνω αυχενική μοίρα, τη μεσοθωρακική και την οσφυοϊερή χώρα. Επίσης πρέπει να λαμβάνονται τομές από την περιφερική περιοχή του κνημιαίου νεύρου και των διακλαδώσεών του στο γαστροκνήμιο μυ καθώς και από το ισχιακό νεύρο. Οι τομές χρώννυνται με κατάλληλες ειδικές για τη μυελίνη και τους νευράξονες χρωστικές. Αρχικά υποβάλλονται σε μικροσκοπική εξέταση οι διατηρημένοι ιστοί όλων των ζώων της ομάδας μάρτυρα και της ομάδας που έχει λάβει την υψηλότερη δόση. Εφόσον προκύψουν ενδείξεις νευροτοξικότητας στην ομάδα της υψηλότερης δόσης, υποβάλλονται σε μικροσκοπική εξέταση και οι όρνιθες των ομάδων στις οποίες χορηγήθηκε ενδιάμεση και χαμηλή δόση.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Κατά κανόνα, αν τα ληφθέντα αποτελέσματα στα τελικά σημεία ελέγχου που επελέγησαν για την παρούσα μέθοδο (βιοχημικές εξετάσεις, ιστοπαθολογική εξέταση, παρατήρηση της συμπεριφοράς) είναι αρνητικά, δεν απαιτείται συνέχιση των δοκιμών για την εκ των υστέρων εμφάνιση νευροτοξικότητας. Σε περίπτωση όμως που τα αποτελέσματα είναι ασαφή ή αβέβαια μπορεί να απαιτηθεί περαιτέρω αξιολόγηση.

Πρέπει να παρέχονται δεδομένα για κάθε ζώο. Επιπλέον, όλα τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα ο οποίος περιλαμβάνει, για κάθε ομάδα δοκιμής, τον αριθμό των ζώων κατά την έναρξη της δοκιμής, τον αριθμό των ζώων που εμφάνισαν αλλοιώσεις, αλλαγές στη συμπεριφορά ή βιοχημικές μεταβολές, τον τύπο και τη σοβαρότητα των αλλοιώσεων ή μεταβολών, το ποσοστό των ζώων που εμφάνισαν τις κάθε τύπου και σοβαρότητας αλλοιώσεις ή μεταβολές.

3. **REPORTING**

TEST REPORT

The test report shall, if possible, include the following information:

3.1. Test animals:

— strain used,

— number and age of animals,

— source, housing conditions, etc.,

— individual weights of animals at the start of the test.

▼B

3.2. Test conditions:

— details of test substance preparation, stability and homogeneity, where appropriate,

— justification for choice of vehicle,

— details of the administration of the test substance,

— details of food and water quality,

— rationale for dose selection,

— specification of doses administered, including details of the vehicle, volume and physical form of the material administered,

— rationale for choosing other times for biochemical determination, if other than 24 and 48 h.

3.3. Results:

— body weight data,

— toxic response data by dose level, including mortality,

— no-observed adverse effect level,

— nature, severity and duration of clinic observations (whether reversible or not),

— a detailed description of biochemical methods and findings,

— necropsy findings,

— a detailed description of all histopathological findings,

— statistical treatment of results, where appropriate.

Discussion of results.

Conclusions.

4. **REFERENCES**

This method is analogous to OECD TG 419.

▼B

B.39. **ΔΟΚΙΜΗ ΜΗ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΕΝΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ DNA (UDS) ΜΕ ΗΠΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ IN VIVO**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

Η παρούσα μέθοδος αποτελεί αντίγραφο της OECD TG 486, Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells In Vivo (1997).

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σκοπός της δοκιμής μη προγραμματισμένης σύνθεσης DNA (UDS) με ηπατικά κύτταρα θηλαστικών *in vivo* είναι η αναγνώριση ουσιών που επάγουν επιδιόρθωση του DNA στα ηπατικά κύτταρα υποβληθέντων σε αγωγή ζώων (1) (2) (3) (4).

Αυτή η *in vivo* δοκιμή παρέχει μέθοδο για τη διερεύνηση των γονοτοξικών επιδράσεων χημικών ουσιών στο ήπαρ. Το μετρούμενο τελικό σημείο είναι ενδεικτικό της βλάβης του DNA και της επακόλουθης επιδιόρθωσης στα ηπατικά κύτταρα. Το ήπαρ είναι συνήθως ο κυριότερος τόπος μεταβολισμού των απορροφουμένων ενώσεων. Αποτελεί συνεπώς πρόσφορο τόπο για τη μέτρηση της βλάβης του DNA *in vivo*.

Εφόσον υπάρχουν ενδείξεις ότι η υπό δοκιμή ουσία δεν θα φθάσει στον ιστό στόχο, δεν ενδείκνυται να χρησιμοποιείται η δοκιμή αυτή.

Το τελικό σημείο της μη προγραμματισμένης σύνθεσης DNA (UDS) μετριέται προσδιορίζοντας την πρόσληψη επισημασμένων νουκλεοτιδίων σε κύτταρα που δεν υπόκεινται σε προγραμματισμένη (S-φάση) σύνθεση DNA. Η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη τεχνική είναι ο προσδιορισμός της πρόσληψης επισημασμένης με τρίτιο θυμιδίνης (^{3}H-TdR) με αυτοακτινογράφηση. Για τις *in vivo* δοκιμές UDS χρησιμοποιείται κατά προτίμηση ήπαρ από επίμυες. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι ιστοί αντί για ήπαρ, αυτό όμως δεν αποτελεί αντικείμενο της παρούσας μεθόδου.

Η ανίχνευση αποκρίσεως UDS εξαρτάται από τον αριθμό των βάσεων DNA που αποκόπηκαν και αντικαταστάθηκαν στο σημείο της βλάβης. Συνεπώς, η δοκιμή UDS έχει ιδιαίτερη αξία για την ανίχνευση εκτεταμένων επιδιορθώσεων (20-30 βάσεις) που προκαλούνται από ουσίες. Αντιθέτως, οι περιορισμένες επιδιορθώσεις (1-3 βάσεις) ανιχνεύονται με πολύ μικρότερη ευαισθησία. Περαιτέρω, μεταλλαξιγόνα συμβάντα μπορεί να προκύψουν λόγω μη επιδιόρθωσης, κακής επιδιόρθωσης ή κακής αντιγραφής αλλοιώσεων DNA. Η έκταση της απόκρισης UDS δεν αποτελεί ένδειξη για την πιστότητα της διεργασίας επιδιόρθωσης. Επιπλέον, μπορεί ένα μεταλλαξογόνο να αντιδρά με το DNA αλλά η βλάβη του DNA να μην επιδιορθώνεται με τη διεργασία της επιδιόρθωσης αποκοπής. Η έλλειψη εξειδικευμένων πληροφοριών για τη μεταλλαξιγόνο δραστικότητα από τη δοκιμή UDS αντισταθμίζεται από την εν δυνάμει ευαισθησία αυτού του τελικού σημείου επειδή μετριέται σε ολόκληρο το γονιδίωμα.

Βλέπε επίσης γενική εισαγωγή μέρος Β.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Κύτταρα σε επιδιόρθωση: καθαρός πυρηνικός κόκκος (NNG) μεγαλύτερος από μία προκαθορισμένη τιμή που πρέπει να αιτιολογείται από το εργαστήριο που διεξάγει τη δοκιμή.

Καθαροί πυρηνικοί κόκκοι (NNG): ποσοτικό μέτρο της UDS δραστικότητας κυττάρων σε αυτοακτινογραφικές δοκιμές UDS που υπολογίζεται αφαιρώντας το μέσο αριθμό κυτταροπλασματικών κόκκων σε πυρηνοϊσοδύναμες κυτταροπλασματικές περιοχές (CG) από τον αριθμό των πυρηνικών κόκκων (NG): NNG=NG-CG. Ο αριθμός των NNG υπολογίζεται για τα μεμονωμένα κύτταρα και κατόπιν αθροίζονται για τα κύτταρα μιας καλλιέργειας, παράλληλων καλλιεργειών, κ.λπ.

▼B

Μη προγραμματισμένη σύνθεση DNA (UDS): Επιδιορθωτική σύνθεση DNA μετά την αποκοπή και απομάκρυνση τμήματος DNA που περιλαμβάνει περιοχή που έχει υποστεί βλάβη προκληθείσα από χημικές ουσίες ή φυσικούς παράγοντες.

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η δοκιμή UDS με ηπατικά κύτταρα θηλαστικών *in vivo* δείχνει επιδιορθωτική σύνθεση DNA μετά την αποκοπή και απομάκρυνση τμήματος DNA που περιλαμβάνει περιοχή που έχει υποστεί βλάβη από χημικές ουσίες ή φυσικούς παράγοντες. Η δοκιμή στηρίζεται συνήθως στην προσθήκη ^{3}H-TdrR στο DNA ηπατικών κυττάρων που εμφανίζουν χαμηλή συχνότητα κυττάρων στην S -φάση του κυτταρικού κύκλου. Η πρόσληψη ^{3}H-TdR προσδιορίζεται συνήθως με αυτοακτινογράφηση επειδή η τεχνική αυτή δεν είναι τόσο επιδεκτική σε παρεμβολές από κύτταρα S-φάσης όπως. π.χ., η υγρή σπινθηρογραφία.

1.4. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.4.1. **Προετοιμασίες**

1.4.1.1. *Επιλογή ζωικών ειδών*

Συνήθως χρησιμοποιούνται επίμυες, αν και μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα κατάλληλα είδη θηλαστικών. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται συνήθως χρησιμοποιούμενες εργαστηριακές φυλές νεαρών υγιών ενήλικων ζώων. Στην αρχή της δοκιμής, οι διαφορές στα βάρη των ζώων θα πρέπει να είναι ελάχιστες και να μην υπερβαίνουν το ± 20 % του μέσου βάρους για κάθε φύλο.

1.4.1.2. *Συνθήκες στέγασης και διατροφής*

Εφαρμόζονται οι γενικές συνθήκες που αναφέρονται στη γενική εισαγωγή του μέρους B, αν και ο στόχος για την υγρασία θα πρέπει να είναι 50-60 %.

1.4.1.3. *Προετοιμασία των ζώων*

Υγιή νεαρά ενήλικα ζώα χωρίζονται τυχαία σε ομάδες μαρτυρίας και αγωγής. Τα κλουβιά θα πρέπει να διατάσσονται με τέτοιο τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται τυχόν επιδράσεις από τη θέση των κλουβιών. Τα ζώα λαμβάνουν μία και μοναδική ταυτότητα και παραμένουν στα κλουβιά τους τουλάχιστον πέντε ημέρες πριν από την έναρξη της δοκιμής για να μπορέσουν να εγκλιματιστούν στις εργαστηριακές συνθήκες.

1.4.1.4. *Υπό δοκιμή ουσία/προετοιμασία*

Στερεές υπό δοκιμή ουσίες θα πρέπει να διαλύονται ή να τίθενται υπό μορφή εναιωρήματος σε κατάλληλους διαλύτες ή φορείς και να αραιώνονται, εφόσον χρειάζεται, πριν να χορηγηθούν στα ζώα. Οι υγρές υπό δοκιμή ουσίες μπορούν να χορηγούνται απευθείας ως έχουν ή να αραιώνονται πριν από τη χορήγηση. Θα πρέπει νυ χρησιμοποιούνται πρόσφατα παρασκευάσματα της υπό δοκιμή ουσίας εκτός κι αν τα στοιχεία σχετικά με τη σταθερότητα της ουσίας επιτρέπουν τη χρήση έτοιμων παρασκευασμάτων.

1.4.2. **Συνθήκες δοκιμής**

1.4.2.1. *Διαλύτης/φορέας*

Ο διαλύτης/φορέας δεν θα πρέπει να εμφανίζει τοξική δράση στα χρησιμοποιούμενα επίπεδα δόσεως αλλά ούτε και να υπάρχουν υπόνοιες για πιθανή χημική αντίδρασή του με την υπό δοκιμή ουσία. Εφόσον ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης/φορέας δεν ανήκει στους γνωστούς, η χρήση του θα πρέπει να στηρίζεται στην ύπαρξη στοιχείων που αποδεικνύουν τη συμβατότητά του. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατό, να εξετάζεται πρώτα η χρήση ενός υδατικού διαλύτη/φορέα.

▼B

1.4.2.2. *Μάρτυρες*

Σε κάθε ανεξαρτήτως εκτελούμενο μέρος της δοκιμής, θα πρέπει να περιλαμβάνονται ταυτόχρονα θετικοί και αρνητικοί (διαλύτης ή φορέας) μάρτυρες. Με εξαίρεση την αγωγή με την υπό δοκιμή ουσία, τα ζώα στις ομάδες μαρτυρίας θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο με εκείνο των ζώων στις υποβαλλόμενες σε αγωγή ομάδες.

Οι θετικοί μάρτυρες θα πρέπει να είναι ουσίες που είναι γνωστό ότι εμφανίζουν το φαινόμενο της UDS όταν χορηγούνται σε δόσεις εκθέσεως που αναμένεται να δώσουν ανιχνεύσιμη αύξηση πάνω από το βασικό όριο. Θετικοί μάρτυρες που χρειάζονται μεταβολική ενεργοποίηση θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε δόσεις που παρέχουν μέτρια απόκριση (4). Οι δόσεις μπορούν να επιλέγονται έτσι ώστε τα αποτελέσματα να είναι σαφή αλλά να μην αποκαλύπτουν αμέσως την ταυτότητα των κωδικοποιημένων αντικειμενοφόρων στον παρατηρητή. Παραδείγματα ουσιών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θετικοί μάρτυρες είναι:

Χρόνος δειγματοληψίας	Ουσία	Αριθ. CAS	Αριθ. EINECS
Πρώτες δειγματοληψίες (2-4 ώρες)	N-νιτροζωδιμεθυλαμίνη	62-75-9	200-249-8
Δεύτερες δειγματοληψίες (12-16 ώρες)	N-2-φλθορενυλοακεταμίδιο (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Ως θετικοί μάρτυρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλες κατάλληλες ουσίες. Επίσης, οι θετικοί μάρτυρες μπορούν να χορηγούνται και από οδό διαφορετική από εκείνη της υπό δοκιμή ουσίας.

1.5. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.5.1. **Αριθμός και φύλο των ζώων**

Θα πρέπει να χρησιμοποιείται κατάλληλος αριθμός ζώων ώστε να λαμβάνεται υπόψη η φυσική βιολογική ποικιλία στην απόκριση. Κάθε ομάδα θα πρέπει να αποτελείται από τρία τουλάχιστον ζώα για εξέταση. Εφόσον υπάρχουν σημαντικά πρότερα στοιχεία, για τις ομάδες μάρτυρες, θετικούς και αρνητικούς, απαιτούνται μόνον ένα ή δύο ζώα.

Εάν κατά το χρόνο της έρευνας υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία από μελέτες στο ίδιο είδος και με την ίδια οδό έκθεσης που αποδεικνύουν ότι δεν υπάρχουν ουσιαστικές διαφορές στην τοξικότητα μεταξύ των φύλων, τότε αρκεί η δοκιμή να γίνει σε ζώα ενός φύλου, κατά προτίμηση αρσενικά. Εφόσον η έκθεση σε μια χημική ουσία αφορά μόνο το ένα φύλο, όπως π.χ. στην περίπτωση φαρμακευτικών ουσιών, η δοκιμή θα πρέπει να πραγματοποιείται με ζώα του αντίστοιχου φύλου.

1.5.2. **Χρονοδιάγραμμα αγωγής**

Οι εξεταζόμενες ουσίες χορηγούνται εν γένει με μία μόνη αγωγή.

1.5.3. **Επίπεδα δόσεων**

Κανονικά, χρησιμοποιούνται τουλάχιστον δύο επίπεδα δόσεων. Η μέγιστη δόση ορίζεται ως η δόση που παρέχει σημάδια τοξικότητας τέτοια ώστε τυχόν υψηλότερα επίπεδα δόσης, με βάση το ίδιο δοσολογικό καθεστώς, να αναμένεται φυσιολογικά να οδηγήσουν σε φαινόμενα θνησιμότητας. Γενικά, η χαμηλότερη δόση αντιστοιχεί στο 50 % έως 25 % της υψηλής δόσης.

▼B

Ουσίες με ειδικές βιολογικές δράσεις σε χαμηλές μη τοξικές δόσεις (όπως ορμόνες και μιτωγόνα) μπορεί να αποτελούν εξαιρέσεις στα κριτήρια ρύθμισης των δόσεων και θα πρέπει vu αξιολογούνται κατά περίπτωση. Εάν πραγματοποιηθεί μελέτη διαπίστωσης του εύρους επειδή δεν υπάρχουν κατάλληλα διαθέσιμα δεδομένα, η μελέτη αυτή θα πρέπει να πραγματοποιείται στο ίδιο εργαστήριο, με το ίδιο είδος, φυλή, φύλο και αγωγή που χρησιμοποιούνται και στην κύρια μελέτη.

Η μέγιστη δόση μπορεί επίσης να οριστεί και ως η δόση που παρέχει ενδείξεις τοξικότητας στο ήπαρ (π.χ. πυκνωτικούς πυρήνες).

1.5.4. **Δοκιμή οριακής δόσης**

Εάν μία δοκιμή με ένα επίπεδο δόσης τουλάχιστον 2 000 mg/kg βάρους σώματος στην οποία χρησιμοποιείται μία μόνη αγωγή, ή δύο αγωγές την ιδια μέρα, δεν δώσει ορατά τοξικά αποτελέσματα, και εφόσον δεν αναμένεται η εμφάνιση γονοτοξικότητας με βάση στοιχεία από ουσίες σχετικής δομής, τότε μπορεί να μην είναι αναγκαία η πραγματοποίηση πλήρους μελέτης. Η αναμενόμενη ανθρώπινη έκθεση μπορεί να δώσει μία ένδειξη για το αν χρειάζεται να χρησιμοποιηθεί υψηλότερο επίπεδο δόσης στη δοκιμή οριακής δόσης.

1.5.5. **Χορήγηση δόσεων**

Η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται συνήθως με διασωλήνωση χρησιμοποιώντας στομαχικό σωλήνα ή κατάλληλο σωλήνα διασωλήνωσης. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες οδοί έκθεσης εφόσον μπορούν να αιτιολογηθούν. Δεν συνιστάται πάντως η ενδοπεριτοναϊκή οδός επειδή με τον τρόπο αυτό το ήπαρ μπορεί να εκτεθεί απευθείας στην υπό δοκιμή) ουσία αντί μέσω του κυκλοφοριακού συστήματος. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί με διασωλήνωση ή έγχυση εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Ο όγκος δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 2 ml/100 g βάρους σώματος. Αν χρησιμοποιηθούν μεγαλύτεροι όγκοι, αυτό πρέπει να αιτιολογείται. Με εξαίρεση τις ερεθιστικές ή διαβρωτικές ουσίες οι οποίες κανονικά εμφανίζουν εντονότερα αποτελέσματα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, οι διαφοροποιήσεις στον όγκο θα πρέπει να ελαχιστοποιούνται προσαρμόζοντας τη συγκέντρωση ώστε να διασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλα τα επίπεδα δόσης.

1.5.6. **Προετοιμασία των ηπατικών κυττάρων**

Τα ηπατικά κύτταρα λαμβάνονται από υποβληθέντα σε αγωγή ζώα κανονικά 12-16 ώρες μετά τη χορήγηση. Χρειάζεται εν γένει μία πρόσθετη πρώιμη δειγματοληψία (κανονικά 2-4 ώρες μετά την αγωγή) εκτός κι αν υπάρχει σαφής θετική απόκριση στις 12-16 ώρες. Εντούτοις, μπορούν να γίνουν δειγματοληψίες σε εναλλακτικά χρονικά διαστήματα εφόσον τούτο αιτιολογείται με βάση τοξικοκινητικά δεδομένα.

Βραχυπρόθεσμες καλλιέργειες ηπατικών κυττάρων θηλαστικών παρασκευάζονται συνήθως εγχύοντας επιτοπίως στο ήπαρ κολλαγενάση και αφήνοντας τα προσφάτως διασταθέντα ηπατικά κύτταρα να προσκολληθούν σε κατάλληλη επιφάνεια. Τα ηπατικά κύτταρα από αρνητικούς μάρτυρες θα πρέπει να εμφανίζουν βιωσιμότητα (5) τουλάχιστον 50 %.

1.5.7. **Προσδιορισμός της UDS**

Προσφάτως απομονωθέντα ηπατικά κύτταρα θηλαστικών επωάζονται συνήθως σε μέσο που περιέχει ^{3}H-TdR για κατάλληλο χρονικό διάστημα, π.χ. 3-8 ώρες. Στο τέλος της περιόδου επωάσεως, το μέσο πρέπει να απομακρύνεται από τα κύτταρα τα οποία μπορούν κατόπιν να επωαστούν σε μέσο που περιέχει περίσσεια μη επισημασμένης θυμιδίνης για να μειωθεί η μη ενσωματωμένη ραδιένεργεια (cold chase). Τα κύτταρα κατόπιν εκπλένονται, στερεώνονται και ξηραίνονται. Για μεγαλύτερους χρόνους επωάσεως, μπορεί να μη χρειάζεται η φάση της «cold chase». Οι αντικει-μενοφόροι πλάκες βυθίζονται σε αυτοακτινογραφικό γαλάκτωμα, εκτίθενται στο σκότος (π.χ. ψύχονται για 7-14 ημέρες), αναπτύσσονται, χρωματίζονται και μετρούνται οι εκτεθειμένοι κόκκοι αργύρου. Για κάθε ζώο ετοιμάζονται δύο έως τρεις αντικειμενοφόροι πλάκες.

▼B

1.5.8. **Ανάλυση**

Τα αντικειμενοφόρα παρασκευάσματα θα πρέπει να περιέχουν ικανό αριθμό κυττάρων κανονικής μορφολογίας για να μπορεί να γίνει σημαντική εκτίμηση της UDS. Τα παρασκευάσματα εξετάζονται με μικροσκόπιο για να διαπιστωθεί αν υπάρχουν σημάδια έκδηλης κυτταροτοξικότητας (π.χ. πύκνωση, μειωμένα επίπεδα ραδιοεπισήμανσης).

Οι αντικειμενοφόροι θα πρέπει να λαμβάνουν ένα κωδικό πριν από την καταμέτρηση των κόκκων. Κανονικά μετρούνται 100 κύτταρα από κάθε ζώο από δύο τουλάχιστον αντικειμενοφόρους πλάκες. Τυχόν καταμέτρηση λιγότερων των 100 κυττάρων/ζώο θα πρέπει να αιτιολογείται. Για τους πυρήνες S-φάσεως δεν μετριέται ο αριθμός κόκκων, μπορεί όμως να καταγραφεί η αναλογία των κυττάρων S-φάσεως.

Η ποσότητα της ενσωματωμένης ^{3}H-TdR στους πυρήνες και το κυτταρόπλασμα μορφολογικώς κανονικών κυττάρων, όπως δεικνύεται από την εναπόθεση κόκκων αργύρου, θα πρέπει να προσδιορίζεται με κατάλληλες μεθόδους.

Προσδιορίζεται ο αριθμός κόκκων στους πυρήνες (πυρηνικοί κόκκοι, NG) και στις πυρηνοϊσοδύναμες περιοχές στο κυτταρόπλασμα (κυτταροπλασματικοί κόκκοι, CG). Οι CG μετρώνται είτε από την ισχυρότερα επισημασμένη περιοχή του κυτταροπλάσματος, είτε από το μέσο όρο δύο ή τριών τυχαίων αριθμών κυτταροπλασματικών κόκκων κοντά στον πυρήνα. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες μέθοδοι καταμέτρησης (π.χ. καταμέτρηση σε ολόκληρο το κύτταρο) εφόσον υπάρχει κατάλληλη αιτιολόγηση (6).

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Θα πρέπει να δίνονται επιμέρους αποτελέσματα για κάθε αντικειμενοφόρο και κάθε ζώο. Επιπλέον, όλα τα δεδομένα θα πρέπει να συνοψίζονται με τη μορφή πίνακα. Ο αριθμός των καθαρών πυρηνικών κόκκων (NNG) θα πρέπει να υπολογίζεται για κάθε κύτταρο, για κάθε ζώο και για κάθε δόση και χρονική στιγμή αφαιρώντας τον αριθμό των CG από τον αριθμό των NG. Εφόσον μετρηθούν τα «κύτταρα σε επιδιόρθωση», θα πρέπει τα κριτήρια για τον ορισμό των «κυττάρων σε επιδιόρθωση» να αιτιολογούνται και να στηρίζονται σε προϋπάρχοντα ή παράλληλα στοιχεία αρνητικών μαρτύρων. Αριθμητικά αποτελέσματα μπορούν να εξαχθούν με στατιστικές μεθόδους. Εφόσον χρησιμοποιούνται, οι στατιστικές δοκιμές θα πρέπει να επιλέγονται και να αιτιολογούνται πριν από τη διεξαγωγή της έρευνας.

2.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Παραδείγματα κριτηρίων για αποκρίσεις θετικές/αρνητικές είναι τα ακόλουθα:

θετικές
- (i) τιμές NNG μεγαλύτερες ενός προκαθορισμένου κατώτερου ορίου που αιτιολογείται με βάση εργαστηριακά προϋπάρχοντα δεδομένα,
- (ii) τιμές NNG σημαντικά μεγαλύτερες από του παράλληλου μάρτυρα,

αρνητικές ή
- (i) τιμές NNG μέσα ή κάτω από τα προϋπάρχοντα δεδομένα για το κατώτερο όριο μάρτυρα,
- (ii) τιμές NNG μη σημαντικά μεγαλύτερες από τον παράλληλο μάρτυρα.

▼B

Θα πρέπει να εξετάζεται η βιολογική σχετικότητα των δεδομένων, δηλαδή θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη παράμετροι όπως η μεταξύ των ζώων διακύμανση, η σχέση δόσης-απόκρισης και η κυτταροτοξικότητα. Ως βοήθημα στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των δοκιμών μπορούν να χρησιμοποιούνται και στατιστικές μέθοδοι. Πάντως, σε μία θετική απόκριση, δεν θα πρέπει ως μοναδικός αποφασιστικός παράγοντας να λαμβάνεται η στατιστική σημαντικότητα.

Αν και τα περισσότερα πειράματα θα δίνουν σαφώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα, σε σπάνιες περιπτώσεις τα δεδομένα ενδέχεται να μην επιτρέπουν την εξαγωγή οριστικού συμπεράσματος σχετικά με τη δραστικότητα της υπό δοκίμι] ουσίας. Τα αποτελέσματα μπορεί να παραμένουν διφορούμενα ή αμφισβητήσιμα άσχετα με το πόσες φορές θα επαναληφθεί το πείραμα.

Θετικά αποτελέσματα από τη δοκιμή USD με ηπατικά κύτταρα θηλαστικών *in vivo* δείχνουν ότι η υπό δοκιμή ουσία προκαλεί βλάβη στο DNA σε ηπατικά κύτταρα θηλαστικών *in vivo* που μπορεί να επιδιορθωθεί με μη προγραμματισμένη σύνθεση DNA *in vitro*. Αρνητικά αποτελέσματα δείχνουν ότι, υπό τις συνθήκες της δοκιμής, η υπό δοκιμή ουσία δεν προκαλεί βλάβη στο DNA που να μπορεί να ανιχνευθεί με τη δοκιμή αυτή.

Θα πρέπει να εξετάζεται η πιθανότητα της υπό δοκιμή ουσίας να φθάσει στη γενική κυκλοφορία ή ειδικά στον ιστό στόχο (π.χ. συστεμική τοξικότητα).

3. **ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Διαλύτης/φορέας:

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα,

— διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας στο διαλύτη/φορέα, εφόσον είναι γνωστές.

Εξετασθέντα ζώα:

— χρησιμοποιηθέν είδος/φυλή,

— αριθμός, ηλικία και φύλο των ζώων,

— πηγή, συνθήκες στέγασης, δίαιτα, κ.λπ.,

— βάρος των μεμονωμένων ζώων στην έναρξη της δοκιμής, συμπεριλαμβανομένου του εύρος των βαρών σώματος, της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης για κάθε ομάδα.

Συνθήκες δοκιμής:

— θετικοί και αρνητικοί (φορέα/διαλύτη) μάρτυρες,

— στοιχεία από τη μελέτη εύρεσης του εύρους, εφόσον έγινε,

— αιτιολογία επιλογής του επιπέδου δόσεως,

— λεπτομέρειες για την προετοιμασία της υπό δοκιμή ουσίας,

— λεπτομέρειες για τη χορήγηση της υπό δοκιμή ουσίας,

— αιτιολογία της επιλεγείσας οδού χορήγησης,

— μέθοδοι επαλήθευσης ότι η υπό δοκιμή ουσία έφθασε στη γενική κυκλοφορία ή στον ιστό στόχο, εφόσον συντρέχει περίπτωση,.

▼B

— μετατροπή της συγκέντρωσης (ppm) της υπό δοκιμή ουσίας στη δίαιτα/πόσιμο νερό στην πραγματική δόση (mg/kg βάρους σώματος/ημέρα), εφόσον συ\τρέχει περίπτωση,

— λεπτομέρειες για την ποιότητα της τροφής και του νερού,

— λεπτομερής περιγραφή των σχημάτων αγωγής και δειγματοληψίας,

— μέθοδοι για τις μετρήσεις της τοξικότητας,

— μέθοδοι προετοιμασίας και καλλιέργειας των ηπατικών κυττάρων,

— χρησιμοποιηθείσα αυτοακτινογραφική τεχνική.

— αριθμός ανικειμενοφόρων πλακών και αριθμοί καταμετρηθέντων κυττάρων,

— κριτήρια αξιολόγησης,

— κριτήρια κατάταξης της δοκιμής ως θετικής, αρνητικής ή διφορούμενης.

Αποτελέσματα:

— μέσες τιμές κατά αντικειμενοφόρο, ζώο και ομάδα για τους πυρηνικούς κόκκους, κυτταροπλασματικούς κόκκους και καθαρούς πυρηνικούς κόκκους,

— σχέση δόσης-απόκρισης, όπου είναι δυνατό,

— στατιστικές εκτιμήσεις, εφόσον υπάρχουν,

— σημάδια τοξικότητας,

— παράλληλα στοιχεία για τους αρνητικούς (διαλύτης/φορέας) και θετικούς μάρτυρες,

— προϋπάρχοντα στοιχεία για τους αρνητικούς (διαλύτης/φορέας) μάρτυρες, με εύρη, μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις,

— αριθμό «κυττάρων σε επιδιόρθωση», εφόσον προσδιορίστηκε,

— αριθμό κυττάρων S-φάσεως, εφόσον προσδιορίστηκε,

— βιωσιμότητα των κυττάρων.

Εξέταση των αποτελεσμάτων.

Συμπεράσματα.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) Ashby,]., Lefevre, P. A., Burlinson, B. and Penman, M. G. (1985), An Assessment of the In Vivo Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, *Mutalion Res.,* 156, pp. 1-18.

(2) Butterworth, B. E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst G. and Williams, G. (1987), A Protocol and Guide for the In *Vivo* Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay, *Mutalion Res., 189,* pp. 123-133.

(3) Kennelly, J. C, Waters, R., Ashby,)., Lefevre, P. A., Burlinson B., Benford, D. J., Dean, S. W. and Mitchell 1. de G. (1993), In Vivo Rat Liver UDS Assay, in: Kirkland D. J. and Fox M., (eds.), Supplementary *Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures, UKEMS Subcommittee on Guidelines for* Mutagenicity Testing Report. Part *II revised,* Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52-77.

▼B

(4) Madle, S., Dean, S. W., Andrac, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D.)., Furihata, C, Hertner, T., McQueen, C. A. and Mori, H. (1993), Recommendations for the Performance of UDS Tests *In Vitro* and *In Vivo,* Mutations Res., 312, pp. 263-285.

(5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993), Assessment of the Relation Between the Initital Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the In Vivo/*In Vitro* DNA Repair Assay (UDS), Mutation Res., 291, pp. 21-27.

(6) Mirsalis, |. C, Tyson, C. K. and Butterworth, B. E. (1982). Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In Vivo/In Vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay, Environ *Mutagen. 4,* pp. 553-562.

▼M8

Β.40. ΔΙΑΒΡΩΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ IN VITRO: ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ΔΙΑΔΕΡΜΙΚΗΣ ΗΛΕΚΤΡΙΚΗΣ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ (TER)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 430 του ΟΟΣΑ (2015). Η διάβρωση του δέρματος αναφέρεται στην πρόκληση μη αναστρέψιμης βλάβης στο δέρμα, που εκδηλώνεται με τη μορφή ορατής νέκρωσης καθ' όλο το πάχος της επιδερμίδας και μέχρι το χόριο, μετά από εφαρμογή υπό δοκιμή χημικής ουσίας [όπως ορίζεται στο Παγκόσμια Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Ουσιών των Ηνωμένων Εθνών (GHS) (1) και στον κανονισμό (ΕΕ) 1272/2008 για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων (CLP) της Ευρωπαϊκής Ένωσης [1]]. Η παρούσα επικαιροποιημένη μέθοδος δοκιμών Β.40 περιλαμβάνει *in vitro* διαδικασία που επιτρέπει τον προσδιορισμό των μη διαβρωτικών και διαβρωτικών ουσιών και μειγμάτων σύμφωνα με το GHS του ΟΗΕ (1) και τον κανονισμό CLP.

2. Η εκτίμηση της διαβρωτικότητας στο δέρμα πραγματοποιείται κατά κανόνα με τη χρήση πειραματόζωων (μέθοδος δοκιμών Β.4, ισοδύναμη με την TG 404 του ΟΟΣΑ που εγκρίθηκε αρχικά το 1981 και αναθεωρήθηκε το 1992, το 2002 και το 2015) (2). Πέραν της παρούσας μεθόδου δοκιμών Β.40, και άλλες μέθοδοι δοκιμών *in vitro* για τον έλεγχο του δυναμικού δερματικής διάβρωσης των χημικών ουσιών έχουν επικυρωθεί και εγκριθεί ως μέθοδος δοκιμών ΤΜ Β.40α (ισοδύναμη με την TG 431 του ΟΟΣΑ) (3) και μέθοδος δοκιμών Β.65 (ισοδύναμη με την TG 435 του ΟΟΣΑ) (4), οι οποίες μπορούν επίσης να προσδιορίζουν υποκατηγορίες διαβρωτικών χημικών ουσιών, όταν απαιτείται. Αρκετές επικυρωθείσες μέθοδοι δοκιμών *in vitro* έχουν εγκριθεί ως μέθοδος δοκιμών Β.46 [ισοδύναμη με την TG 439 του ΟΟΣΑ (5)], προς χρήση για τον έλεγχο του ερεθισμού του δέρματος. Σε έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ σχετικά με τις ολοκληρωμένες προσεγγίσεις στη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση (ΙΑΤΑ) για τον ερεθισμό/διάβρωση του δέρματος περιγράφονται ορισμένες ενότητες για την ομαδοποίηση πηγών πληροφοριών και εργαλείων ανάλυσης, και παρέχεται καθοδήγηση σχετικά με i) τον τρόπο ενσωμάτωσης και χρήσης των υφιστάμενων δεδομένων δοκιμών και δεδομένων εκτός δοκιμών για την αξιολόγηση του δυναμικού των χημικών ουσιών για ερεθισμό και διάβρωση του δέρματος, και ii) μια προτεινόμενη προσέγγιση σε περίπτωση που απαιτείται η διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών (6).

3. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών αφορά την παράμετρο της υγείας του ανθρώπου «διάβρωση του δέρματος». Βασίζεται στη μέθοδο δοκιμών διαδερμικής ηλεκτρικής αντίστασης (TER) σε δέρμα επίμυος, κατά την οποία χρησιμοποιούνται δίσκοι δέρματος για τον προσδιορισμό των διαβρωτικών ουσιών με βάση την ικανότητά τους να προκαλούν απώλεια της φυσιολογικής ακεραιότητας και της λειτουργίας φραγμού της κεράτινης στιβάδας. Η αντίστοιχη κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών του ΟΟΣΑ εγκρίθηκε αρχικά το 2004 και επικαιροποιήθηκε το 2015 ώστε να παραπέμπει στο έγγραφο καθοδήγησης ΙΑΤΑ.

4. Για να αξιολογηθούν οι δοκιμές *in vitro* διάβρωσης του δέρματος για κανονιστικούς σκοπούς, διενεργήθηκαν προεπικυρωτικές μελέτες (7), ακολουθούμενες από επίσημη μελέτη επικύρωσης της μεθόδου δοκιμών TER σε δέρμα επίμυος για την αξιολόγηση της διάβρωσης του δέρματος (8) (9) (10) (11). Το αποτέλεσμα των εν λόγω μελετών οδήγησε στη διατύπωση σύστασης

[1] Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων, την τροποποίηση και την κατάργηση των οδηγιών 67/548/ΕΟΚ και 1999/45/ΕΚ και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006, ΕΕ L 353/1 της 31.12.2008

▼**M8**

σύμφωνα με την οποία η μέθοδος δοκιμών TER (που χαρακτηρίστηκε επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς – VRM) μπορεί να χρησιμοποιείται για κανονιστικούς σκοπούς για την αξιολόγηση της *in vivo* διαβρωτικότητας στο δέρμα (12) (13) (14).

5. Για να καταστεί δυνατή η χρήση μιας παρεμφερούς ή τροποποιημένης μεθόδου δοκιμών *in vitro* TER για τη διάβρωση του δέρματος, διαφορετική από την επικυρωμένη μέθοδο αναφοράς, για κανονιστικούς σκοπούς, θα πρέπει να προσδιορίζεται η αξιοπιστία, η καταλληλότητα (ορθότητα) και οι περιορισμοί της σε σχέση με την προτεινόμενη χρήση της, ούτως ώστε να διασφαλίζεται η ομοιότητά της με την επικυρωμένη μέθοδο αναφοράς, σύμφωνα με τις απαιτήσεις των προτύπων επιδόσεων (PS) (15). Η αμοιβαία αποδοχή δεδομένων του ΟΟΣΑ θα διασφαλίζεται μόνον αφού τυχόν προτεινόμενη νέα ή επικαιροποιημένη μέθοδος δοκιμών που συμμορφώνεται με τα πρότυπα επιδόσεων επανεξεταστεί και συμπεριληφθεί στην αντίστοιχη κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών του ΟΟΣΑ.

ΟΡΙΣΜΟΙ

6. Οι χρησιμοποιούμενοι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

7. Σε μελέτη επικύρωσης (10) και άλλες δημοσιευμένες μελέτες (16) (17) έχει αναφερθεί ότι η μέθοδος δοκιμών TER σε δέρμα επίμυος είναι ικανή να διακρίνει μεταξύ των γνωστών διαβρωτικών του δέρματος ουσιών και των μη διαβρωτικών ουσιών με συνολική ευαισθησία 94 % (51/54) και ειδικότητα 71 % (48/68) για βάση δεδομένων 122 ουσιών.

8. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών αφορά τη διάβρωση του δέρματος *in vitro*. Επιτρέπει τον προσδιορισμό των μη διαβρωτικών και των διαβρωτικών υπό δοκιμή χημικών ουσιών σύμφωνα με το GHS του ΟΗΕ / τον κανονισμό CLP. Ένας περιορισμός της παρούσας μεθόδου δοκιμών, όπως αποδεικνύεται βάσει των μελετών επικύρωσης (8) (9) (10) (11), είναι ότι δεν επιτρέπει την κατάταξη των διαβρωτικών ουσιών και μειγμάτων σε υποκατηγορίες σύμφωνα με το GHS του ΟΗΕ / τον κανονισμό CLP. Ο τρόπος χρήσης της παρούσας μεθόδου δοκιμών καθορίζεται βάσει του ισχύοντος κανονιστικού πλαισίου. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν παρέχει επαρκείς πληροφορίες σχετικά με τον ερεθισμό του δέρματος, αλλά η μέθοδος δοκιμών B.46 αφορά ειδικά τον ερεθισμό του δέρματος *in vitro* (5). Για την πλήρη αξιολόγηση των τοπικών επιδράσεων στο δέρμα μετά από εφάπαξ έκθεση του δέρματος, ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ για την ΙΑΤΑ (6).

9. Κατά την επικύρωση στην οποία στηρίζεται η παρούσα μέθοδος δοκιμών ελέγχθηκε ένα ευρύ φάσμα χημικών προϊόντων, κυρίως μεμονωμένων ουσιών, η δε εμπειρική βάση δεδομένων της μελέτης επικύρωσης περιλαμβάνει 60 ουσίες οι οποίες καλύπτουν με τη σειρά τους ένα ευρύ φάσμα χημικών κατηγοριών (8) (9). Με βάση τα συνολικά διαθέσιμα δεδομένα, η μέθοδος δοκιμών είναι εφαρμοστέα σε ευρύ φάσμα χημικών κατηγοριών και φυσικών καταστάσεων, περιλαμβανομένων υγρών, ημιστερεών, στερεών και κηρών. Ωστόσο, δεδομένου ότι δεν υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία δοκιμών με κατάλληλα δεδομένα αναφοράς για συγκεκριμένες φυσικές καταστάσεις, θα πρέπει να επισημανθεί ότι κατά την επικύρωση αξιολογήθηκε συγκριτικά μικρός αριθμός κηρών και διαβρωτικών στερεών. Τα υγρά μπορεί να είναι υδατικά ή μη, και τα στερεά μπορεί να είναι υδατοδιαλυτά ή μη. Εάν υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι η μέθοδος δοκιμών δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε συγκεκριμένη κατηγορία ουσιών, η μέθοδος δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τη συγκεκριμένη κατηγορία ουσιών. Επιπλέον, η παρούσα μέθοδος δοκιμών θεωρείται ότι μπορεί να εφαρμοστεί σε μείγματα κατ' επέκταση της εφαρμοσιμότητάς της σε ουσίες. Εντούτοις, λόγω του γεγονότος ότι τα μείγματα καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα κατηγοριών και συστάσεων, καθώς και του ότι οι πληροφορίες σχετικά με τις δοκιμές μειγμάτων είναι επί του παρόντος περιορισμένες, όταν υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι η μέθοδος δοκιμών δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε συγκεκριμένη κατηγορία μειγμάτων (π.χ. βάσει στρατηγικής όπως προτείνεται από τους Eskes *et al.*, 2012) (18), η μέθοδος δοκιμών δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τη συγκεκριμένη κατηγορία μειγμάτων. Πριν από τη χρήση της

▼M8

μεθόδου δοκιμών σε μείγμα για την παραγωγή δεδομένων για συγκεκριμένο κανονιστικό σκοπό, θα πρέπει να εξετάζεται αν –και, εάν ναι, για ποιον λόγο– μπορεί να αποδώσει αποτελέσματα κατάλληλα για τον επιδιωκόμενο σκοπό. Τέτοια εξέταση δεν χρειάζεται όταν οι κανονιστικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τον έλεγχο του μείγματος. Αέρια και αερολύματα δεν έχουν ακόμη αξιολογηθεί με μελέτες επικύρωσης (8) (9). Παρότι η μέθοδος δοκιμών TER μπορεί θεωρητικά να χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή αερίων και αερολυμάτων, αυτά δεν μπορούν να εξεταστούν με την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

10. Η υπό δοκιμή χημική ουσία εφαρμόζεται για διάστημα 24 ωρών, κατά μέγιστο όριο, στην επιδερμική επιφάνεια δίσκων δέρματος σε σύστημα δοκιμών αποτελούμενο από δύο διαμερίσματα, όπου οι δίσκοι δέρματος λειτουργούν ως διαχωριστικό στοιχείο μεταξύ των διαμερισμάτων. Οι δίσκοι δέρματος λαμβάνονται από επίμυες ηλικίας 28-30 ημερών που θανατώνονται με ευθανασία. Οι διαβρωτικές χημικές ουσίες προσδιορίζονται βάσει της ικανότητάς τους να προκαλούν απώλεια της φυσιολογικής ακεραιότητας και λειτουργίας φραγμού της κεράτινης στιβάδας, η οποία μετράται ως μείωση της διαδερμικής ηλεκτρικής αντίστασης (TER) σε επίπεδα χαμηλότερα μιας τιμής κατωφλίου (16) (βλ. παράγραφο 32). Για την TER σε δέρμα επιμύων έχει επιλεγεί τιμή αποκοπής 5 kΩ, βάσει σωρείας δεδομένων για ευρύ φάσμα ουσιών, όπου η πλειονότητα των τιμών ήταν είτε σαφώς μεγαλύτερη (συχνά > 10 kΩ) είτε σαφώς μικρότερη (συχνά < 3 kΩ) από την τιμή αυτή (16). Κατά κανόνα, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν είναι διαβρωτικές σε ζώα, αλλά είναι ερεθιστικές ή μη ερεθιστικές δεν μειώνουν την TER σε επίπεδα χαμηλότερα από αυτή την τιμή αποκοπής. Επιπλέον, η χρήση άλλων δερματικών παρασκευασμάτων ή άλλου εξοπλισμού ενδέχεται να μεταβάλει την τιμή αποκοπής, με αποτέλεσμα να χρειάζεται περαιτέρω επικύρωση.

11. Στη διαδικασία της δοκιμής περιλαμβάνεται μια φάση δέσμευσης χρωστικής για την επιβεβαίωση των θετικών αποτελεσμάτων της TER, συμπεριλαμβανομένων των τιμών γύρω από τα 5 kΩ. Με τη φάση δέσμευσης χρωστικής προσδιορίζεται αν η αύξηση της ιοντικής διαπερατότητας οφείλεται σε φυσική καταστροφή της κεράτινης στιβάδας. Η μέθοδος TER με χρήση δέρματος επίμυος αποδείχθηκε ότι παρέχει πρόβλεψη της διαβρωτικότητας *in vivo* σε κουνέλια, η οποία εκτιμάται με τη μέθοδο δοκιμών B.4 (2).

ΑΠΟΔΕΙΞΗ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

12. Πριν εντάξουν στην καθημερινή πρακτική τη μέθοδο δοκιμών TER σε δέρμα επίμυος που συμμορφώνεται με την παρούσα μέθοδο δοκιμών, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα ταξινομώντας σωστά τις δώδεκα ουσίες ελέγχου ικανότητας που συνιστώνται στον πίνακα 1. Σε περιπτώσεις όπου μια απαριθμούμενη ουσία δεν είναι διαθέσιμη, ή εφόσον αυτό δικαιολογείται, μπορεί να χρησιμοποιείται άλλη ουσία για την οποία υπάρχουν επαρκή δεδομένα αναφοράς *in vivo* και *in vitro* [π.χ. από τον κατάλογο χημικών ουσιών αναφοράς (16)], υπό την προϋπόθεση ότι εφαρμόζονται τα ίδια κριτήρια επιλογής που περιγράφονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1

Κατάλογος ουσιών ελέγχου ικανότητας [1]

Ουσία	Αριθμός CAS	Χημική κατηγορία [2]	Κατηγορία GHS του ΟΗΕ / CLP βασιζόμενη σε αποτελέσματα *in vivo* [3]	Κατηγορία VRM βασιζόμενη σε αποτελέσματα *in vitro*	Φυσική κατάσταση	pH [4]
Διαβρωτικά *in vivo*						
N,N'-Διμεθυλο-διπροπυλενοτριαμίνη	10563-29-8	οργανική βάση	1A	6 × C	Y	8,3
1,2-Διαμινοπροπάνιο	78-90-0	οργανική βάση	1A	6 × C	Y	8,3

▼**M8**

Ουσία	Αριθμός CAS	Χημική κατηγορία [2]	Κατηγορία GHS του ΟΗΕ / CLP βασιζόμενη σε αποτελέσματα *in vivo* [3]	Κατηγορία VRM βασιζόμενη σε αποτελέσματα *in vitro*	Φυσική κατάσταση	pH [4]
Διαβρωτικά *in vivo*						
Θειικό οξύ (10 %)	7664-93-9	ανόργανο οξύ	(1A/)1B/1C	5 × C1 × NC	Y	1,2
Υδροξείδιο του καλίου (υδατικό διάλυμα 10 %)	1310-58-3	ανόργανη βάση	(1A/)1B/1C	6 × C	Y	13,2
Οκτανικό (καπρυλικό) οξύ	124-07-2	οργανικό οξύ	1B/1C	4 × C2 × NC	Y	3,6
2-tert-Βουτυλοφαινόλη	88-18-6	φαινόλη	1B/1C	4 × C2 × NC	Y	3,9
Μη διαβρωτικά *in vivo*						
Ισοστεατικό οξύ	2724-58-5	οργανικό οξύ	NC	6 × NC	Y	3,6
4-Αμινο-1,2,4-τριαζόλιο	584-13-4	οργανική βάση	NC	6 × NC	Σ	5,5
Φαιναιθυλοβρωμίδιο	103-63-9	ηλεκτρονιόφιλο	NC	6 × NC	Y	3,6
4-(Μεθυλοθειο)-βενζαλδεΰδη	3446-89-7	ηλεκτρονιόφιλο	NC	6 × NC	Y	6,8
1,9-Δεκαδιένιο	1647-16-1	ουδέτερη οργανική	NC	6 × NC	Y	3,9
Τετραχλωροαιθυλένιο	127-18-4	ουδέτερη οργανική	NC	6 × NC	Y	4,5

Συντμήσεις: CASRN = αριθμός μητρώου της υπηρεσίας Chemical Abstracts Service, VRM = επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς, C = διαβρωτικό, NC = μη διαβρωτικό.

([1]) Οι ουσίες ελέγχου ικανότητας, ταξινομημένες πρώτα βάσει της διάκρισης διαβρωτικές (C) / μη διαβρωτικές (NC), κατόπιν βάσει υποκατηγορίας διαβρωτικών ουσιών και, στη συνέχεια, βάσει χημικής κατηγορίας, επιλέχτηκαν από τις ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη επικύρωσης ECVAM της μεθόδου δοκιμών TER σε δέρμα επίμυος (8) (9). Εκτός εάν αναφέρεται διαφορετικά, οι ουσίες υποβλήθηκαν σε δοκιμή στο επίπεδο της καθαρότητας που είχαν κατά την αγορά τους από εμπορική πηγή (8). Η επιλογή περιλάμβανε, στο μέτρο του δυνατού, ουσίες οι οποίες: i) είναι αντιπροσωπευτικές του φάσματος αποκρίσεων διαβρωτικότητας (π.χ. μη διαβρωτικές, ήπια έως ισχυρά διαβρωτικές) το οποίο η επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς είναι ικανή να μετρά ή να προβλέπει, ii) είναι αντιπροσωπευτικές των χημικών κατηγοριών που χρησιμοποιούνται στη μελέτη επικύρωσης, iii) αντικατοπτρίζουν τα χαρακτηριστικά επιδόσεων της επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς, iv) έχουν καλά προσδιορισμένες χημικές δομές, v) επάγουν οριστικά αποτελέσματα στη μέθοδο δοκιμών *in vivo* αναφοράς, vi) διατίθενται στο εμπόριο, και vii) δεν έχουν απαγορευτικό κόστος απόρριψης.

([2]) Η χημική κατηγορία αποδίδεται κατά Barratt *et al.* (8).

([3]) Οι αντίστοιχες ομάδες συσκευασίας του ΟΗΕ είναι I, II και III αντίστοιχα για τις κατηγορίες 1A, 1B και 1C του GHS του ΟΗΕ / του κανονισμού CLP.

([4]) Οι τιμές pH ελήφθησαν από Fentem *et al.* (9) και Barratt *et al.* (8).

▼M8

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

13. Υπάρχουν διαθέσιμες τυποποιημένες διαδικασίες (SOP) για τη μέθοδο δοκιμών διάβρωσης TER σε δέρμα επίμυος (19). Οι μέθοδοι δοκιμών TER σε δέρμα επίμυος που καλύπτονται από την παρούσα μέθοδο δοκιμών θα πρέπει να εκπληρώνουν τις ακόλουθες προϋποθέσεις:

Ζώα

14. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται επίμυες λόγω της ήδη αποδεδειγμένης ευαισθησίας του δέρματός τους σε ουσίες με την παρούσα μέθοδο δοκιμών (12) και διότι είναι η μόνη πηγή δέρματος που έχει επικυρωθεί επίσημα (8) (9). Η ηλικία (όταν λαμβάνεται το δέρμα) καθώς και η φυλή του επίμυος είναι ιδιαίτερα σημαντικοί παράγοντες για να εξασφαλιστεί ότι οι θύλακες των τριχών βρίσκονται στο τελογενές στάδιο, πριν από την έναρξη της ανάπτυξης του τριχώματος του ενήλικου ζώου.

15. Αφαιρείται προσεκτικά με μικρό ψαλίδι το ραχιαίο και λαγόνιο τρίχωμα από νεαρούς (ηλικίας περίπου 22 ημερών) αρσενικούς ή θηλυκούς επίμυες της φυλής Wistar ή συγκρίσιμης ποικιλίας. Στη συνέχεια, τα πειραματόζωα πλένονται προσεκτικά με σφούγγισμα ενώ η αποτριχωμένη περιοχή εμβαπτίζεται σε αντιβιοτικό διάλυμα (το οποίο περιέχει, επί παραδείγματι, στρεπτομυκίνη, πενικιλλίνη, χλωραμφενικόλη και αμφοτερικίνη σε συγκεντρώσεις κατάλληλες για την αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης). Τα πειραματόζωα πλένονται εκ νέου με αντιβιοτικά την τρίτη ή τέταρτη ημέρα μετά την πρώτη πλύση και χρησιμοποιούνται εντός 3 ημερών από τη δεύτερη πλύση, αφού έχει αποκατασταθεί η κεράτινη στιβάδα μετά την αφαίρεση του τριχώματος.

Παρασκευή των δίσκων δέρματος

16. Τα ζώα θανατώνονται με ευθανασία σε ηλικία μεταξύ 28-30 ημερών· η ηλικία είναι κρίσιμης σημασίας. Το ραχιαίο-λαγόνιο δέρμα κάθε ζώου αφαιρείται και απαλλάσσεται από την περίσσεια υποδορίου λίπους με προσεκτική αποκόλλησή του από το δέρμα. Αποκόπτονται δίσκοι δέρματος, διαμέτρου περίπου 20 mm ο καθένας. Το δέρμα μπορεί να αποθηκευτεί πριν από τη χρήση των δίσκων, εφόσον αποδεικνύεται ότι τα σχετικά με τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες δεδομένα είναι ισοδύναμα με αυτά που λαμβάνονται με πρόσφατο δέρμα.

17. Κάθε δίσκος δέρματος τοποθετείται επάνω από ένα από τα άκρα σωλήνα πολυτετραφθοροαιθυλενίου (PTFE), κατά τρόπον ώστε η επιφάνεια της επιδερμίδας να βρίσκεται σε επαφή με τον σωλήνα. Το δέρμα συγκρατείται στη θέση του με τη βοήθεια ελαστικού δακτυλίου ο οποίος στερεώνεται με πίεση στο άκρο του σωλήνα, ενώ η περίσσεια ιστού αποκόπτεται. Στη συνέχεια, η ένωση του ελαστικού δακτυλίου με το άκρο του σωλήνα PTFE στεγανοποιείται με χρήση βαζελίνης. Ο σωλήνας στερεώνεται με ελατηριωτό σφιγκτήρα μέσα σε υποδοχέα που περιέχει διάλυμα θειικού μαγνησίου ($MgSO_4$) 154 mM (σχήμα 1). Ο δίσκος δέρματος πρέπει να είναι πλήρως βυθισμένος στο διάλυμα $MgSO_4$. Από το δέρμα ενός και μόνο επίμυος μπορούν να ληφθούν μέχρι 10-15 δίσκοι δέρματος. Οι διαστάσεις του σωλήνα και του δακτυλίου φαίνονται στο σχήμα 2.

18. Πριν από την έναρξη των δοκιμών πραγματοποιείται μέτρηση της TER σε δύο δίσκους δέρματος εν είδει διαδικασίας ελέγχου ποιότητας για το δέρμα κάθε ζώου. Αμφότεροι οι δίσκοι πρέπει να εμφανίζουν τιμές ηλεκτρικής αντίστασης μεγαλύτερες των 10 kΩ για να χρησιμοποιηθούν οι υπόλοιποι δίσκοι στη μέθοδο δοκιμών. Εάν η τιμή αντίστασης είναι μικρότερη από 10 kΩ, οι εναπομένοντες δίσκοι από το εν λόγω δέρμα πρέπει να απορρίπτονται.

Εφαρμογή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων

19. Πρέπει να χρησιμοποιούνται παράλληλοι θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες για κάθε σειρά δοκιμών (πείραμα), ώστε να εξασφαλίζονται ικανοποιητικές επιδόσεις του πειραματικού μοντέλου. Σε κάθε σειρά δοκιμών (πείραμα) θα πρέπει να χρησιμοποιούνται δίσκοι δέρματος από ένα μεμονωμένο ζώο. Συνιστάται το υδροχλωρικό οξύ 10 M και το απεσταγμένο νερό για χρήση ως θετικός και αρνητικός μάρτυρας αντίστοιχα.

▼M8

20. Οι υγρές υπό δοκιμή χημικές ουσίες (150 μL) εφαρμόζονται ομοιόμορφα στην επιδερμική επιφάνεια που βρίσκεται στο εσωτερικό του σωλήνα. Όταν εξετάζονται στερεά υλικά, εφαρμόζεται ομοιόμορφα στον δίσκο επαρκής ποσότητα του στερεού υλικού ώστε να καλύπτεται ολόκληρη η επιφάνεια της επιδερμίδας. Στη συνέχεια προστίθεται απιονισμένο νερό (150 μL) επάνω στο στερεό υλικό και ο σωλήνας ανακινείται ηπίως. Για να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή επαφή με το δέρμα, τα στερεά υλικά ενδέχεται να χρειάζονται θέρμανση στους 30 °C ώστε η υπό δοκιμή χημική ουσία να τηχθεί ή να μαλακώσει, ή λειοτρίβηση ώστε να παραχθεί κοκκώδες υλικό ή σκόνη.

21. Σε κάθε σειρά δοκιμών (πείραμα), για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία και για κάθε μάρτυρα χρησιμοποιούνται τρεις δίσκοι δέρματος. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες εφαρμόζονται για 24 ώρες στους 20-23 °C. Η υπό δοκιμή χημική ουσία απομακρύνεται με έκπλυση με εκτόξευση νερού βρύσης σε θερμοκρασία δωματίου μέχρις ότου να μην είναι δυνατή η απομάκρυνση περαιτέρω υλικού.

Μετρήσεις της TER

22. Η εμπέδηση του δέρματος μετράται ως TER με τη χρήση γέφυρας Wheatstone εναλλασσόμενου ρεύματος χαμηλής τάσης (18). Οι γενικές προδιαγραφές της γέφυρας είναι: τάση λειτουργίας 1-3 Volt, ημιτονοειδές ή ορθογώνιο εναλλασσόμενο ρεύμα 50-1 000 Hz και κλίμακα μέτρησης τουλάχιστον 0,1-30 kΩ. Η γέφυρα που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη επικύρωσης μετρούσε την επαγωγή, τη χωρητικότητα και την αντίσταση σε επίπεδα τιμών μέχρι 2 000 H, 2 000 μF και 2 MΩ αντιστοίχως, σε συχνότητες 100 Hz ή 1 kHz, με τη χρήση σειριακών ή παραλλήλων τιμών. Για τους σκοπούς της δοκιμής διαβρωτικότητας TER, οι μετρήσεις καταγράφονται ως αντίσταση, σε συχνότητα 100 Hz και με τη χρήση σειριακών τιμών. Πριν από τη μέτρηση της ηλεκτρικής αντίστασης, ελαττώνεται η επιφανειακή τάση του δέρματος με την προσθήκη αιθανόλης 70 %, στην ποσότητα που απαιτείται για να καλυφθεί η επιδερμίδα. Λίγα δευτερόλεπτα αργότερα, απομακρύνεται η αιθανόλη από τον σωλήνα και ο ιστός ενυδατώνεται με την προσθήκη 3 ml διαλύματος $MgSO_4$ (154 mM). Τα ηλεκτρόδια Databridge τοποθετούνται ανά ένα σε κάθε πλευρά του δίσκου δέρματος για τη μέτρηση της αντίστασης σε kΩ/δίσκο δέρματος (σχήμα 1). Οι διαστάσεις των ηλεκτροδίων και το μήκος του τμήματος του ηλεκτροδίου που μένει ακάλυπτο κάτω από τους σφιγκτήρες δίνονται στο σχήμα 2. Ο σφιγκτήρας του εσωτερικού ηλεκτροδίου ακουμπά στην κορυφή του σωλήνα PTFE κατά τη μέτρηση της αντίστασης, ώστε να εξασφαλίζεται η εμβάπτιση σταθερού τμήματος του ηλεκτροδίου στο διάλυμα $MgSO_4$. Το εξωτερικό ηλεκτρόδιο τοποθετείται μέσα στον υποδοχέα κατά τρόπο ώστε να ακουμπά στον πυθμένα του. Η απόσταση μεταξύ του ελατηριωτού σφιγκτήρα και του πυθμένα του σωλήνα PTFE διατηρείται σταθερή (σχήμα 2), καθώς αυτό επηρεάζει τη λαμβανόμενη τιμή αντίστασης. Κατά συνέπεια, η απόσταση μεταξύ του εσωτερικού ηλεκτροδίου και του δίσκου δέρματος πρέπει να είναι σταθερή και ελάχιστη (1-2 mm).

23. Εάν η μετρούμενη τιμή αντίστασης υπερβαίνει τα 20 kΩ, αυτό οφείλεται ενδεχομένως σε κατάλοιπα της ελεγχόμενης ουσίας που επικαλύπτουν την επιδερμική επιφάνεια του δίσκου δέρματος. Μπορεί να επιχειρηθεί περαιτέρω απομάκρυνση της εν λόγω επικάλυψης, λόγου χάριν με ανακίνηση του σωλήνα PTFE επί 10 δευτερόλεπτα περίπου αφού κλειστεί το στόμιό του με γαντοφορεμένο δάκτυλο. Το διάλυμα $MgSO_4$ απορρίπτεται και η μέτρηση της αντίστασης επαναλαμβάνεται με νέο διάλυμα $MgSO_4$.

24. Τα χαρακτηριστικά και οι διαστάσεις της χρησιμοποιούμενης συσκευής δοκιμών καθώς και η ακολουθούμενη πειραματική διαδικασία ενδέχεται να επηρεάσουν τις λαμβανόμενες τιμές TER. Το όριο διαβρωτικότητας των 5 kΩ υπολογίστηκε με βάση τα δεδομένα τα οποία ελήφθησαν με τη συγκεκριμένη συσκευή και διαδικασία που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών. Σε περίπτωση μεταβολής των συνθηκών της δοκιμής ή χρήσης άλλης συσκευής είναι δυνατόν να ισχύουν διαφορετικά όρια και διαφορετικές τιμές για τους μάρτυρες. Ως εκ τούτου, είναι αναγκαία η βαθμονόμηση των μεθοδολογικών παραγόντων και των τιμών κατωφλίου της αντίστασης, με τη δοκιμή σειράς ουσιών ελέγχου ικανότητας, επιλεγμένων από τις ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη επικύρωσης (8) (9), ή από κατηγορίες παρόμοιες με αυτές των υπό διερεύνηση ουσιών. Στον πίνακα 1 εμφαίνεται μια σειρά κατάλληλων ουσιών ελέγχου ικανότητας.

▼M8

Μέθοδοι δέσμευσης χρωστικής

25. Η έκθεση σε ορισμένα μη διαβρωτικά υλικά μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση της αντίστασης κάτω από την τιμή αποκοπής των 5 kΩ, καθώς επιτρέπει τη δίοδο ιόντων διαμέσου της κεράτινης στιβάδας και μειώνει, συνεπώς, την ηλεκτρική αντίσταση (9). Λόγου χάριν, ουδέτερες οργανικές ενώσεις και επιφανειοδραστικές χημικές ουσίες (συμπεριλαμβανομένων των απορρυπαντικών, των γαλακτωματοποιητών και άλλων επιφανειοδραστικών παραγόντων) μπορούν να απομακρύνουν τα δερματικά λιπίδια, αυξάνοντας τη διαπερατότητα του φραγμού στα ιόντα. Εάν λοιπόν οι τιμές TER που προκύπτουν από τέτοιες χημικές ουσίες είναι μικρότερες των 5 kΩ ή γύρω από αυτή την τιμή και δεν παρατηρείται ορατή βλάβη των δίσκων δέρματος, πρέπει να διενεργείται εκτίμηση της διείσδυσης χρωστικής στους ιστούς μάρτυρες και στους ιστούς που υποβλήθηκαν σε αγωγή, ώστε να διαπιστώνεται αν οι τιμές TER οφείλονται σε αυξημένη διαπερατότητα ή σε διάβρωση του δέρματος (7) (9). Στη δεύτερη περίπτωση, όπου εμφανίζεται λύση της συνέχειας της κεράτινης στιβάδας, η χρωστική σουλφοροδαμίνη Β διεισδύει γρήγορα και χρωματίζει τον υποκείμενο ιστό εάν απλωθεί στην επιφάνεια του δέρματος. Η συγκεκριμένη χρωστική είναι σταθερή σε ευρύ φάσμα χημικών ουσιών και δεν επηρεάζεται από την κατωτέρω περιγραφόμενη εκχυλιστική διαδικασία.

Εφαρμογή και απομάκρυνση της χρωστικής σουλφοροδαμίνης Β

26. Μετά την εκτίμηση της TER, το θειικό μαγνήσιο αποχύνεται από τον σωλήνα και το δέρμα εξετάζεται προσεκτικά για εμφανείς βλάβες. Εάν δεν υπάρχει εμφανής σοβαρή βλάβη (π.χ. διάτρηση), 150 μl διαλύματος χρωστικής σουλφοροδαμίνης Β (ερυθρά χρωστική Acid Red 52, C.I. 45100, αριθ. CAS 3520-42-1) 10 % κ.ό. σε απεσταγμένο νερό εφαρμόζονται στην επιδερμική επιφάνεια κάθε δίσκου δέρματος για 2 ώρες. Στη συνέχεια, οι δίσκοι δέρματος εκπλένονται με νερό βρύσης θερμοκρασίας όχι μεγαλύτερης από τη θερμοκρασία δωματίου για 10 περίπου δευτερόλεπτα, ώστε να απομακρυνθεί τυχόν πλεονάζουσα/αδέσμευτη χρωστική. Κάθε δίσκος δέρματος αφαιρείταιπροσεκτικά από τον σωλήνα PTFE και τοποθετείται σε φιαλίδιο (π.χ. γυάλινο φιαλίδιο σπινθηρισμού των 20 ml) που περιέχει απιονισμένο νερό (8 ml). Τα φιαλίδια ανακινούνται ηπίως επί 5 λεπτά ώστε να απομακρυνθεί τυχόν εναπομένουσα αδέσμευτη χρωστική. Επαναλαμβάνεται η έκπλυση και, στη συνέχεια, οι δίσκοι δέρματος αφαιρούνται και τοποθετούνται σε φιαλίδια που περιέχουν 5 ml διαλύματος δωδεκυλοθειικού νατρίου (SDS) 30 % κ.ό. σε απεσταγμένο νερό και ακολουθεί ολονύκτια επώαση στους 60 °C.

27. Μετά την επώαση, οι δίσκοι δέρματος αφαιρούνται από τα φιαλίδια και απορρίπτονται, ενώ το εναπομένον διάλυμα φυγοκεντρείται επί 8 λεπτά στους 21 °C (σχετική φυγόκεντρος δύναμη ~175 g). Από την υπερκείμενη στιβάδα λαμβάνεται δείγμα 1 ml και αραιώνεται σε αναλογία 1 προς 5 κ.ό. [1 ml + 4 ml] με διάλυμα SDS 30 % κ.ό. σε απεσταγμένο νερό. Μετράται η οπτική πυκνότητα (OD) του διαλύματος σε μήκος κύματος 565 nm.

Υπολογισμός της περιεκτικότητας σε χρωστική

28. Η περιεκτικότητα κάθε δίσκου σε χρωστική σουλφοροδαμίνη Β υπολογίζεται με βάση τις τιμές OD (9) (μοριακή απορροφητικότητα της σουλφοροδαμίνης Β στα 565 nm = $8,7 \times 10^4$, μοριακό βάρος = 580). Προσδιορίζεται η περιεκτικότητα κάθε δίσκου δέρματος σε χρωστική με τη χρήση κατάλληλης καμπύλης βαθμονόμησης και στη συνέχεια υπολογίζεται η μέση περιεκτικότητα σε χρωστική για τα πανομοιότυπα δείγματα.

Κριτήρια αποδοχής

29. Οι προκύπτοντες μέσοι όροι TER γίνονται δεκτοί εφόσον οι τιμές για τον θετικό και τον αρνητικό μάρτυρα, οι οποίοι ελέγχθηκαν ταυτόχρονα, περικλείονται στα αποδεκτά για τη μέθοδο πεδία τιμών στο εργαστήριο που εκτελεί τη δοκιμή. Τα αποδεκτά πεδία τιμών αντίστασης, για τη μεθοδολογία και τη συσκευή που περιγράφονται ανωτέρω, παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα:

▼**M8**

Μάρτυρας	Ουσία	Πεδίο τιμών ηλεκτρικής αντίστασης (kΩ)
Θετικός	Υδροχλωρικό οξύ 10M	0,5 - 1,0
Αρνητικός	Απεσταγμένο νερό	10 - 25

30. Οι προκύπτουσες μέσες τιμές δέσμευσης χρωστικής γίνονται δεκτές εφόσον οι τιμές για τους μάρτυρες, οι οποίοι ελέγχθηκαν ταυτόχρονα, περικλείονται στα αποδεκτά για τη μέθοδο πεδία τιμών. Τα υποδεικνυόμενα αποδεκτά πεδία τιμών περιεκτικότητας σε χρωστική για τις ουσίες μάρτυρες, για τη μεθοδολογία και τη συσκευή που περιγράφονται ανωτέρω, παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα:

Μάρτυρας	Ουσία	Πεδίο τιμών περιεκτικότητας σε χρωστική (μg/δίσκο)
Θετικός	Υδροχλωρικό οξύ 10M	40 - 100
Αρνητικός	Απεσταγμένο νερό	15 - 35

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

31. Η τιμή αποκοπής TER, η οποία αποτελεί το μέτρο διάκρισης μεταξύ διαβρωτικών και μη διαβρωτικών υπό δοκιμή χημικών ουσιών, καθορίστηκε κατά τη βελτιστοποίηση της μεθόδου δοκιμών, ελέγχθηκε κατά τη διάρκεια μιας προεπικυρωτικής φάσης και επιβεβαιώθηκε σε επίσημη μελέτη επικύρωσης.

32. Το μοντέλο πρόβλεψης για τη μέθοδο δοκιμών διάβρωσης του δέρματος επίμυος TER (9) (19), που σχετίζεται το σύστημα ταξινόμησης του GHS του ΟΗΕ / του κανονισμού CLP, δίνεται παρακάτω:

Η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται μη διαβρωτική για το δέρμα εάν:

i) η λαμβανόμενη μέση τιμή TER για την υπό δοκιμή ουσία είναι μεγαλύτερη (>) των 5 kΩ, ή

ii) η λαμβανόμενη μέση τιμή TER για την υπό δοκιμή ουσία είναι μικρότερη ή ίση (≤) των 5 kΩ, και

— οι δίσκοι δέρματος δεν παρουσιάζουν εμφανή βλάβη (π.χ. διάτρηση), και

— η μέση περιεκτικότητα των δίσκων σε χρωστική είναι μικρότερη (<) της μέσης περιεκτικότητας που λαμβάνεται ταυτόχρονα με τον θετικό μάρτυρα HCl 10M (βλ. παράγραφο 30 για τις τιμές θετικού μάρτυρα).

Η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται διαβρωτική για το δέρμα εάν:

i) η λαμβανόμενη μέση τιμή TER για την υπό δοκιμή χημική ουσία είναι μικρότερη ή ίση (≤) των 5 kΩ και οι δίσκοι δέρματος παρουσιάζουν εμφανή βλάβη (π.χ. διάτρηση), ή

ii) η λαμβανόμενη μέση τιμή TER για την υπό δοκιμή ουσία είναι μικρότερη ή ίση (≤) των 5 kΩ, και

— οι δίσκοι δέρματος δεν παρουσιάζουν εμφανή βλάβη (π.χ. διάτρηση) αλλά

▼M8

— η μέση περιεκτικότητα των δίσκων σε χρωστική είναι μεγαλύτερη ή ίση (≥) της μέσης περιεκτικότητας που λαμβάνεται ταυτόχρονα με τον θετικό μάρτυρα HCl 10M (βλ. παράγραφο 30 για τις τιμές θετικού μάρτυρα).

33. Για υπό δοκιμή χημική ουσία της οποίας η ταξινόμηση δεν επιδέχεται αμφισβήτηση, αναμένεται να αρκεί μία μόνο σειρά δοκιμών (πείραμα) με τουλάχιστον τρεις πανομοιότυπους δίσκους δέρματος. Όταν όμως το αποτέλεσμα είναι οριακό, όπως π.χ. σε περίπτωση ασυμφωνίας μεταξύ των μετρήσεων των πανομοιότυπων δειγμάτων και/ή με μέση τιμή TER ίση με 5 ± 0,5 kΩ, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο εκτέλεσης δεύτερης ανεξάρτητης σειράς δοκιμών (πείραμα), ή ακόμη και τρίτης σειράς σε περίπτωση ασυμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο πρώτων σειρών δοκιμών (πειραμάτων).

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Δεδομένα

34. Οι τιμές αντίστασης (kΩ) και οι τιμές περιεκτικότητας σε χρωστική (μg/δίσκο), κατά περίπτωση, για την υπό δοκιμή χημική ουσία, καθώς και για τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες θα πρέπει να αναφέρονται υπό μορφή πίνακα, περιλαμβανομένων δεδομένων για κάθε μεμονωμένο πανομοιότυπο δίσκο σε κάθε σειρά δοκιμών (πείραμα) και των μέσων τιμών ± SD. Κάθε επανάληψη πειράματος θα πρέπει να αναφέρεται. Η παρατηρούμενη βλάβη στους δίσκους δέρματος θα πρέπει να αναφέρεται για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία.

Έκθεση δοκιμής

35. Στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία και μάρτυρες:

— Μονοσυστατική ουσία: ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμίξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

— Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγμα: περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες,

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

— προέλευση, αριθμός παρτίδας εάν είναι διαθέσιμος,

— κατεργασία της υπό δοκιμή χημικής ουσίας/μάρτυρα πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, κονιοποίηση),

— σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, καταληκτική ημερομηνία χρήσης ή ημερομηνία νέας ανάλυσης, εάν είναι γνωστή,

— συνθήκες φύλαξης.

Πειραματόζωα:

— χρησιμοποιούμενη φυλή και φύλο,

— ηλικία των ζώων όταν χρησιμοποιήθηκαν ως ζώα δότες,

— προέλευση των ζώων, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσιο κ.λπ.,

— λεπτομέρειες για το δερματικό παρασκεύασμα.

▼**M8**

Συνθήκες δοκιμής:

— καμπύλες βαθμονόμησης της συσκευής της δοκιμής,

— καμπύλες βαθμονόμησης για την εκτέλεση της δοκιμής δέσμευσης χρωστικής, ζώνη διάβασης που εφαρμόστηκε για τη μέτρηση των τιμών OD, και γραμμική κλίμακα τιμών OD της συσκευής μέτρησης (π.χ. φασματοφωτόμετρο), ανάλογα με την περίπτωση,

— λεπτομέρειες της διαδικασίας δοκιμών που εφαρμόστηκε για τις μετρήσεις της TER,

— κατά περίπτωση, λεπτομέρειες της διαδικασίας δοκιμών που εφαρμόστηκε για την εκτίμηση της δέσμευσης χρωστικής,

— χρησιμοποιηθείσες δόσεις δοκιμής, διάρκεια περιόδου/-ων έκθεσης και θερμοκρασία/-ες έκθεσης,

— λεπτομέρειες της διαδικασίας πλύσης που εφαρμόστηκε μετά την περίοδο έκθεσης,

— αριθμός πανομοιότυπων δίσκων δέρματος που χρησιμοποιήθηκαν ανά χημική ουσία και μάρτυρα δοκιμής (θετικός και αρνητικός μάρτυρας),

— περιγραφή τυχόν τροποποίησης της διαδικασίας δοκιμών,

— παραπομπή σε ιστορικά δεδομένα για το μοντέλο. Τα εν λόγω δεδομένα πρέπει να περιλαμβάνουν τα ακόλουθα, χωρίς να περιορίζονται σ' αυτά:

  i) Δυνατότητα αποδοχής των τιμών TER αρνητικού και θετικού μάρτυρα (σε kΩ) με παραπομπή στα πεδία τιμών αντίστασης θετικού και αρνητικού μάρτυρα

  ii) Δυνατότητα αποδοχής των τιμών περιεκτικότητας αρνητικού και θετικού μάρτυρα σε χρωστική (σε μg/δίσκο) με παραπομπή στα πεδία τιμών περιεκτικότητας θετικού και αρνητικού μάρτυρα σε χρωστική

  iii) Δυνατότητα αποδοχής των αποτελεσμάτων της δοκιμής με παραπομπή στην ιστορική διακύμανση μεταξύ των πανομοιότυπων δίσκων δέρματος

— Περιγραφή των κριτηρίων απόφασης/μοντέλου πρόβλεψης που εφαρμόστηκαν.

Αποτελέσματα:

— καταχώριση σε πίνακα των δεδομένων από τις δοκιμές TER και δέσμευσης χρωστικής (ανάλογα με την περίπτωση) για μεμονωμένες υπό δοκιμή χημικές ουσίες και μάρτυρες, για κάθε σειρά δοκιμών (πείραμα) και κάθε πανομοιότυπο δίσκο δέρματος (μεμονωμένα ζώα και μεμονωμένα δείγματα δέρματος), μέσες τιμές, SD και CV,

— περιγραφή κάθε επίδρασης που παρατηρήθηκε,

— ταξινόμηση στην οποία κατέληξε η δοκιμή, με αναφορά του μοντέλου πρόβλεψης και/ή των κριτηρίων απόφασης που χρησιμοποιήθηκαν.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].

▼**M8**

(2) Κεφάλαιο Β.4 του παρόντος παραρτήματος: Οξείας μορφής ερεθισμός/διάβρωση του δέρματος.

(3) Κεφάλαιο Β.40α του παρόντος παραρτήματος: Μοντέλο δέρματος *in vitro*.

(4) Κεφάλαιο Β.65 του παρόντος παραρτήματος: Μέθοδος δοκιμών φραγμού μεμβράνης *in vitro*.

(5) Κεφάλαιο Β.46 του παρόντος παραρτήματος: Δερματικός ερεθισμός *in vitro*: μέθοδος δοκιμών σε ανασυσταθείσα ανθρώπινη επιδερμίδα.

(6) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6.*ATLA* 23, 219-255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxic.In Vitro* 12, 471-482.

(9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhütter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests For Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxic.In Vitro*12, 483- 524.

(10) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H., and Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops.*ATLA*23, 129-147.

(11) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(12) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneos Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.

(13) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.

(14) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(15) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 218. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

(16) Oliver G.J.A., Pemberton M.A., and Rhodes C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test -Modifications and Validation. Fd. Chem. *Toxicol.* 24, 507-512.

(17) Botham P.A., Hall T.J., Dennett R., McCall J.C., Basketter D.A., Whittle E., Cheeseman M., Esdaile D.J., and Gardner J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In Vitro*: Results of an Interlaboratory Trial. *Toxicol*. *In Vitro* 6,191-194.

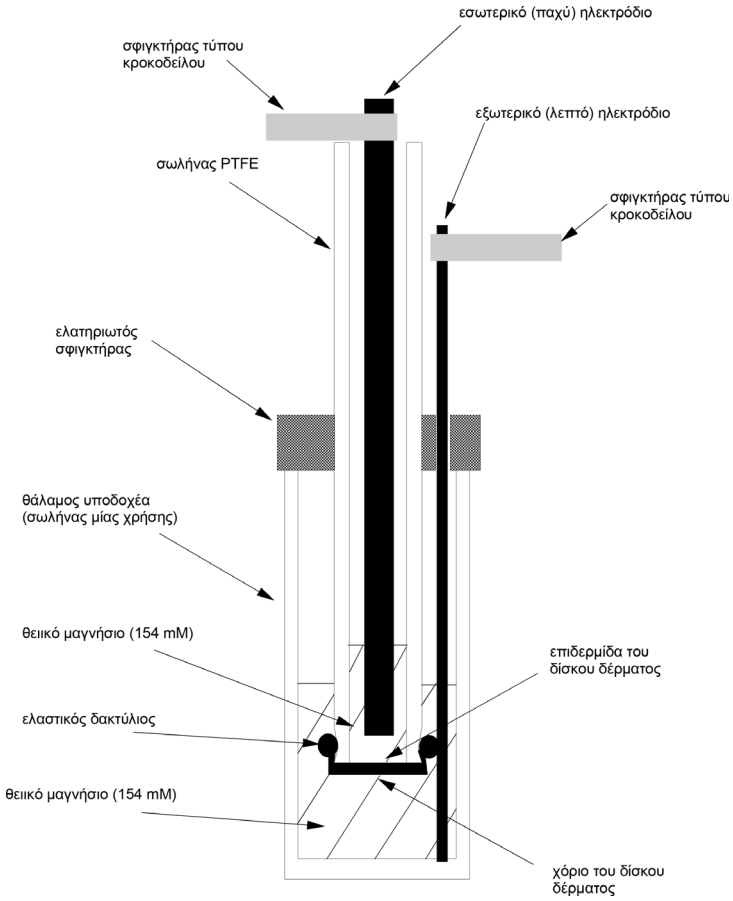
(18) Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüschweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher M., Hofmann M., Hopf N., Molinari J., Oberli A., Ott M., Peter R., Sá-Rocha V.M., Schenk D., Tomicic C., Vanparys P., Verdon B., Wallenhorst T., Winkler G.C. and Depallens O. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.*Toxicol.Pharmacol.* 62, 393-403.

(19) TER SOP (December 2008). *INVITTOX* Protocol (No 115) Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test.

(20) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Devlopment, Paris.

Σχημα 1

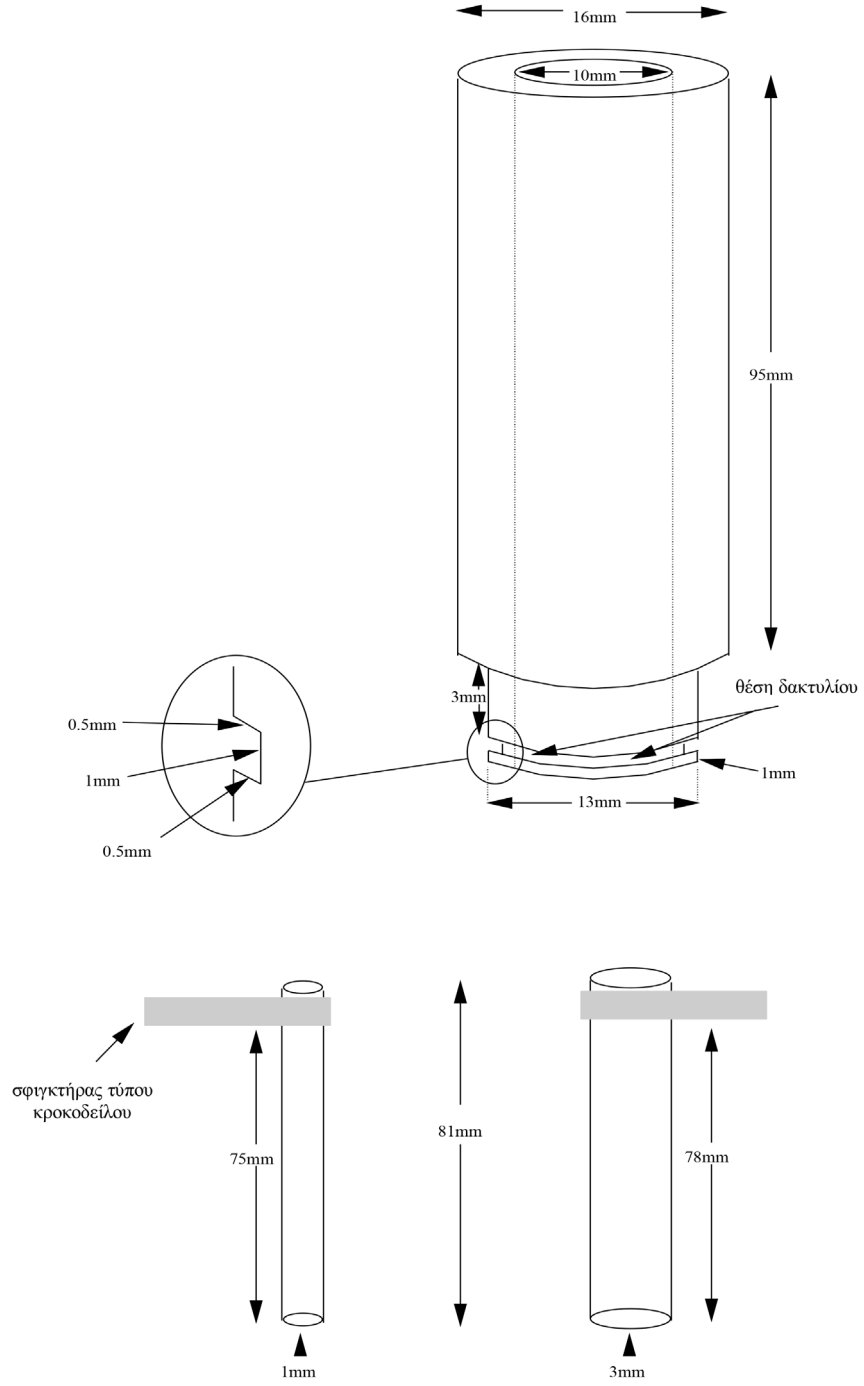
Συσκευη για τη Δοκιμη ter σε Δερμα Επιμυοσ



▼**M8**

Σχημα 2

Διαστασεισ του Σωληνα Πολυτετραφθοροαιθυλενιου (PFTE), του Υποδοχεα και των Ηλεκτροδιων που Χρησιμοποιηθηκαν



Κρίσιμοι παράγοντες στην ανωτέρω συσκευή:

— η εσωτερική διάμετρος του σωλήνα PTFE,

— το μήκος των ηλεκτροδίων σε σχέση με τον σωλήνα PTFE και τον υποδοχέα, ώστε ο δίσκος δέρματος να μην ακουμπά στα ηλεκτρόδια και ένα σταθερού μήκους τμήμα ηλεκτροδίου να βρίσκεται σε επαφή με το διάλυμα $MgSO_4$,

▼**M8**

— η ποσότητα διαλύματος $MgSO_4$ στον υποδοχέα πρέπει να εξασφαλίζει βάθος του υγρού, σε σχέση με τη στάθμη του στον σωλήνα PFTE, όπως εμφαίνεται στο σχήμα 1,

— ο δίσκος δέρματος πρέπει να στερεώνεται ικανοποιητικά στον σωλήνα PFTE, ώστε η ηλεκτρική αντίσταση να αποτελεί πραγματικό μέτρο των ιδιοτήτων του δέρματος.

▼**M8**

Προσάρτημα

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ορθότητα: Ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί κριτήριο επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών και μια από τις πτυχές της «καταλληλότητας». Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς τη «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας μεθόδου δοκιμών (20).

C: Διαβρωτικό

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Συμφωνία: μέτρο των επιδόσεων των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Ο όρος χρησιμοποιείται ενίοτε εναλλακτικά προς τον όρο «ορθότητα», και ορίζεται ως το ποσοστό επί του συνόλου των υπό δοκιμή χημικών ουσιών που έχουν ταξινομηθεί ορθά ως θετικές ή αρνητικές. Η συμφωνία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον επιπολασμό των θετικών ουσιών στα είδη των υπό δοκιμή χημικών ουσιών που ελέγχονται (20).

GHS [Globally Harmonised System for the Classification and Labelling of Chemicals – Παγκόσμια Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Προϊόντων (ΟΗΕ)]: σύστημα που προτείνει την ταξινόμηση των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) με βάση τυποποιημένα είδη και βαθμούς φυσικής επικινδυνότητας και επικινδυνότητας για την υγεία και το περιβάλλον και καλύπτει τα αντίστοιχα στοιχεία γνωστοποίησης, όπως εικονογράμματα, προειδοποιητικές λέξεις, δηλώσεις επικινδυνότητας, δηλώσεις προφύλαξης και δελτία δεδομένων ασφαλείας, με τα οποία γνωστοποιούνται πληροφορίες σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις με σκοπό την προστασία των ανθρώπων (εργοδοτών, εργαζομένων, μεταφορέων, καταναλωτών και διασωστών) και του περιβάλλοντος (1).

IATA: Integrated Approach on Testing and Assessment (Ολοκληρωμένη προσέγγιση για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση).

Μείγμα: Ένα μείγμα ή διάλυμα που αποτελείται από δύο ή περισσότερες ουσίες.

Μονοσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας ένα κύριο συστατικό περιέχεται σε ποσοστό τουλάχιστον 80 % κ.β.

Πολυσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας περισσότερα από ένα κύρια συστατικά περιέχονται σε συγκέντρωση ≥ 10 % κ.β. και < 80 % κ.β. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα μεταποιητικών διεργασιών. Η διαφορά μεταξύ μείγματος και πολυσυστατικής ουσίας είναι ότι το μείγμα λαμβάνεται με ανάμειξη δύο ή περισσότερων ουσιών, χωρίς χημική αντίδραση. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα χημικών αντιδράσεων.

NC: Μη διαβρωτικό.

OD: Οπτική πυκνότητα.

PC: Θετικός μάρτυρας, πανομοιότυπο δείγμα που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και υποβάλλεται σε αγωγή με ουσία που είναι γνωστό ότι προκαλεί θετική απόκριση. Για να διασφαλίζεται η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας της απόκρισης του θετικού μάρτυρα σε συνάρτηση με τον χρόνο, το μέγεθος της θετικής απόκρισης δεν θα πρέπει να είναι υπερβολικό.

▼**M8**

Πρότυπα επιδόσεων: πρότυπα που βασίζονται σε επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών και παρέχουν τη βάση για την αξιολόγηση της συγκρισιμότητας προτεινόμενης μεθόδου δοκιμών η οποία είναι μηχανιστικά και λειτουργικά παρεμφερής. Τα πρότυπα επιδόσεων περιλαμβάνουν i) βασικά στοιχεία της μεθόδου δοκιμών, ii) κατάλογο ελάχιστων ουσιών αναφοράς, οι οποίες έχουν επιλεγεί μεταξύ των χημικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για την απόδειξη των αποδεκτών επιδόσεων της επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς, και iii) τα ανάλογα επίπεδα αξιοπιστίας και ορθότητας, που βασίζονται στα επιτευχθέντα για την επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών και τα οποία πρέπει να επιδεικνύει η προτεινόμενη μέθοδος δοκιμών όταν αξιολογείται με χρήση του καταλόγου ελάχιστων ουσιών αναφοράς.

Καταλληλότητα: περιγραφή της σχέσης της μεθόδου δοκιμών με την υπό μελέτη επίδραση και του κατά πόσον αυτή είναι αρμόζουσα και χρήσιμη για συγκεκριμένο σκοπό. Πρόκειται για τον βαθμό στον οποίο η μέθοδος δοκιμών μετρά ή προβλέπει σωστά τη βιολογική επίδραση υπό μελέτη. Η καταλληλότητα εμπεριέχει συνεκτίμηση της ορθότητας (συμφωνίας) της μεθόδου δοκιμών (20).

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια μέθοδος δοκιμών μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (20).

Ευαισθησία: το ποσοστό του συνόλου των θετικών/δραστικών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, και είναι σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των μεθόδων δοκιμών (20).

Διάβρωση του δέρματος *in vivo*: η πρόκληση μη αναστρέψιμων βλαβών στο δέρμα, όπως εμφανούς νεκρώσεως που διαπερνά την επιδερμίδα φθάνοντας στο χόριο, μετά την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας για χρονικό διάστημα έως 4 ωρών. Τυπικές διαβρωτικές αντιδράσεις είναι τα έλκη, η αιμορραγία, οι αιματηρές εσχάρες και, στο τέλος της παρατήρησης μετά παρέλευση 14 ημερών, ο αποχρωματισμός λόγω λευκοδερμίας, επιφάνειες με τέλεια αλωπεκία και ουλές. Για την αξιολόγηση των αμφισβητήσιμων αλλοιώσεων θα πρέπει να διερευνάται η δυνατότητα ιστοπαθολογικής εξέτασης.

Ειδικότητα: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών/αδρανών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των μεθόδων δοκιμών (20).

Ουσία: ένα χημικό στοιχείο και οι ενώσεις του σε φυσική κατάσταση ή όπως λαμβάνονται με οποιαδήποτε παραγωγική διεργασία, στα οποία συμπεριλαμβάνονται όλα τα πρόσθετα που απαιτούνται για να διατηρείται η σταθερότητά του, καθώς και τυχόν προσμείξεις που προκύπτουν από τη χρησιμοποιούμενη διεργασία, αλλά από τα οποία εξαιρούνται οι διαλύτες που είναι δυνατόν να διαχωριστούν χωρίς να επηρεαστεί η σταθερότητα της ουσίας ούτε να μεταβληθεί η σύνθεσή της.

Σειρά (δοκιμών): δοκιμή μιας μεμονωμένης χημικής ουσίας σε τουλάχιστον τρεις πανομοιότυπους δίσκους δέρματος.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Διαδερμική ηλεκτρική αντίσταση (TER): μέτρο της ηλεκτρικής σύνθετης αντίστασης (εμπέδησης) του δέρματος, σε μονάδες αντίστασης kΩ. Πρόκειται για απλή και αξιόπιστη μέθοδο εκτίμησης της λειτουργίας φραγμού, με καταγραφή της διόδου ιόντων μέσω του δέρματος με τη βοήθεια συσκευής που λειτουργεί με γέφυρα Wheatstone.

UVCB: Ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, πολύπλοκα προϊόντα αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά.

▼M8

Β.40α ΔΙΑΒΡΩΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ *IN VITRO*: ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ΣΕ ΑΝΑΣΥΣΤΑΘΕΙΣΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΕΠΙΔΕΡΜΙΔΑ (RhE)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 431 του ΟΟΣΑ (2016). Η διάβρωση του δέρματος αναφέρεται στην πρόκληση μη αναστρέψιμης βλάβης στο δέρμα που εκδηλώνεται με τη μορφή ορατής νέκρωσης που διαπερνά την επιδερμίδα φθάνοντας στο χόριο, μετά από εφαρμογή υπό δοκιμή χημικής ουσίας [όπως ορίζεται στο Παγκόσμια Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Ουσιών των Ηνωμένων Εθνών (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)] (1) και στον κανονισμό (ΕΕ) 1272/2008 για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων (CLP) της Ευρωπαϊκής Ένωσης ([1])]. Η παρούσα επικαιροποιημένη μέθοδος δοκιμών Β.40α περιλαμβάνει διαδικασία *in vitro* που επιτρέπει τον προσδιορισμό των μη διαβρωτικών και διαβρωτικών ουσιών και μειγμάτων σύμφωνα με το GHS του ΟΗΕ και τον κανονισμό CLP. Επιτρέπει επίσης τη μερική ταξινόμηση των διαβρωτικών ουσιών σε υποκατηγορίες.

2. Η εκτίμηση της διαβρωτικότητας χημικών ουσιών στο δέρμα πραγματοποιείται κατά κανόνα με τη χρήση πειραματόζωων (μέθοδος δοκιμών Β.4, ισοδύναμη με την TG 404 του ΟΟΣΑ, η οποία εγκρίθηκε αρχικά το 1981 και αναθεωρήθηκε το 1992, το 2002 και το 2015) (2). Πέραν της παρούσας μεθόδου δοκιμών Β.40α έχουν επικυρωθεί και εγκριθεί άλλες δύο μέθοδοι δοκιμών *in vitro* για τον έλεγχο της διαβρωτικότητας χημικών ουσιών στο δέρμα, ως μέθοδος δοκιμών Β.40 (ισοδύναμη με την TG 430 του ΟΟΣΑ) (3) και μέθοδος δοκιμών Β.65 (ισοδύναμη με την TG 435 του ΟΟΣΑ) (4). Επιπλέον, η μέθοδος δοκιμών *in vitro* Β.46 (ισοδύναμη με την TG 439 του ΟΟΣΑ) (5) έχει εγκριθεί για τον έλεγχο του δυναμικού ερεθισμού του δέρματος. Σε έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ σχετικά με τις ολοκληρωμένες προσεγγίσεις στη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση (IATA) για τον ερεθισμό/διάβρωση του δέρματος περιγράφονται ορισμένες ενότητες για την ομαδοποίηση πηγών πληροφοριών και εργαλείων ανάλυσης, και παρέχεται καθοδήγηση σχετικά με i) τον τρόπο ενσωμάτωσης και χρήσης των υφιστάμενων δεδομένων δοκιμών και δεδομένων εκτός δοκιμών για την αξιολόγηση του δυναμικού των χημικών ουσιών για ερεθισμό και διάβρωση του δέρματος, και ii) μια προτεινόμενη προσέγγιση σε περίπτωση που απαιτείται η διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών (6).

3. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών αφορά την παράμετρο της υγείας του ανθρώπου «διάβρωση του δέρματος». Χρησιμοποιεί ανασυσταθείσα ανθρώπινη επιδερμίδα (RhE) (που λαμβάνεται από μη μετασχηματισμένα επιδερμικά κερατινοκύτταρα ανθρώπινης προέλευσης) η οποία μιμείται σε μεγάλο βαθμό τις ιστολογικές, μορφολογικές, βιοχημικές και φυσιολογικές ιδιότητες των ανώτερων στιβάδων του ανθρώπινου δέρματος, δηλαδή της επιδερμίδας. Η αντίστοιχη κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών του ΟΟΣΑ εγκρίθηκε αρχικά το 2004, επικαιροποιήθηκε το 2013 προκειμένου να συμπεριλάβει πρόσθετες μεθόδους δοκιμών στις οποίες χρησιμοποιείται το μοντέλο RhE και να δοθεί η δυνατότητα χρήσης των μεθόδων αυτών για την υποστήριξη της ταξινόμησης των διαβρωτικών χημικών ουσιών σε υποκατηγορίες, και επικαιροποιήθηκε και το 2015 προκειμένου να περιλαμβάνει αναφορά στο έγγραφο καθοδήγησης IATA και να εισαγάγει τη χρήση εναλλακτικής διαδικασίας για τη μέτρηση της βιωσιμότητας.

4. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών περιλαμβάνονται τέσσερα επικυρωμένα και διαθέσιμα στο εμπόριο μοντέλα RhE. Προεπικυρωτικές μελέτες (7), ακολουθούμενες από επίσημη μελέτη επικύρωσης για την αξιολόγηση της διάβρωσης του δέρματος (8)(9)(10), διενεργήθηκαν (11) (12) για δύο από αυτά τα διαθέσιμα στο εμπόριο μοντέλα δοκιμών, το τυποποιημένο μοντέλο EpiSkin™ και τη δοκιμή διαβρωτικότητας στο δέρμα EpiDerm™ (EPI-200) (στο κείμενο που ακολουθεί αναφέρονται ως «επικυρωμένες μέθοδοι αναφοράς», VRM). Το αποτέλεσμα των εν λόγω μελετών είχε ως αποτέλεσμα

([1]) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων, την τροποποίηση και την κατάργηση των οδηγιών 67/548/ΕΟΚ και 1999/45/ΕΚ και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006, ΕΕ L 353/1 της 31.12.2008

▼M8

να διατυπωθεί σύσταση περί της δυνατότητας χρήσης των δύο αυτών VRM για κανονιστικούς σκοπούς για τη διάκριση των διαβρωτικών (C) από τις μη διαβρωτικές (NC) ουσίες, και περί της δυνατότητας επιπλέον χρήσης του EpiSkin™ με σκοπό την υποστήριξη της ταξινόμησης των διαβρωτικών ουσιών σε υποκατηγορίες (13)(14)(15). Δύο ακόμη διαθέσιμα στο εμπόριο μοντέλα δοκιμών RhE *in vitro* έχουν δώσει αποτελέσματα παρόμοια με αυτά της επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς EpiDerm™ κατόπιν επικύρωσης βάσει προτύπων επιδόσεων (16)(17)(18). Αυτά είναι το SkinEthic™ RHE ([1]) και το epiCS® (πρώην EST-1000), που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για κανονιστικούς σκοπούς για τη διάκριση των διαβρωτικών από τις μη διαβρωτικές ουσίες (19)(20). Στο πλαίσιο μετεπικυρωτικών μελετών που διενήργησαν οι παραγωγοί του μοντέλου RhE τα έτη 2012 έως 2014 με χρήση εξελιγμένου πρωτοκόλλου διόρθωσης της παρεμποδιστικής δράσης μη ειδικής αναγωγής MTT από τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες βελτιώθηκαν οι επιδόσεις τόσο ως προς τη δυνατότητα διάκρισης μεταξύ C και NC όσο και ως προς την υποστήριξη της ταξινόμησης των διαβρωτικών ουσιών σε υποκατηγορίες (21)(22). Διενεργήθηκαν περαιτέρω στατιστικές αναλύσεις των μετεπικυρωτικών δεδομένων που ελήφθησαν με τα EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE και EpiCS® για τον προσδιορισμό εναλλακτικών μοντέλων πρόβλεψης που βελτίωσαν την ικανότητα πρόβλεψης ως προς την ταξινόμηση σε υποκατηγορίες (23).

5. Για να καταστεί δυνατή η χρήση μιας παρεμφερούς ή τροποποιημένης μεθόδου δοκιμών *in vitro* RhE για τη διάβρωση του δέρματος, διαφορετική από τις επικυρωμένες μεθόδους αναφοράς, για κανονιστικούς σκοπούς, θα πρέπει να προσδιορίζεται η αξιοπιστία, η καταλληλότητα (ορθότητα) και οι περιορισμοί της σε σχέση με την προτεινόμενη χρήση της, ούτως ώστε να διασφαλίζεται η ομοιότητά της με τις επικυρωμένες μεθόδους αναφοράς, σύμφωνα με τις απαιτήσεις των προτύπων επιδόσεων (PS) (24) που καθορίζονται σύμφωνα με τις αρχές του εγγράφου καθοδήγησης αριθ. 34 του ΟΟΣΑ (25). Η αμοιβαία αποδοχή δεδομένων θα διασφαλίζεται μόνο αφού μια προτεινόμενη νέα ή επικαιροποιημένη μέθοδος δοκιμών που συμμορφώνεται με τα πρότυπα επιδόσεων επανεξεταστεί και συμπεριληφθεί στην αντίστοιχη κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών. Τα μοντέλα δοκιμών που περιλαμβάνονται στην εν λόγω κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη συμμόρφωση προς τις απαιτήσεις των χωρών όσον αφορά τα αποτελέσματα δοκιμών με μεθόδους *in vitro* για τη διάβρωση του δέρματος, ενώ αξιοποιείται παράλληλα η αμοιβαία αποδοχή δεδομένων.

ΟΡΙΣΜΟΙ

6. Οι χρησιμοποιούμενοι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

7. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών επιτρέπει τον προσδιορισμό των μη διαβρωτικών και των διαβρωτικών ουσιών και μειγμάτων σύμφωνα με το GHS του ΟΗΕ και τον κανονισμό CLP. Υποστηρίζει επίσης την ταξινόμηση των διαβρωτικών ουσιών και μειγμάτων στην προαιρετική υποκατηγορία 1A, σύμφωνα με το GHS του ΟΗΕ (1), καθώς και σε συνδυασμό των υποκατηγοριών 1B και 1C (21)(22)(23). Ένας περιορισμός της παρούσας μεθόδου δοκιμών είναι ότι δεν επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ των υποκατηγοριών διαβρωτικών 1B και 1C, σύμφωνα με το GHS του ΟΗΕ και τον κανονισμό CLP, λόγω του περιορισμένου αριθμού γνωστών διαβρωτικών χημικών ουσιών *in vivo* που ανήκουν στην υποκατηγορία 1C. Τα μοντέλα δοκιμών EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE και epiCS® παρέχουν τη δυνατότητα ταξινόμησης σε υποκατηγορίες (δηλαδή 1A έναντι 1B+1C έναντι NC)

8. Ευρύ φάσμα χημικών ουσιών που αντιπροσωπεύουν κυρίως μεμονωμένες ουσίες έχουν υποβληθεί σε δοκιμή στο πλαίσιο της επικύρωσης και υποστηρίζουν τα μοντέλα δοκιμών της παρούσας μεθόδου δοκιμών, όταν χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των μη διαβρωτικών και των διαβρωτικών ουσιών· η εμπειρική βάση δεδομένων της μελέτης επικύρωσης περιλάμβανε 60 χημικές ουσίες που κάλυπταν ευρύ φάσμα χημικών κατηγοριών

([1]) Το αρκτικόλεξο RhE (=Reconstructed human Epidermis, ανασυσταθείσα ανθρώπινη επιδερμίδα) χρησιμοποιείται για όλα τα μοντέλα που βασίζονται στην τεχνολογία RhE. Το αρκτικόλεξο RHE, όπως χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το μοντέλο SkinEthic™, έχει την ίδια σημασία, αλλά, ως μέρος του ονόματος της συγκεκριμένης μεθόδου δοκιμών, όπως αυτή διατίθεται στο εμπόριο, γράφεται ολόκληρο με κεφαλαία γράμματα.

▼M8

(8)(9)(10). Προκειμένου να καταδείξουν την ευαισθησία, την ειδικότητα, την ορθότητα και την αναπαραγωγιμότητα στο εργαστήριο της δοκιμής για ταξινόμηση σε υποκατηγορίες, οι φορείς ανάπτυξης της μεθόδου δοκιμών διεξήγαγαν δοκιμές, τα αποτελέσματα των οποίων επανεξέτασε ο ΟΟΣΑ (21) (22) (23). Με βάση τα συνολικά διαθέσιμα δεδομένα, η μέθοδος δοκιμών είναι εφαρμοστέα σε ευρύ φάσμα χημικών κατηγοριών και φυσικών καταστάσεων, περιλαμβανομένων υγρών, ημιστερεών, στερεών και κηρών. Τα υγρά μπορεί να είναι υδατικά ή μη και τα στερεά μπορεί να είναι υδατοδιαλυτά ή μη. Τα στερεά πρέπει, κατά το δυνατόν, να μετατρέπονται σε λεπτόκοκκη σκόνη πριν από την εφαρμογή· δεν απαιτείται άλλη προκατεργασία του δείγματος. Εάν υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι τα μοντέλα δοκιμών που περιλαμβάνονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών δεν μπορούν να εφαρμοστούν σε συγκεκριμένη κατηγορία υπό δοκιμή χημικών ουσιών, τα εν λόγω μοντέλα δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για τη συγκεκριμένη κατηγορία ουσιών. Επιπλέον, η παρούσα μέθοδος δοκιμών θεωρείται ότι μπορεί να εφαρμοστεί σε μείγματα κατ' επέκταση της εφαρμοσιμότητάς της σε ουσίες. Εντούτοις, λόγω του γεγονότος ότι τα μείγματα καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα κατηγοριών και σύστασης, καθώς και του ότι οι πληροφορίες σχετικά με τις δοκιμές μειγμάτων είναι επί του παρόντος περιορισμένες, όταν υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι η μέθοδος δοκιμών δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε συγκεκριμένη κατηγορία μειγμάτων [π.χ. βάσει στρατηγικής, όπως προτείνεται στο (26)], η μέθοδος δοκιμών δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τη συγκεκριμένη κατηγορία μειγμάτων. Πριν από τη χρήση της μεθόδου δοκιμών σε μείγμα για την παραγωγή δεδομένων για συγκεκριμένο κανονιστικό σκοπό, θα πρέπει να εξετάζεται αν –και, εάν ναι, για ποιον λόγο– μπορεί να αποδώσει αποτελέσματα κατάλληλα για τον επιδιωκόμενο σκοπό. Τέτοια εξέταση δεν χρειάζεται όταν οι κανονιστικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τον έλεγχο του μείγματος. Αέρια και αερολύματα δεν έχουν ακόμη αξιολογηθεί με μελέτες επικύρωσης (8)(9)(10). Παρότι η τεχνολογία RhE μπορεί θεωρητικά να χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή αερίων και αερολυμάτων, αυτά δεν μπορούν να εξεταστούν με την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

9. Υπό δοκιμή χημικές ουσίες που απορροφούν το φως στο ίδιο φάσμα με το άλας φορμαζάνης ΜΤΤ και υπό δοκιμή χημικές ουσίες ικανές να ανάγουν άμεσα τη χρωστική ζωτικής χρώσης ΜΤΤ (σε άλας φορμαζάνης ΜΤΤ) μπορεί να παρεμποδίζουν τις μετρήσεις βιωσιμότητας των ιστών, καθιστώντας αναγκαία τη χρήση προσαρμοσμένων μαρτύρων για διορθώσεις. Το είδος των προσαρμοσμένων μαρτύρων που μπορεί να απαιτούνται ποικίλλει ανάλογα με το είδος της παρεμποδιστικής δράσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και της χρησιμοποιούμενης διαδικασίας μέτρησης του άλατος φορμαζάνης ΜΤΤ (βλ. παραγράφους 25-31).

10. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν παρέχει επαρκείς πληροφορίες σχετικά με τον ερεθισμό του δέρματος, αλλά η μέθοδος δοκιμών Β.46 αφορά ειδικά τον ερεθισμό του δέρματος *in vitro* και βασίζεται στο ίδιο σύστημα δοκιμών RhE, αν και χρησιμοποιεί άλλο πρωτόκολλο (5). Για την πλήρη αξιολόγηση των τοπικών επιδράσεων στο δέρμα μετά από εφάπαξ έκθεση του δέρματος, ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ για τις ολοκληρωμένες προσεγγίσεις για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση (6). Η εν λόγω προσέγγιση ΙΑΤΑ περιλαμβάνει την εκτέλεση δοκιμών *in vitro* για διάβρωση του δέρματος (όπως περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο) και ερεθισμό του δέρματος, πριν εξεταστεί το ενδεχόμενο διεξαγωγής δοκιμών σε ζωντανά ζώα. Είναι γνωστό ότι η χρήση ανθρώπινου δέρματος υπόκειται σε εθνικούς και διεθνείς προβληματισμούς ηθικής φύσεως και δεοντολογικούς όρους.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

11. Η υπό δοκιμή χημική ουσία εφαρμόζεται τοπικά σε τρισδιάστατο μοντέλο RhE, το οποίο αποτελείται από μη μετασχηματισμένα επιδερμικά κερατινοκύτταρα ανθρώπινης προέλευσης που έχουν καλλιεργηθεί ώστε να σχηματίσουν πολυστρωματικό μοντέλο της ανθρώπινης επιδερμίδας με υψηλή διαφοροποίηση. Το μοντέλο αυτό συνίσταται από τις εξής οργανωμένες στιβάδες: βασική, ακανθώδη και κοκκώδη, καθώς και από πολυστρωματική κεράτινη στιβάδα που περιέχει μεσοκυττάρια στρώματα λιπιδίων που αντιπροσωπεύουν τις κυριότερες κατηγορίες λιπιδίων, ανάλογα με εκείνα που συναντώνται *in vivo*.

▼M8

12. Η μέθοδος δοκιμών RhE βασίζεται στην παραδοχή ότι οι διαβρωτικές χημικές ουσίες είναι ικανές να διεισδύουν στην κεράτινη στιβάδα μέσω διάχυσης ή διάβρωσης, και είναι κυτταροτοξικές για τα κύτταρα των υποκείμενων στιβάδων. Η κυτταρική βιωσιμότητα μετράται με βάση την ενζυμική μετατροπή της χρωστικής ζωτικής χρώσης MTT [βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο, βρωμιούχο τετραζόλιο–κυανό του θειαζολυλίου, αριθ. CAS 298-93-1] σε κυανό άλας φορμαζάνης, το οποίο προσδιορίζεται ποσοτικά μετά την εκχύλισή του από τους ιστούς (27). Οι διαβρωτικές χημικές ουσίες αναγνωρίζονται από την ικανότητά τους να μειώνουν την κυτταρική βιωσιμότητα σε επίπεδα χαμηλότερα από καθορισμένα κατώφλια (βλ. παραγράφους 35 και 36). Η μέθοδος δοκιμών διάβρωσης του δέρματος βάσει RhE έχει αποδειχθεί ότι παρέχει δυνατότητα πρόβλεψης των διαβρωτικών επιδράσεων που παρατηρούνται στο δέρμα *in vivo* με αξιολόγηση σε κουνέλια, σύμφωνα με τη μέθοδο δοκιμών B.4 (2).

ΑΠΟΔΕΙΞΗ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

13. Πριν εντάξουν στην καθημερινή πρακτική οποιοδήποτε από τα τέσσερα επικυρωμένα μοντέλα δοκιμών RhE που συμμορφώνονται με την παρούσα μέθοδο δοκιμών, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα ταξινομώντας σωστά τις δώδεκα ουσίες ελέγχου ικανότητας που απαριθμούνται στον πίνακα 1. Σε περίπτωση χρήσης μιας μεθόδου για ταξινόμηση σε υποκατηγορίες, θα πρέπει επίσης να αποδεικνύεται η ικανότητα ορθής ταξινόμησης σε υποκατηγορίες. Σε περιπτώσεις όπου μια απαριθμούμενη ουσία δεν είναι διαθέσιμη, ή εφόσον αυτό δικαιολογείται, μπορεί να χρησιμοποιείται άλλη ουσία για την οποία υπάρχουν επαρκή δεδομένα αναφοράς *in vivo* και *in vitro* [π.χ. από τον κατάλογο χημικών ουσιών αναφοράς (24)], υπό την προϋπόθεση ότι εφαρμόζονται τα ίδια κριτήρια επιλογής που περιγράφονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1

Κατάλογος ουσιών ελέγχου ικανότητας [1]

Ουσία	Αριθμός CAS	Χημική κατηγορία [2]	Κατηγορία GHS του OHE/CLP βασιζόμενη σε αποτελέσματα *in vivo* [3]	Κατηγορία VRM βασιζόμενη σε αποτελέσματα *in vitro* [4]	Αναγωγικό της MTT [5]	Φυσική κατάσταση
Διαβρωτικά υποκατηγορίας 1A *in vivo*						
Βρωμοοξικό οξύ	79-08-3	Οργανικό οξύ	1A	(3) 1A	—	Σ
Τριφθοριούχο βόριο διένυδρο	13319-75-0	Ανόργανο οξύ	1A	(3) 1A	—	Υ
Φαινόλη	108-95-2	Φαινόλη	1A	(3) 1A	—	Σ
Χλωριούχο διχλωροακετύλιο	79-36-7	Ηλεκτρονιόφιλο	1A	(3) 1A	—	Υ
Συνδυασμός διαβρωτικών υποκατηγοριών 1B+1C *in vivo*						
Γλυοξυλικό οξύ μονοένυδρο	563-96-2	Οργανικό οξύ	1B+1C	(3) 1B+1C	—	Σ
Γαλακτικό οξύ	598-82-3	Οργανικό οξύ	1B+1C	(3) 1B+1C	—	Υ
Αιθανολαμίνη	141-43-5	Οργανική βάση	1B	(3) 1B+1C	Ναι	Παχύρρευστο

▼**M8**

Ουσία	Αριθμός CAS	Χημική κατηγορία ([2])	Κατηγορία GHS του ΟΗΕ/CLP βασιζόμενη σε αποτελέσματα *in vivo* ([3])	Κατηγορία VRM βασιζόμενη σε αποτελέσματα *in vitro* ([4])	Αναγωγικό της MTT ([5])	Φυσική κατάσταση
Διαβρωτικά υποκατηγορίας 1Α *in vivo*						
Υδροχλωρικό οξύ (14,4 %)	7647-01-0	Ανόργανο οξύ	1B+1C	(3) 1B+1C	—	Υ
Μη διαβρωτικά *in vivo*						
Φαιναιθυλοβρωμίδιο	103-63-9	Ηλεκτρονιόφιλο	NC	(3) NC	Ναι	Υ
4-Αμινο-1,2,4-τριαζόλιο	584-13-4	Οργανική βάση	NC	(3) NC	—	Σ
4-(Μεθυλοθειο)-βενζαλδεΰδη	3446-89-7	Ηλεκτρονιόφιλο	NC	(3) NC	Ναι	Υ
Λαυρικό οξύ	143-07-7	Οργανικό οξύ	NC	(3) NC	—	Σ

Συντμήσεις: CASRN = αριθμός μητρώου της υπηρεσίας Chemical Abstracts Service, VRM = επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς, NC = μη διαβρωτικό, S = στερεό, L = υγρό

([1]) Οι ουσίες ελέγχου ικανότητας, ταξινομημένες πρώτα βάσει της διάκρισης διαβρωτικών έναντι μη διαβρωτικών, κατόπιν βάσει υποκατηγορίας διαβρωτικών και, στη συνέχεια, βάσει χημικής κατηγορίας, επιλέχθηκαν μεταξύ των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες επικύρωσης ECVAM EpiSkin™ και EpiDerm™ (8) (9) (10) καθώς και από τις μετεπικυρωτικές μελέτες με βάση δεδομένα που παρείχαν οι φορείς ανάπτυξης των EpiSkin™ (22), EpiDerm™, SkinEthic™ και epiCS® (23). Εκτός εάν αναφέρεται διαφορετικά, οι ουσίες υποβλήθηκαν σε δοκιμή στο επίπεδο καθαρότητας που είχαν κατά την αγορά τους από εμπορική πηγή (8) (10). Η επιλογή περιλαμβάνει, στο μέτρο του δυνατού, ουσίες οι οποίες: i) είναι αντιπροσωπευτικές του φάσματος αποκρίσεων διαβρωτικότητας (π.χ. μη διαβρωτικές, ήπια έως ισχυρά διαβρωτικές) το οποίο οι επικυρωμένες μέθοδοι αναφοράς είναι ικανές να μετρούν ή να προβλέπουν, ii) είναι αντιπροσωπευτικές των χημικών κατηγοριών που χρησιμοποιούνται στις μελέτες επικύρωσης, iv) έχουν καλά προσδιορισμένες χημικές δομές, iv) επάγουν αναπαραγώγιμα αποτελέσματα στην επικυρωμένη μέθοδο αναφοράς, v) επάγουν οριστικά αποτελέσματα στη μέθοδο δοκιμών *in vivo* αναφοράς, vi) διατίθενται στο εμπόριο, και vii) δεν έχουν απαγορευτικό κόστος απόρριψης.

([2]) Η χημική κατηγορία αποδίδεται κατά Barratt *et al.* (8).

([3]) Οι αντίστοιχες ομάδες συσκευασίας του ΟΗΕ είναι I, II και III αντίστοιχα για τις κατηγορίες 1Α, 1Β και 1C του GHS του ΟΗΕ / του κανονισμού CLP.

([4]) Οι προβλέψεις των *in vitro* επικυρωμένων μεθόδων αναφοράς που περιλαμβάνονται στον παρόντα πίνακα ελήφθησαν με τα μοντέλα δοκιμών EpiSkin™ και EpiDerm™ (VRM) με μετεπικυρωτικές δοκιμές που εκτέλεσαν οι φορείς ανάπτυξης της μεθόδου δοκιμών.

([5]) Οι τιμές βιωσιμότητας που ελήφθησαν με τις μελέτες επικύρωσης της διάβρωσης του δέρματος ECVAM δεν διορθώθηκαν ως προς την άμεση αναγωγή της MTT (στις μελέτες επικύρωσης δεν χρησιμοποιήθηκαν αδρανοποιημένοι μάρτυρες). Ωστόσο, τα μετεπικυρωτικά δεδομένα που παρείχαν οι φορείς ανάπτυξης της μεθόδου δοκιμών και τα οποία παρουσιάζονται στον παρόντα πίνακα ελήφθησαν με προσαρμοσμένους μάρτυρες (23).

14. Στο πλαίσιο της διαδικασίας απόδειξης ικανότητας, συνιστάται να ελέγχουν οι χρήστες τις ιδιότητες φραγμού των ιστών, κατά τις προδιαγραφές του παρασκευαστή του μοντέλου RhE, μετά την παραλαβή τους. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία στις περιπτώσεις μεταφοράς των ιστών σε μεγάλες αποστάσεις/με μεγάλη διάρκεια. Μετά την επιτυχή εδραίωση της μεθόδου δοκιμών και αφού αποδειχθεί η ικανότητα χρήσης της, ο εν λόγω έλεγχος δεν είναι απαραίτητος ως συνήθης πρακτική. Παρόλα αυτά, όταν η μέθοδος δοκιμών εισάγεται στη συνήθη πρακτική, συνιστάται να συνεχίζεται η αξιολόγηση των ιδιοτήτων φραγμού σε τακτά διαστήματα.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

15. Στη συνέχεια παρατίθεται γενική περιγραφή των στοιχείων και των διαδικασιών των μοντέλων δοκιμών RhE για την αξιολόγηση της διάβρωσης του δέρματος που καλύπτει η παρούσα μέθοδος δοκιμών. Τα μοντέλα RhE που έχουν αναγνωριστεί ως επιστημονικώς έγκυρα για χρήση με την παρούσα μέθοδο δοκιμών, δηλ. τα μοντέλα EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE και epiCS® (16)(17)(19)(28)(29)(30)(31)(32)(33), μπορούν να ληφθούν από εμπορικές πηγές. Για τα εν λόγω τέσσερα μοντέλα RhE υπάρχουν διαθέσιμες τυποποιημένες διαδικασίες (SOP) (34)(35)(36)(37), και τα κύρια στοιχεία των μεθόδων δοκιμών παρουσιάζονται συνοπτικά στο προσάρτημα 2. Κατά την εφαρμογή και τη χρήση ενός εξ αυτών των μοντέλων

▼M8

στο εργαστήριο, συνιστάται να λαμβάνονται υπόψη οι σχετικές τυποποιημένες διαδικασίες. Η διεξαγωγή δοκιμών με τα τέσσερα μοντέλα δοκιμών RhE που καλύπτονται από την παρούσα μέθοδο δοκιμών θα πρέπει να εκπληρώνει τις ακόλουθες προϋποθέσεις:

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ RHE

Γενικοί όροι

16. Πρέπει να χρησιμοποιούνται μη μετασχηματισμένα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα για την ανασύσταση του επιθηλίου. Πρέπει να υπάρχουν πολλαπλές στιβάδες βιώσιμων επιθηλιακών κυττάρων (βασική, ακανθώδης, κοκκώδης) κάτω από λειτουργική κεράτινη στιβάδα. Η κεράτινη στιβάδα πρέπει να είναι πολυστρωματική και να διαθέτει τα αναγκαία λιπιδικά χαρακτηριστικά ώστε να δημιουργεί ισχυρό λειτουργικό φραγμό, ανθεκτικό στην ταχεία διείσδυση κυτταροτοξικών χημικών ουσιών συγκριτικής αξιολόγησης, π.χ. δωδεκυλοσουλφονικού νατρίου (SDS) ή Triton X-100. Η λειτουργία φραγμού πρέπει να καταδεικνύεται και είναι δυνατόν να εκτιμηθεί με προσδιορισμό είτε της συγκέντρωσης στην οποία μια χημική ουσία συγκριτικής αξιολόγησης μειώνει τη βιωσιμότητα των ιστών κατά 50 % (IC_{50}), μετά από καθορισμένο χρόνο έκθεσης, είτε του χρόνου έκθεσης που απαιτείται για να μειωθεί η κυτταρική βιωσιμότητα κατά 50 % (ET_{50}) μετά την εφαρμογή καθορισμένης συγκέντρωσης της χημικής ουσίας συγκριτικής αξιολόγησης (βλ. παράγραφο 18). Οι ιδιότητες συγκράτησης του μοντέλου RhE πρέπει να αποτρέπουν τη διέλευση του υλικού γύρω από την κεράτινη στιβάδα μέχρι τον βιώσιμο ιστό, η οποία θα συνεπαγόταν ατελή μοντελοποίηση της έκθεσης του δέρματος. Το μοντέλο RhE πρέπει να μην έχει μολυνθεί από βακτήρια, ιούς, μυκοπλάσματα ή μύκητες.

Λειτουργικοί όροι

Βιωσιμότητα

17. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της βιωσιμότητας χρησιμοποιείται η δοκιμασία MTT (27). Τα βιώσιμα κύτταρα του ιστικού μορφώματος RhE ανάγουν τη χρωστική ζωτικής χρώσης MTT σε κυανό ίζημα άλατος φορμαζάνης MTT, το οποίο εκχυλίζεται στη συνέχεια από τον ιστό με χρήση ισοπροπανόλης (ή παρεμφερούς διαλύτη). Η οπτική πυκνότητα (OD) του διαλύτη εκχύλισης πρέπει να είναι αρκούντως χαμηλή, δηλ. μικρότερη από 0,1. Το εκχυλιζόμενο άλας φορμαζάνης MTT μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά είτε με χρήση τυπικής μέτρησης απορρόφησης (OD) είτε μέσω διαδικασίας HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας (38). Οι χρήστες του μοντέλου RhE πρέπει να εξασφαλίζουν ότι κάθε παρτίδα του μοντέλου RhE πληροί καθορισμένα κριτήρια για τον αρνητικό μάρτυρα. Ο φορέας ανάπτυξης/προμηθευτής του μοντέλου RhE θα πρέπει να προσδιορίζει πεδίο τιμών αποδοχής (ανώτερο και κατώτερο όριο) για τις τιμές OD αρνητικού μάρτυρα. Τα πεδία τιμών αποδοχής για τις τιμές OD αρνητικού μάρτυρα για τα τέσσερα επικυρωμένα μοντέλα δοκιμών RhE που περιλαμβάνονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών φαίνονται στον πίνακα 2. Ένας χρήστης HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας θα πρέπει να χρησιμοποιεί τα πεδία τιμών OD αρνητικού μάρτυρα που φαίνονται στον πίνακα 2 ως κριτήριο αποδοχής για τον αρνητικό μάρτυρα. Πρέπει να τεκμηριώνεται ότι οι ιστοί που υποβάλλονται σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα είναι σταθεροί σε καλλιέργεια (οι μετρήσεις OD παρέχουν παραπλήσιες τιμές) για τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης.

Πίνακας 2

Πεδία τιμών αποδοχής για τις τιμές OD αρνητικού μαρτύρα για τον έλεγχο της ποιότητας της παρτίδας

	Κατώτερο όριο αποδοχής	Ανώτερο όριο αποδοχής
EpiSkin™ (SM)	> 0,6	< 1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	> 0,8	< 2,8
SkinEthic™ RHE	> 0,8	< 3,0
epiCS®	> 0,8	< 2,8

▼M8

Λειτουργία φραγμού

18. Η κεράτινη στιβάδα και η λιπιδική της σύσταση πρέπει να ανθίστανται επαρκώς στην ταχεία διείσδυση κυτταροτοξικών χημικών ουσιών συγκριτικής αξιολόγησης (π.χ. SDS ή Triton X-100), όπως εκτιμάται με τη βοήθεια της τιμής IC_{50} ή ET_{50} (πίνακας 3). Η φραγματική λειτουργία κάθε παρτίδας του μοντέλου RhE θα πρέπει να καταδεικνύεται από τον φορέα ανάπτυξης/πωλητή του μοντέλου RhE κατά την προμήθεια των ιστών στον τελικό χρήστη (βλ. παράγραφο 21).

Μορφολογία

19. Το μοντέλο RhE πρέπει να υποβάλλεται σε ιστολογική εξέταση από την οποία να προκύπτει πολυστρωματική δομή όμοια με αυτή της ανθρώπινης επιδερμίδας, που να περιλαμβάνει βασική, ακανθώδη, κοκκώδη και κεράτινη στιβάδα, και από την οποία να προκύπτουν λιπιδικά χαρακτηριστικά όμοια με εκείνα της ανθρώπινης επιδερμίδας. Κατά την προμήθεια των ιστών στον τελικό χρήστη, ο φορέας ανάπτυξης/πωλητής του μοντέλου RhE θα πρέπει να παρέχει ιστολογική εξέταση κάθε χρησιμοποιούμενης παρτίδας του εν λόγω μοντέλου από την οποία να προκύπτει κατάλληλη μορφολογία των ιστών (βλ. παράγραφο 21).

Αναπαραγωγιμότητα

20. Οι χρήστες της μεθόδου δοκιμών πρέπει να καταδεικνύουν τη διαχρονική αναπαραγωγιμότητα των μεθόδων δοκιμών με τους θετικούς και τους αρνητικούς μάρτυρες. Επιπλέον, η μέθοδος δοκιμών θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο εάν ο φορέας ανάπτυξης/προμηθευτής του μοντέλου RhE παρέχει στοιχεία βάσει των οποίων προκύπτει η διαχρονική αναπαραγωγιμότητα με διαβρωτικές και μη διαβρωτικές χημικές ουσίες που προέρχονται π.χ. από τον κατάλογο ουσιών ελέγχου ικανότητας (πίνακας 1). Σε περίπτωση χρήσης μεθόδου δοκιμών για ταξινόμηση σε υποκατηγορίες, θα πρέπει επίσης να αποδεικνύεται η αναπαραγωγιμότητα όσον αφορά την ικανότητα ταξινόμησης σε υποκατηγορίες.

Έλεγχος ποιότητας

21. Το μοντέλο RhE θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο εφόσον ο φορέας ανάπτυξης/προμηθευτής αποδεικνύει ότι κάθε παρτίδα του μοντέλου RhE ανταποκρίνεται σε καθορισμένα κριτήρια αποδέσμευσης παρτίδων παραγωγής, τα σημαντικότερα από τα οποία είναι εκείνα που αφορούν τη *βιωσιμότητα* (παράγραφος 17), τη *λειτουργία φραγμού* (παράγραφος 18) και τη *μορφολογία* (παράγραφος 19). Τα στοιχεία αυτά γνωστοποιούνται στους χρήστες της μεθόδου δοκιμών ώστε αυτοί να μπορούν να τα συμπεριλάβουν στην έκθεση δοκιμής. Δεκτά για την αξιόπιστη πρόβλεψη της ταξινόμησης ως προς τη διάβρωση μπορούν να γίνουν μόνο αποτελέσματα που έχουν ληφθεί με παρτίδες ιστών οι οποίες πληρούν τα κριτήρια ελέγχου ποιότητας. Ο φορέας ανάπτυξης/προμηθευτής του μοντέλου RhE θα πρέπει να προσδιορίζει πεδίο τιμών αποδοχής (ανώτερο και κατώτερο όριο) για τα IC50 ή ET50. Τα πεδία τιμών αποδοχής για τα τέσσερα επικυρωμένα μοντέλα δοκιμών φαίνονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3

Κριτήρια ελέγχου ποιότητας για την αποδέσμευση παρτίδων

	Κατώτερο όριο αποδοχής	Ανώτερο όριο αποδοχής
EpiSkin™ (SM) (αγωγή διάρκειας 18 ωρών με SDS) (33)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (34)	ET50 = 4,0 ώρες	ET50 = 8,7 ώρες
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (35)	ET50 = 4,0 ώρες	ET50 = 10,0 ώρες
epiCS® (1 % Triton X-100) (36)	ET50 = 2,0 ώρες	ET50 = 7,0 ώρες

▼M8

Εφαρμογή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των χημικών ουσιών-μαρτύρων

22. Για κάθε χρόνο έκθεσης θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον δύο πανομοιότυπα δείγματα ιστών για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία και για τους μάρτυρες. Προκειμένου τόσο για υγρές όσο και για στερεές χημικές ουσίες, πρέπει να εφαρμόζεται επαρκής ποσότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ώστε να καλύπτεται ομοιόμορφα η επιφάνεια της επιδερμίδας και, ταυτόχρονα, να αποφεύγονται οι πλεονάζουσες δόσεις, δηλ. πρέπει να χρησιμοποιούνταιτουλάχιστον 70 μl/cm^2 ή 30 mg/cm^2. Ανάλογα με τα μοντέλα, στην περίπτωση των στερεών χημικών ουσιών, η επιφάνεια της επιδερμίδας πρέπει να υγραίνεται με απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό πριν από την εφαρμογή, ώστε να βελτιώνεται η επαφή της με την υπό δοκιμή χημική ουσία (34)(35)(36)(37). Τα στερεά θα πρέπει, κατά το δυνατόν, να ελέγχονται σε μορφή λεπτόκοκκης σκόνης. Η μέθοδος εφαρμογής θα πρέπει να είναι η κατάλληλη για την υπό δοκιμή χημική ουσία [βλ. π.χ. παραπομπές (34-37)]. Στο τέλος της περιόδου έκθεσης, η υπό δοκιμή χημική ουσία πρέπει να εκπλένεται επιμελώς από την επιδερμίδα με υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα ή με διάλυμα NaCl 0,9 %. Ανάλογα με το ποιο από τα τέσσερα επικυρωμένα μοντέλα δοκιμών RhE χρησιμοποιείται, ανά υπό δοκιμή χημική ουσία χρησιμοποιούνται δύο ή τρεις περίοδοι έκθεσης (για τα τέσσερα έγκυρα μοντέλα RhE: 3 λεπτά και 1 ώρα· για το EpiSkin™, πρόσθετος χρόνος έκθεσης 4 ωρών). Ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο μοντέλο δοκιμών RhE και την περίοδο έκθεσης της αξιολόγησης, η θερμοκρασία επώασης κατά την έκθεση μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ της θερμοκρασίας δωματίου και των 37 °C.

23. Σε κάθε σειρά δοκιμών θα πρέπει να χρησιμοποιούνται παράλληλοι θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες (PC) για να αποδεικνύεται ότι η βιωσιμότητα (με τους αρνητικούς μάρτυρες), η λειτουργία φραγμού και η προκύπτουσα ευαισθησία (με τον PC) των ιστών περιλαμβάνονται εντός καθορισμένου ιστορικού πεδίου τιμών αποδοχής. Οι προτεινόμενες ως θετικοί μάρτυρες χημικές ουσίες είναι το άνυδρο οξικό οξύ και το διάλυμα KOH 8N, ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο μοντέλο RhE. Επισημαίνεται ότι το KOH 8N είναι άμεσο αναγωγικό της MTT για το οποίο ενδέχεται να απαιτούνται προσαρμοσμένοι μάρτυρες, όπως αναφέρεται στις παραγράφους 25 και 26. Ως αρνητικοί μάρτυρες προτείνονται το διάλυμα NaCl 0,9 % κ.ό. ή το νερό.

Μετρήσεις της κυτταρικής βιωσιμότητας

24. Η δοκιμασία MTT αποτελεί ποσοτική μέθοδο η οποία πρέπει να χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών (27). Το δείγμα ιστού φέρεται σε διάλυμα MTT κατάλληλης συγκέντρωσης (0,3 ή 1 mg/mL), όπου αφήνεται να παραμείνει επί τρίωρο. Στη συνέχεια, το σχηματιζόμενο κυανό ίζημα φορμαζάνης εκχυλίζεται από τον ιστό με διαλύτη (π.χ. ισοπροπανόλη, όξινο διάλυμα ισοπροπανόλης) και η συγκέντρωση της φορμαζάνης μετράται με προσδιορισμό της OD σε μήκος κύματος 570 nm, με φίλτρο μέγιστης ζώνης διάβασης ± 30 nm, ή μέσω διαδικασίας HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας (βλ. παραγράφους 30 και 31) (38).

25. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορεί να παρεμποδίσουν τη δοκιμασία MTT επειδή ανάγουν άμεσα την MTT σε κυανή φορμαζάνη MTT και/ή επειδή δρουν παρεμποδιστικά ως έγχρωμες ουσίες, σε περίπτωση που η υπό δοκιμή χημική ουσία απορροφά το φως, εκ φύσεως ή λόγω της αγωγής, στο ίδιο φάσμα με τη φορμαζάνη (570 ± 30 nm, κυρίως κυανές και ιώδεις χημικές ουσίες). Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσθετοι μάρτυρες για την ανίχνευση και διόρθωση τυχόν παρεμπόδισης από τέτοιες ουσίες, όπως ο μάρτυρας μη ειδικής αναγωγής MTT (NSMTT) και ο μάρτυρας μη ειδικού χρώματος (NSC) (βλ. παραγράφους 26 έως 30). Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό όταν μια συγκεκριμένη υπό δοκιμή χημική ουσία δεν απομακρύνεται ολοκληρωτικά από τον ιστό μέσω έκπλυσης ή όταν διαπερνά την επιδερμίδα και, ως εκ τούτου, εξακολουθεί να είναι παρούσα στους ιστούς κατά την εκτέλεση της δοκιμής βιωσιμότητας MTT. Ο τρόπος διόρθωσης της άμεσης αναγωγής της MTT και της παρεμποδιστικής δράσης των έγχρωμων ουσιών περιγράφεται λεπτομερώς στις SOP των μοντέλων δοκιμών (34)(35)(36)(37).

▼M8

26. Για τον προσδιορισμό των άμεσων αναγωγικών της ΜΤΤ, κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να προστίθεται σε πρόσφατο μέσο ΜΤΤ (34) (35) (36) (37). Εάν το μείγμα ΜΤΤ που περιέχει την υπό δοκιμή χημική ουσία αποκτήσει κυανό/ιώδες χρώμα, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται ότι ανάγει άμεσα την ΜΤΤ και, επομένως, θα πρέπει να διενεργείται περαιτέρω λειτουργικός έλεγχος στη μη βιώσιμη επιδερμίδα, ανεξάρτητα από τη χρήση της τυπικής μέτρησης απορρόφησης (OD) ή της διαδικασίας HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας. Σε αυτόν τον πρόσθετο λειτουργικό έλεγχο χρησιμοποιούνται αδρανοποιημένοι ιστοί με υπολειμματική μόνο μεταβολική δραστηριότητα, οι οποίοι, ωστόσο, απορροφούν την υπό δοκιμή χημική ουσία σε ποσότητα παρόμοια με τους βιώσιμους ιστούς. Κάθε αναγωγική της ΜΤΤ χημική ουσία εφαρμόζεται σε τουλάχιστον δύο αδρανοποιημένα πανομοιότυπα δείγματα ιστού ανά περίοδο έκθεσης, τα οποία υποβάλλονται σε όλα τα στάδια της δοκιμής διάβρωσης του δέρματος. Στη συνέχεια, εκτιμάται η πραγματική βιωσιμότητα των ιστών ως η εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών που μετρήθηκε με ζωντανούς ιστούς που εκτέθηκαν στο αναγωγικό της ΜΤΤ, μείον την εκατοστιαία μη ειδική αναγωγή της ΜΤΤ που μετρήθηκε με τους αδρανοποιημένους ιστούς που εκτέθηκαν στο ίδιο αναγωγικό της ΜΤΤ, υπολογιζόμενη σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα που ελέγχθηκε ταυτόχρονα με την υπό διόρθωση δοκιμή (%NSMTT).

27. Για τον προσδιορισμό της πιθανής παρεμπόδισης από έγχρωμες υπό δοκιμή χημικές ουσίες ή υπό δοκιμή χημικές ουσίες που χρωματίζονται όταν έρχονται σε επαφή με νερό ή ισοπροπανόλη και τη λήψη απόφασης σχετικά με την ανάγκη χρήσης πρόσθετων μαρτύρων, θα πρέπει να εκτελείται φασματική ανάλυση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο νερό (περιβάλλον κατά την έκθεση) και/ή σε ισοπροπανόλη (διάλυμα εκχύλισης). Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία στο νερό και/ή σε ισοπροπανόλη απορροφά το φως σε φάσμα μηκών κύματος 570 ± 30 nm, πρέπει ναχρησιμοποιούνται πρόσθετοι μάρτυρες χρωστικής, ή, εναλλακτικά, θα πρέπει να χρησιμοποιείται διαδικασία HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας, οπότε και δεν χρειάζονται τέτοιοι μάρτυρες (βλ. παραγράφους 30 και 31). Κατά την πραγματοποίηση της τυπικής μέτρησης απορρόφησης (OD), κάθε έγχρωμη υπό δοκιμή χημική ουσία με παρεμποδιστική δράση εφαρμόζεται τουλάχιστον σε δύο πανομοιότυπα δείγματα βιώσιμου ιστού, τα οποία υποβάλλονται σε όλα τα στάδια της δοκιμής διάβρωσης του δέρματος αλλά επωάζονται με θρεπτικό μέσο αντί διαλύματος ΜΤΤ κατά το στάδιο της επώασης της ΜΤΤ προκειμένου να χρησιμεύσουν ως μάρτυρες μη ειδικού χρώματος (NSC_{living}). Ο έλεγχος μάρτυρα NSC_{living} πρέπει να διενεργείται ταυτόχρονα ανά περίοδο έκθεσης και ανά έγχρωμη υπό δοκιμή χημική ουσία (σε κάθε σειρά δοκιμών) λόγω της εγγενούς βιολογικής μεταβλητότητας των ζωντανών ιστών. Στη συνέχεια εκτιμάται η πραγματική βιωσιμότητα των ιστών ως η εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών που μετρήθηκε με ζωντανούς ιστούς που εκτέθηκαν στην παρεμποδιστική υπό δοκιμή χημική ουσία και επωάστηκαν με το διάλυμα ΜΤΤ μείον την εκατοστιαία μη ειδική εμφάνιση χρώματος που μετρήθηκε με τους ζωντανούς ιστούς που εκτέθηκαν στην παρεμποδιστική υπό δοκιμή χημική ουσία και επωάστηκαν με θρεπτικό μέσο χωρίς ΜΤΤ ταυτόχρονα με την υπό διόρθωση δοκιμή ($\%NSC_{living}$).

28. Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες που διαπιστώνεται ότι προκαλούν άμεση αναγωγή της ΜΤΤ (βλ. παράγραφο 26) και παρεμπόδιση λόγω χρώματος (βλ. παράγραφο 27) θα απαιτηθεί επίσης ένα τρίτο σύνολο μαρτύρων, πέραν των μαρτύρων NSMTT και NSC_{living} που περιγράφηκαν στις προηγούμενες παραγράφους, κατά την τυπική μέτρηση απορρόφησης (OD). Αυτό συμβαίνει συνήθως σε περιπτώσεις σκουρόχρωμων υπό δοκιμή χημικών ουσιών που παρεμποδίζουν τη δοκιμασία ΜΤΤ (π.χ. κυανές, ιώδεις, μαύρες), διότι το εγγενές χρώμα τους παρεμποδίζει την αξιολόγηση της ικανότητάς τους να ανάγουν απευθείας την ΜΤΤ όπως περιγράφεται στην παράγραφο 26. Οι ουσίες αυτές μπορεί να δεσμεύονται τόσο σε ζωντανούς όσο και σε αδρανοποιημένους ιστούς και, συνεπώς, ο μάρτυρας NSMTT μπορεί να διορθώσει τη δοκιμή όχι μόνο ως προς την πιθανή άμεση αναγωγή της ΜΤΤ αλλά και ως προς την παρεμπόδιση λόγω χρώματος που οφείλεται στη δέσμευση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας από τους αδρανοποιημένους ιστούς. Κατ' αυτόν τον τρόπο ενδέχεται να προκύψει διπλή διόρθωση ως προς την παρεμπόδιση λόγω χρώματος, δεδομένου ότι ο μάρτυρας NSC_{living} διορθώνει ήδη τη δοκιμή ως προς την παρεμπόδιση λόγω χρώματος που οφείλεται στη δέσμευση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας από τους ζωντανούς ιστούς. Για την αποφυγή πιθανής διπλής διόρθωσης ως προς την παρεμπόδιση λόγω χρώματος, πρέπει να χρησιμοποιείται τρίτος μάρτυρας μη ειδικής εμφάνισης

▼M8

χρώματος σε αδρανοποιημένους ιστούς (NSC_{killed}). Σε αυτόν τον πρόσθετο μάρτυρα, η υπό δοκιμή χημική ουσία εφαρμόζεται σε τουλάχιστον δύο πανομοιότυπα δείγματα αδρανοποιημένου ιστού ανά περίοδο έκθεσης, τα οποία υποβάλλονται σε όλα τα στάδια της διαδικασίας δοκιμής αλλά τα οποία επωάζονται με θρεπτικό μέσο αντί διαλύματος MTT κατά το στάδιο της επώασης MTT. Ένας μοναδικός μάρτυρας NSC_{killed} ανά υπό δοκιμή χημική ουσία αρκεί, ανεξάρτητα από τον αριθμό των ανεξάρτητων δοκιμών δοκιμών/σειρών δοκιμών που εκτελούνται, αλλά θα πρέπει να χρησιμοποιείται ταυτόχρονα με τον μάρτυρα NSMTT και, ει δυνατόν, με την ίδια παρτίδα ιστών. Στη συνέχεια εκτιμάται η πραγματική βιωσιμότητα των ιστών ως η εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών που μετρήθηκε με ζωντανούς ιστούς που εκτέθηκαν στην υπό δοκιμή χημική ουσία μείον τον %NSMTT μείον τον $\%NSC_{living}$ συν την εκατοστιαία μη ειδική εμφάνιση χρώματος που μετρήθηκε με τους αδρανοποιημένους ιστούς που εκτέθηκαν στην παρεμποδιστική υπό δοκιμή χημική ουσία και επωάστηκαν με θρεπτικό μέσο χωρίς MTT, υπολογιζόμενη σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα που χρησιμοποιήθηκε ταυτόχρονα με την υπό διόρθωση δοκιμή ($\%NSC_{killed}$).

29. Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι οι παρεμποδίσεις λόγω μη ειδικής αναγωγής της MTT και λόγω μη ειδικού χρώματος ενδέχεται να έχουν ως αποτέλεσμα να αυξηθούν οι μετρήσεις από το εκχύλισμα ιστού πάνω από την περιοχή τιμών γραμμικότητας του φασματοφωτόμετρου. Με βάση τα παραπάνω, κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθορίζει τη γραμμική περιοχή τιμών του φασματοφωτόμετρού του με φορμαζάνη MTT (CAS # 57360-69-7) από εμπορική πηγή, προτού ξεκινήσει τις δοκιμές χημικών ουσιών για κανονιστικούς σκοπούς. Ειδικότερα, η τυπική μέτρηση απορρόφησης (OD) με χρήση φασματοφωτόμετρου είναι κατάλληλη για την αξιολόγηση άμεσων αναγωγικών της MTT και υπό δοκιμή χημικών ουσιών που προκαλούν παρεμπόδιση λόγω χρώματος όταν οι τιμές OD των εκχυλισμάτων ιστών που λαμβάνονται με την υπό δοκιμή χημική ουσία χωρίς διόρθωση ως προς την άμεση αναγωγή της MTT και/ή την παρεμπόδιση λόγω χρώματος εμπίπτουν στην περιοχή γραμμικότητας του φασματοφωτόμετρου ή όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία έχει ήδη χαρακτηριστεί διαβρωτική βάσει της μη διορθωμένης εκατοστιαίας βιωσιμότητας (βλ. παραγράφους 35 και 36). Εντούτοις, τα αποτελέσματα για υπό δοκιμή χημικές ουσίες από τις οποίες προκύπτουν %NSMTT και/ή $\%NSC_{living} > 50$ % του αρνητικού μάρτυρα θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με επιφυλακτικότητα.

30. Όσον αφορά έγχρωμες υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν είναι συμβατές με την τυπική μέτρηση απορρόφησης (OD) λόγω υπερβολικά έντονης παρεμπόδισης με τη δοκιμασία MTT, μπορεί να χρησιμοποιείται η εναλλακτική διαδικασία HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας για τη μέτρηση της φορμαζάνης MTT (βλ. παράγραφο 31) (37). Το σύστημα HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας επιτρέπει τον διαχωρισμό της φορμαζάνης MTT από την υπό δοκιμή χημική ουσία πριν από τον ποσοτικό προσδιορισμό της (38). Για αυτόν τον λόγο, δεν χρειάζονται ποτέ μάρτυρες NSC_{living} ή NSC_{killed} όταν χρησιμοποιείται HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρία, ανεξάρτητα από την υπό δοκιμή χημική ουσία. Εντούτοις, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μάρτυρες NSMTT εάν υπάρχει υπόνοια ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία ανάγει άμεσα την MTT ή έχει χρώμα που παρεμποδίζει την αξιολόγηση της ικανότητας άμεσης αναγωγής της MTT (όπως περιγράφεται στην παράγραφο 26). Όταν γίνεται χρήση HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας για τη μέτρησητης φορμαζάνης MTT, η εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών υπολογίζεται ως το ποσοστό του εμβαδού της κορυφής της φορμαζάνης MTT που μετράται με ζωντανούς ιστούς που εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία σε σχέση με την κορυφή της φορμαζάνης MTT που μετράται με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα. Όσον αφορά υπό δοκιμή χημικές ουσίες που είναι ικανές να ανάγουν άμεσα την MTT, η πραγματική βιωσιμότητα των ιστών υπολογίζεται ως η εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών που μετράται με ζωντανούς ιστούς που εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία, μείον το %NSMTT. Τέλος, πρέπει να επισημανθεί ότι οι άμεσοι αναγωγείς της MTT, οι οποίοι μπορεί επίσης να έχουν παρεμποδιστική δράση λόγω χρώματος και οι οποίοι κατακρατούνται στους ιστούς μετά την αγωγή και ανάγουν την MTT σε τέτοιο βαθμό ώστε να δίνουν OD (με τυπική μέτρηση OD) ή εμβαδά κορυφών (με χρήση UPLC/HPLC-φασματοφωτομετρίας) των υπό δοκιμή εκχυλισμάτων ιστών που είναι εκτός της περιοχής γραμμικότητας του φασματοφωτόμετρου, δεν μπορούν να αξιολογηθούν, αν και δεν αναμένεται να εμφανίζονται παρά σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις.

▼M8

31. Η HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρία μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί με όλα τα είδη υπό δοκιμή χημικών ουσιών (έγχρωμων, μη έγχρωμων, αναγωγικών της MTT και μη αναγωγικών της MTT) για τη μέτρηση της φορμαζάνης της MTT (38). Λόγω της ποικιλίας των συστημάτων HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας, πριν από τη χρήση ενός τέτοιου συστήματος για τον ποσοτικό προσδιορισμό της φορμαζάνης MTT από εκχυλίσματα ιστών θα πρέπει να καταδεικνύεται η καταλληλότητά του για τον συγκεκριμένο σκοπό διά της εκπλήρωσης των κριτηρίων αποδοχής για σειρά τυποποιημένων παραμέτρων συμμόρφωσης που βασίζονται στις παραμέτρους που περιγράφονται στην καθοδήγηση της αμερικανικής Υπηρεσίας Τροφίμων και Φαρμάκων για τον κλάδο σχετικά με την επικύρωση των βιοαναλυτικών μεθόδων (38)(39). Οι εν λόγω κύριες παράμετροι και τα κριτήρια αποδοχής τους παρατίθενται στο προσάρτημα 4. Εφόσον εκπληρούνται τα κριτήρια αποδοχής που καθορίζονται στο προσάρτημα 4, το σύστημα HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας θεωρείται κατάλληλο και έτοιμο για μέτρηση της φορμαζάνης MTT υπό τις πειραματικές συνθήκες που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών.

Κριτήρια αποδοχής

32. Για κάθε μέθοδο δοκιμών που περιλαμβάνει χρήση έγκυρων μοντέλων RhE, οι ιστοί που υποβάλλονται σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα πρέπει να εμφανίζουν OD που αντικατοπτρίζει την ποιότητα των ιστών, όπως περιγράφεται στον πίνακα 2, και δεν θα πρέπει να βρίσκονται κάτω από τα ιστορικά καθορισμένα όρια. Οι ιστοί που υποβάλλονται σε αγωγή με τον θετικό μάρτυρα, δηλαδή άνυδρο οξικό οξύ ή διάλυμα KOH 8N, θα πρέπει να αντικατοπτρίζουν την ικανότητα των ιστών να αποκρίνονται σε διαβρωτική χημική ουσία υπό τις συνθήκες του μοντέλου δοκιμών (βλ. προσάρτημα 2). Η διαφορά μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού της υπό δοκιμής χημικής ουσίας και/ή των χημικών ουσιών μαρτύρων θα πρέπει να περιλαμβάνεται εντός των αποδεκτών ορίων βάσει των απαιτήσεων κάθε έγκυρου μοντέλου RhE (βλ. προσάρτημα 2) (π.χ. η διαφορά βιωσιμότητας μεταξύ των δύο πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 30 %). Σε περίπτωση που είτε ο αρνητικός είτε ο θετικός μάρτυρας που περιλαμβάνονται σε μια σειρά δοκιμών είναι εκτός των αποδεκτών πεδίων τιμών, η σειρά θεωρείται ότι δεν πληροί τα κριτήρια και θα πρέπει να διεξάγεται εκ νέου. Σε περίπτωση που η διαφορά μεταξύ των υπό δοκιμή χημικών ουσιών είναι εκτός του καθορισμένου πεδίου τιμών, οι σχετικές δοκιμές θα πρέπει να επαναλαμβάνονται.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων και μοντέλο πρόβλεψης

33. Οι τιμές OD που προκύπτουν για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό ενός εκατοστιαίου ποσοστού βιωσιμότητας σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, ο οποίος ορίζεται ίσος με 100 %. Όταν γίνεται χρήση HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας, η εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών υπολογίζεται ως το ποσοστό του εμβαδού της κορυφής της φορμαζάνης MTT που μετράται με ζωντανούς ιστούς που εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία σε σχέση με την κορυφή της φορμαζάνης MTT που μετράται με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα. Οι εκατοστιαίες τιμές αποκοπής για την κυτταρική βιωσιμότητα, που διακρίνουν τις διαβρωτικές από τις μη διαβρωτικές υπό δοκιμή χημικές ουσίες (ή τις διάφορες υποκατηγορίες διαβρωτικών), καθορίζονται κατωτέρω στις παραγράφους 35 και 36 για καθένα από τα μοντέλα δοκιμών που καλύπτει η παρούσα μέθοδος δοκιμών και θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

34. Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες των οποίων η ταξινόμηση δεν επιδέχεται αμφισβήτηση, αρκεί μία μόνο σειρά μετρήσεων, αποτελούμενη από δύο τουλάχιστον πανομοιότυπα δείγματα ιστού. Όταν όμως το αποτέλεσμα είναι οριακό, όπως σε περίπτωση ασυμφωνίας μεταξύ των μετρήσεων των πανομοιότυπων δειγμάτων, μπορεί να εξετάζεται το ενδεχόμενο εκτέλεσης δεύτερης σειράς μετρήσεων, ακόμη και τρίτης σειράς σε περίπτωση ασυμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο πρώτων σειρών.

35. Το μοντέλο πρόβλεψης για το μοντέλο δοκιμών διάβρωσης του δέρματος EpiSkin™ (9)(34)(22), που σχετίζεται το σύστημα ταξινόμησης του GHS του ΟΗΕ / του κανονισμού CLP, φαίνεται στον πίνακα 4:

▼**M8**

Πίνακας 4

Μοντέλο πρόβλεψης EpiSkin™

Βιωσιμότητα μετρούμενη βάσει χρονικών σημείων έκθεσης (t=3, 60 και 240 λεπτά)	Πρόβλεψη προς εξέταση
< 35 % μετά από έκθεση 3 λεπτών	**Διαβρωτικό:** • Προαιρετική υποκατηγορία 1A (*)
≥ 35 % μετά από έκθεση 3 λεπτών **ΚΑΙ** < 35 % μετά από έκθεση 60 λεπτών **Η** ≥ 35 % μετά από έκθεση 60 λεπτών **ΚΑΙ** < 35 % μετά από έκθεση 240 λεπτών	**Διαβρωτικό:** • Συνδυασμός προαιρετικών υποκατηγοριών 1B+1C
≥ 35 % μετά από έκθεση 240 λεπτών	**Μη διαβρωτικό**

(*) Με βάση τα δεδομένα που προέκυψαν για την αξιολόγηση της χρησιμότητας των μοντέλων δοκιμών RhE με σκοπό την υποστήριξη της ταξινόμησης σε υποκατηγορίες, καταδείχθηκε ότι περίπου 22 % των αποτελεσμάτων της υποκατηγορίας 1A του μοντέλων δοκιμών EpiSkin™ μπορεί, στην πραγματικότητα, να αποτελούν ουσίες/μείγματα της υποκατηγορίας 1B ή της υποκατηγορίας 1C (δηλ. υπερταξινομήσεις) (βλ. προσάρτημα 3).

36. Τα μοντέλα πρόβλεψης για τα μοντέλα δοκιμών διάβρωσης του δέρματος EpiDerm™ SCT (10)(23)(35), SkinEthic™ RHE (17)(18) (23) (36), και epiCS® (16)(23)(37), που σχετίζονται με το σύστημα ταξινόμησης του GHS του ΟΗΕ / του κανονισμού CLP, φαίνονται στον πίνακα 5:

Πίνακας 5

EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE και epiCS®

Βιωσιμότητα μετρούμενη βάσει χρονικών σημείων έκθεσης (t=3 και 60 λεπτά)	Πρόβλεψη προς εξέταση
ΣΤΑΔΙΟ 1 για τα EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE και epiCS®	
< 50 % μετά από έκθεση 3 λεπτών	**Διαβρωτικό**
≥ 50 % μετά από έκθεση 3 λεπτών **ΚΑΙ** < 15 % μετά από έκθεση 60 λεπτών	**Διαβρωτικό**
≥ 50 % μετά από έκθεση 3 λεπτών **ΚΑΙ** ≥ 15 % μετά από έκθεση 60 λεπτών	**Μη διαβρωτικό**
ΣΤΑΔΙΟ 2 για το EpiDerm™ SCT - για ουσίες/μείγματα που έχουν χαρακτηριστεί διαβρωτικά στο στάδιο 1	
< 25 % μετά από έκθεση 3 λεπτών	Προαιρετική υποκατηγορία 1A*
≥ 25 % μετά από έκθεση 3 λεπτών	Συνδυασμός προαιρετικών υποκατηγοριών 1B και 1C
ΣΤΑΔΙΟ 2 για το SkinEthic™ RHE - για ουσίες/μείγματα που έχουν χαρακτηριστεί διαβρωτικά στο στάδιο 1	
< 18 % μετά από έκθεση 3 λεπτών	Προαιρετική υποκατηγορία 1A*

▼**M8**

Βιωσιμότητα μετρούμενη βάσει χρονικών σημείων έκθεσης (t=3 και 60 λεπτά)	Πρόβλεψη προς εξέταση
ΣΤΑΔΙΟ 1 για τα EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE και epiCS®	
≥ 18 % μετά από έκθεση 3 λεπτών	Συνδυασμός προαιρετικών υποκατηγοριών 1B και 1C
ΣΤΑΔΙΟ 2 για το epiCS® - για ουσίες/μείγματα που έχουν χαρακτηριστεί διαβρωτικά στο στάδιο 1	
< 15 % μετά από έκθεση 3 λεπτών	Προαιρετική υποκατηγορία 1A*
≥ 15 % μετά από έκθεση 3 λεπτών	Συνδυασμός προαιρετικών υποκατηγοριών 1B και 1C

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Δεδομένα

37. Για κάθε δοκιμή πρέπει να αναφέρονται, σε μορφή πίνακα, τα δεδομένα που προέκυψαν για κάθε επιμέρους πανομοιότυπο δείγμα ιστού (π.χ. τιμές OD και υπολογισθείσα εκατοστιαία κυτταρική βιωσιμότητα για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία, καθώς και ταξινόμηση), συμπεριλαμβανομένων δεδομένων από επαναληπτικά πειράματα, κατά περίπτωση. Επιπλέον, θα πρέπει να αναφέρονται για κάθε δοκιμή οι μέσες τιμές και τα πεδία τιμών για τη βιωσιμότητα και τους συντελεστές μεταβλητότητας μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού. Για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία πρέπει να αναφέρονται οι παρατηρούμενες αλληλεπιδράσεις με τα άμεσα αναγωγικά MTT ή τις έγχρωμες υπό δοκιμή χημικές ουσίες.

Έκθεση δοκιμής

38. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία και μάρτυρες:

— Μονοσυστατική ουσία: ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμίξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

— Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγμα: περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες,

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και τυχόν πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

— προέλευση, αριθμός παρτίδας εάν είναι διαθέσιμος,

— κατεργασία της υπό δοκιμή χημικής ουσίας/μάρτυρα πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, κονιοποίηση),

— σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, καταληκτική ημερομηνία χρήσης ή ημερομηνία νέας ανάλυσης, εάν είναι γνωστή,

— συνθήκες φύλαξης.

Μοντέλο RhE και πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκαν και αιτιολόγησή τους (κατά περίπτωση)

Συνθήκες δοκιμής:

— μοντέλο XRhE που χρησιμοποιήθηκε (περιλαμβανομένου του αριθμού παρτίδας),

▼**M8**

— στοιχεία βαθμονόμησης για τη συσκευή μέτρησης (π.χ. φασματοφωτόμετρο), μήκος κύματος και ζώνη διάβασης (κατά περίπτωση) που χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό της φορμαζάνης MTT, και περιοχή τιμών γραμμικότητας της συσκευής μέτρησης,

— περιγραφή της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της φορμαζάνης MTT,

— περιγραφή των στοιχείων που αποδεικνύουν ότι το σύστημα HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας πληροί τα κριτήρια καταλληλότητας, κατά περίπτωση,

— πλήρη στοιχεία τεκμηρίωσης για το συγκεκριμένο μοντέλο RhE που χρησιμοποιήθηκε, συμπεριλαμβανομένων των επιδόσεών του. Τα εν λόγω δεδομένα πρέπει να περιλαμβάνουν τα ακόλουθα, χωρίς να περιορίζονται σ' αυτά:

  i) βιωσιμότητα,

  ii) λειτουργία φραγμού,

  iii) μορφολογία,

  iv) αναπαραγωγιμότητα και προβλεπτική ικανότητα,

  v) ποιοτικούς ελέγχους του μοντέλου,

— παραπομπή σε ιστορικά δεδομένα για το μοντέλο. Σε αυτά θα πρέπει να περιλαμβάνονται, μεταξύ άλλων, και ιστορικά δεδομένα για τις παρτίδες ώστε να τεκμηριώνεται η αποδοχή των δεδομένων ποιοτικού ελέγχου,

— κατάδειξη της τεχνικής ικανότητας διεξαγωγής της μεθόδου δοκιμών προτού χρησιμοποιηθεί στην καθημερινή πρακτική, μέσω ελέγχου των ουσιών ελέγχου ικανότητας.

Διαδικασία δοκιμής:

— λεπτομέρειες της διαδικασίας δοκιμής που χρησιμοποιήθηκε (περιλαμβανομένων των διαδικασιών έκπλυσης που χρησιμοποιήθηκαν μετά την περίοδο έκθεσης),

— χρησιμοποιηθείσες δόσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και των μαρτύρων,

— διάρκεια περιόδου/-ων έκθεσης και θερμοκρασία/-ες έκθεσης,

— αναφορά των χρησιμοποιηθέντων μαρτύρων για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που είναι άμεσα αναγωγικά της MTT και/ή έγχρωμες,

— αριθμός των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που χρησιμοποιήθηκαν ανά υπό δοκιμή χημική ουσία και μάρτυρα (θετικός μάρτυρας, αρνητικός μάρτυρας και NSMTT, NSC_{living} και NSC_{killed}, κατά περίπτωση), βάσει περιόδου έκθεσης,

— περιγραφή των κριτηρίων απόφασης/μοντέλου πρόβλεψης που εφαρμόστηκαν με βάση το χρησιμοποιηθέν μοντέλο RhE,

— περιγραφή τυχόν τροποποιήσεων της διαδικασίας δοκιμών (περιλαμβανομένων των διαδικασιών έκπλυσης).

Κριτήρια της σειράς δοκιμών και της δοκιμής:

— μέσες τιμές και πεδία τιμών αποδοχής του θετικού και αρνητικού μάρτυρα βάσει ιστορικών δεδομένων,

— αποδεκτή μεταβλητότητα μεταξύ πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού για τους θετικούς και τους αρνητικούς μάρτυρες,

▼**M8**

— αποδεκτή μεταβλητότητα μεταξύ πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού για την υπό δοκιμή χημική ουσία.

Αποτελέσματα:

— δεδομένα σε μορφή πίνακα για τις επιμέρους υπό δοκιμή χημικές ουσίες και τους μάρτυρες, για κάθε περίοδο έκθεσης, κάθε σειρά δοκιμών και κάθε μέτρηση πανομοιότυπου δείγματος, περιλαμβανομένης της OD ή του εμβαδού κορυφής της φορμαζάνης MTT, της εκατοστιαίας βιωσιμότητας ιστών, της μέσης εκατοστιαίας βιωσιμότητας ιστών, των διαφορών μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων, των SD και/ή των συντελεστών μεταβλητότητας, κατά περίπτωση,

— κατά περίπτωση, αποτελέσματα των μαρτύρων που χρησιμοποιήθηκαν για τα άμεσα αναγωγικά της MTT και/ή τις έγχρωμες υπό δοκιμή χημικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένης της OD ή του εμβαδού της κορυφής της φορμαζάνης MTT, του %NSMTT, του $\%NSC_{living}$, του $\%NSC_{killed}$, των διαφορών μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού, των SD και/ή των συντελεστών μεταβλητότητας (κατά περίπτωση), και της τελικής ορθής εκατοστιαίας βιωσιμότητας των ιστών,

— αποτελέσματα που προέκυψαν με την υπό δοκιμή χημική ουσία/-ες και τους μάρτυρες σε σχέση με τα καθορισμένα κριτήρια αποδοχής για τη σειρά δοκιμών και τη δοκιμή,

— περιγραφή άλλων επιδράσεων που παρατηρήθηκαν,

— ταξινόμηση στην οποία κατέληξε η δοκιμή, με αναφορά του μοντέλου πρόβλεψης / των κριτηρίων απόφασης που χρησιμοποιήθηκαν.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) UN (2013). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth Revised Edition, UN New York and >Geneva. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Κεφάλαιο B.4 του παρόντος παραρτήματος: Οξείας μορφής ερεθισμός/διάβρωση του δέρματος.

(3) Κεφάλαιο B.40 του παρόντος παραρτήματος: Διάβρωση του δέρματος *in vitro*.

(4) Κεφάλαιο B.65 του παρόντος παραρτήματος: Μέθοδος δοκιμών φραγμού μεμβράνης *in vitro*.

(5) Κεφάλαιο B.46 του παρόντος παραρτήματος: Δερματικός ερεθισμός *in vitro*: μέθοδος δοκιμών σε ανασυσταθείσα ανθρώπινη επιδερμίδα.

(6) OECD (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The report and Recommendations of ECVAM Workshop *6. ATLA* 23:219-255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and distribution of the Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 12:471-482.

▼**M8**

(9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhutter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for SkinCorrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicol. in Vitro 12:483-524.

(10) Liebsch M., Traue D., Barrabas C., Spielmann H., Uphill, P., Wilkins S., Wiemann C., Kaufmann T., Remmele M. and Holzhütter H. G. (2000). The ECVAM Prevalidation Study on the Use of EpiDerm for Skin Corrosivity Testing, *ATLA* 28: 371-401.

(11) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H. et Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, ATLA 23:129-147.

(12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological TestMethods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(13) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(14) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Epi-Skin™ Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.

(15) EC-ECVAM (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC14), 21 March 2000.

(16) Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. and Fuchs H.W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000)-A New Reconstructed Epidermis for *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. *Toxicol. In Vitro* 19: 925-929.

(17) Kandárová H., Liebsch M., Spielmann,H., Genschow E., Schmidt E., Traue D., Guest R., Whittingham A., Warren N, Gamer A.O., Remmele M., Kaufmann T., Wittmer E., De Wever B., and Rosdy M. (2006). Assessment of the Human Epidermis Model SkinEthic RHE for *In Vitro* Skin Corrosion Testing of Chemicals According to New OECD TG 431. *Toxicol.In Vitro* 20: 547-559.

(18) Tornier C., Roquet M. and Fraissinette A.B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0,5 cm^2 Tissue Sample. *Toxicol. In Vitro* 24: 1379-1385.

(19) EC-ECVAM (2006). Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC25), 17 November 2006.

(20) EC-ECVAM (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an *In-Vitro* Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 12 June 2009.

▼**M8**

(21) OECD (2013). Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation. Environment, Health, and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 190). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(22) Alépée N., Grandidier M.H., and Cotovio J. (2014). Sub-Categorisation of Skin Corrosive Chemicals by the EpiSkin™ Reconstructed Human Epidermis Skin Corrosion Test Method According to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431. *Toxicol. In Vitro* 28:131-145.

(23) Desprez B., Barroso J., Griesinger C., Kandárová H., Alépée N., and Fuchs, H. (2015). Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline No 431. *Toxicol. In Vitro* 29:2055-2080.

(24) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods For Skin Corrosion in Relation to OECD TG 431. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 219). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

(25) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(26) Eskes C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62:393-403.

(27) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65:55-63.

(28) Tinois E., *et al.* (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human *Epidermis In Vitro*. Στο: *In Vitro* Skin Toxicology. Rougier A.,. Goldberg A.M and Maibach H.I. (Eds): 133-140.

(29) Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. and Klausner M. (1994), New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. *Toxicol. in Vitro* 8:889 - 891.

(30) Ponec M., Boelsma E, Weerheim A, Mulder A, Bouwstra J and Mommaas M. (2000). Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models. Inter. J. Pharmaceu. 203:211 - 225.

(31) Tinois E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M. and Thivolet J. (1991). *In Vitro* and Post - Transplantation Differentiation of Human Keratinocytes Grown on the Human Type IV Collagen Film of a Bilayered Dermal Substitute. *Exp. Cell Res.* 193:310-319.

(32) Parenteau N.L., Bilbo P, Nolte CJ, Mason VS and Rosenberg M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. *Cytotech.* 9:163-171.

(33) Wilkins L.M., Watson SR, Prosky SJ, Meunier SF and Parenteau N.L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. *Biotech. Bioeng.* 43/8:747-756.

(34) EpiSkin™ SOP (December 2011). *INVITTOX* Protocol (No 118). EpiSkin™ Skin Corrosivity Test.

(35) EpiDerm™ SOP (February 2012). Version MK-24-007-0024 Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm.

▼**M8**

(36) SkinEthic™ RHE SOP (January 2012). *INVITTOX* Protocol SkinEthic™ Skin Corrosivity Test.

(37) EpiCS® SOP (January 2012). Version 4.1 *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1000 (epiCS®) CellSystems.

(38) Alépée N., Barroso J., De Smedt A., De Wever B., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Templier M., and McNamee P. Use of HPLC/UPLC- spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in In Vitro Reconstructed Human Tissue (RhT)- based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29: 741-761.

(39) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (May 2001). Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

▼**M8**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ορθότητα: ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί μέτρο των επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς τη «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας μεθόδου δοκιμών (25).

Κυτταρική βιωσιμότητα: παράμετρος με την οποία μετράται η συνολική δραστηριότητα κυτταρικού πληθυσμού, π.χ. ως ικανότητα των κυτταρικών μιτοχονδριακών αφυδρογονασών να ανάγουν τη χρωστική ζωτικής χρώσης MTT [βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο, κυανό του θειαζολυλίου], η οποία, ανάλογα με τη μετρούμενη παράμετρο και τον χρησιμοποιούμενο σχεδιασμό δοκιμής, συσχετίζεται με τον συνολικό αριθμό και/ή τη ζωτικότητα των κυττάρων.

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Συμφωνία: μέτρο των επιδόσεων των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Ο όρος χρησιμοποιείται ενίοτε εναλλακτικά προς τον όρο «ορθότητα», και ορίζεται ως το ποσοστό επί του συνόλου των υπό δοκιμή χημικών ουσιών που έχουν ταξινομηθεί ορθά ως θετικές ή αρνητικές. Η συμφωνία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον επιπολασμό των θετικών ουσιών στα είδη των υπό δοκιμή χημικών ουσιών που ελέγχονται (25).

ET_{50}: η τιμή αυτή μπορεί να υπολογιστεί κατ' εκτίμηση με τον προσδιορισμό του χρόνου έκθεσης που απαιτείται για να μειωθεί η κυτταρική βιωσιμότητα κατά 50 % μετά την εφαρμογή καθορισμένης συγκέντρωσης της ουσίας συγκριτικής αξιολόγησης, βλ. επίσης IC_{50}.

GHS (Globally Harmonised System for the Classification and Labelling of Chemicals – Παγκόσμιο Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Προϊόντων): σύστημα που προτείνει την ταξινόμηση των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) με βάση τυποποιημένα είδη και βαθμούς φυσικής επικινδυνότητας και επικινδυνότητας για την υγεία και το περιβάλλον και καλύπτει τα αντίστοιχα στοιχεία γνωστοποίησης, όπως εικονογράμματα, προειδοποιητικές λέξεις, δηλώσεις επικινδυνότητας, δηλώσεις προφύλαξης και δελτία δεδομένων ασφαλείας, με τα οποία γνωστοποιούνται πληροφορίες σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις με σκοπό την προστασία των ανθρώπων (εργοδοτών, εργαζομένων, μεταφορέων, καταναλωτών και διασωστών) και του περιβάλλοντος (1).

HPLC: υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης.

IATA: Integrated Approach on Testing and Assessment/Ολοκληρωμένη προσέγγιση για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση.

IC_{50}: η τιμή αυτή μπορεί να υπολογιστεί κατ' εκτίμηση με τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης στην οποία μια χημική ουσία συγκριτικής αξιολόγησης μειώνει τη βιωσιμότητα των ιστών κατά 50 % (IC_{50}) μετά από καθορισμένο χρόνο έκθεσης, βλ. επίσης ET_{50}.

Πλεονάζουσα δόση: ποσότητα υπό δοκιμή χημικής ουσίας που εφαρμόζεται στην επιδερμίδα και υπερβαίνει την απαιτούμενη για την πλήρη και ομοιόμορφη κάλυψη της επιδερμικής επιφάνειας.

Μείγμα: ένα μείγμα ή διάλυμα που αποτελείται από δύο ή περισσότερες ουσίες οι οποίες δεν αντιδρούν μέσα σε αυτό.

Μονοσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας ένα κύριο συστατικό περιέχεται σε ποσοστό τουλάχιστον 80 % κ.β.

▼**M8**

MTT: βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο, βρωμιούχο τετραζόλιο–κυανό του θειαζολυλίου.

Πολυσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας περισσότερα από ένα κύρια συστατικά περιέχονται σε συγκέντρωση > 10 % κ.β. και < 80 % κ.β. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα μεταποιητικών διεργασιών. Η διαφορά μεταξύ μείγματος και πολυσυστατικής ουσίας είναι ότι το μείγμα λαμβάνεται με ανάμειξη δύο ή περισσότερων ουσιών, χωρίς χημική αντίδραση. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα χημικών αντιδράσεων.

NC: μη διαβρωτικό.

Μάρτυρας NSC_{killed}: μάρτυρας μη ειδικού χρώματος σε αδρανοποιημένους ιστούς.

Μάρτυρας NSC_{living}: μάρτυρας μη ειδικού χρώματος σε ζωντανούς ιστούς.

NSMTT: μη ειδική αναγωγή της MTT.

OD: (Optical Density) οπτική πυκνότητα.

PC: (Positive Control) θετικός μάρτυρας, πανομοιότυπο δείγμα που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και υποβάλλεται σε αγωγή με χημική ουσία που είναι γνωστό ότι προκαλεί θετική απόκριση. Για να διασφαλίζεται η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας της απόκρισης του θετικού μάρτυρα σε συνάρτηση με τον χρόνο, το μέγεθος της θετικής απόκρισης δεν θα πρέπει να είναι υπερβολικό.

Πρότυπα επιδόσεων: πρότυπα που βασίζονται σε επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών και παρέχουν τη βάση για την αξιολόγηση της συγκρισιμότητας προτεινόμενης μεθόδου δοκιμών η οποία είναι μηχανιστικά και λειτουργικά παρεμφερής. Τα πρότυπα επιδόσεων περιλαμβάνουν i) βασικά στοιχεία της μεθόδου δοκιμών, ii) κατάλογο ελάχιστων ουσιών αναφοράς, οι οποίες έχουν επιλεγεί μεταξύ των χημικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για την απόδειξη των αποδεκτών επιδόσεων της επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς, και iii) τα ανάλογα επίπεδα αξιοπιστίας και ορθότητας, που βασίζονται στα επιτευχθέντα για την επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών και τα οποία πρέπει να επιδεικνύει η προτεινόμενη μέθοδος δοκιμών, όταν αξιολογείται με χρήση του καταλόγου ελαχίστων ουσιών αναφοράς (25).

Καταλληλότητα: περιγραφή της σχέσης της μεθόδου δοκιμών με την υπό μελέτη επίδραση και του κατά πόσον αυτή έχει σημασία και είναι χρήσιμη για συγκεκριμένο σκοπό. Πρόκειται για τον βαθμό στον οποίο η μέθοδος δοκιμών μετρά ή προβλέπει σωστά τη βιολογική επίδραση υπό μελέτη. Η καταλληλότητα εμπεριέχει συνεκτίμηση της ορθότητας (συμφωνίας) της μεθόδου δοκιμών (25).

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια μέθοδος δοκιμών μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (25).

Σειρά δοκιμών: μια σειρά περιλαμβάνει μία ή περισσότερες υπό δοκιμή χημικές ουσίες που υποβάλλονται σε δοκιμή ταυτόχρονα με αρνητικό μάρτυρα και θετικό μάρτυρα.

Ευαισθησία: το ποσοστό του συνόλου των θετικών/δραστικών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των μεθόδων δοκιμών (25).

▼**M8**

Διάβρωση του δέρματος *in vivo*: η πρόκληση μη αναστρέψιμων βλαβών στο δέρμα, όπως εμφανούς νεκρώσεως που διαπερνά την επιδερμίδα φθάνοντας στο χόριο, μετά την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας για χρονικό διάστημα έως 4 ωρών. Τυπικές διαβρωτικές αντιδράσεις είναι τα έλκη, η αιμορραγία, οι αιματηρές εσχάρες και, στο τέλος της παρατήρησης μετά παρέλευση 14 ημερών, ο αποχρωματισμός λόγω λευκοδερμίας, επιφάνειες με τέλεια αλωπεκία και ουλές. Για την αξιολόγηση των αμφισβητήσιμων αλλοιώσεων θα πρέπει να διερευνάται η δυνατότητα ιστοπαθολογικής εξέτασης.

Ειδικότητα: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών/αδρανών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των μεθόδων δοκιμών (25).

Ουσία: ένα χημικό στοιχείο και οι ενώσεις του σε φυσική κατάσταση ή όπως λαμβάνονται με οποιαδήποτε παραγωγική διεργασία, στα οποία συμπεριλαμβάνονται όλα τα πρόσθετα που απαιτούνται για να διατηρείται η σταθερότητά του, καθώς και τυχόν προσμείξεις που προκύπτουν από τη χρησιμοποιούμενη διεργασία, αλλά από τα οποία εξαιρούνται οι διαλύτες που είναι δυνατόν να διαχωριστούν χωρίς να επηρεαστεί η σταθερότητα της ουσίας ούτε να μεταβληθεί η σύνθεσή της.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

UPLC: υγροχρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης.

UVCB: ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, πολύπλοκα προϊόντα αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά.

▼M8

Προσάρτημα 2

Κυρια ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ RHE ΠΟΥ ΕΠΙΚΥΡΩΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΔΟΚΙΜΕΣ ΔΙΑΒΡΩΣΗΣ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

Στοιχεία μοντέλου δοκιμών	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Επιφάνεια μοντέλου	0,38 cm^2	0,63 cm^2	0,5 cm^2	0,6 cm^2
Αριθμός πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού	Τουλάχιστον 2 ανά χρόνο έκθεσης	Τουλάχιστον 2-3 ανά χρόνο έκθεσης	Τουλάχιστον 2 ανά χρόνο έκθεσης	Τουλάχιστον 2 ανά χρόνο έκθεσης
Δόσεις αγωγής και εφαρμογή	Υγρά και παχύρρευστα: 50 μl ± 3 μl (131,6 μl/cm^2) Στερεά: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm^2) + 100 μl ± 5 μl διαλύματος NaCl (9 g/l) Κηρώδη/κολλώδη: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm^2) με πλέγμα από νάιλον	Υγρά: 50 μl (79,4 μl/cm^2) με ή χωρίς πλέγμα από νάιλον *Συμβατότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας με πλέγμα από νάιλον πριν από την έναρξη της δοκιμής* Ημιστερεά: 50 μl (79,4 μl/cm^2) Στερεά: 25 μl H_2O (ή περισσότερο, εφόσον απαιτείται) + 25 mg (39,7 mg/cm^2) Κηροί: επίπεδο δισκοειδές τεμάχιο διαμέτρου περίπου 8 mm που τοποθετείται πάνω στον ιστό και διαβρέχεται με 15 μl H_2O.	Υγρά και παχύρρευστα: 40 μl ± 3μl (80 μl/cm^2) με χρήση πλέγματος από νάιλον *Συμβατότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας με πλέγμα από νάιλον πριν από την έναρξη της δοκιμής* Στερεά: 20 μl ± 2μl H_2O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) Κηρώδη/κολλώδη: 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) με χρήση πλέγματος από νάιλον	Υγρά: 50 μl (83,3 μl/cm^2) με χρήση πλέγματος από νάιλον *Συμβατότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας με πλέγμα από νάιλον πριν από την έναρξη της δοκιμής* Ημιστερεά: 50 μl (83,3 μl/cm^2) Στερεά: 25 mg (41,7 mg/cm^2) + 25 μl H_2O (ή περισσότερο, εφόσον απαιτείται) Κηρώδη: επίπεδο δισκοειδές τεμάχιο διαμέτρου περίπου 8 mm που τοποθετείται πάνω στον ιστό και διαβρέχεται με 15 μl H_2O.
Προέλεγχος για άμεση αναγωγή της MTT	50 μl (υγρό) ή 20 mg (στερεό) + 2 ml MTT διάλυμα 0,3 mg/ml επί 180 ± 5 λεπτά στους 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → εάν το διάλυμα αποκτήσει κυανό/ιώδες χρώμα, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν αδρανοποιημένοι σε νερό προσαρμοσμένοι μάρτυρες	50 μl (υγρό) ή 25 mg (στερεό) + 1 ml MTT διάλυμα 1 mg/ml επί 60 λεπτά στους 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → εάν το διάλυμα αποκτήσει κυανό/ιώδες χρώμα, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν αδρανοποιημένοι με κατάψυξη προσαρμοσμένοι μάρτυρες	40 μl (υγρό) ή 20 mg (στερεό) + 1 ml MTT διάλυμα 1 mg/ml επί 180 ± 15 λεπτά στους 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → εάν το διάλυμα αποκτήσει κυανό/ιώδες χρώμα, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν αδρανοποιημένοι με κατάψυξη προσαρμοσμένοι μάρτυρες	50 μl (υγρό) ή 25 mg (στερεό) + 1 ml MTT διάλυμα 1 mg/ml επί 60 λεπτά στους 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → εάν το διάλυμα αποκτήσει κυανό/ιώδες χρώμα, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν αδρανοποιημένοι με κατάψυξη προσαρμοσμένοι μάρτυρες

▼M8

Στοιχεία μοντέλου δοκιμών	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Προέλεγχος για παρεμπόδιση λόγω χρώματος	10 μl (υγρό) ή 10 mg (στερεό) + 90 μl H_2O αναμεμειγμένα επί 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου → εάν το διάλυμα χρωματιστεί, πρέπει να χρησιμοποιηθούν ζωντανοί προσαρμοσμένοι μάρτυρες	50 μl (υγρό) ή 25 mg (στερεό) + 300 μl H_2O επί 60 λεπτά στους 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → εάν το διάλυμα χρωματιστεί, πρέπει να χρησιμοποιηθούν ζωντανοί προσαρμοσμένοι μάρτυρες	40 μl (υγρό) ή 20 mg (στερεό) + 300 μl H_2O αναμεμειγμένα επί 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου → εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία χρωματιστεί, πρέπει να χρησιμοποιηθούν ζωντανοί προσαρμοσμένοι μάρτυρες	50 μl (υγρό) ή 25 mg (στερεό) + 300 μl H_2O επί 60 λεπτά στους 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → εάν το διάλυμα χρωματιστεί, πρέπει να χρησιμοποιηθούν ζωντανοί προσαρμοσμένοι μάρτυρες
Έκθεση χρόνος και θερμοκρασία	3 λεπτά, 60 λεπτά (± 5 λεπτά) και 240 λεπτά (± 10 λεπτά) Σε εξαεριζόμενο θάλαμο Θερμοκρασία δωματίου (RT, 18-28°C)	3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, και 60 λεπτά στους 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, και 60 λεπτά στους 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, και 60 λεπτά στους 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH
Έκπλυση	25 ml 1x PBS (2 ml/έκπλυση)	20 φορές με σταθερή, ήπια ροή 1x PBS	20 φορές με σταθερή, ήπια ροή 1x PBS	20 φορές με σταθερή, ήπια ροή 1x PBS
Αρνητικός μάρτυρας	διάλυμα 50 μl NaCl (9 g/l) Υποβάλλεται σε δοκιμή με κάθε χρόνο έκθεσης	50 μl H_2O Υποβάλλεται σε δοκιμή με κάθε χρόνο έκθεσης	40 μl H_2O Υποβάλλεται σε δοκιμή με κάθε χρόνο έκθεσης	50 μl H_2O Υποβάλλεται σε δοκιμή με κάθε χρόνο έκθεσης
Θετικός μάρτυρας	50 μl άνυδρο οξικό οξύ Υποβάλλεται σε δοκιμή μόνο επί 4 ώρες	8N KOH 50 μl Υποβάλλεται σε δοκιμή με κάθε χρόνο έκθεσης	8N KOH 40 μl Υποβάλλεται σε δοκιμή μόνο επί 1 ώρα	8N KOH 50 μl Υποβάλλεται σε δοκιμή με κάθε χρόνο έκθεσης
Διάλυμα MTT	2 ml 0,3 mg/ml	300 μl 1 mg/ml	300 μl 1 mg/ml	300 μl 1 mg/ml
Επώαση MTT χρόνος και θερμοκρασία	180 λεπτά (± 15 λεπτά) στους 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 λεπτά στους 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 λεπτά (± 15 λεπτά) στους 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 λεπτά στους 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH

▼M8

Στοιχεία μοντέλου δοκιμών	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Διαλύτης εκχύλισης	500 μl οξινισθείσας ισοπροπανόλης (0,04 N HCl σε ισοπροπανόλη) (απομονωμένος ιστός πλήρως εμβαπτισμένος)	2 ml ισοπροπανόλης (εκχύλιση από το επάνω και το κάτω τμήμα του ενθέματος)	1,5 ml ισοπροπανόλης (εκχύλιση από το επάνω και το κάτω τμήμα του ενθέματος)	2 ml ισοπροπανόλης (εκχύλιση από το επάνω και το κάτω τμήμα του ενθέματος)
Χρόνος και θερμοκρασία εκχύλισης	Όλη τη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου, απουσία φωτός	Όλη τη νύχτα χωρίς ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου ή επί 120 λεπτά με ανακίνηση (~120 σ.α.λ.) σε θερμοκρασία δωματίου	Όλη τη νύχτα χωρίς ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου ή επί 120 λεπτά με ανακίνηση (~120 σ.α.λ.) σε θερμοκρασία δωματίου	Όλη τη νύχτα χωρίς ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου ή επί 120 λεπτά με ανακίνηση (~120 σ.α.λ.) σε θερμοκρασία δωματίου
Μέτρηση OD	570 nm (545 - 595 nm) χωρίς φίλτρο αναφοράς	570 nm (ή 540 nm) χωρίς φίλτρο αναφοράς	570 nm (540 - 600 nm) χωρίς φίλτρο αναφοράς	540 - 570 nm χωρίς φίλτρο αναφοράς
Ποιοτικός έλεγχος ιστού	αγωγή 18 ωρών με SDS 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,0 mg/ml	αγωγή με 1 % Triton X-100 4,08 ώρες ≤ ET_{50} ≤ 8,7 ώρες	αγωγή με 1 % Triton X-100 4,0 ώρες ≤ ET_{50} ≤ 10,0 ώρες	αγωγή με 1 % Triton X-100 2,0 ώρες ≤ ET_{50} ≤ 7,0 ώρες
Κριτήρια αποδοχής	1. Η μέση OD των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που υποβλήθηκαν σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα (NaCl) θα πρέπει να είναι ≥ 0,6 και ≤ 1,5 για κάθε χρόνο έκθεσης 2. Η μέση βιωσιμότητα των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που εκτέθηκαν επί 4 ώρες στον θετικό μάρτυρα (άνυδρο οξικό οξύ), εκφραζόμενη ως ποσοστό (%) του αρνητικού μάρτυρα, θα πρέπει να είναι ≤ 20 % 3. Στο φάσμα τιμών βιωσιμότητας 20-100 % και για OD ≥ 0,3, η διαφορά βιωσιμότητας μεταξύ των δύο πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 30 %.	1. Η μέση OD των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που υποβλήθηκαν σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα (H_2O) θα πρέπει να είναι ≥ 0,8 και ≤ 2,8 για κάθε χρόνο έκθεσης 2. Η μέση βιωσιμότητα των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που εκτέθηκαν επί 1 ώρα στον θετικό μάρτυρα (8N KOH), εκφραζόμενη ως ποσοστό (%) του αρνητικού μάρτυρα, θα πρέπει να είναι ≤ 15 % 3. Στο φάσμα τιμών βιωσιμότητας 20 - 100 %, ο συντελεστής μεταβλητότητας μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού θα πρέπει να είναι ≤ 30 %	1. Η μέση OD των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που υποβλήθηκαν σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα (H_2O) θα πρέπει να είναι ≥ 0,8 και ≤ 3,0 για κάθε χρόνο έκθεσης 2. Η μέση βιωσιμότητα των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που εκτέθηκαν επί 1 ώρα (και επί 4 ώρες, κατά περίπτωση) στον θετικό μάρτυρα (8N KOH), εκφραζόμενη ως ποσοστό (%) του αρνητικού μάρτυρα, θα πρέπει να είναι < 15 % 3. Στο φάσμα τιμών βιωσιμότητας 20-100 %, και για OD ≥ 0,3, η διαφορά βιωσιμότητας μεταξύ των δύο πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 30 %	1. Η μέση OD των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που υποβλήθηκαν σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα (H_2O) θα πρέπει να είναι ≥ 0,8 και ≤ 2,8 για κάθε χρόνο έκθεσης 2. Η μέση βιωσιμότητα των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που εκτέθηκαν επί 1 ώρα στον θετικό μάρτυρα (8N KOH), εκφραζόμενη ως ποσοστό (%) του αρνητικού μάρτυρα, θα πρέπει να είναι < 20 % 3. Στο φάσμα τιμών βιωσιμότητας 20-100 %, και για OD ≥ 0,3, η διαφορά βιωσιμότητας μεταξύ των δύο πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 30 %

▼**M8**

Προσάρτημα 3

ΕΠΙΔΟΣΕΙΣ ΤΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ ΓΙΑ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΣΕ ΥΠΟΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ

Στον κατωτέρω πίνακα φαίνονται οι επιδόσεις των τεσσάρων μοντέλων δοκιμών, όπως υπολογίστηκαν με βάση ένα σύνολο 80 χημικών ουσιών που υποβλήθηκαν σε δοκιμή από τους φορείς ανάπτυξης των τεσσάρων δοκιμών. Οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν από τη γραμματεία του ΟΟΣΑ, και ελέγχθηκαν και εγκρίθηκαν κατόπιν συμφωνίας από υποομάδα εμπειρογνωμόνων (21) (23).

Τα μοντέλα δοκιμών EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ και epiCS® παρέχουν τη δυνατότητα ταξινόμησης σε υποκατηγορίες (δηλ. 1A έναντι 1B+1C έναντι NC)

Οι επιδόσεις, τα ποσοστά υπερταξινόμησης, τα ποσοστά υποταξινόμησης και η ορθότητα (προβλεπτική ικανότητα) των τεσσάρων μοντέλων δοκιμών βασίστηκαν σε ένα σύνολο 80 χημικών ουσιών, οι οποίες υποβλήθηκαν όλες σε δοκιμές στο πλαίσιο 2 ή 3 σειρών δοκιμών σε κάθε μοντέλο δοκιμών:

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΙΣ ΠΡΟΒΛΕΨΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΕΠΙ ΤΟΥ ΣΥΝΟΛΟΥ ΤΩΝ ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

(n = 80 χημικές ουσίες που υποβλήθηκαν σε δοκιμές στο πλαίσιο 2 ανεξάρτητων σειρών δοκιμών για το epiCS® ή 3 ανεξάρτητες σειρές δοκιμών για το EpiDerm™ SCT, το EpiSkin™ και το SkinEthic™ RHE, δηλ. αντίστοιχα 159 (*) ή 240 ταξινομήσεις)

	EpiSkin™	EpiDerm ™	SkinEthic™	epiCS®
Υπερταξινομήσεις:				
1B+1C που υπερταξινομήθηκαν ως 1A	21,50%	29,0%	31,2%	32,8%
NC που υπερταξινομήθηκαν ως 1B+1C	20,7%	23,4%	27,0%	28,4 %
NC που υπερταξινομήθηκαν ως 1A	0,00%	2,7%	0,0%	0,00%
υπερταξινομήθηκαν ως διαβρωτικά	20,7%	26,1%	27,0%	28,4%
Συνολικό ποσοστό υπερταξινόμησης (όλες οι κατηγορίες)	**17,9%**	**23,3%**	**24,5%**	**25,8%**
Υποταξινομήσεις:				
1A που υποταξινομήθηκαν ως 1B+1C	16,7%	16,7%	16,7%	12,5%
1A που υποταξινομήθηκαν ως NC	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
1B+1C που υποταξινομήθηκαν ως NC	2,2%	0,00%	7,5%	6,6%
Συνολικό ποσοστό υποταξινόμησης (όλες οι κατηγορίες)	**3,3%**	**2,5%**	**5,4%**	**4,4%**
Ορθές ταξινομήσεις:				
ορθή ταξινόμηση ως 1A	83,3%	83,3%	83,3%	87,5%
ορθή ταξινόμηση ως 1B+1C	76,3%	71,0%	61,3%	60,7%
ορθή ταξινόμηση ως NC	79,3%	73,9%	73,0%	71,62%
Συνολική ορθότητα	**78,8%**	**74,2%**	**70%**	**69,8%**

NC: Μη διαβρωτικό

(*) μία χημική ουσία δοκιμάστηκε μία φορά με το epiCS® λόγω μη διαθεσιμότητας (23)

▼**M8**

Προσάρτημα 4

Βασικές παράμετροι και κριτήρια αποδοχής της καταλληλότητας συστήματος HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας για μέτρηση της φορμαζάνης MTT που εκχυλίζεται από ιστό RhE

Παράμετρος	Πρωτόκολλο από την καθοδήγηση της FDA (37)(38)	Κριτήρια αποδοχής
Επιλεκτικότητα	Ανάλυση ισοπροπανόλης, ζωντανού τυφλού δείγματος (εκχύλισμα ισοπροπανόλης από ζωντανούς ιστούς RhE χωρίς καμία αγωγή), αδρανοποιημένου τυφλού δείγματος (εκχύλισμα ισοπροπανόλης από αδρανοποιημένους ιστούς RhE χωρίς καμία αγωγή)	εμβαδόν$_{παρεμβολής}$ ≤ 20 % του εμβαδού$_{LLOQ}$ ([1])
Ακρίβεια	Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου (φορμαζάνη MTT στα 1,6 μg/ml, 16 μg/ml και 160 μg/ml) σε ισοπροπανόλη (n=5)	CV ≤ 15 % ή ≤ 20 % για το LLOQ
Ορθότητα	Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ισοπροπανόλη (n=5)	%Dev ≤ 15 % ή ≤ 20 % για το LLOQ
Φαινόμενο μήτρας	Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ζωντανό τυφλό δείγμα (n=5)	85 % ≤ φαινόμενο μήτρας % ≤ 115 %
Μεταφορά υλικού	Ανάλυση ισοπροπανόλης μετά από πρότυπο ULOQ^2 ([2])	εμβαδόν$_{παρεμβολής}$ ≤ 20 % του εμβαδού$_{LLOQ}$
Αναπαραγωγιμότητα (εντός ημέρας)	3 ανεξάρτητες καμπύλες βαθμονόμησης (με βάση 6 διαδοχικές αραιώσεις φορμαζάνης MTT 1:3 σε ισοπροπανόλη, ξεκινώντας από το ULOQ, δηλαδή 200 μg/ml), Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ισοπροπανόλη (n=5)	Καμπύλες βαθμονόμησης: %Dev ≤ 15 % ή ≤ 20 % για το LLOQ Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου: %Dev ≤ 15 % και CV ≤ 15 %
Αναπαραγωγιμότητα (μεταξύ ημερών)	1η ημέρα: 1 καμπύλη βαθμονόμησης και μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ισοπροπανόλη (n=3) 2η ημέρα: 1 καμπύλη βαθμονόμησης και μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ισοπροπανόλη (n=3) 3η ημέρα: 1 καμπύλη βαθμονόμησης και μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ισοπροπανόλη (n=3)	
Βραχυπρόθεσμη σταθερότητα της φορμαζάνης MTT σε εκχύλισμα ιστών RhE	Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ζωντανό τυφλό δείγμα (n=3) αναλυόμενοι την ημέρα της παρασκευής και μετά από 24 ώρες φύλαξης σε θερμοκρασία δωματίου	%Dev ≤ 15 %
Μακροπρόθεσμη σταθερότητα της φορμαζάνης MTT σε εκχύλισμα ιστών RhE, εφόσον απαιτείται	Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ζωντανό τυφλό δείγμα (n=3) αναλυόμενοι την ημέρα της παρασκευής και μετά από αρκετές ημέρες φύλαξης σε καθορισμένη θερμοκρασία (π.χ. 4°C, -20°C, -80°C)	%Dev ≤ 15 %

([1]) LLOQ: Κατώτερο όριο ποσοτικού προσδιορισμού, ορισμένο ώστε να καλύπτει βιωσιμότητα ιστού 1-2 %, δηλαδή 0,8 μg/ml.
([2]) ULOQ: Ανώτερο όριο ποσοτικού προσδιορισμού, ορισμένο ώστε να είναι τουλάχιστον δύο φορές υψηλότερο από την υψηλότερη αναμενόμενη συγκέντρωση φορμαζάνης MTT σε εκχυλίσματα ισοπροπανόλης από αρνητικούς μάρτυρες, δηλαδή 200 μg/ml.

▼B

B.41. **ΔΟΚΙΜΗ ΦΩΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ 3T3 NRU *IN VITRO***

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

Η παρούσα μέθοδος είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών TG 432 (2004) του ΟΟΣΑ.

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ως φωτοτοξικότητα ορίζεται η τοξική απόκριση που προκαλείται από την εφαρμογή ουσίας στο σώμα και εμφανίζεται ή εντείνεται (ορατή σε χαμηλότερες δόσεις) μετά την εν συνεχεία έκθεση στο φως ή που επάγεται από ακτινοβόληση του δέρματος κατόπιν συστηματικής χορήγησης μιας ουσίας.

Η δοκιμή φωτοτοξικότητας 3T3 NRU *in vitro* χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του φωτοτοξικού δυναμικού ελεγχόμενης χημικής ουσίας, το οποίο επάγεται από τη διέγερσή της μετά την έκθεση στο φως. Με τη δοκιμή αυτή αξιολογείται η φωτοκυτταροτοξικότητα με βάση τη σχετική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων που εκτίθενται στη χημική ουσία παρουσία και απουσία φωτός. Οι χαρακτηριζόμενες με την παρούσα δοκιμή ουσίες ενδέχεται να είναι φωτοτοξικές *in vivo* μετά από συστηματική εφαρμογή και κατανομή στο δέρμα ή μετά από τοπική εφαρμογή.

Υπάρχουν διάφοροι τύποι χημικών ουσιών που έχουν αναφερθεί ως φωτοτοξικές (1)(2)(3)(4). Το κοινό χαρακτηριστικό τους είναι η ικανότητά τους να απορροφούν φωτεινή ενέργεια στη περιοχή μηκών κύματος του ηλιακού φωτός. Σύμφωνα με τον πρώτο νόμο της φωτοχημείας (νόμος Grotthaus-Draper), η φωτοαντίδραση απαιτεί επαρκή απορρόφηση κβάντων φωτός. Συνεπώς, πριν εξεταστεί το ενδεχόμενο διεξαγωγής βιολογικής δοκιμής, πρέπει να προσδιορίζεται το φάσμα απορρόφησης υπεριώδους/ορατού της ελεγχόμενης ουσίας σύμφωνα με την κατευθυντήρια γραμμή TG 101 του ΟΟΣΑ. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι εάν η μοριακή απορροφητικότητα είναι μικρότερη από 10 λίτρα × mol-1 × cm-1, η χημική ουσία δεν είναι πιθανό να είναι φωτοδραστική. Μια τέτοια ουσία μπορεί να μη χρειάζεται να υποβληθεί στη δοκιμή φωτοτοξικότητας 3T3 NRU *in vitro* ή σε άλλη βιολογική δοκιμή για τον προσδιορισμό δυσμενών φωτοχημικών επιδράσεων (1)(5). Βλέπε επίσης παράρτημα 1.

Η αξιοπιστία και η καταλληλότητα της δοκιμής φωτοτοξικότητας 3T3 NRU *in vitro* αξιολογήθηκαν πρόσφατα (6)(7)(8)(9). Καταδείχθηκε ότι με τη δοκιμή αυτή επιτυγχάνεται πρόγνωση επιδράσεων οξείας φωτοτοξικότητας σε ζώα και στον άνθρωπο *in vivo*. Η δοκιμή δεν έχει σχεδιαστεί για την πρόγνωση άλλων δυσμενών επιδράσεων που μπορεί να προκύψουν από τη συνδυασμένη δράση χημικής ουσίας και φωτός, π.χ. δεν καλύπτει τη φωτογονιδιοτοξικότητα, τη φωτοαλλεργία ή τη φωτοκαρκινογένεση ούτε επιτρέπει την εκτίμηση της φωτοτοξικής ισχύος. Εξάλλου, η δοκιμή δεν έχει σχεδιαστεί για την εξέταση των έμμεσων μηχανισμών φωτοτοξικότητας, της επίδρασης των μεταβολιτών της ελεγχόμενης ουσίας ή της επίδρασης μιγμάτων.

Αν και η χρήση μεταβολικών συστημάτων αποτελεί γενική απαίτηση για όλες τις δοκιμές *in vitro* για την πρόγνωση του γονιδιοτοξικού και καρκινογόνου δυναμικού, μέχρι σήμερα, στην περίπτωση της φωτοτοξικολογίας, υπάρχουν ελάχιστα παραδείγματα όπου χρειάζεται μεταβολικός μετασχηματισμός για να δράσει η ουσία ως φωτοτοξίνη *in vivo* ή *in vitro*. Δεν θεωρείται επομένως αναγκαία ούτε δικαιολογείται επιστημονικά η εκτέλεση της παρούσας δοκιμής με σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης.

▼B

1.2. ΟΡΙΣΜΟΊ

Ένταση ακτινοβολίας: η ένταση του προσπίπτοντος σε μια επιφάνεια υπεριώδους (UV) ή ορατού φωτός, μετρούμενη σε W/m^2 ή mW/cm^2.

Δόση φωτός: η ποσότητα (= ένταση × χρόνος) της προσπίπτουσας σε μια επιφάνεια υπεριώδους (UV) ή ορατής ακτινοβολίας, εκφραζόμενη σε Joule (= W × s) ανά μονάδα επιφανείας, π.χ. J/m^2 ή J/cm^2.

Ζώνες UV φωτός: οι χαρακτηρισμοί που συνιστά η διεθνής επιτροπή CIE (Commision Internationale de L'Eclairage) είναι: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) και UVC (100-280 nm). Χρησιμοποιούνται επίσης και άλλοι χαρακτηρισμοί: το όριο μεταξύ UVB και UVA τοποθετείται συχνά στα 320 nm, ενώ η UVA μπορεί να υποδιαιρείται σε UV-A1 και UV-A2, με όριο τα 340 nm περίπου.

Κυτταρική βιωσιμότητα: παράμετρος με την οποία μετράται η συνολική δραστηριότητα κυτταρικού πληθυσμού (π.χ. πρόσληψη της ερυθράς χρωστικής ζωτικής χρώσης Neutral Red σε κυτταρικά λυσοσώματα), η οποία, ανάλογα με το μετρούμενο τελικό σημείο και τον χρησιμοποιούμενο σχεδιασμό δοκιμής, συσχετίζεται με το συνολικό αριθμό ή/και τη ζωτικότητα των κυττάρων.

Σχετική κυτταρική βιωσιμότητα: η κυτταρική βιωσιμότητα εκφραζόμενη σε σχέση με διαλύτες μάρτυρες (αρνητικούς), οι οποίοι έχουν υποβληθεί σε όλα τα στάδια της διαδικασίας δοκιμής (είτε +Irr είτε -Irr), όχι όμως σε αγωγή με την ελεγχόμενη χημική ουσία.

PIF (Photo-Irritation-Factor/συντελεστής φωτοερεθισμού): συντελεστής που λαμβάνεται με σύγκριση δύο εξίσου αποτελεσματικών κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων (IC_{50}) της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, χωρίς (-Irr) και με (+Irr) μη κυτταροτοξική ακτινοβόληση με UVA/ορατό φως.

IC_{50}: η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που προκαλεί μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας κατά 50 %.

MPE (Mean-Photo-Effect/μέση φωτοεπίδραση): μέτρηση που προκύπτει από μαθηματική ανάλυση των καμπυλών συγκέντρωσης-απόκρισης οι οποίες λαμβάνονται χωρίς (-Irr) και με (+Irr) μη κυτταροτοξική ακτινοβόληση με UVA/ορατό φως.

Φωτοτοξικότητα: οξεία τοξική απόκριση, η οποία εμφανίζεται μετά την πρώτη έκθεση του δέρματος σε ορισμένες χημικές ουσίες και την εν συνεχεία έκθεση στο φως ή επάγεται, ομοίως, από ακτινοβόληση του δέρματος κατόπιν συστηματικής χορήγησης χημικής ουσίας.

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Η δοκιμή φωτοτοξικότητας 3T3 NRU *in vitro* βασίζεται σε σύγκριση της κυτταροτοξικότητας χημικής ουσίας, όταν ελέγχεται με και χωρίς έκθεση σε μη κυτταροτοξική δόση προσομοιωμένου ηλιακού φωτός. Η κυτταροτοξικότητα στη δοκιμή αυτή εκφράζεται ως εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση μείωση της πρόσληψης της ερυθράς χρωστικής ζωτικής χρώσης Neutral Red (NR), μετρούμενη 24 ώρες μετά από αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία και ακτινοβόληση (10). Η NR είναι ασθενής, κατιονική χρωστική που διαπερνά εύκολα την κυτταρική μεμβράνη χωρίς διάχυση και συσσωρεύεται ενδοκυτταρικά στα λυσοσώματα. Αλλοιώσεις της επιφάνειας της ευαίσθητης λυσοσωματικής μεμβράνης συνεπάγονται ευθραυστότητα των λυσοσωμάτων και άλλες αλλαγές που σταδιακά καθίστανται μη αναστρέψιμες. Οι αλλαγές αυτές, που οφείλονται στη δράση ξενοβιοτικών, έχουν ως αποτέλεσμα τη μειωμένη πρόσληψη και σύνδεση της NR. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατόν να γίνει διάκριση μεταξύ κυττάρων που είναι βιώσιμα, έχουν υποστεί βλάβη ή είναι νεκρά, το οποίο αποτελεί και τη βάση της συγκεκριμένης δοκιμής.

▼B

Κύτταρα Balb/c 3T3 διατηρούνται σε καλλιέργεια επί 24 ώρες ώστε να σχηματιστούν μονοστιβάδες. Δύο τρυβλία 96 κοιλοτήτων ανά ελεγχόμενη χημική ουσία προεπωάζονται με οκτώ διαφορετικές συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας επί μία ώρα. Στη συνέχεια, ένα από τα δύο τρυβλία εκτίθεται στην υψηλότερη μη κυτταροτοξική δόση ακτινοβόλησης, ενώ το δεύτερο διατηρείται στο σκοτάδι. Και στα δύο τρυβλία, το υλικό αγωγής αντικαθίσταται κατόπιν από θρεπτικό υλικό και, έπειτα από 24 ακόμη ώρες επώασης, προσδιορίζεται η κυτταρική βιωσιμότητα με πρόσληψη Neutral Red. Η κυτταρική βιωσιμότητα, εκφράζεται ως επί τοις εκατό ποσοστό των μη υποβληθέντων σε αγωγή διαλυτών μαρτύρων και υπολογίζεται για καθεμία από τις συγκεντρώσεις δοκιμής. Για την πρόγνωση του φωτοτοξικού δυναμικού, συγκρίνονται οι αποκρίσεις συναρτήσει της συγκέντρωσης που λαμβάνονται με και χωρίς ακτινοβόληση, συνήθως στο επίπεδο IC_{50}, δηλαδή της συγκέντρωσης που προκαλεί μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας κατά 50 % σε σύγκριση με τους μη υποβληθέντες σε αγωγή μάρτυρες.

1.4. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

1.4.1 **Παρασκευάσματα**

1.4.1.1 *Κύτταρα*

Στη μελέτη επικύρωσης χρησιμοποιήθηκε η μόνιμη κυτταρική σειρά ινοβλαστών ποντικού Balb/c 3T3, κλώνος 31, προερχόμενη είτε από την American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA, είτε από την European Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, Wiltshire, UK, και ως εκ τούτου, συνιστάται η προμήθεια αυτής της κυτταρικής σειράς από καταξιωμένες συλλογές κυττάρων. Στην ίδια διαδικασία δοκιμής μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα κύτταρα ή κυτταρικές σειρές, εφόσον οι συνθήκες καλλιέργειας είναι προσαρμοσμένες στις ειδικές ανάγκες των κυττάρων, πρέπει όμως να καταδεικνύεται η ισοδυναμία.

Τα κύτταρα θα πρέπει να ελέγχονται τακτικά για να εξακριβώνεται ότι δεν έχουν μολυνθεί από μυκόπλασμα και να χρησιμοποιούνται μόνον εφόσον το αποτέλεσμα του ελέγχου είναι αρνητικό (11).

Έχει ιδιαίτερη σημασία να ελέγχεται τακτικά η ευαισθησία των κυττάρων στο UV σύμφωνα με τη διαδικασία ποιοτικού ελέγχου που περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο. Επειδή η ευαισθησία των κυττάρων στο UVA μπορεί να αυξάνεται με τον αριθμό των ανακαλλιεργειών, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κύτταρα Balb/c 3T3 με τον χαμηλότερο δυνατό αριθμό ανακαλλιεργειών, κατά προτίμηση κάτω των 100 (βλέπε σημείο 1.4.2.2.2 και παράρτημα 2).

1.4.1.2. *Θρεπτικά υλικά και συνθήκες καλλιέργειας*

Για τη συνήθη καλλιέργεια κυττάρων και κατά τη διάρκεια της διαδικασίας δοκιμής θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλα θρεπτικά υλικά και συνθήκες επώασης, π.χ. προκειμένου για κύτταρα Balb/c 3T3, το υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) με προσθήκη ορού νεογέννητου μοσχαριού 10 %, γλουταμίνης 4 mM, πενικιλίνης (100 IU) και στρεπτομυκίνης (100 mg/ml) και επώαση με υγρασία στους 37 °C, 5-7,5 % CO_2 ανάλογα με το ρυθμιστικό διάλυμα (βλέπε σημείο 1.4.1.4, δεύτερο εδάφιο). Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να εξασφαλίζουν οι συνθήκες της κυτταρικής καλλιέργειας ότι ο χρόνος κυτταρικού κύκλου περιλαμβάνεται στα κανονικά ιστορικά πλαίσια των χρησιμοποιούμενων κυττάρων ή κυτταρικών σειρών.

1.4.1.3 *Παρασκευή των καλλιεργειών*

Κύτταρα από κατεψυγμένες αρχικές καλλιέργειες εμβολιάζονται σε θρεπτικό υλικό σε κατάλληλη πυκνότητα και ανακαλλιεργούνται τουλάχιστον μία φορά, πριν χρησιμοποιηθούν στην δοκιμή φωτοτοξικότητας 3T3 NRU *in vitro*.

▼B

Τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή φωτοτοξικότητας εμβολιάζονται σε θρεπτικό υλικό σε πυκνότητα τέτοια ώστε οι καλλιέργειες να μη φθάνουν σε κατάσταση συρροής μέχρι το τέλος της δοκιμής, δηλαδή όταν προσδιορίζεται η κυτταρική βιωσιμότητα, 48 ώρες μετά τον εμβολιασμό των κυττάρων. Στην περίπτωση των κυττάρων Balb/c 3T3 που καλλιεργούνται σε τρυβλία 96 κοιλοτήτων, η συνιστώμενη κυτταρική πυκνότητα εμβολιασμού είναι 1×10^4 κύτταρα ανά κοιλότητα.

Για κάθε ελεγχόμενη χημική ουσία, τα κύτταρα εμβολιάζονται με τον ίδιο τρόπο σε δύο χωριστά τρυβλία 96 κοιλοτήτων, τα οποία υποβάλλονται κατόπιν, ταυτόχρονα, στην πλήρη διαδικασία της δοκιμής υπό πανομοιότυπες συνθήκες καλλιέργειας, εκτός από το χρονικό διάστημα κατά το οποίο το ένα από τα τρυβλία ακτινοβολείται (+Irr) και το άλλο διατηρείται στο σκοτάδι (-Irr).

1.4.1.4 *Παρασκευή της ελεγχόμενης ουσίας*

Οι ελεγχόμενες ουσίες πρέπει να παρασκευάζονται αμέσως πριν από τη χρήση τους, εκτός εάν τα υπάρχοντα δεδομένα καταδεικνύουν ότι παραμένουν σταθερές κατά την αποθήκευση. Συνιστάται να εκτελούνται όλοι οι χειρισμοί των χημικών ουσιών και η αρχική κατεργασία των κυττάρων υπό συνθήκες φωτισμού που δεν επιτρέπουν τη φωτοενεργοποίηση ή αποικοδόμηση της ελεγχόμενης ουσίας πριν από την ακτινοβόλησή της.

Οι ελεγχόμενες ουσίες διαλύονται σε ρυθμιστικά διαλύματα αλάτων, π.χ. Earl's Balanced Salt Solution (EBSS), ή σε άλλα φυσιολογικά ρυθμιστικά διαλύματα, τα οποία, προς αποφυγή παρεμβολών κατά την ακτινοβόληση, πρέπει να είναι απαλλαγμένα πρωτεϊνικών συστατικών και συστατικών που απορροφούν το φως (π.χ. χρωστικές δείκτες του pH και βιταμίνες). Δεδομένου ότι κατά τη διάρκεια της ακτινοβόλησης τα κύτταρα παραμένουν έξω από τον επωαστήρα CO_2 επί 50 λεπτά περίπου, πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για την αποφυγή αλκαλοποίησης. Σε περίπτωση χρησιμοποίησης ασθενών ρυθμιστικών διαλυμάτων, όπως το EBSS, αυτό μπορεί να επιτευχθεί με επώαση των κυττάρων σε 7,5 % CO_2. Εφόσον τα κύτταρα επωάζονται σε 5 % CO_2 μόνο, θα πρέπει να επιλέγεται ισχυρότερο ρυθμιστικό διάλυμα.

Οι ελεγχόμενες χημικές ουσίες που είναι δυσδιάλυτες στο νερό θα πρέπει να διαλύονται σε κατάλληλο διαλύτη. Εφόσον χρησιμοποιείται διαλύτης, ο όγκος του πρέπει να είναι σταθερός σε όλες τις καλλιέργειες, δηλαδή τόσο στους αρνητικούς μάρτυρες (διαλύτες), όσο και σε όλες τις συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας, και η συγκέντρωσή του να μην είναι κυτταροτοξική. Οι συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας θα πρέπει να επιλέγονται κατά τρόπο ώστε να μην προκύπτουν ιζηματούχα ή θολά διαλύματα.

Ως διαλύτες συνιστώνται το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) και η αιθανόλη. Κατάλληλοι μπορεί να είναι και άλλοι διαλύτες χαμηλής κυτταροτοξικότητας. Πριν από τη χρήση των διαλυτών, πρέπει να αξιολογούνται συγκεκριμένες ιδιότητές τους, π.χ. αντίδραση με την ελεγχόμενη ουσία, εξασθένηση της φωτοτοξικής επίδρασης, δέσμευση ελευθέρων ριζών ή/και χημική σταθερότητα της ουσίας στον διαλύτη.

Η διαλυτοποίηση είναι δυνατόν να διευκολύνεται με ανάδευση (vortex) ή/και επίδραση υπερήχων ή/και θέρμανση σε κατάλληλη θερμοκρασία, εφόσον δεν επηρεάζεται η σταθερότητα της ελεγχόμενης ουσίας.

▼B

1.4.1.5 *Συνθήκες ακτινοβόλησης*

1.4.1.5.1 Φωτεινή πηγή

Η επιλογή κατάλληλης φωτεινής πηγής και κατάλληλων φίλτρων αποτελεί κρίσιμο παράγοντα της δοκιμής φωτοτοξικότητας. Το φως στις περιοχές της ακτινοβολίας UVA και της ορατής συνδέεται συνήθως με φωτοτοξικές αντιδράσεις *in vivo* (3)(12), ενώ η UVB, που γενικά είναι λιγότερο σημαντική ως προς τη φωτοτοξικότητα, παρουσιάζει υψηλή κυτταροτοξικότητα, η οποία χιλιαπλασιάζεται, καθώς το μήκος κύματος μειώνεται από 313 σε 280 nm (13). Στα κριτήρια επιλογής κατάλληλης φωτεινής πηγής πρέπει να περιλαμβάνεται η απαίτηση να εκπέμπει σε μήκη κύματος που απορροφούνται από την ελεγχόμενη ουσία (φάσμα απορρόφησης), ενώ η δόση φωτός (εφικτή μέσα σε εύλογο χρονικό διάστημα έκθεσης) θα πρέπει να είναι επαρκής για την ανίχνευση γνωστών φωτοκυτταροτοξικών χημικών ουσιών. Επιπλέον, τα χρησιμοποιούμενα μήκη κύματος και δόσεις δεν θα πρέπει να είναι αδικαιολόγητα επιβλαβή για το σύστημα δοκιμής, π.χ. με την εκπομπή θερμότητας (περιοχή υπερύθρου).

Ως βέλτιστη τεχνητή φωτεινή πηγή θεωρείται η προσομοίωση του ηλιακού φωτός με ηλιακούς προσομοιωτές. Η κατανομή της ισχύος ακτινοβόλησης του εφοδιασμένου με φίλτρα ηλιακού προσωμοιωτή θα πρέπει να είναι παραπλήσια εκείνης του φωτός της ημέρας σε εξωτερικούς χώρους, που παρατίθεται στη βιβλιογραφική παραπομπή (14). Ως ηλιακοί προσομοιωτές χρησιμοποιούνται τόσο τόξα ξένου όσο και (εμπλουτισμένα) τόξα υδραργύρου-αλογονιδίου μετάλλου. Τα τελευταία παρουσιάζουν το πλεονέκτημα ότι εκπέμπουν λιγότερη θερμότητα και είναι φθηνότερα, αλλά η απομίμηση του ηλιακού φωτός είναι ατελέστερη σε σύγκριση με τα τόξα ξένου. Δεδομένου ότι όλοι οι ηλιακοί προσομοιωτές εκπέμπουν σημαντικές ποσότητες UVB, θα πρέπει να είναι εφοδιασμένοι με κατάλληλα φίλτρα, ώστε να εξασθενεί η υψηλής κυτταροτοξικότητας ακτινοβολία UVB. Επειδή τα πλαστικά υλικά κυτταροκαλλιέργειας περιέχουν σταθεροποιητές UV, το φάσμα θα πρέπει να μετράται διαμέσου καλύμματος τρυβλίου 96 κοιλοτήτων του ιδίου τύπου με εκείνο που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί στη δοκιμασία. Ανεξαρτήτως των μέτρων που λαμβάνονται για την εξασθένηση τμημάτων του φάσματος, είτε με χρήση φίλτρων είτε μέσω του αναπόφευκτου φιλτραρίσματος από τον εξοπλισμό, το φάσμα που καταγράφεται κάτω από τα φίλτρα αυτά δεν θα πρέπει να αποκλίνει από το τυποποιημένο φως της ημέρας σε εξωτερικούς χώρους (14). Παράδειγμα της κατανομής της φασματικής έντασης ακτινοβολίας του εφοδιασμένου με φίλτρα ηλιακού προσομοιωτή που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη επικύρωσης της δοκιμής φωτοτοξικότητας 3T3 NRU *in vitro*, παρέχεται στις βιβλιογραφικές παραπομπές (8) και (16). Βλέπε επίσης παράρτημα 2 σχήμα 1.

1.4.1.5.2 Δοσιμετρία

Η ένταση του φωτός (ένταση ακτινοβολίας) θα πρέπει να ελέγχεται τακτικά πριν από κάθε δοκιμή φωτοτοξικότητας, με τη βοήθεια κατάλληλου ευρυζωνικού μετρητή ακτινοβολίας UV. Η ένταση θα πρέπει να μετράται διαμέσου καλύμματος τρυβλίου 96 κοιλοτήτων του ιδίου τύπου με εκείνο που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί στη δοκιμασία. Ο μετρητής ακτινοβολίας UV πρέπει να βαθμονομείται ως προς την πηγή. Οι επιδόσεις του θα πρέπει να ελέγχονται και, για το σκοπό αυτό, συνιστάται η χρήση ενός δεύτερου μετρητή UV αναφοράς του ίδιου τύπου και με την ίδια ακριβώς βαθμονόμηση. Θεωρητικά, κατά μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, θα πρέπει να χρησιμοποιείται φασματοραδιόμετρο για τη μέτρηση της φασματικής έντασης της ακτινοβολίας της εφοδιασμένης με φίλτρα φωτεινής πηγής και για τον έλεγχο της βαθμονόμησης του ευρυζωνικού μετρητή UV.

Προσδιορίστηκε ότι δόση 5 J/cm^2 (μετρούμενη στην περιοχή UVA) δεν είναι κυτταροτοξική για τα κύτταρα Balb/c 3T3, είναι όμως επαρκής για τη διέγερση χημικών ουσιών ώστε να προκαλέσουν εμφανείς φωτοτοξικές επιδράσεις (6) (17)· π.χ. για την επίτευξη 5 J/cm^2 εντός χρονικού διαστήματος 50 λεπτών, η ένταση της ακτινοβολίας ρυθμίστηκε στα 1,7 mW/cm^2. Βλέπε παράρτημα 2 σχήμα 2. Εάν χρησιμοποιηθεί άλλη κυτταρική σειρά ή διαφορετική φωτεινή πηγή, η δόση ακτινοβόλησης ενδέχεται να πρέπει να ρυθμιστεί κατά τρόπο ώστε να είναι δυνατόν να επιλεγούν επίπεδα δόσης αβλαβή για τα κύτταρα, αλλά επαρκή για τη διέγερση συνήθων φωτοτοξινών. Ο χρόνος έκθεσης στο φως υπολογίζεται ως εξής:

▼B

$$t(\min) = \frac{\text{δόση ακτινοβόλησης } (J/cm^2) \times 1000}{\text{ένταση ακτινοβολίας } (mW/cm^2) \times 60} \quad (1\ J = 1\ Wsec)$$

1.4.2 **Συνθήκες δοκιμής**

1.4.2.1 *Συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας*

Το εύρος των συγκεντρώσεων μιας χημικής ουσίας που υποβάλλεται σε δοκιμή παρουσία (+Irr) και απουσία (-Irr) φωτός θα πρέπει να προσδιορίζεται κατάλληλα με πειράματα εύρεσης του πεδίου τιμών δόσης. Μπορεί να είναι χρήσιμο να εκτιμηθεί η διαλυτότητα στην αρχή και στα 60 λεπτά (ή σε όποιο χρόνο αγωγής πρόκειται να χρησιμοποιηθεί), δεδομένου ότι είναι δυνατόν να μεταβληθεί με την πάροδο του χρόνου ή κατά τη διάρκεια της έκθεσης. Για να αποφευχθεί η επαγωγή τοξικότητας από ακατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας ή από πολύ όξινες ή αλκαλικές χημικές ουσίες, το pH των κυτταρικών καλλιεργειών στις οποίες έχει προστεθεί η ελεγχόμενη ουσία πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 6,5 και 7,8.

Η υψηλότερη συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας θα πρέπει να βρίσκεται εντός των ορίων των φυσιολογικών συνθηκών δοκιμής — θα πρέπει να αποφεύγονται, λόγου χάριν, δυσμενείς συνθήκες οσμωτικής πίεσης ή pH. Ανάλογα με την ελεγχόμενη ουσία, ενδέχεται να χρειαστεί να συνεκτιμηθούν άλλες φυσικοχημικές ιδιότητες ως παράγοντες που περιορίζουν την υψηλότερη συγκέντρωση ελεγχόμενης ουσίας. Για σχετικά αδιάλυτες ουσίες, οι οποίες δεν είναι τοξικές σε συγκεντρώσεις που φθάνουν το σημείο κορεσμού, η δοκιμή θα πρέπει να διενεργείται με την υψηλότερη εφικτή συγκέντρωση. Θα πρέπει γενικά να αποφεύγεται η καθίζηση της ελεγχόμενης ουσίας σε οιαδήποτε από τις ελεγχόμενες συγκεντρώσεις. Η μέγιστη συγκέντρωση ελεγχόμενης ουσίας δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 1 000 mg/ml, ενώ η ωσμωτικότητα δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 10 mmolar. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται γεωμετρική σειρά αραιώσεων 8 συγκεντρώσεων της ελεγχόμενης ουσίας με σταθερό συντελεστή αραίωσης (βλέπε σημείο 2.1, δεύτερο εδάφιο).

Εάν υπάρχουν στοιχεία (από πείραμα εύρεσης πεδίου τιμών) σύμφωνα με τα οποία η ελεγχόμενη ουσία δεν είναι κυτταροτοξική μέχρι την οριακή συγκέντρωση στο πείραμα που εκτελείται στο σκοτάδι (-Irr), αλλά είναι πολύ κυτταροτοξική όταν ακτινοβοληθεί (+Irr), το εύρος συγκεντρώσεων που θα επιλεγεί για το πείραμα (+Irr) μπορεί να είναι διαφορετικό από εκείνο που θα επιλεγεί για το πείραμα (–Irr), προκειμένου να τηρηθεί η απαίτηση επαρκούς ποιότητας των δεδομένων.

1.4.2.2 *Μάρτυρες*

1.4.2.2.1 Ευαισθησία των κυττάρων στην ακτινοβολία, συγκέντρωση ιστορικών στοιχείων:

Η ευαισθησία των κυττάρων στην φωτεινή πηγή θα πρέπει να ελέγχεται τακτικά (σε κάθε πέμπτη ανακαλλιέργεια περίπου) με εκτίμηση της βιωσιμότητάς τους μετά από έκθεση σε αυξανόμενες δόσεις ακτινοβολίας. Στην εκτίμηση αυτή θα πρέπει να χρησιμοποιούνται διάφορες δόσεις ακτινοβόλησης, συμπεριλαμβανομένων δόσεων σημαντικά υψηλότερων από εκείνες που χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή φωτοτοξικότητας 3T3 NRU. Ο ευκολότερος τρόπος ποσοτικού προσδιορισμού των δόσεων αυτών είναι η μέτρηση της υπεριώδους ακτινοβολίας της φωτεινής πηγής. Τα κύτταρα εμβολιάζονται στην πυκνότητα που χρησιμοποιείται για τη δοκιμή φωτοτοξικότητας 3T3 NRU *in vitro* και ακτινοβολούνται την επόμενη ημέρα. Η βιωσιμότητα των κυττάρων προσδιορίζεται μία ημέρα αργότερα με πρόσληψη χρωστικής Neutral Red. Θα πρέπει να καταδεικνύεται ότι η προκύπτουσα υψηλότερη μη κυτταροτοξική δόση (π.χ. στη μελέτη επικύρωσης: 5 J/cm^2 [UVA]) ήταν επαρκής για την ορθή ταξινόμηση των χημικών ουσιών αναφοράς (πίνακας 1).

▼B

1.4.2.2.2 Ευαισθησία στην ακτινοβολία, έλεγχος της τρέχουσας δοκιμής:

Η δοκιμή πληροί τα ποιοτικά κριτήρια, εάν οι ακτινοβολημένοι αρνητικοί μάρτυρες/διαλύτες, εμφανίζουν βιωσιμότητα μεγαλύτερη από 80 % σε σχέση με τον μη ακτινοβολημένο αρνητικό μάρτυρα/διαλύτη.

1.4.2.2.3 Βιωσιμότητα των διαλυτών μαρτύρων:

Η απόλυτη οπτική πυκνότητα ($OD_{540\ NRU}$) της Neutral Red που εκχυλίζεται από τους διαλύτες μάρτυρες δηλώνει κατά πόσον τα εμβολιασθέντα 1×10^4 κύτταρα ανά κοιλότητα αναπτύχθηκαν με κανονικό χρόνο διπλασιασμού κατά τη διήμερη διάρκεια της δοκιμασίας. Η δοκιμή πληροί τα κριτήρια αποδοχής εάν η μέση $OD_{540\ NRU}$ των μη υποβληθέντων σε αγωγή μαρτύρων είναι ίση με 0,4 ή μεγαλύτερη (δηλαδή περίπου εικοσαπλάσια της απορροφητικότητας υποβάθρου του διαλύτη).

1.4.2.2.4 Θετικός μάρτυρας:

Σε κάθε δοκιμή φωτοτοξικότητας 3T3 NRU *in vitro* πρέπει να ελέγχεται συγχρόνως και μια γνωστή φωτοτοξική χημική ουσία. Συνιστάται η χλωροπρομαζίνη (CPZ). Για τον έλεγχο της CPZ με το τυποποιημένο πρωτόκολλο της δοκιμής φωτοτοξικότητας 3T3 NRU *in vitro*, ορίστηκαν τα ακόλουθα κριτήρια αποδοχής της δοκιμής: CPZ ακτινοβολημένη (+Irr): IC_{50} = 0,1 έως 2,0 mg/ml, CPZ μη ακτινοβολημένη (-Irr): IC_{50} = 7,0 έως 90,0 mg/ml. Ο συντελεστής φωτοερεθισμού (PIF) θα πρέπει να είναι μεγαλύτερος του 6. Οι ιστορικές επιδόσεις του θετικού μάρτυρα θα πρέπει να παρακολουθούνται.

Αντί της χλωροπρομαζίνης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συγχρονικοί θετικοί μάρτυρες άλλες φωτοτοξικές χημικές ουσίες κατάλληλες για τη χημική κατηγορία ή τα χαρακτηριστικά διαλυτότητας της αξιολογούμενης ουσίας.

1.4.3 **Διαδικασία δοκιμής (6)(7)(8)(16)(17):**

1.4.3.1 *1η ημέρα:*

Φέρονται 100 mg θρεπτικού υλικού στις περιφερειακές κοιλότητες ενός μικροτιτλοδοτικού τρυβλίου ιστοκαλλιέργειας 96 κοιλοτήτων (= τυφλός προσδιορισμός). Στις εναπομένουσες κοιλότητες, φέρονται 100 ml κυτταρικού εναιωρήματος με 1×10^5 κύτταρα/ml (= 1×10^4 κύτταρα/κοιλότητα). Ετοιμάζονται δύο τρυβλία για κάθε σειρά συγκεντρώσεων της ελεγχόμενης ουσίας, καθώς και για τους μάρτυρες με διαλύτη και τους θετικούς μάρτυρες.

Τα κύτταρα επωάζονται επί 24 ώρες (βλέπε σημείο 1.4.1.2) έως ότου σχηματίσουν μονοστιβάδα σε επίπεδα ημισυρροής. Αυτή η περίοδος επώασης επιτρέπει την επαναφορά των κυττάρων σε κανονική κατάσταση, την πρόσφυση και τη λογαριθμική τους ανάπτυξη.

1.4.3.2 *2η ημέρα:*

Μετά την επώαση, αποχύνεται το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα εκπλύνονται προσεκτικά με 150 ml του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε για την επώαση. Προστίθενται 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος με την κατάλληλη συγκέντρωση ελεγχόμενης χημικής ουσίας ή διαλύτη (διαλύτης μάρτυρας). Χρησιμοποιούνται 8 διαφορετικές συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας. Τα κύτταρα επωάζονται με την ελεγχόμενη ουσία στο σκοτάδι επί 60 λεπτά (βλέπε σημείο 1.4.1.2 και σημείο 1.4.1.4 δεύτερο εδάφιο).

Από τα δύο τρυβλία που ετοιμάστηκαν για κάθε σειρά συγκεντρώσεων ελεγχόμενης ουσίας και για τους μάρτυρες, επιλέγεται ένα, συνήθως τυχαία, για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικότητας (-Irr) (τρυβλίο μάρτυρας) και ένα (τρυβλίο αγωγής) για τον προσδιορισμό της φωτοκυτταροτοξικότητας (+Irr).

▼B

Για την έκθεση +Irr, τα κύτταρα ακτινοβολούνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος επί 50 λεπτά διαμέσου του καλύμματος του τρυβλίου 96 κοιλοτήτων με την υψηλότερη δόση ακτινοβολίας που δεν είναι κυτταροτοξική (βλέπε επίσης παράρτημα 2). Τα μη ακτινοβοληθέντα τρυβλία (-Irr) διατηρούνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μέσα σε σκοτεινό κουτί επί 50 λεπτά (= χρόνος έκθεσης στο φως).

Το ελεγχόμενο διάλυμα αποχύνεται και ακολουθεί διπλή προσεκτική έκπλυση με 150 ml του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε για την επώαση, το οποίο όμως δεν περιέχει την ελεγχόμενη ουσία. Το ρυθμιστικό διάλυμα αντικαθίσταται με θρεπτικό υλικό και ακολουθεί επώαση (βλέπε σημείο 1.4.1.2) όλη τη νύκτα (18-22 ώρες).

1.4.3.3 *3η ημέρα:*

1.4.3.3.1 Μικροσκοπική αξιολόγηση

Εξετάζονται η ανάπτυξη και η μορφολογία των κυττάρων, καθώς και η ακεραιότητα της μονοστιβάδας με μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων. Καταγράφονται οι αλλαγές στη μορφολογία και οι επιδράσεις στην ανάπτυξη των κυττάρων.

1.4.3.3.2 Δοκιμή πρόσληψης Neutral Red

Τα κύτταρα εκπλύνονται με 150 ml προθερμασμένου ρυθμιστικού διαλύματος. Το διάλυμα έκπλυσης απομακρύνεται με ήπια άντληση. Προστίθενται 100 ml διαλύματος Neutral Red (NR) (υδροχλωρική 3-αμινο-7-διμεθυλαμινο-2-μεθυλοφαιναζίνη, αριθ. EINECS 209-035-8, αριθ. CAS 553-24-2, C.I. 50040) 50 μg/mL σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό (16) και ακολουθεί επώαση επί 3 ώρες, όπως περιγράφεται στο σημείο 1.4.1.2.

Μετά την επώαση, απομακρύνεται το υλικό NR και τα κύτταρα εκπλύνονται με 150 ml ρυθμιστικού διαλύματος. Ακολουθεί απόχυση και απομάκρυνση της περίσσειας ρυθμιστικού διαλύματος με στύπωση ή φυγοκέντρηση.

Προστίθενται ακριβώς 150 ml διαλύματος εκρόφησης NR (έχει παρασκευαστεί πρόσφατα με 49 μέρη νερού + 50 μέρη αιθανόλης + 1 μέρος οξικού οξέος).

Το μικροτιτλοδοτικό τρυβλίο ανακινείται ήπια με τη βοήθεια συσκευής ανακίνησης μικροτιτλοδοτικών τρυβλίων επί 10 λεπτά, μέχρις ότου εκχυλιστεί η NR από τα κύτταρα και σχηματιστεί ομοιογενές διάλυμα.

Μετράται η οπτική πυκνότητα του εκχυλίσματος NR στα 540 nm με φασματοφωτόμετρο, χρησιμοποιώντας την ένδειξη του τυφλού προσδιορισμού ως σημείο αναφοράς. Τα δεδομένα αποθηκεύονται σε κατάλληλα ηλεκτρονικά αρχεία για μεταγενέστερη ανάλυση.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1. ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Τα δεδομένα της δοκιμής θα πρέπει να επιτρέπουν την ουσιαστική ανάλυση της σχέσης συγκέντρωσης-απόκρισης με και χωρίς ακτινοβόληση και, εάν είναι δυνατόν, της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας που προκαλεί μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων κατά 50 % (IC_{50}). Εφόσον διαπιστωθεί κυτταροτοξικότητα, τόσο το εύρος των συγκεντρώσεων όσο και το μεταξύ των επιμέρους συγκεντρώσεων διάστημα θα πρέπει να ρυθμίζονται κατά τρόπο ώστε να μπορεί να χαραχθεί καμπύλη προσαρμοσμένη στα πειραματικά δεδομένα.

Σε περίπτωση σαφώς θετικών ή σαφώς αρνητικών αποτελεσμάτων (βλέπε σημείο 2.3, πρώτο εδάφιο), ενδέχεται να αρκεί το αρχικό πείραμα, υποστηριζόμενο από ένα ή περισσότερα προκαταρκτικά πειράματα εύρεσης πεδίου τιμών δόσης.

▼B

Τα διφορούμενα, οριακά ή ασαφή αποτελέσματα πρέπει να αποσαφηνίζονται με τη διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών (βλέπε επίσης σημείο 2.4 δεύτερο εδάφιο). Στις περιπτώσεις αυτές θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο μεταβολής των πειραματικών συνθηκών. Μεταξύ των πειραματικών συνθηκών που μπορούν να μεταβληθούν αναφέρονται το εύρος των συγκεντρώσεων, τα μεταξύ των διαδοχικών συγκεντρώσεων διαστήματα, ο χρόνος προεπώασης και ο χρόνος ακτινοβόλησης-έκθεσης. Στην περίπτωση των ασταθών στο νερό χημικών ουσιών μπορεί να ενδείκνυται μικρότερος χρόνος έκθεσης.

2.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η αξιολόγηση των δεδομένων μπορεί να βασιστεί στον υπολογισμό του συντελεστή φωτοερεθισμού (PIF) ή της μέσης φωτοεπίδρασης (MPE).

Για τον υπολογισμό των μέτρων φωτοκυτταροτοξικότητας (βλέπε κατωτέρω) η σειρά των διακριτών τιμών συγκέντρωσης-απόκρισης πρέπει να προκύψει κατά προσέγγιση από κατάλληλη συνεχή καμπύλη δόσης-απόκρισης (μοντέλο). Η καμπύλη προσαρμόζεται συνήθως στα δεδομένα με μέθοδο μη γραμμικής παλινδρόμησης (18). Για την εκτίμηση της επίδρασης της διακύμανσης των δεδομένων στην προσαρμοσμένη καμπύλη, συνιστάται η εφαρμογή της μεθόδου εύρεσης εκτιμητριών bootstrap.

Ο συντελεστής φωτοερεθισμού (PIF) υπολογίζεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$\mathrm{PIF} = \frac{\mathrm{IC}_{50}(-\mathrm{Irr})}{\mathrm{IC}_{50}(+\mathrm{Irr})}$$

Εάν δεν μπορεί να υπολογιστεί η IC_{50} παρουσία ή απουσία φωτός, δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστεί PIF για το ελεγχόμενο υλικό.

Η μέση φωτοεπίδραση (MPE) βασίζεται σε σύγκριση των πλήρων καμπυλών συγκέντρωσης-απόκρισης (19) και ορίζεται ως ο σταθμισμένος μέσος όρος αντιπροσωπευτικής σειράς τιμών φωτοεπίδρασης

$$\mathrm{MPE} = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i \mathrm{PE}_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

Η φωτοεπίδραση PE_c σε κάθε συγκέντρωση C ορίζεται ως το γινόμενο της επίδρασης της απόκρισης RE_c επί την επίδραση της δόσης DE_c, δηλαδή $PE_c = RE_c \times DE_c$. Η επίδραση της απόκρισης RE_c είναι η διαφορά μεταξύ των παρατηρούμενων αποκρίσεων απουσία και παρουσία φωτός, δηλαδή $RE_c = R_c$ (-Irr) - R_c (+Irr). Η επίδραση της δόσης δίδεται από τον τύπο

$$\mathrm{DE}_c = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

όπου C* αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση ισοδυναμίας, δηλαδή τη συγκέντρωση στην οποία η απόκριση +Irr ταυτίζεται με την απόκριση –Irr σε συγκέντρωση C. Σε περίπτωση που δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστεί η C*, επειδή οι τιμές απόκρισης της καμπύλης +Irr είναι συστηματικά υψηλότερες ή χαμηλότερες από την RC(-Irr), η επίδραση της δόσης ορίζεται σε 1. Οι συντελεστές στάθμισης w_i δίδονται από την υψηλότερη τιμή απόκρισης, δηλαδή w_i = MAX {Ri (+Irr), Ri (-Irr) }. Ο κάναβος συγκεντρώσεων C_i επιλέγεται κατά τρόπο ώστε να περικλείεται ο ίδιος αριθμός σημείων σε καθένα από τα διαστήματα συγκέντρωσης που ορίζονται από τις τιμές συγκέντρωσης οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα. Ο υπολογισμός της MPE περιορίζεται στη μέγιστη τιμή συγκέντρωσης, στην οποία μία τουλάχιστον από τις δύο καμπύλες εξακολουθεί να εμφανίζει τιμή απόκρισης τουλάχιστον 10 %. Εάν η μέγιστη αυτή συγκέντρωση υπερβαίνει την υψηλότερη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα +Irr, το υπόλοιπο τμήμα της καμπύλης +Irr ορίζεται στην τιμή απόκρισης «0». Η χημική ουσία ταξινομείται ως φωτοτοξική αναλόγως του εάν η τιμή MPE είναι ή όχι υψηλότερη από μία καταλλήλως επιλεγμένη διαχωριστική τιμή (τιμή αποκοπής/cut-off value) MPE_c = 0,15.

▼B

Για τον υπολογισμό των PIF και MPE διατίθεται σχετικό λογισμικό (20).

2.3. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Με βάση τη μελέτη επικύρωσης (8), η πρόγνωση για ελεγχόμενη ουσία με PIF < 2 ή MPE < 0,1 είναι «απουσία φωτοτοξικότητας». Μια τιμή PIF > 2 και < 5 ή MPE > 0,1 και < 0,15 συνεπάγεται «πιθανή φωτοτοξικότητα», ενώ τιμή PIF > 5 ή MPE > 0,15 συνεπάγεται «φωτοτοξικότητα».

Τα εργαστήρια που εκτελούν για πρώτη φορά την εν λόγω δοκιμασία οφείλουν να ελέγξουν τις ουσίες αναφοράς που παρατίθενται στον πίνακα 1, πριν υποβάλουν τις ελεγχόμενες ουσίες σε δοκιμή φωτοτοξικότητας. Οι τιμές PIF ή MPE πρέπει να είναι παραπλήσιες εκείνων που αναγράφονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1

Χημική ονομασία	Αριθ. EINECS	Αριθ. CAS	PIF	MPE	κορυφή απορρόφησης	Διαλύτης [1]
Υδροχλωρική αμιοδαρόνη	243-293-2	[19774-82-4]	> 3,25	0,27-0,54	242 nm 300 nm (ώμος)	αιθανόλη
Υδροχλωρική χλωροπρομαζίνη	200-701-3	[69-09-0]	> 14,4	0,33-0,63	309 nm	αιθανόλη
Νορφλοξακίνη	274-614-4	[70458-96-7]	> 71,6	0,34-0,90	316 nm	ακετονιτρίλιο
Ανθρακένιο	204-371-1	[120-12-7]	> 18,5	0,19-0,81	356 nm	ακετονιτρίλιο
Πρωτοπορφυρίνη IX, άλας με νάτριο	256-815-9	[50865-01-5]	> 45,3	0,54-0,74	402 nm	αιθανόλη
L-ιστιδίνη		[7006-35-1]	απουσία PIF	0,05-0,10	211 nm	νερό
Εξαχλωροφαίνιο	200-733-8	[70-30-4]	1,1-1,7	0,00-0,05	299 nm 317 nm (ώμος)	αιθανόλη
Λαυρυλοθειικό νάτριο	205-788-1	[151-21-3]	1,0-1,9	0,00-0,05	απουσία απορρόφησης	νερό

[1] Διαλύτης χρησιμοποιούμενος για τη μέτρηση της απορρόφησης.

2.4. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Εάν παρατηρούνται φωτοτοξικές επιδράσεις μόνο στην υψηλότερη ελεγχόμενη συγκέντρωση (ιδίως προσκειμένου για υδατοδιαλυτές ελεγχόμενες ουσίες) μπορεί να χρειαστεί να ληφθούν υπόψη πρόσθετες παράμετροι για την εκτίμηση του κινδύνου. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται δεδομένα για την απορρόφηση από το δέρμα και τη συσσώρευση της χημικής ουσίας στο δέρμα και/ή δεδομένα από άλλες δοκιμές, π.χ. δοκιμές *in vitro* σε δέρμα ζώων ή ανθρώπου ή μοντέλα δέρματος.

▼B

Εφόσον δεν καταδειχθεί τοξικότητα (+Irr και -Irr) και εάν, λόγω μικρής διαλυτότητας, οι συγκεντρώσεις που μπορούσαν να ελεγχθούν ήταν περιορισμένες, ενδέχεται να αμφισβητηθεί η καταλληλότητα της δοκιμασίας για την ελεγχόμενη ουσία. Στην περίπτωση αυτή, πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο διεξαγωγής επιβεβαιωτικής δοκιμής, π.χ. με χρήση άλλου μοντέλου.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ**

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση για τη δοκιμή πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη ουσία:

— στοιχεία ταυτοποίησης, κοινόχρηστες ονομασίες, ονομασία κατά IUPAC και αριθ. CAS, εφόσον είναι γνωστά,

— φυσική μορφή και καθαρότητα,

— φυσικοχημικές ιδιότητες που έχουν σημασία για τη διεξαγωγή της μελέτης,

— φάσμα απορρόφησης υπεριώδους/ορατού,

— σταθερότητα και φωτοσταθερότητα, εάν είναι γνωστές.

Διαλύτης:

— αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη,

— διαλυτότητα της ελεγχόμενης ουσίας στον διαλύτη,

— εκατοστιαία αναλογία του διαλύτη στο υλικό αγωγής.

Κύτταρα:

— τύπος και προέλευση των κυττάρων

— απουσία μυκοπλάσματος,

— αριθμός κυτταρικών ανακαλλιεργειών, εάν είναι γνωστός,

— ευαισθησία των κυττάρων στην ακτινοβολία, προσδιοριζόμενη με τον εξοπλισμό ακτινοβόλησης που χρησιμοποιείται στη δοκιμή φωτοτοξικότητας 3T3 NRU *in vitro*.

Συνθήκες δοκιμής (1)· *επώαση πριν και μετά την αγωγή*:

— τύπος και σύνθεση του θρεπτικού υλικού,

— συνθήκες επώασης (συγκέντρωση CO_2, θερμοκρασία, υγρασία),

— διάρκεια της επώασης (πριν και μετά την αγωγή).

Συνθήκες δοκιμής (2)· *αγωγή με τη χημική ουσία*:

— σκεπτικό της επιλογής των συγκεντρώσεων της ελεγχόμενης ουσίας που χρησιμοποιήθηκαν με και χωρίς ακτινοβόληση,

— σε περίπτωση δυσδιάλυτης ελεγχόμενης ουσίας και απουσίας κυτταροτοξικότητας, σκεπτικό της επιλογής της υψηλότερης συγκέντρωσης που ελέγχθηκε,

— τύπος και σύνθεση του υλικού αγωγής (ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων),

— διάρκεια της αγωγής με τη χημική ουσία.

Συνθήκες δοκιμής (3)· *ακτινοβόληση*:

— σκεπτικό της επιλογής της χρησιμοποιηθείσας φωτεινής πηγής,

▼B

— κατασκευαστής και τύπος της φωτεινής πηγής και του ραδιομέτρου

— χαρακτηριστικά της φασματικής έντασης ακτινοβολίας της φωτεινής πηγής,

— χαρακτηριστικά διαπερατότητας και απορρόφησης του ή των χρησιμοποιηθέντων φίλτρων,

— χαρακτηριστικά του ραδιομέτρου και λεπτομέρειες της βαθμονόμησής του,

— απόσταση της φωτεινής πηγής από το σύστημα δοκιμής,

— ένταση της ακτινοβολίας UVA στην απόσταση αυτή, εκφραζόμενη σε mW/cm^2,

— διάρκεια της έκθεσης σε υπεριώδες/ορατό φως,

— δόση UVA (ένταση ακτινοβολίας x χρόνος), εκφραζόμενη σε J/cm^2,

— θερμοκρασία των κυτταρικών καλλιεργειών κατά την ακτινοβόληση και των κυτταρικών καλλιεργειών που διατηρήθηκαν, ταυτόχρονα, στο σκοτάδι.

Συνθήκες δοκιμής (4)· *δοκιμή βιωσιμότητας με Neutral Red*:

— σύνθεση του υλικού αγωγής με Neutral Red,

— διάρκεια επώασης με Neutral Red,

— συνθήκες επώασης (συγκέντρωση CO_2, θερμοκρασία, υγρασία),

— συνθήκες εκχύλισης της Neutral Red (εκχυλιστικό μέσο, διάρκεια),

— μήκος κύματος που χρησιμοποιήθηκε για τη φασματοφωτομετρική μέτρηση της οπτικής πυκνότητας της Neutral Red,

— δεύτερο μήκος κύματος (αναφοράς), εφόσον χρησιμοποιήθηκε,

— περιεχόμενο του τυφλού δείγματος του φασματοφωτομέτρου, εφόσον χρησιμοποιήθηκε.

Αποτελέσματα:

— κυτταρική βιωσιμότητα σε κάθε συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας, εκφραζόμενη σε επί τοις εκατό ποσοστό της μέσης βιωσιμότητας των συγχρονικών διαλυτών μαρτύρων,

— καμπύλες συγκέντρωσης-απόκρισης (συγκέντρωση ελεγχόμενης ουσίας σε συνάρτηση με τη σχετική κυτταρική βιωσιμότητα), λαμβανόμενες σε ταυτόχρονα πειράματα +Irr και -Irr,

— ανάλυση των καμπυλών συγκέντρωσης — απόκρισης: εφόσον είναι δυνατόν, υπολογισμός με/χωρίς υπολογιστή των τιμών IC_{50} (+Irr) και IC_{50} (-Irr),

— σύγκριση των δύο καμπυλών συγκέντρωσης — απόκρισης που λαμβάνονται με και χωρίς ακτινοβόληση, είτε με υπολογισμό του συντελεστή φωτοερεθισμού (PIF) είτε με υπολογισμό της μέσης φωτοεπίδρασης (MPE),

— κριτήρια αποδοχής της δοκιμής· συγχρονικός μάρτυρας-διαλύτης:

— απόλυτη βιωσιμότητα (οπτική πυκνότητα του εκχυλίσματος Neutral Red) ακτινοβολημένων και μη ακτινοβολημένων κυττάρων,

— ιστορικά στοιχεία για τον αρνητικό μάρτυρα-διαλύτη· μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις.

— κριτήρια αποδοχής της δοκιμής· συγχρονικός θετικός μάρτυρας:

▼B

— IC_{50} (+Irr) και IC_{50} (-Irr) και PIF/MPE της χημικής ουσίας-θετικού μάρτυρα,

— ιστορικά στοιχεία για τη χημική ουσία-θετικό μάρτυρα: IC_{50} (+Irr) και IC_{50} (-Irr) και PIF/MPE· μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Lovell W.W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. Toxic. *In Vitro* 7: 95-102.

2. Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In «Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry» Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam. p XI-XXXV.

3. Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, 22, 314-348.

4. Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In «The science of Photobiology» Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, p 79-110.

5. OECD (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.7 «Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water» Environment Directorate, OECD, Paris.

6. Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer. F. Moore. L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxic. *In Vitro* 8, 793-796.

7. Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA, 26, 7-8.

8. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G. De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P. (1998). The international EU/COLIPA *In vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxic. *In Vitro* 12, 305-327.

9. OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30th-31th October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.

10. Borenfreund, E., and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Lett., 24, 119-124.

11. Hay, R.J. (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical Biochemistry 171, 225-237.

▼B

12. Lambert L.A, Warner W.G., and Kornhauser A. (1996) Animal models for phototoxicity testing. In «Dermatotoxicology», edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, p 515-530.

13. Tyrrell R.M., Pidoux M (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. Cancer Res., 47, 1825-1829.

14. ISO 10977. (1993). Photography — Processed photographic colour films and paper prints — Methods for measuring image stability.

15. Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumnation, Publication No. 90, Vienna, 1993, ISBN 3900734275

16. ZEBET/ECVAM/COLIPA — Standard Operating Procedure: *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998. 18 pgs.

17. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U. (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union *Directive 76/768/EEC,* in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. ATLA 26, 679-708.

18. Holzhütter, H.G., and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. J. Biol. Systems 3, 127-138.

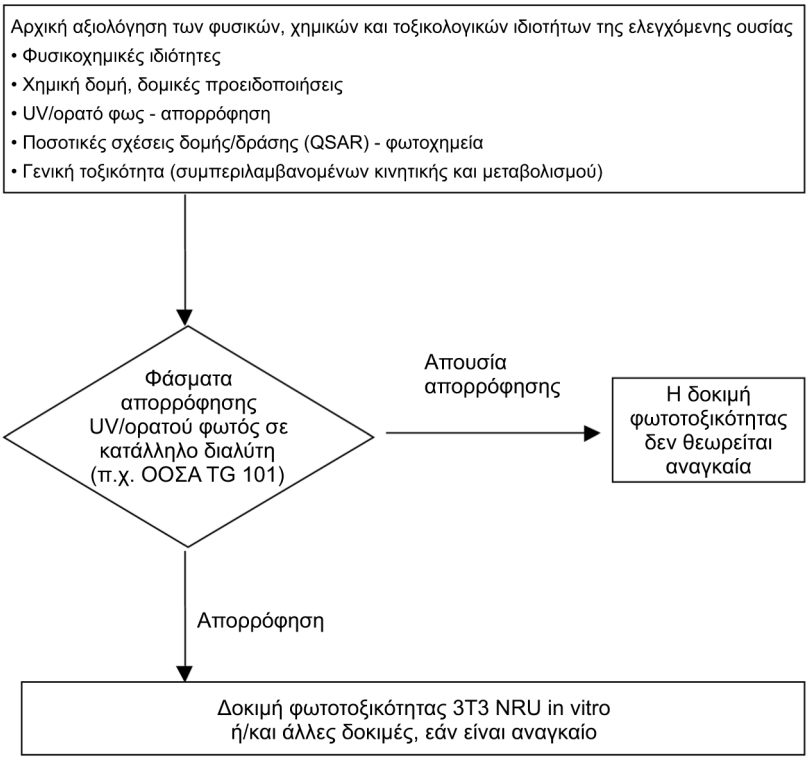
19. Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, 445-462.

20. http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html

▼**B**

Παραρτημα 1

Ρόλος της δοκιμής φωτοτοξικότητας 3T3 NRU σε μια προσέγγιση διαδοχικών δοκιμών (ακολουθιακός έλεγχος) φωτοτοξικότητας των χημικών ουσιών

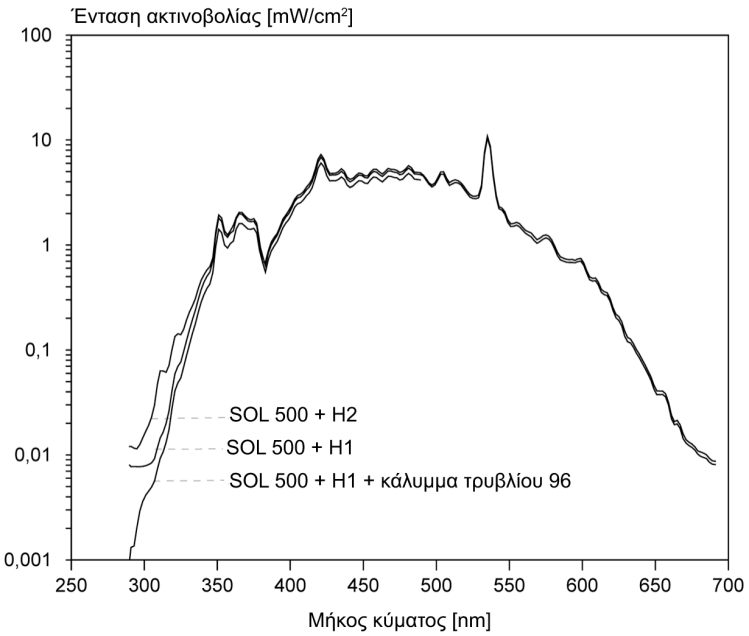


▼B

Παραρτημα 2

Σχήμα 1

Κατανομή της φασματικής έντασης της ακτινοβολίας ηλιακού προσομοιωτή εφοδιασμένου με φίλτρα



(Βλέπε σημείο 1.4.1.5 δεύτερο εδάφιο.)

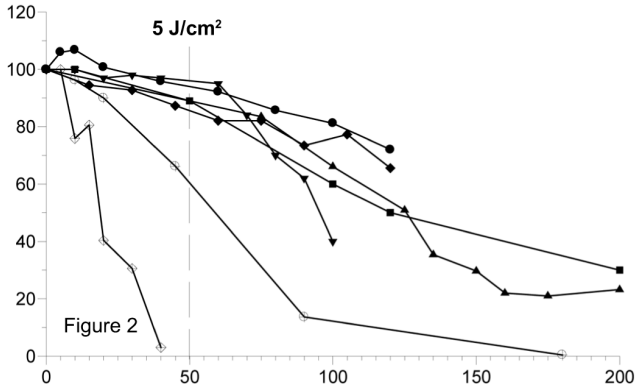
Στο σχήμα 1 παρέχεται παράδειγμα αποδεκτής κατανομής της φασματικής έντασης της ακτινοβολίας ηλιακού προσωμοιωτή εφοδιασμένου με φίλτρα, η οποία ελήφθη από την εμπλουτισμένη πηγή αλογονιδίου μετάλλου που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη επικύρωσης της δοκιμής φωτοτοξικότητας 3T3 XRU (6)(8)(17). Παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της χρήσης δύο διαφορετικών φίλτρων και το επιπλέον φιλτράρισμα από το κάλυμμα τρυβλίου 96 κοιλοτήτων. Το φίλτρο H2 χρησιμοποιήθηκε μόνο με συστήματα δοκιμής που ανέχονται υψηλότερες δόσεις UVB (δοκιμή με μοντέλο δέρματος και δοκιμή φωτοαιμόλυσης ερυθρών αιμοσφαιρίων). Στη δοκιμή φωτοτοξικότητας 3T3 NRU χρησιμοποιήθηκε το φίλτρο H1. Από το σχήμα προκύπτει ότι το επιπλέον φιλτράρισμα από το κάλυμμα του τρυβλίου παρατηρείται κυρίως στην περιοχή UVB, απομένει ωστόσο επαρκής UVB στο φάσμα ακτινοβόλησης για τη διέγερση χημικών ουσιών που απορροφούν κατά κανόνα στην περιοχή UVB, όπως η αμιοδαρόνη (βλέπε πίνακα 1).

▼B

Σχήμα 2

Ευαισθησία των κυττάρων Balb/c 3T3 στην ακτινοβόληση (μετρούμενη στην περιοχή UVA)

Κυτταρική βιωσιμότητα (% πρόσληψη Neutral Red από μάρτυρες στο σκοτάδι)



χρόνος ακτινοβόλησης (λεπτά)

(10 λεπτά = 1 joule UVA/cm²)

(Βλέπε σημεία 1.4.1.5.2 δεύτερο εδάφιο, 1.4.2.2.1 και 1.4.2.2.2.)

Ευαισθησία των κυττάρων Balb/c 3T3 στην ακτινοβόληση με τον ηλιακό προσομοιωτή που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη επικύρωσης της δοκιμής φωτοτοξικότητας 3T3NRU, μετρούμενη στην περιοχή UVA. Στο σχήμα εμφαίνονται τα αποτελέσματα της μελέτης προεπικύρωσης σε 7 διαφορετικά εργαστήρια (1). Ενώ οι δύο καμπύλες με τα λεπτά σύμβολα ελήφθησαν με κύτταρα μεγάλης ηλικίας (μεγάλος αριθμός ανακαλλιεργειών), τα οποία χρειάστηκε να αντικατασταθούν με νέες κυτταρικές καλλιέργειες, οι καμπύλες με τα έντονα σύμβολα δείχνουν κύτταρα με αποδεκτή ανοχή ακτινοβολίας.

Με βάση τα στοιχεία αυτά προσδιορίστηκε η υψηλότερη μη κυτταροτοξική δόση ακτινοβόλησης των 5 J/cm^2 (κατακόρυφη διακεκομμένη γραμμή). Η οριζόντια διακεκομμένη γραμμή δείχνει επιπλέον τη μέγιστη αποδεκτή επίδραση της ακτινοβόλησης που παρατίθεται στο σημείο 1.4.2.2.

▼M3

B.42. **ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ: ΤΟΠΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΛΕΜΦΑΔΕΝΩΝ**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Οι κατευθυντήριες γραμμές του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή δοκιμών με χημικές ουσίες και οι μέθοδοι δοκιμών της ΕΕ που βασίζονται στις εν λόγω κατευθυντήριες γραμμές επανεξετάζονται κατά περιόδους με βάση την επιστημονική πρόοδο, τις μεταβαλλόμενες ανάγκες κανονιστικής ρύθμισης και τον προβληματισμό όσον αφορά την καλή μεταχείριση των ζώων. Στο παρελθόν θεσπίστηκε η αρχική μέθοδος δοκιμών για τον προσδιορισμό της δερματικής ευαισθητοποίησης σε ποντικούς, δηλαδή η τοπική δοκιμασία λεμφαδένων (LLNA — OECD Test Guideline 429, κεφάλαιο B.42 του παρόντος παραρτήματος) (1). Έχουν δημοσιευθεί λεπτομερείς περιγραφές της επικύρωσης της LLNA, καθώς και επισκόπηση των σχετικών εργασιών (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). Η επικαιροποιημένη LLNA βασίζεται στην αξιολόγηση της αποκτηθείσας πείρας και των επιστημονικών δεδομένων (12). Πρόκειται για μια δεύτερη μέθοδο δοκιμών που σχεδιάστηκε για την εκτίμηση του δερματικού ευαισθητοποιητικού δυναμικού των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) στα ζώα. Η άλλη μέθοδος δοκιμών (δηλαδή η «OECD Test Guideline 406», κεφάλαιο B.6 του παρόντος παραρτήματος) συνίσταται σε δοκιμές σε ινδικά χοιρίδια, συγκεκριμένα στη δοκιμή μεγιστοποίησης σε ινδικά χοιρίδια και τη δοκιμή Buehler (13). Η LLNA προσφέρει πλεονεκτήματα έναντι της μεθόδου B.6 και της κατευθυντήριας γραμμής «OECD Test Guideline 406» (13) από πλευράς καλής μεταχείρισης των ζώων. Η παρούσα επικαιροποιημένη μέθοδος δοκιμών LLNA περιλαμβάνει μια σειρά από πρότυπα επιδόσεων (προσάρτημα 1) τα οποία είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση της κατάστασης επικύρωσης νέων και/ή τροποποιημένων μεθόδων δοκιμών που είναι λειτουργικά και μηχανιστικά παρεμφερείς με την LLNA, σύμφωνα με το καθοδηγητικό έγγραφο «OECD Guidance Document No. 34» του ΟΟΣΑ (14).

2. Η LLNA μελετά το επαγωγικό στάδιο της δερματικής ευαισθητοποίησης και παρέχει κατάλληλα ποσοτικά δεδομένα για την εκτίμηση της σχέσης δόσης-απόκρισης. Επισημαίνεται ότι οι ασθενείς/μέτριες ευαισθητοποιητικές ουσίες που συνιστάται να χρησιμοποιούνται ως θετικοί μάρτυρες στις μεθόδους δοκιμών σε ινδικά χοιρίδια (δηλαδή στις μεθόδους B.6, OECD Test Guideline 406) (13) είναι κατάλληλες και για την LLNA (6) (8) (15). Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών περιγράφεται επίσης, ως εναλλακτική επιλογή, μια προσέγγιση περιορισμένης LLNA (reduced LLNA/rLLNA) με την οποία είναι δυνατόν να μειωθεί ο αριθμός των χρησιμοποιούμενων ζώων έως και κατά 40 % (16) (17) (18). Η rLLNA μπορεί να χρησιμοποιείται όταν χρειάζεται να επιβεβαιωθεί, για ρυθμιστικούς λόγους, μια αρνητική πρόγνωση δυναμικού δερματικής ευαισθητοποίησης, υπό τον όρο ότι τηρούνται όλες οι υπόλοιπες προδιαγραφές του πρωτοκόλλου της LLNA, όπως περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών. Η πρόγνωση αρνητικού αποτελέσματος θα πρέπει να βασίζεται σε όλα τα διαθέσιμα στοιχεία, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4. Για την εφαρμογή της προσέγγισης rLLNA θα πρέπει να προβάλλονται σαφείς λόγοι και επιστημονική αιτιολόγηση. Εάν, παρά τις προβλέψεις, προκύψει θετικό ή αμφίβολο αποτέλεσμα από την rLLNA, ενδέχεται να χρειαστούν πρόσθετες δοκιμές για την ερμηνεία ή τη διασαφήνιση των ευρημάτων. Η rLLNA δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της επικινδυνότητας ευαισθητοποιητικών για το δέρμα ελεγχόμενων ουσιών, όταν χρειάζονται στοιχεία σχετικά με τη σχέση δόσης-απόκρισης, λόγου χάριν για την κατάταξη σε υποκατηγορίες στο πλαίσιο του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων και του Παγκοσμίως Εναρμονισμένου Συστήματος Ταξινόμησης και Επισήμανσης Χημικών Προϊόντων (GHS).

ΟΡΙΣΜΟΙ

3. Οι χρησιμοποιούμενοι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 2.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

4. Η LLNA παρέχει μια εναλλακτική μέθοδο αναγνώρισης χημικών προϊόντων που πιθανώς προκαλούν δερματική ευαισθητοποίηση. Αυτό δεν σημαίνει κατ' ανάγκη ότι η LLNA πρέπει να χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση αντί των δοκιμών σε ινδικά χοιρίδια (μέθοδοι B.6, OECD Test Guideline 406) (13), αλλά μάλλον ότι είναι εφάμιλλη των τελευταίων και μπορεί να χρησιμοποιείται ως εναλλακτική λύση, η οποία κατά κανόνα δεν απαιτεί περαιτέρω επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, θετικών και αρνητικών. Πριν

▼M3

από τη διεξαγωγή της μελέτης, το εργαστήριο δοκιμών θα πρέπει να εξετάζει όλα τα διαθέσιμα στοιχεία σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία, μεταξύ των οποίων την ταυτότητα και τη χημική δομή της, τις φυσικές και χημικές ιδιότητές της, τα αποτελέσματα τυχόν άλλων δοκιμών τοξικότητας της ουσίας, in vitro ή in vivo, και τα τοξικολογικά δεδομένα που αφορούν χημικά προϊόντα ανάλογης δομής. Τα στοιχεία αυτά θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη προκειμένου να κριθεί αν η LLNA είναι κατάλληλη για την ουσία (με δεδομένη την ασυμβατότητα περιορισμένου αριθμού ειδών χημικών προϊόντων με την LLNA —βλέπε παράγραφο 5) και ως βοήθημα κατά την επιλογή δόσεων.

5. Η LLNA είναι μέθοδος in vivo και, επομένως, δεν καταργεί τη χρήση ζώων στην εκτίμηση της δραστικότητας αλλεργικής ευαισθητοποίησης εξ επαφής. Είναι ωστόσο ικανή να περιορίσει τον αριθμό των ζώων που απαιτούνται για τον σκοπό αυτό. Επιπλέον, βελτιώνει ουσιαστικά (ελάττωση του πόνου και της δυσφορίας) τον τρόπο με τον οποίο χρησιμοποιούνται τα ζώα στις δοκιμές αλλεργικής ευαισθητοποίησης εξ επαφής. Η LLNA βασίζεται στην εξέταση των ανοσολογικών συμβάντων που προκαλούν τα χημικά προϊόντα κατά το επαγωγικό στάδιο της ευαισθητοποίησης. Σε αντίθεση με τις δοκιμές σε ινδικά χοιρίδια (μέθοδοι B.6, OECD Test Guideline 406) (13), η LLNA δεν απαιτεί την εκδήλωση των επαγόμενων από το ερέθισμα αντιδράσεων δερματικής υπερευαισθησίας. Επιπροσθέτως, δεν απαιτεί τη χρήση ανοσοενισχυτικών, όπως η δοκιμή μεγιστοποίησης σε ινδικά χοιρίδια (13). Κατ' αυτόν τον τρόπο, η LLNA περιορίζει τους πόνους και τη δυσφορία των ζώων. Παρά τα πλεονεκτήματά της έναντι των μεθόδων B.6 και OECD Test Guideline 406, πρέπει να αναγνωριστεί ότι υπάρχουν ορισμένοι περιοριστικοί παράγοντες που ενδέχεται να επιβάλλουν τη χρήση των B.6 και OECD Test Guideline 406 (13) (π.χ., ψευδαρνητικά ευρήματα κατά την LLNA με ορισμένα μέταλλα, ψευδοθετικά ευρήματα με ορισμένες ερεθιστικές για το δέρμα ουσίες [όπως ορισμένα επιφανειοδραστικά χημικά προϊόντα] (19) (20) ή η διαλυτότητα της ελεγχόμενης ουσίας). Επιπροσθέτως, η χρήση των δοκιμών σε ινδικά χοιρίδια (μέθοδοι B.6, OECD Test Guideline 406) (13) ενδέχεται να καταστεί αναγκαία στην περίπτωση χημικών ουσιών ή τάξεων χημικών ουσιών που περιέχουν δραστικές ομάδες οι οποίες έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να αποτελέσουν συγχυτικούς παράγοντες (21). Επίσης, αν ληφθεί υπόψη η περιορισμένη βάση δεδομένων επικύρωσης, η οποία περιλαμβάνει κατά κύριο λόγο σκευάσματα φυτοφαρμάκων, είναι πιθανότερο να προκύψει θετικό αποτέλεσμα για τα συγκεκριμένα είδη ελεγχόμενων ουσιών με την LLNA απ' ό,τι με τη δοκιμή σε ινδικά χοιρίδια (22). Ωστόσο, κατά τη διεξαγωγή δοκιμών με σκευάσματα, είναι δυνατόν να εξετάζεται το ενδεχόμενο συμπερίληψης ομοειδών ουσιών με γνωστά αποτελέσματα ως ουσιών συγκριτικής αξιολόγησης, ώστε να καταδεικνύεται η ορθή λειτουργία της LLNA (βλέπε παράγραφο 16). Εκτός αυτών των εντοπισθέντων περιορισμών, θεωρείται ότι η LLNA μπορεί να εφαρμοστεί στις δοκιμές οποιασδήποτε ουσίας, εκτός εάν αυτή έχει ιδιότητες που ενδέχεται να επηρεάσουν την ορθότητα της μεθόδου.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

6. Η βασική αρχή στην οποία στηρίζεται η LLNA είναι ότι οι ευαισθητοποιητικές ουσίες επάγουν πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων των λεμφαδένων που αποχετεύουν το σημείο εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας. Ο πολλαπλασιασμός αυτός είναι ανάλογος με τη δόση και με την ισχύ του εφαρμοζόμενου αλλεργιογόνου και αποτελεί ένα απλό μέσο αντικειμενικής, ποσοτικής μέτρησης της ευαισθητοποίησης. Μετράται με σύγκριση του αριθμητικού μέσου του πολλαπλασιασμού σε κάθε ομάδα δοκιμής προς τον αριθμητικό μέσο του πολλαπλασιασμού στην ομάδα-μάρτυρα που έχει υποβληθεί σε αγωγή με τον φορέα (VC). Προσδιορίζεται ο λόγος του αριθμητικού μέσου του πολλαπλασιασμού σε κάθε ομάδα που υποβάλλεται σε αγωγή προς την αντίστοιχη τιμή για την παράλληλη ομάδα VC, ο οποίος καλείται δείκτης διέγερσης (SI) και πρέπει να είναι ≥ 3 ώστε να δικαιολογείται η ταξινόμηση μιας ελεγχόμενης ουσίας ως δυνάμει ευαισθητοποιητικής για το δέρμα. Οι διαδικασίες που περιγράφονται στο παρόν κεφάλαιο βασίζονται στη χρήση ραδιοσήμανσης in vivo για τη μέτρηση ενός αυξημένου αριθμού πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων στους αποχετευτικούς ωτικούς λεμφαδένες. Ωστόσο, επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται και άλλα τελικά σημεία για την εκτίμηση του αριθμού πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων, υπό τον όρο ότι πληρούνται απόλυτα οι απαιτήσεις των προτύπων για τις επιδόσεις (προσάρτημα 1).

▼M3

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Επιλογή ζωικού είδους

7. Το είδος που έχει επιλεγεί για τη συγκεκριμένη δοκιμή είναι ο ποντικός. Χρησιμοποιούνται νεαροί ενήλικες θηλυκοί ποντικοί της φυλής CBA/Ca ή CBA/J, που δεν έχουν ποτέ γεννήσει ούτε εγκυμονούν. Κατά την έναρξη της μελέτης, η ηλικία των ζώων πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 8 και 12 εβδομάδων και οι διαφορές βάρους μεταξύ τους πρέπει να είναι ελάχιστες και να μην υπερβαίνουν το 20 % της μέσης τιμής. Εναλλακτικά, είναι δυνατή η χρήση άλλων φυλών, καθώς και αρσενικών ζώων, εφόσον έχουν συγκεντρωθεί επαρκή δεδομένα από τα οποία προκύπτει ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές απόκρισης κατά την LLNA, οφειλόμενες ειδικά στη φυλή και/ή το φύλο.

Συνθήκες στέγασης και διατροφής

8. Οι ποντικοί πρέπει να στεγάζονται σε ομάδες (23), εκτός εάν η ατομική στέγασή τους δικαιολογείται με επαρκή επιστημονική αιτιολόγηση. Η θερμοκρασία του θαλάμου πειραματόζωων πρέπει να είναι 22 ± 3 °C. Αν και η σχετική υγρασία πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου, εντούτοις ο στόχος θα πρέπει να είναι μια τιμή 50-60 %. Ο φωτισμός θα πρέπει να είναι τεχνητός, με φωτοπερίοδο 12ώρου. Για τη διατροφή επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται συνήθη εργαστηριακά σιτηρέσια με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού.

Προετοιμασία των ζώων

9. Τα ζώα επιλέγονται τυχαία, σημαίνονται με τρόπο που επιτρέπει την αναγνώριση του καθενός (αλλά όχι με αναγνωριστικό ενώτιο οποιασδήποτε μορφής) και παραμένουν στους κλωβούς τους τουλάχιστον για πέντε ημέρες πριν από την έναρξη της χορήγησης των δόσεων, ώστε να εγκλιματιστούν στις εργαστηριακές συνθήκες. Πριν από την έναρξη της αγωγής, εξετάζονται όλα τα ζώα για να είναι βέβαιο ότι δεν παρουσιάζουν εμφανείς βλάβες του δέρματος.

Παρασκευή των διαλυμάτων δοσολογίας

10. Πριν από την εφαρμογή στο αυτί ποντικού, τα στερεά χημικά προϊόντα πρέπει να διαλύονται, ή να σχηματίζεται εναιώρημά τους, σε κατάλληλους διαλύτες/φορείς και να αραιώνονται, εφόσον ενδείκνυται. Τα υγρά χημικά προϊόντα μπορούν να εφαρμόζονται ως έχουν ή να αραιώνονται πριν από τη χορήγηση. Τα αδιάλυτα χημικά προϊόντα, όπως αυτά που συναντώνται συνήθως στα ιατροτεχνολογικά είδη, πρέπει να υποβάλλονται σε εξαντλητική εκχύλιση με κατάλληλο διαλύτη, ώστε να παραλαμβάνονται όλα τα εκχυλίσιμα συστατικά για δοκιμή πριν από την εφαρμογή στο αυτί ποντικού. Τα παρασκευάσματα της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να ανανεώνονται καθημερινά, εκτός εάν η φύλαξή τους είναι αποδεκτή βάσει των σχετικών με τη σταθερότητα στοιχείων.

Έλεγχος αξιοπιστίας

11. Χρησιμοποιούνται χημικά προϊόντα ως θετικοί μάρτυρες για να καταδειχθεί η ορθή εκτέλεση της δοκιμασίας με την απόκριση, με επαρκή και αναπαραγώγιμη ευαισθησία, σε ευαισθητοποιητική ελεγχόμενη ουσία για την οποία έχει χαρακτηριστεί επακριβώς το μέγεθος της απόκρισης. Συνιστάται η συμπερίληψη παράλληλου θετικού μάρτυρα επειδή καταδεικνύει την ικανότητα του εργαστηρίου να εκτελεί με επιτυχία κάθε δοκιμασία και καθιστά δυνατή την εκτίμηση της ενδοεργαστηριακής και διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας και συγκρισιμότητας. Επίσης, καθώς ορισμένες ρυθμιστικές Αρχές απαιτούν τη χρήση θετικού μάρτυρα σε κάθε μελέτη, συνιστάται στους χρήστες να ζητούν τη γνώμη των αρμόδιων αρχών πριν από τη διεξαγωγή της LLNA. Συνιστάται, επομένως, η χρήση παράλληλου θετικού μάρτυρα ως συνήθης πρακτική, ώστε να μη χρειάζονται πρόσθετες δοκιμές σε ζώα για την κάλυψη των αναγκών που μπορεί να δημιουργήσει η περιοδική χρήση θετικών μαρτύρων (βλέπε παράγραφο 12). Ένας θετικός μάρτυρας θα πρέπει να δίδει θετική απόκριση κατά την LLNA σε επίπεδα έκθεσης τα οποία αναμένεται να προκαλέσουν αύξηση του SI σε τιμή άνω του 3 σε σύγκριση με την ομάδα αρνητικού μάρτυρα. Η δόση για τον θετικό μάρτυρα θα πρέπει να επιλέγεται κατά τρόπο ώστε να μην προκαλεί υπέρμετρο ερεθισμό του δέρματος ή συστημική τοξικότητα και η επαγωγή να είναι αναπαραγώγιμη αλλά όχι υπερβολική (δηλαδή οι τιμές SI > 20 θεωρούνται υπέρμετρες). Οι προτιμώμενοι θετικοί μάρτυρες είναι το

▼M3

διάλυμα εξυλοκινναμωμικής αλδεΰδης (αριθ. Chemical Abstracts Service [CAS] 101-86-0) 25 % σε μείγμα ακετόνης-ελαιολάδου (4:1, v/v) και το διάλυμα μερκαπτο-βενζοθειαζολίου (αριθ. CAS 149-30-4) 5 % σε *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο (βλέπε προσάρτημα 1, πίνακας 1). Σε ορισμένες, δεόντως αιτιολογημένες περιπτώσεις, μπορούν να χρησιμοποιούνται άλλοι θετικοί μάρτυρες που πληρούν τα προαναφερόμενα κριτήρια.

12. Παρά τη σύσταση για συμπερίληψη παράλληλης ομάδας θετικού μάρτυρα, σε ορισμένες περιπτώσεις ενδέχεται να αρκεί η περιοδική δοκιμή του θετικού μάρτυρα (δηλαδή ανά διαστήματα που δεν υπερβαίνουν το εξάμηνο) για εργαστήρια που εκτελούν τακτικά LLNA (δηλαδή με συχνότητα τουλάχιστον μηνιαία) και διαθέτουν εδραιωμένη ιστορική βάση δεδομένων για τον θετικό μάρτυρα, η οποία καταδεικνύει την ικανότητα του εργαστηρίου να επιτυγχάνει αναπαραγώγιμα και ορθά αποτελέσματα με τους θετικούς μάρτυρες. Η επαρκής τεχνική ικανότητα ως προς την LLNA μπορεί να αποδειχθεί με την επίτευξη σταθερών θετικών αποτελεσμάτων με τον θετικό μάρτυρα σε 10 τουλάχιστον ανεξάρτητες δοκιμές που έχουν διεξαχθεί εντός εύλογου χρονικού διαστήματος, δηλαδή μικρότερου από ένα έτος.

13. Πρέπει να συμπεριλαμβάνεται πάντοτε παράλληλη ομάδα θετικού μάρτυρα όταν επέρχονται διαδικαστικές αλλαγές στην LLNA (π.χ. αλλαγή ειδικευμένου προσωπικού, αλλαγή υλικών και/ή αντιδραστηρίων της μεθόδου δοκιμών ή του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται σε αυτή, αλλαγή της προέλευσης των πειραματόζωων), οι οποίες πρέπει να τεκμηριώνονται στις εκθέσεις του εργαστηρίου. Πρέπει να εξετάζονται οι επιπτώσεις των αλλαγών αυτών στην επάρκεια της ήδη συγκροτημένης ιστορικής βάσης δεδομένων, προκειμένου να κριθεί αν είναι απαραίτητη η δημιουργία νέας ιστορικής βάσης δεδομένων για την τεκμηρίωση της σταθερότητας των αποτελεσμάτων που προκύπτουν με τους θετικούς μάρτυρες.

14. Οι ερευνητές θα πρέπει να γνωρίζουν ότι η απόφαση για διεξαγωγή περιοδικής και όχι ταυτόχρονης μελέτης με θετικό μάρτυρα επηρεάζει έμμεσα την επάρκεια και τη δυνατότητα αποδοχής των αρνητικών αποτελεσμάτων που προκύπτουν χωρίς παράλληλο θετικό μάρτυρα κατά το μεσοδιάστημα μεταξύ των περιοδικών μελετών με θετικό μάρτυρα. Για παράδειγμα, σε περίπτωση ψευδαρνητικού αποτελέσματος της περιοδικής μελέτης με θετικό μάρτυρα, μπορεί να αμφισβητηθούν τα αρνητικά αποτελέσματα που προέκυψαν για την ελεγχόμενη ουσία κατά το μεσοδιάστημα μεταξύ της τελευταίας αποδεκτής περιοδικής μελέτης με θετικό μάρτυρα και της μη αποδεκτής. Οι συνέπειες αυτές θα πρέπει να λαμβάνονται επιμελώς υπόψη όταν κρίνεται αν θα συμπεριλαμβάνονται παράλληλοι θετικοί μάρτυρες ή θα διεξάγονται απλώς περιοδικές μελέτες με θετικούς μάρτυρες. Θα πρέπει επίσης να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης μικρότερου αριθμού ζώων στην παράλληλη ομάδα θετικού μάρτυρα, εφόσον δικαιολογείται από επιστημονική άποψη και το εργαστήριο καταδεικνύει τη δυνατότητα χρήσης μικρότερου αριθμού ποντικών με βάση ειδικά για το ίδιο ιστορικά δεδομένα (12).

15. Παρόλο που ο θετικός μάρτυρας θα πρέπει να ελέγχεται στον φορέα που είναι γνωστό ότι αποσπά σταθερή απόκριση (π.χ. μείγμα ακετόνης-ελαιολάδου σε αναλογία 4:1, v/v), ενδέχεται να υπάρχουν περιπτώσεις όπου οι νομοθετικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τη διεξαγωγή δοκιμών και σε μη τυποποιημένο φορέα (κλινικώς/χημικώς συναφές σκεύασμα) (24). Σε περίπτωση δοκιμής του παράλληλου θετικού μάρτυρα και της ελεγχόμενης ουσίας σε διαφορετικούς φορείς, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται χωριστός μάρτυρας VC για τον παράλληλο θετικό μάρτυρα.

16. Όταν αξιολογούνται ελεγχόμενες ουσίες που ανήκουν σε συγκεκριμένη τάξη χημικών ουσιών ή προκαλούν συγκεκριμένο φάσμα αποκρίσεων, είναι ενδεχομένως χρήσιμες και οι ουσίες συγκριτικής αξιολόγησης για να καταδειχθεί η ορθή λειτουργία της μεθόδου ως προς την ανίχνευση του δερματικού ευαισθητοποιητικού δυναμικού των συγκεκριμένων ειδών ελεγχόμενων ουσιών. Οι κατάλληλες ουσίες συγκριτικής αξιολόγησης πρέπει να διαθέτουν τις ακόλουθες ιδιότητες:

— δομική και λειτουργική αναλογία προς την τάξη της ελεγχόμενης ουσίας,

— γνωστά φυσικά/χημικά χαρακτηριστικά,

— δεδομένα τεκμηρίωσης που προέρχονται από την LLNA,

— δεδομένα τεκμηρίωσης που αφορούν άλλα ζωικά μοντέλα και/ή τον άνθρωπο.

▼M3

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

Αριθμός ζώων και επίπεδα δόσεων

17. Χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τέσσερα ζώα ανά δοσολογική ομάδα, με τρεις τουλάχιστον συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας, συν μια παράλληλη ομάδα αρνητικού μάρτυρα, που υποβάλλεται σε αγωγή μόνο με τον φορέα της ελεγχόμενης ουσίας, και έναν θετικό μάρτυρα (παράλληλο ή πρόσφατο, ανάλογα με την πολιτική που εφαρμόζει το εργαστήριο λαμβάνοντας υπόψη τις παραγράφους 11-14). Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο δοκιμής με πολλαπλές δόσεις της ουσίας που χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας, κυρίως στις περιπτώσεις διαλειπουσών δοκιμών με θετικό μάρτυρα. Η μεταχείριση και η αγωγή των ζώων των ομάδων-μαρτύρων, εκτός του ότι αυτά δεν υποβάλλονται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία, πρέπει κατά τα άλλα να είναι πανομοιότυπες με των ζώων των ομάδων αγωγής.

18. Η επιλογή των δόσεων και του φορέα πρέπει να βασίζεται στις συστάσεις των βιβλιογραφικών πηγών (3) και (5). Επιλέγονται κατά κανόνα διαδοχικές δόσεις από κατάλληλη σειρά συγκεντρώσεων, όπως 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % κ.λπ. Η επιλογή της χρησιμοποιούμενης σειράς συγκεντρώσεων πρέπει να συνοδεύεται από επαρκή επιστημονική αιτιολόγηση. Κατά την επιλογή των τριών διαδοχικών συγκεντρώσεων, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όλα τα υπάρχοντα τοξικολογικά στοιχεία (π.χ. οξεία τοξικότητα και δερματικός ερεθισμός) και στοιχεία για τη δομή και τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης ουσίας (και/ή ουσιών ανάλογης δομής) που ενδιαφέρουν, έτσι ώστε η υψηλότερη συγκέντρωση να μεγιστοποιεί την έκθεση, χωρίς να προκαλεί συστημική τοξικότητα και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος (3) (25). Εάν δεν υπάρχουν τέτοια στοιχεία, μπορεί να χρειάζεται δοκιμή προδιαλογής (βλέπε παραγράφους 21-24).

19. Ο φορέας πρέπει να μην προκαλεί συστηματικά και άλλα σφάλματα στα αποτελέσματα των δοκιμών και να επιλέγεται με γνώμονα τη μεγιστοποίηση της διαλυτότητας, ώστε να προκύπτει η μέγιστη εφικτή συγκέντρωση και, ταυτόχρονα, να σχηματίζεται κατάλληλο διάλυμα/εναιώρημα για την εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας. Συνιστώνται οι ακόλουθοι φορείς: μείγμα ακετόνης-ελαιολάδου (4:1, v/v), *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο, μεθυλαιθυλκετόνη, προπυλενογλυκόλη και διμεθυλοσουλφοξείδιο (19), χωρίς να αποκλείεται η χρήση άλλων, εφόσον παρέχεται επαρκής επιστημονική αιτιολόγηση. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ενδέχεται να απαιτείται η χρήση, ως πρόσθετου μάρτυρα, ενός κλινικώς συναφούς διαλύτη ή του σκευάσματος του εμπορίου με τη μορφή του οποίου διατίθεται στην αγορά η ελεγχόμενη ουσία. Θα πρέπει να λαμβάνεται ιδιαίτερη μέριμνα για την ενσωμάτωση των υδρόφιλων ελεγχόμενων ουσιών σε ένα σύστημα φορέα το οποίο διαβρέχει το δέρμα και δεν απορρέει αμέσως, με την προσθήκη κατάλληλων διαλυτοποιητών (π.χ. 1 % Pluronic® L92). Κατά συνέπεια, θα πρέπει να αποφεύγονται οι εξ ολοκλήρου υδατικοί φορείς.

20. Η επεξεργασία λεμφαδένων μεμονωμένων ποντικών επιτρέπει την εκτίμηση της μεταβλητότητας μεταξύ των ζώων και τη στατιστική ανάλυση της διαφοράς μεταξύ των μετρήσεων της ελεγχόμενης ουσίας και των μετρήσεων της ομάδας VC (βλέπε παράγραφο 35). Επιπλέον, η συλλογή δεδομένων για μεμονωμένα ζώα καθιστά εφικτή την αξιολόγηση της δυνατότητας μείωσης του αριθμού ποντικών της ομάδας θετικού μάρτυρα (12). Επίσης, μολονότι ορισμένες ρυθμιστικές Αρχές απαιτούν τη συλλογή δεδομένων για μεμονωμένα ζώα, ενδέχεται να θεωρούν αποδεκτά τα συγχωνευμένα δεδομένα για ζώα. Στις περιπτώσεις αυτές, οι χρήστες θα έχουν ίσως την ευχέρεια να συγκεντρώνουν είτε ατομικά είτε συγχωνευμένα δεδομένα για τα ζώα.

Δοκιμή προδιαλογής

21. Όταν δεν υπάρχουν στοιχεία για τον προσδιορισμό της μέγιστης δόσης προς δοκιμή (βλέπε παράγραφο 18), θα πρέπει να εκτελείται δοκιμή προδιαλογής, προκειμένου να καθοριστεί το κατάλληλο επίπεδο δόσης για τη δοκιμή με LLNA. Η δοκιμή προδιαλογής αποσκοπεί στην καθοδήγηση κατά την επιλογή του ανώτατου επιπέδου δόσης το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για την κυρίως μελέτη LLNA, στις περιπτώσεις που δεν υπάρχουν στοιχεία σχετικά με τη συγκέντρωση η οποία επάγει συστημική τοξικότητα (βλέπε παράγραφο 24) και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος (βλέπε παράγραφο 23). Το ανώτατο επίπεδο δόσης που χρησιμοποιείται στη δοκιμή πρέπει να είναι το 100 % της ελεγχόμενης ουσίας, εάν αυτή είναι υγρή, ή η μέγιστη δυνατή συγκέντρωση, προκειμένου για στερεά ή εναιωρήματα.

▼M3

22. Η δοκιμή προδιαλογής διεξάγεται στις ίδιες συνθήκες όπως η κυρίως μελέτη LLNA, εκτός από την εκτίμηση του πολλαπλασιασμού στους λεμφαδένες, η οποία παραλείπεται, και τη δυνατότητα μείωσης του αριθμού των ζώων που χρησιμοποιούνται σε κάθε δοσολογική ομάδα. Προτείνεται η χρήση ενός ή δύο ζώων ανά δοσολογική ομάδα. Όλοι οι ποντικοί εξετάζονται καθημερινά για την ανίχνευση κλινικών σημείων συστημικής τοξικότητας ή τοπικού ερεθισμού στο σημείο εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας. Καταγράφεται το βάρος σώματος πριν από την έναρξη και πριν από τον τερματισμό της δοκιμής (6η ημέρα). Εξετάζονται και τα δύο αυτιά κάθε ποντικού για την ανίχνευση ερυθήματος, το οποίο βαθμολογείται με τη βοήθεια του πίνακα 1 (25). Μετράται το πάχος των αυτιών με παχύμετρο (π.χ. ψηφιακό μικρόμετρο ή παχύμετρο Peacock Dial) την 1η ημέρα (πριν από τη χορήγηση της δόσης), την 3η ημέρα (περίπου 48 ώρες μετά την πρώτη δόση) και την 6η ημέρα. Επιπλέον, το πάχος των αυτιών είναι δυνατόν να προσδιοριστεί την 6η ημέρα με προσδιορισμούς βάρους δείγματος αυτιού λαμβανόμενου με λαβίδα βιοψίας, οι οποίοι πρέπει να εκτελούνται μετά τη θανάτωση των ζώων με ευθανασία. Μια βαθμολογία ερυθήματος ≥ 3 και/ή η αύξηση του πάχους των αυτιών κατά ≥ 25 %, σε οποιαδήποτε ημέρα μέτρησης, αποτελούν ενδείξεις υπέρμετρου τοπικού ερεθισμού του δέρματος (26) (27). Ως μέγιστη δόση για την κυρίως μελέτη LLNA επιλέγεται η αμέσως χαμηλότερη δόση στη σειρά συγκεντρώσεων της προδιαλογής (βλέπε παράγραφο 18) η οποία δεν επάγει συστημική τοξικότητα και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος.

Πίνακας 1

Βαθμολογία ερυθήματος

Παρατήρηση	Βαθμολογία
Απουσία ερυθήματος	0
Πολύ ελαφρό ερύθημα (μόλις αντιληπτό)	1
Περιγεγραμμένο ερύθημα	2
Μέτριο έως σοβαρό ερύθημα	3
Σοβαρό ερύθημα (ερυθρότητα τεύτλων) έως σχηματισμός εσχάρας που εμποδίζει τη διαβάθμιση του ερυθήματος	4

23. Εκτός από την αύξηση του πάχους των αυτιών κατά 25 % (26) (27), έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση των ερεθιστικών ουσιών κατά την LLNA η στατιστικά σημαντική αύξηση του πάχους των αυτιών των ποντικών που υποβάλλονται σε αγωγή σε σύγκριση με τους ποντικούς-μάρτυρες (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Ωστόσο, η αύξηση του πάχους των αυτιών κατά λιγότερο από 25 %, έστω και αν είναι στατιστικά σημαντική, δεν έχει συσχετιστεί ειδικά με υπέρμετρο ερεθισμό (30) (32) (33) (34).

24. Οι ακόλουθες κλινικές παρατηρήσεις, εντασσόμενες σε ολοκληρωμένη εκτίμηση, είναι δυνατόν να αποτελούν ένδειξη συστημικής τοξικότητας (35) (36) και, κατ' επέκταση, να υποδεικνύουν το ανώτατο επίπεδο δόσης προς χρήση στην κυρίως μελέτη LLNA: αλλαγές στη λειτουργία του νευρικού συστήματος (π.χ. ανόρθωση τριχών, αταξία, τρόμοι, σπασμοί), στη συμπεριφορά (π.χ. επιθετικότητα, αλλαγή όσον αφορά την περιποίηση του σώματος, έντονη μεταβολή της κινητικότητας), στον αναπνευστικό ρυθμό (δηλαδή μεταβολές της συχνότητας και της έντασης των αναπνοών, όπως δύσπνοια, ασθμαίνουσα αναπνοή και ρόγχος), καθώς και στην κατανάλωση τροφής και νερού. Επιπλέον, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη στην αξιολόγηση τα σημεία λήθαργου και/ή απουσίας αντίδρασης σε ερεθίσματα και κάθε κλινικό σημείο που υπερβαίνει τον ελαφρό ή στιγμιαίο πόνο και δυσφορία, η μείωση του βάρους σώματος κατά > 5 % μεταξύ 1ης και 6ης ημέρας και η θνησιμότητα. Τα ετοιμοθάνατα ζώα, καθώς και όσα παρουσιάζουν έκδηλο πόνο ή σημεία έντονης και διαρκούς δυσφορίας, πρέπει να θανατώνονται με ευθανασία (37).

▼M3

Πρόγραμμα πειραμάτων της κυρίως μελέτης

25. Το πρόγραμμα πειραμάτων της δοκιμασίας έχει ως εξής:

— *1η ημέρα:* Κάθε ζώο ζυγίζεται χωριστά και καταγράφονται το βάρος του και οι ενδεχόμενες κλινικές παρατηρήσεις. Στη ραχιαία επιφάνεια κάθε αυτιού τοποθετούνται 25 μL κατάλληλης αραίωσης της ελεγχόμενης ουσίας, του φορέα μόνου ή του θετικού μάρτυρα (παράλληλου ή πρόσφατου, ανάλογα με την πολιτική που εφαρμόζει το εργαστήριο λαμβάνοντας υπόψη τις παραγράφους 11-15).

— *2η και 3η ημέρα:* Επαναλαμβάνεται η διαδικασία εφαρμογής της ουσίας όπως την πρώτη ημέρα.

— *4η και 5η ημέρα:* Καμία αγωγή.

— *6η ημέρα:* Καταγράφεται το βάρος κάθε ζώου. Σε όλους τους ποντικούς, ελεγχόμενους και μάρτυρες, χορηγούνται με ένεση μέσω της ουραίας φλέβας 250 μL στείρου φυσιολογικού ορού με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (PBS), ο οποίος περιέχει 20 μCi ($7{,}4 \times 10^5$ Bq) ραδιοσημασμένης με τρίτιο (^{3}H)-μεθυλοθυμιδίνης. Εναλλακτικά, χορηγούνται σε όλους τους ποντικούς, με ένεση μέσω της ουραίας φλέβας, 250 μL PBS που περιέχει 2 μCi ($7{,}4 \times 10^4$ Bq) ^{125}I-ιωδοδεσοξυουριδίνης και φθοροδεσοξυουριδίνη σε συγκέντρωση 10^{-5} M. Μετά από πέντε ώρες, τα ζώα θανατώνονται με ευθανασία. Εκτέμνονται οι αποχετευτικοί ωτικοί λεμφαδένες από κάθε αυτί ποντικού και συνενώνονται σε PBS ανά ζώο (προσέγγιση μεμονωμένου ζώου). Εναλλακτικά, εκτέμνονται οι λεμφαδένες από κάθε αυτί και συνενώνονται σε PBS ανά ομάδα ζώων που υποβλήθηκε σε αγωγή (προσέγγιση συγχωνευμένης ομάδας αγωγής). Λεπτομέρειες και διαγράμματα για την αναγνώριση και την εκτομή των λεμφαδένων παρέχονται στη βιβλιογραφική πηγή (12). Για την περαιτέρω παρακολούθηση της τοπικής απόκρισης του δέρματος κατά την κυρίως μελέτη, το πρωτόκολλό της μπορεί να περιλαμβάνει πρόσθετες παραμέτρους, όπως βαθμολογία του ωτικού ερυθήματος ή μετρήσεις του πάχους των αυτιών (με τη βοήθεια παχυμέτρου ή με προσδιορισμούς βάρους δείγματος αυτιού λαμβανόμενου με λαβίδα βιοψίας κατά τη νεκροψία).

Παρασκευή κυτταρικών εναιωρημάτων

26. Παρασκευάζεται εναιώρημα μεμονωμένων λεμφοκυττάρων από τους λεμφαδένες που έχουν ληφθεί με αμφοτερόπλευρη εκτομή, σύμφωνα με την προσέγγιση μεμονωμένου ζώου ή, εναλλακτικά, με την προσέγγιση συγχωνευμένης ομάδας αγωγής, με ήπια μηχανική διάσπαση μέσω πλέγματος από ανοξείδωτο χάλυβα με οπές των 200 μm ή με άλλη αποδεκτή τεχνική σχηματισμού εναιωρήματος μεμονωμένων κυττάρων. Τα λεμφοκύτταρα εκπλύνονται δύο φορές με περίσσεια PBS και ακολουθεί καταβύθιση του DNA με τριχλωροξικό οξύ (TCA) 5 % σε θερμοκρασία 4 °C για 18 ώρες (3). Τα σφαιρίδια του ιζήματος μεταφέρονται σε φιαλίδια σπινθηρισμών που περιέχουν 10 mL υγρού σπινθηρισμών για μέτρηση του τριτίου, αφού προηγουμένως παρασκευαστεί νέο εναιώρημά τους σε 1 mL TCA, ή μεταφέρονται κατευθείαν σε σωλήνες απαριθμητή ακτινοβολίας γ για μέτρηση του ιωδίου ^{125}I.

Προσδιορισμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (ενσωματωμένη ραδιενέργεια)

27. Η ενσωμάτωση ^{3}H-μεθυλοθυμιδίνης μετράται με απαρίθμηση σπινθηρισμών ακτινοβολίας β, σε διασπάσεις ανά λεπτό (dpm). Η ενσωμάτωση ^{125}I-ιωδοδεσοξυουριδίνης μετράται με απαρίθμηση ^{125}I, επίσης σε dpm. Ανάλογα με την εφαρμοζόμενη προσέγγιση, η ενσωμάτωση εκφράζεται είτε σε dpm/ποντικό (προσέγγιση μεμονωμένου ζώου) ή σε dpm/ομάδα αγωγής (προσέγγιση συγχωνευμένης ομάδας αγωγής).

Περιορισμένη LLNA

28. Σε ορισμένες περιπτώσεις, στις οποίες χρειάζεται να επιβεβαιωθεί, για ρυθμιστικούς λόγους, μια αρνητική πρόγνωση δυναμικού δερματικής ευαισθητοποίησης, επιτρέπεται η χρήση ενός προαιρετικού πρωτοκόλλου περιορισμένης LLNA (rLLNA) (16) (17) (18) που προβλέπει μικρότερο αριθμό ζώων, υπό τον όρο ότι τηρούνται όλες οι υπόλοιπες προδιαγραφές του πρωτοκόλλου της LLNA που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών. Για την εφαρμογή της προσέγγισης rLLNA θα πρέπει να προβάλλονται σαφείς λόγοι και επιστημονική αιτιολόγηση. Εάν προκύψει θετικό ή αμφίβολο αποτέλεσμα, ενδέχεται να χρειαστούν πρόσθετες δοκιμές για την ερμηνεία ή τη διασαφήνιση των ευρημάτων.

▼M3

29. Δεδομένου ότι η μόνη διαφορά μεταξύ των πρωτοκόλλων των μεθόδων δοκιμών LLNA και rLLNA είναι η μείωση του αριθμού των δοσολογικών ομάδων, η rLLNA δεν παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη σχέση δόσης-απόκρισης. Συνεπώς, δεν πρέπει να χρησιμοποιείται όταν χρειάζονται στοιχεία για τη σχέση δόσης-απόκρισης. Όπως και στην LLNA πολλαπλών δόσεων, η συγκέντρωση ελεγχόμενης ουσίας που αξιολογείται κατά την rLLNA πρέπει να είναι η μέγιστη συγκέντρωση η οποία δεν επάγει έκδηλη συστημική τοξικότητα και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος στους ποντικούς (βλέπε παράγραφο 18).

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Κλινικές παρατηρήσεις

30. Κάθε ποντικός πρέπει να εξετάζεται με προσοχή, τουλάχιστον μία φορά ημερησίως, για την ανίχνευση κλινικών σημείων είτε τοπικού ερεθισμού στο σημείο εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας είτε συστημικής τοξικότητας. Όλες οι παρατηρήσεις καταγράφονται συστηματικά σε χωριστό αρχείο για κάθε ποντικό. Τα σχέδια παρακολούθησης πρέπει να περιλαμβάνουν κριτήρια για τον ταχύ εντοπισμό, με σκοπό την ευθανασία, των ποντικών που εμφανίζουν συστημική τοξικότητα ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό ή διάβρωση του δέρματος (37).

Βάρος σώματος

31. Όπως αναφέρεται στην παράγραφο 25, το βάρος κάθε ζώου πρέπει να μετράται κατά την έναρξη της δοκιμής και κατά τον προγραμματισμένο χρόνο ευθανασίας.

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

32. Τα αποτελέσματα για κάθε ομάδα αγωγής εκφράζονται σε SI. Όταν εφαρμόζεται η προσέγγιση μεμονωμένου ζώου, ο SI προκύπτει με διαίρεση της μέσης τιμής dpm/ποντικό κάθε ομάδας αγωγής με την ελεγχόμενη ουσία, όπως επίσης και της ομάδας θετικού μάρτυρα, διά της μέσης τιμής dpm/ποντικό της ομάδας που υποβλήθηκε σε αγωγή με τον διαλύτη/ομάδας VC. Στην περίπτωση αυτή, ο μέσος SI για τις ομάδες VC ισούται με τη μονάδα. Όταν εφαρμόζεται η προσέγγιση συγχωνευμένης ομάδας αγωγής, ο SI προκύπτει με διαίρεση της συγχωνευμένης ενσωμάτωσης ραδιενεργού ισοτόπου σε κάθε ομάδα αγωγής διά της ενσωμάτωσης στη συγχωνευμένη ομάδα VC. Το αποτέλεσμα της πράξης αυτής είναι η μέση τιμή SI.

33. Στη διαδικασία λήψης απόφασης, ένα αποτέλεσμα θεωρείται θετικό όταν SI $\geq$ 3. Ωστόσο, όταν κρίνεται αν ένα οριακό αποτέλεσμα θα χαρακτηριστεί ή όχι θετικό, μπορούν επίσης να χρησιμοποιούνται η ισχύς της σχέσης δόσης-απόκρισης, η στατιστική σημαντικότητα και η σταθερότητα των αποκρίσεων των μαρτύρων που υποβάλλονται σε αγωγή με τον διαλύτη/φορέα και των θετικών μαρτύρων (4) (5) (6).

34. Εάν απαιτείται διασαφήνιση των αποτελεσμάτων, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη διάφορες ιδιότητες της ελεγχόμενης ουσίας, μεταξύ των οποίων το κατά πόσον έχει δομική σχέση με γνωστές ευαισθητοποιητικές για το δέρμα ουσίες, το κατά πόσον προκαλεί υπέρμετρο ερεθισμό του δέρματος του ποντικού και το είδος της σχέσης δόσης-απόκρισης που διαπιστώθηκε. Αυτά και άλλα κριτήρια αναλύονται στη βιβλιογραφική πηγή (7).

35. Η συλλογή δεδομένων ραδιενέργειας σε επίπεδο μεμονωμένου ποντικού καθιστά δυνατή τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων για τη διαπίστωση της ύπαρξης σχέσης δόσης-απόκρισης και του βαθμού της σχέσης αυτής. Η ενδεχόμενη στατιστική εκτίμηση θα μπορούσε να περιλαμβάνει αξιολόγηση της σχέσης δόσης-απόκρισης, καθώς και κατάλληλα προσαρμοσμένες συγκρίσεις των ομάδων δοκιμής (π.χ. συγκρίσεις κατά ζεύγη μεταξύ της ομάδας που λαμβάνει τη δόση και της παράλληλης ομάδας VC). Οι στατιστικές αναλύσεις είναι δυνατόν να περιλαμβάνουν, λόγου χάριν, γραμμική παλινδρόμηση ή δοκιμή Williams για την εκτίμηση των τάσεων της απόκρισης σε σχέση με τη δόση και δοκιμή Dunnett για τις συγκρίσεις κατά ζεύγη. Κατά την επιλογή της ενδεδειγμένης μεθόδου στατιστικής ανάλυσης, ο ερευνητής θα πρέπει να έχει επίγνωση των πιθανώς άνισων διακυμάνσεων (διασπορών) και άλλων συναφών προβλημάτων τα οποία ενδέχεται να επιβάλλουν μετασχηματισμό των δεδομένων ή μη παραμετρική στατιστική ανάλυση. Σε κάθε περίπτωση, ενδέχεται να χρειαστεί να εκτελέσει ο ερευνητής υπολογισμούς του SI και στατιστικές αναλύσεις με και χωρίς ορισμένα σημεία δεδομένων (καλούμενα μερικές φορές «έκτροπες τιμές»).

▼M3

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ

Δεδομένα

36. Τα δεδομένα πρέπει να συγκεφαλαιώνονται με τη μορφή πίνακα. Στην περίπτωση της προσέγγισης μεμονωμένου ζώου, αναφέρονται η τιμή dpm για κάθε ζώο, η ομαδική μέση τιμή dpm/ζώο, η σχετική στατιστική έκφραση του σφάλματος (π.χ. SD, SEM) και η μέση τιμή του SI για κάθε δοσολογική ομάδα σε σύγκριση με την παράλληλη ομάδα VC. Στην περίπτωση της προσέγγισης συγχωνευμένης ομάδας αγωγής, αναφέρονται η μέση τιμή/διάμεσος dpm και η μέση τιμή του SI για κάθε δοσολογική ομάδα σε σύγκριση με την παράλληλη ομάδα VC.

Έκθεση δοκιμής

37. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιέχει τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη ουσία και μάρτυρες:

— στοιχεία ταυτότητας (π.χ. αριθ. CAS και EC, εφόσον υπάρχουν, πηγή, καθαρότητα, γνωστές προσμίξεις, αριθμός παρτίδας),

— σύσταση και φυσικές και χημικές ιδιότητες (π.χ. πτητικότητα, σταθερότητα, διαλυτότητα),

— προκειμένου για μείγματα, σύνθεση και εκατοστιαία αναλογία των συστατικών.

Διαλύτης/φορέας:

— στοιχεία ταυτότητας (καθαρότητα, συγκέντρωση, κατά περίπτωση, όγκος που χρησιμοποιήθηκε),

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα.

Ζώα της δοκιμής:

— προέλευση των ποντικών της φυλής CBA,

— μικροβιολογική κατάσταση των ζώων, εφόσον είναι γνωστή,

— αριθμός και ηλικία των ζώων,

— προέλευση των ζώων, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσιο κ.λπ.

Συνθήκες δοκιμής:

— λεπτομέρειες για την παρασκευή και εφαρμογή του δείγματος της ελεγχόμενης ουσίας,

— αιτιολόγηση της επιλογής των δόσεων (συμπεριλαμβανομένων των αποτελεσμάτων της δοκιμής προδιαλογής, εφόσον έχει διεξαχθεί),

— συγκεντρώσεις φορέα και ελεγχόμενης ουσίας που χρησιμοποιήθηκαν και συνολική ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας που χορηγήθηκε,

— λεπτομέρειες για την ποιότητα της τροφής και του νερού (μεταξύ άλλων, τύπος/προέλευση του σιτηρεσίου, προέλευση του νερού),

— λεπτομέρειες για τα προγράμματα αγωγής και δειγματοληψίας,

— μέθοδοι μέτρησης της τοξικότητας,

— κριτήρια χαρακτηρισμού της μελέτης ως θετικής ή αρνητικής,

— λεπτομέρειες για τυχόν παρεκκλίσεις από το πρωτόκολλο και επεξήγηση του τρόπου με τον οποίο αυτές επηρεάζουν τον σχεδιασμό και τα αποτελέσματα της μελέτης.

Έλεγχος αξιοπιστίας:

— περίληψη των αποτελεσμάτων του πιο πρόσφατου ελέγχου αξιοπιστίας, συμπεριλαμβανομένων πληροφοριών σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία, τη συγκέντρωση και τον φορέα που χρησιμοποιήθηκε,

— δεδομένα του εργαστηρίου δοκιμών που αφορούν τον παράλληλο και/ή ιστορικό θετικό μάρτυρα και τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα,

▼M3

— εάν δεν συμπεριελήφθη στη δοκιμή παράλληλος θετικός μάρτυρας, ημερομηνία διεξαγωγής της πιο πρόσφατης περιοδικής δοκιμής με θετικό μάρτυρα και σχετική έκθεση του εργαστηρίου, καθώς και έκθεση με λεπτομερή ιστορικά δεδομένα του εργαστηρίου για τον θετικό μάρτυρα που δικαιολογούν την απόφαση να μη συμπεριληφθεί παράλληλος θετικός μάρτυρας.

Αποτελέσματα:

— βάρος κάθε ποντικού κατά την έναρξη της χορήγησης των δόσεων και κατά τον προγραμματισμένο χρόνο θανάτωσης, καθώς και μέση τιμή και σχετική στατιστική έκφραση του σφάλματος (π.χ. SD, SEM) για κάθε ομάδα αγωγής,

— για κάθε ζώο, χρόνος εκδήλωσης και εξέλιξη των σημείων τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένου τυχόν ερεθισμού του δέρματος στο σημείο χορήγησης,

— πίνακας με τις τιμές dpm ανά ποντικό (προσέγγιση μεμονωμένου ζώου) ή τις μέσες τιμές/διαμέσους dpm (προσέγγιση συγχωνευμένης ομάδας αγωγής) και τις τιμές SI για κάθε ομάδα αγωγής,

— στην περίπτωση της προσέγγισης μεμονωμένου ζώου, μέση τιμή dpm/ποντικό και σχετική στατιστική έκφραση του σφάλματος (π.χ. SD, SEM), καθώς και τα αποτελέσματα της ανάλυσης έκτροπων τιμών, για κάθε ομάδα αγωγής,

— στην περίπτωση της προσέγγισης μεμονωμένου ζώου, υπολογισμένος SI και κατάλληλο μέτρο μεταβλητότητας στο οποίο συνεκτιμάται η μεταβλητότητα μεταξύ των ζώων, τόσο της ομάδας που υποβάλλεται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία όσο και των ομάδων-μαρτύρων,

— σχέση δόσης-απόκρισης,

— στατιστικές αναλύσεις, κατά περίπτωση.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων:

— σύντομος σχολιασμός των αποτελεσμάτων, της ανάλυσης της σχέσης δόσης-απόκρισης και, κατά περίπτωση, των στατιστικών αναλύσεων, με γνωμάτευση για τον χαρακτηρισμό ή μη της ελεγχόμενης ουσίας ως ευαισθητοποιητικής για το δέρμα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol*., 30, 165-169.

(3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol*., 93, 13-31.

(4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.

(5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol*., 34, 999-1002.

(6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 34, 985-997.

(7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 36, 327-33.

▼M3

(8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol*., 146, 49-59.

(9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 258-273.

(10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34, 274-286.

(11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 249-257.

(12) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(13) OECD (1992), *Skin Sensitisation*. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(14) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol*., 18, 281-284.

(16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181-185.

(17) ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, April 2007. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf]

(18) ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

(19) ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llna-rep.pdf]

▼**M3**

(20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), Food Chem. Toxicol., 46, 1896-1904.

(21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90-96.

(22) ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

(23) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(24) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, Toxicol., 238, 71-89.

(25) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404, Paris, France. Διατίθεται στον ιστότοπο: http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, Toxicologist, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf]

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, Drug. Chem. Toxicol., 21, 195-206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol*., 153, 83-94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth*., 8, 245-256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol*., 22, 491-506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60-68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721-728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, *Environ. Health Perspect*., 115, 1023-1028.

(35) OECD (1987), *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

(36) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διατίθεται στον ιστότοπο: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

(37) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼M3

Προσάρτημα 1

Πρότυπα επιδόσεων για την αξιολόγηση προτεινόμενων παρεμφερών ή τροποποιημένων μεθόδων δοκιμών δερματικής ευαισθητοποίησης LLNA

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Σκοπός των προτύπων για τις επιδόσεις είναι να παρέχουν τη βάση με την οποία είναι δυνατόν να διαπιστωθεί ότι νέες μέθοδοι δοκιμών —αποκλειστικές (δηλαδή κατοχυρωμένες με δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, με εμπορικά σήματα, με καταχώριση) και μη— διαθέτουν επαρκή ορθότητα και αξιοπιστία για συγκεκριμένες δοκιμές. Τα εν λόγω πρότυπα επιδόσεων βασίζονται σε επικυρωμένες και εγκεκριμένες μεθόδους δοκιμών και μπορούν να χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της αξιοπιστίας και της ορθότητας άλλων παρεμφερών μεθόδων (καλούνται κοινώς «δοκιμές me-too»), οι οποίες στηρίζονται σε παρεμφερείς επιστημονικές αρχές και με τις οποίες μετράται ή προβλέπεται η ίδια βιολογική ή τοξική επίδραση (14).

2. Πριν από την υιοθέτηση τροποποιημένων μεθόδων (δηλαδή προτεινόμενων δυνητικών βελτιώσεων σε εγκεκριμένη μέθοδο δοκιμών), πρέπει να διενεργείται αξιολόγηση για να διαπιστωθούν οι επιδράσεις των προτεινόμενων αλλαγών στις επιδόσεις της δοκιμής και ο βαθμός στον οποίο οι εν λόγω αλλαγές επηρεάζουν τα στοιχεία που τροφοδοτούν τις υπόλοιπες συνιστώσες της διαδικασίας επικύρωσης. Ανάλογα με το πλήθος και το είδος των προτεινόμενων αλλαγών, τα δεδομένα που έχουν προκύψει και τα έγγραφα τεκμηρίωσης των εν λόγω αλλαγών, αυτές θα πρέπει να υποβάλλονται είτε στη διαδικασία επικύρωσης που περιγράφεται για τις νέες δοκιμές είτε, όπου ενδείκνυται, σε περιορισμένη εκτίμηση αξιοπιστίας και καταλληλότητας με τη βοήθεια καθιερωμένων προτύπων για τις επιδόσεις (14).

3. Οι παρεμφερείς ή τροποποιημένες μέθοδοι που προτείνεται να χρησιμοποιηθούν στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών πρέπει να αξιολογούνται για να διαπιστωθούν η αξιοπιστία και η ορθότητά τους, με τη χρήση χημικών ουσιών που καλύπτουν την πλήρη βαθμολογική κλίμακα της LLNA. Προκειμένου να αποφευχθεί η αδικαιολόγητη χρήση ζώων, συνιστάται ένθερμα σε όσους αναπτύσσουν μοντέλα να ζητούν τη γνώμη των αρμόδιων αρχών προτού αρχίσουν μελέτες επικύρωσης σύμφωνα με τα πρότυπα επιδόσεων και τις κατευθύνσεις που περιλαμβάνει η παρούσα μέθοδος δοκιμών.

4. Τα παρόντα πρότυπα επιδόσεων βασίζονται στα εναρμονισμένα πρότυπα επιδόσεων των κέντρων επικύρωσης εναλλακτικών μεθόδων ICCVAM των ΗΠΑ, ECVAM της Ευρωπαϊκής Επιτροπής και JaCVAM της Ιαπωνίας (12) για την αξιολόγηση της εγκυρότητας παρεμφερών ή τροποποιημένων εκδόσεων της LLNA. Τα πρότυπα επιδόσεων συνίστανται από τα βασικά συστατικά στοιχεία της μεθόδου δοκιμών, τις συνιστώμενες χημικές ουσίες αναφοράς και από επίπεδα ορθότητας και αξιοπιστίας που πρέπει να επιτυγχάνει ή να υπερβαίνει η προτεινόμενη μέθοδος.

I. **Βασικά συστατικά στοιχεία της μεθόδου δοκιμών**

5. Για να εξασφαλίζεται ότι μια παρεμφερής ή τροποποιημένη μέθοδος LLNA είναι μηχανιστικά και λειτουργικά ανάλογη με την LLNA και μετρά την ίδια βιολογική επίδραση, το πρωτόκολλο της μεθόδου δοκιμών πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

— η ελεγχόμενη ουσία πρέπει να εφαρμόζεται τοπικά και στα δύο αυτιά των ποντικών,

— ο πολλαπλασιασμός των λεμφοκυττάρων πρέπει να μετράται στους λεμφαδένες που αποχετεύουν το σημείο εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας,

— ο πολλαπλασιασμός των λεμφοκυττάρων πρέπει να μετράται κατά το επαγωγικό στάδιο της δερματικής ευαισθητοποίησης,

▼M3

— η υψηλότερη δόση που επιλέγεται για τις ελεγχόμενες ουσίες πρέπει να ισούται με τη μέγιστη συγκέντρωση η οποία δεν επάγει συστημική τοξικότητα και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος στους ποντικούς. Για τις θετικές χημικές ουσίες αναφοράς, η υψηλότερη δόση πρέπει να είναι τουλάχιστον ίση με τις τιμές EC3 της LLNA για την εκάστοτε χημική ουσία αναφοράς, χωρίς να προκαλεί συστημική τοξικότητα και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος στους ποντικούς,

— σε κάθε μελέτη πρέπει να συμπεριλαμβάνεται παράλληλος μάρτυρας VC και, όπου ενδείκνυται, πρέπει να χρησιμοποιείται παράλληλος θετικός μάρτυρας,

— πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τέσσερα ζώα ανά δοσολογική ομάδα,

— επιτρέπεται να συγκεντρώνουν είτε ατομικά είτε συγχωνευμένα δεδομένα για τα ζώα.

Εάν δεν πληρούται οποιοδήποτε από τα ανωτέρω κριτήρια, τα παρόντα πρότυπα επιδόσεων δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επικύρωση της παρεμφερούς ή τροποποιημένης μεθόδου.

II. **Κατάλογος ελάχιστων ουσιών αναφοράς**

6. Στα εναρμονισμένα πρότυπα επιδόσεων των κέντρων ICCVAM των ΗΠΑ, ECVAM της Ευρωπαϊκής Επιτροπής και JaCVAM της Ιαπωνίας (12) προσδιορίζονται 18 ουσίες αναφοράς που θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατ' ελάχιστο όριο, καθώς και τέσσερις προαιρετικές ουσίες αναφοράς (δηλαδή ουσίες με τις οποίες έχουν προκύψει ψευδοθετικά ή ψευδαρνητικά αποτελέσματα κατά την LLNA σε σύγκριση με τα αποτελέσματα των δοκιμών στον άνθρωπο και σε ινδικά χοιρίδια (μέθοδος B.6 ή OECD Test Guideline 406) και οι οποίες, συνεπώς, παρέχουν τη δυνατότητα να καταδειχθούν επιδόσεις εφάμιλλες ή ανώτερες εκείνων της LLNA) που συμπεριλαμβάνονται στα πρότυπα επιδόσεων της LLNA. Τα κριτήρια βάσει των οποίων επιλέχθηκαν οι εν λόγω χημικές ουσίες ήταν τα εξής:

— ο κατάλογος των χημικών ουσιών αναφοράς καλύπτει τα είδη ουσιών που συνήθως υποβάλλονται σε δοκιμή για να διαπιστωθεί το δυναμικό δερματικής ευαισθητοποίησης και το φάσμα αποκρίσεων που η LLNA είναι ικανή να μετρά ή να προβλέπει,

— η χημική δομή των ουσιών είναι επακριβώς καθορισμένη,

— για κάθε ουσία υπάρχουν δεδομένα από δοκιμές LLNA σε ινδικά χοιρίδια (μέθοδος B.6 ή OECD Test Guideline 406) (13) και (στο μέτρο του δυνατού) δεδομένα από μελέτες στον άνθρωπο, και

— οι ουσίες είναι ευρέως διαθέσιμες στο εμπόριο.

Οι συνιστώμενες χημικές ουσίες αναφοράς παρατίθενται στον πίνακα 1. Οι μελέτες στις οποίες χρησιμοποιούνται οι προτεινόμενες χημικές ουσίες αναφοράς πρέπει να αξιολογούνται με τον φορέα που προβλέπεται για τις ουσίες αυτές στον πίνακα 1. Εάν μια ουσία του πίνακα δεν είναι διαθέσιμη, επιτρέπεται η χρήση άλλων ουσιών που πληρούν τα προαναφερόμενα κριτήρια επιλογής, με επαρκή αιτιολόγηση.

▼M3

Πίνακας 1

Συνιστωμενες χημικές ουσίες αναφοράς για τα πρότυπα επιδόσεων της LLNA

Α/Α	Χημική ουσία ([1])	Αριθ. CAS	Μορφή	Veh ([2])	EC3 % ([3])	N ([4])	0,5x - 2,0x EC3	Πραγματικό εύρος τιμών EC3	LLNA έναντι GP	LLNA έναντι δοκιμών στον άνθρωπο
1	5-Χλωρο-2-μεθυλ-4-ισοθειαζολινόνη-3 (CMI)/2-μεθυλ-4-ισοθειαζολινόνη-3 (MI) ([5])	26172-55-4/ 2682-20-4	Liq	DMF	0,009	1	0,0045-0,018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Sol	AOO	0,049	15	0,025-0,099	0,02-0,094	+/+	+/+
3	4-Φαινυλενοδιαμίνη	106-50-3	Sol	AOO	0,11	6	0,055-0,22	0,07-0,16	+/+	+/+
4	Χλωριούχο κοβάλτιο	7646-79-9	Sol	DMSO	0,6	2	0,3-1,2	0,4-0,8	+/+	+/+
5	Ισοευγενόλη	97-54-1	Liq	AOO	1,5	47	0,77-3,1	0,5-3,3	+/+	+/+
6	2-Μερκαπτοβενζοθειαζόλιο	149-30-4	Sol	DMF	1,7	1	0,85-3,4	NC	+/+	+/+
7	Κιτράλη	5392-40-5	Liq	AOO	9,2	6	4,6-18,3	5,1-13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Liq	AOO	9,7	21	4,8-19,5	4,4-14,7	+/+	+/+
9	Ευγενόλη	97-53-0	Liq	AOO	10,1	11	5,05-20,2	4,9-15	+/+	+/+
10	Βενζοϊκό φαινύλιο	93-99-2	Sol	AOO	13,6	3	6,8-27,2	1,2-20	+/+	+/+
11	Κινναμωμική αλκοόλη	104-54-1	Sol	AOO	21	1	10,5-42	NC	+/+	+/+
12	Ιμιδαζολιδινυλουρία	39236-46-9	Sol	DMF	24	1	12-48	NC	+/+	+/+
13	Μεθακρυλικό μεθύλιο	80-62-6	Liq	AOO	90	1	45-100	NC	+/+	+/+
14	Χλωροβενζόλιο	108-90-7	Liq	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
15	Ισοπροπανόλη	67-63-0	Liq	AOO	50	1	NA	NA	–/–	–/+

▼M3

A/A	Χημική ουσία ([1])	Αριθ. CAS	Μορφή	Veh ([2])	EC3 % ([3])	N ([4])	0,5x - 2,0x EC3	Πραγματικό εύρος τιμών EC3	LLNA έναντι GP	LLNA έναντι δοκιμών στον άνθρωπο
16	Γαλακτικό οξύ	50-21-5	Liq	DMSO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
17	Σαλικυλικό μεθύλιο	119-36-8	Liq	AOO	20	9	NA	NA	–/–	–/–
18	Σαλικυλικό οξύ	69-72-7	Sol	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/–
Προαιρετικές ουσίες για την απόδειξη βελτιωμένων επιδόσεων σε σχέση με την LLNA										
19	Λαουρυλοθειικό νάτριο	151-21-3	Sol	DMF	8,1	5	4,05-16,2	1,5-17,1	+/–	+/–
20	Διμεθακρυλικός εστέρας της αιθυλενογλυκόλης	97-90-5	Liq	MEK	28	1	14-56	NC	+/–	+/+
21	Ξυλόλιο	1330-20-7	Liq	AOO	95,8	1	47,9-100	NC	+/ (**)	+/–
22	Χλωριούχο νικέλιο	7718-54-9	Sol	DMSO	5	2	NA	NA	–/+	–/+

Συντμήσεις: AOO = μείγμα ακετόνης-ελαιολάδου (4:1, v/v), Αριθ. CAS = αριθμός μητρώου της Chemical Abstracts Service, DMF = *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο, DMSO = διμεθυλοσουλφοξείδιο, DNCB = 2,4-δινιτροχλωροβενζόλιο, EC3 = κατ' εκτίμηση συγκέντρωση που απαιτείται για να προκύψει δείκτης διέγερσης ίσος με 3, GP = αποτέλεσμα δοκιμής σε ινδικά χοιρίδια (δηλαδή μέθοδος B. 6 ή OECD Test Guideline 406) (13), HCA = εξυλοκινναμωμική αλδεΰδη, Liq = υγρό, LLNA = αποτέλεσμα τοπικής δοκιμασίας λεμφαδένων σε ποντικό (δηλαδή μέθοδος B. 42 ή OECD Test Guideline 429) (1), MEK = μεθυλαιθυλοκετόνη, NA = δεν εφαρμόζεται επειδή ο δείκτης διέγερσης είναι μικρότερος από 3, NC = δεν έχει υπολογιστεί επειδή τα δεδομένα προέρχονται από μία μόνο μελέτη, Sol = στερεό, Veh = φορέας χρησιμοποιούμενος στη δοκιμή.

(*) Θεωρείται ότι δεν είναι ευαισθητοποιητική για τον άνθρωπο ουσία, με βάση το γεγονός ότι δεν εντοπίστηκαν αποτελέσματα κλινικών δοκιμών επιθέματος, δεν συμπεριλαμβάνεται ως αλλεργιογόνο στα έτοιμα αντιδραστήρια για δοκιμές επιθέματος και δεν εντοπίστηκαν αναφορές περιστατικών ευαισθητοποίησης του ανθρώπου.

(**) Δεν υπάρχουν δεδομένα από δοκιμές σε ινδικά χοιρίδια.

([1]) Τα παρασκευάσματα των χημικών ουσιών πρέπει να ανανεώνονται καθημερινά, εκτός εάν η φύλαξή τους είναι αποδεκτή βάσει των σχετικών με τη σταθερότητα στοιχείων.

([2]) Λόγω των πιθανών επιπτώσεων των διαφόρων φορέων στις επιδόσεις της LLNA, πρέπει να χρησιμοποιείται ο φορέας που συνιστάται για κάθε χημική ουσία αναφοράς (24) (32).

([3]) Μέση τιμή στις περιπτώσεις περισσότερων από μία διαθέσιμων τιμών EC3. Για τις ουσίες αρνητικού αποτελέσματος (δηλαδή με δείκτη διέγερσης κάτω του 3), παρέχεται η μέγιστη ελεγχθείσα συγκέντρωση.

([4]) Πλήθος μελετών LLNA από τις οποίες προέρχονται τα δεδομένα.

([5]) Κυκλοφορεί στο εμπόριο ως Kathon CG (αριθ. CAS 55965-84-9), που είναι μείγμα CMI και MI σε αναλογία 3:1. Η σχετική συγκέντρωση κάθε συστατικού κυμαίνεται από 1,1 % έως 1,25 % (CMI) και από 0,3 % έως 0,45 % (MI). Τα αδρανή συστατικά είναι άλατα του μαγνησίου (21,5 % έως 24 %) και νιτρικός χαλκός (0,15 % έως 0,17 %), ενώ η σύνθεση συμπληρώνεται με νερό σε ποσοστό 74 % έως 77 %. Το Kathon CG διατίθεται ευρέως από τις εταιρείες Sigma-Aldrich και Rohm and Haas (νυν Dow Chemical Corporation).

▼M3

III. **Καθορισμένα επίπεδα αξιοπιστίας και ορθότητας**

7. Η ορθότητα της παρεμφερούς ή τροποποιημένης μεθόδου LLNA, αξιολογούμενη με τη βοήθεια των 18 χημικών ουσιών αναφοράς που πρέπει να χρησιμοποιούνται κατ' ελάχιστο όριο, πρέπει να είναι εφάμιλλη ή ανώτερη εκείνης που προβλέπεται στα πρότυπα επιδόσεων της LLNA. Η νέα ή τροποποιημένη μέθοδος θα πρέπει να έχει ως αποτέλεσμα την ορθή ταξινόμηση με βάση απόφαση «ναι/όχι». Ενδέχεται, όμως, να μην ταξινομούνται σωστά με τη νέα ή τροποποιημένη μέθοδο όλες οι χημικές ουσίες αναφοράς που πρέπει να χρησιμοποιούνται κατ' ελάχιστο όριο. Για παράδειγμα, σε περίπτωση εσφαλμένης ταξινόμησης μιας από τις ασθενείς ευαισθητοποιητικές ουσίες, πρέπει να εξετάζεται η δυνατότητα αιτιολόγησης της εσφαλμένης ταξινόμησης και χρήσης κατάλληλων συμπληρωματικών δεδομένων (π.χ. αποτελέσματα δοκιμών βάσει των οποίων ταξινομούνται σωστά άλλες ουσίες με φυσικές, χημικές και ευαισθητοποιητικές ιδιότητες ανάλογες με εκείνες της ουσίας που δεν ταξινομήθηκε σωστά) για την απόδειξη της ισοδυναμίας των επιδόσεων. Υπό τις συνθήκες αυτές, η κατάσταση επικύρωσης της νέας ή τροποποιημένης μεθόδου δοκιμών LLNA θα αξιολογείται κατά περίπτωση.

Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα

8. Για τον προσδιορισμό της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, η νέα ή τροποποιημένη μέθοδος LLNA πρέπει να αξιολογείται με τη χρήση ευαισθητοποιητικής ουσίας που χαρακτηρίζεται επακριβώς με την LLNA. Για τον λόγο αυτό, τα πρότυπα επιδόσεων της LLNA βασίζονται στη μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων επαναλαμβανόμενων δοκιμών με εξυλοκινναμωμική αλδεΰδη (HCA). Για την εκτίμηση της ενδοεργαστηριακής αξιοπιστίας πρέπει να συνάγονται τιμές κατωφλίου εκτιμώμενης συγκέντρωσης (ECt) για την HCA από τέσσερις χωριστές δοκιμές που απέχουν χρονικά μεταξύ τους τουλάχιστον μια εβδομάδα. Ένδειξη αποδεκτής ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας αποτελεί η ικανότητα ενός εργαστηρίου να επιτυγχάνει, σε κάθε δοκιμή με HCA, τιμές ECt μεταξύ 5 % και 20 %, οι οποίες αντιστοιχούν στο πεδίο τιμών που προκύπτει αν πολλαπλασιαστεί επί 0,5-2,0 η μέση τιμή EC3 που έχει καθοριστεί για την HCA (10 %) στην LLNA (βλέπε πίνακα 1).

Διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα

9. Η διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα νέας ή τροποποιημένης μεθόδου LLNA πρέπει να εκτιμάται με τη χρήση δύο ευαισθητοποιητικών ουσιών που χαρακτηρίζονται επακριβώς με την LLNA. Τα πρότυπα επιδόσεων της LLNA βασίζονται στη μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων δοκιμών που διεξάγονται με HCA και 2,4-δινιτρο-χλωροβενζόλιο (DNCB) σε διαφορετικά εργαστήρια. Πρέπει να συνάγονται ανεξάρτητες τιμές HCA από μία μόνο δοκιμή, διεξαγόμενη σε τρία τουλάχιστον χωριστά εργαστήρια. Προκειμένου να καταδειχθεί αποδεκτή διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα, κάθε εργαστήριο πρέπει να επιτυγχάνει τιμές ECt μεταξύ 5 % και 20 % για την HCA και 0,025 % έως 0,1 % για το DNCB, οι οποίες αντιπροσωπεύουν τα πεδία τιμών που προκύπτουν αν πολλαπλασιαστεί επί 0,5-2,0 η μέση συγκέντρωση EC3 που έχει καθοριστεί για την HCA (10 %) και το DNCB (0,05 %) στην LLNA, αντίστοιχα (βλέπε πίνακα 1).

▼M3

Προσάρτημα 2

Ορισμοί

Ορθότητα: η εγγύτητα της συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί μέτρο των επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς την «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας μεθόδου δοκιμών (14).

Ουσία συγκριτικής αξιολόγησης: ουσία, ευαισθητοποιητική ή μη, που χρησιμοποιείται ως πρότυπο για σύγκριση με ελεγχόμενη ουσία. Μια ουσία συγκριτικής αξιολόγησης πρέπει να διαθέτει τις ακόλουθες ιδιότητες: i) σταθερή(-ές) και αξιόπιστη(-ες) προέλευση(-εις), ii) δομική και λειτουργική αναλογία προς την τάξη των ελεγχόμενων ουσιών, iii) γνωστά φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά, iv) δεδομένα τεκμηρίωσης γνωστών επιδράσεων και v) γνωστή ισχύ στο εύρος της επιθυμητής απόκρισης.

Τιμή κατωφλίου εκτιμώμενης συγκέντρωσης (ECt): η κατ' εκτίμηση συγκέντρωση ελεγχόμενης ουσίας που είναι αναγκαία για να προκύψει δείκτης διέγερσης ο οποίος αποτελεί ένδειξη θετικής απόκρισης.

Εκτιμώμενη συγκέντρωση τρία (EC3): η κατ' εκτίμηση συγκέντρωση ελεγχόμενης ουσίας που είναι αναγκαία για να προκύψει δείκτης διέγερσης ίσος με 3.

Ψευδαρνητικό αποτέλεσμα: ο εσφαλμένος χαρακτηρισμός ελεγχόμενης ουσίας ως αρνητικής ή μη δραστικής με μέθοδο δοκιμών, ενώ στην πραγματικότητα είναι θετική ή δραστική.

Ψευδοθετικό αποτέλεσμα: ο εσφαλμένος χαρακτηρισμός ελεγχόμενης ουσίας ως θετικής ή δραστικής με δοκιμή, ενώ στην πραγματικότητα είναι αρνητική ή μη δραστική.

Κίνδυνος: το δυναμικό δυσμενούς επίδρασης στην υγεία ή στο περιβάλλον. Η δυσμενής επίδραση εκδηλώνεται μόνο εάν τα επίπεδα έκθεσης είναι επαρκή.

Διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα: μέτρο του βαθμού στον οποίο διαφορετικά ειδικευμένα εργαστήρια μπορούν να επιτυγχάνουν ποιοτικά και ποσοτικά παραπλήσια αποτελέσματα, χρησιμοποιώντας το ίδιο πρωτόκολλο και υποβάλλοντας σε δοκιμή τις ίδιες ελεγχόμενες ουσίες. Η διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα προσδιορίζεται κατά τις διαδικασίες προεπικύρωσης και επικύρωσης και αποτελεί ένδειξη του κατά πόσον υπάρχει δυνατότητα επιτυχούς μεταφοράς μιας δοκιμής μεταξύ εργαστηρίων· καλείται επίσης «αναπαραγωγιμότητα μεταξύ εργαστηρίων» (14).

Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα: προσδιορισμός του βαθμού στον οποίο ειδικευμένα άτομα μπορούν να επαναλάβουν με επιτυχία τα ίδια αποτελέσματα εντός του ίδιου εργαστηρίου, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένο πρωτόκολλο σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Καλείται επίσης «αναπαραγωγιμότητα εντός του εργαστηρίου» (14).

Δοκιμή me-too: έκφραση της καθομιλουμένης που παραπέμπει σε μέθοδο δοκιμών η οποία είναι δομικά και λειτουργικά ανάλογη με επικυρωμένη και εγκεκριμένη μέθοδο δοκιμών αναφοράς. Η εν λόγω μέθοδος δοκιμών προσφέρεται για ταχεία επικύρωση (catch-up validation). Ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς την «παρεμφερή μέθοδο δοκιμών» (14).

Έκτροπη τιμή: έκτροπη τιμή (outlier) είναι μια παρατήρηση σε τυχαίο δείγμα πληθυσμού η οποία διαφέρει σημαντικά από άλλες τιμές αυτού του δείγματος.

Πρότυπα επιδόσεων: πρότυπα που βασίζονται σε επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών και παρέχουν τη βάση για την αξιολόγηση της συγκρισιμότητας προτεινόμενης μεθόδου δοκιμών η οποία είναι λειτουργικά και μηχανιστικά παρεμφερής. Τα πρότυπα επιδόσεων περιλαμβάνουν: i) βασικά συστατικά στοιχεία της μεθόδου δοκιμών, ii) κατάλογο ελάχιστων ουσιών αναφοράς, οι οποίες έχουν επιλεγεί μεταξύ των χημικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για την απόδειξη των αποδεκτών επιδόσεων της επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς και iii) τα ανάλογα επίπεδα ορθότητας και αξιοπιστίας, που βασίζονται στα επιτευχθέντα για την επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών και τα οποία πρέπει να επιδεικνύει η προτεινόμενη μέθοδος δοκιμών, όταν αξιολογείται με χρήση του καταλόγου ελαχίστων ουσιών αναφοράς (14).

Αποκλειστική μέθοδος δοκιμών: μέθοδος δοκιμών της οποίας η παραγωγή και η διανομή υπόκεινται σε περιορισμούς βάσει διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας, δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας, εμπορικών σημάτων κ.λπ.

▼**M3**

Διασφάλιση ποιότητας: διαχειριστική διαδικασία με την οποία αξιολογούνται, από άτομα ανεξάρτητα από εκείνα που εκτελούν τις δοκιμές, η τήρηση των προτύπων, των απαιτήσεων και των διαδικασιών τήρησης αρχείων που αφορούν τις εργαστηριακές δοκιμές, καθώς και η ορθότητα της μεταφοράς δεδομένων.

Χημικές ουσίες αναφοράς: χημικές ουσίες που επιλέγονται για να χρησιμοποιηθούν στη διαδικασία επικύρωσης και για τις οποίες είναι ήδη γνωστές οι αποκρίσεις στο σύστημα δοκιμών αναφοράς in vitro ή in vivo ή στο ζωικό είδος που ενδιαφέρει. Οι εν λόγω χημικές ουσίες πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικές, αφενός των τάξεων χημικών προϊόντων στις οποίες προβλέπεται ότι θα εφαρμόζεται η μέθοδος δοκιμών και, αφετέρου, του πλήρους φάσματος των αποκρίσεων —ισχυρή, ασθενής, αρνητική— που αναμένονται για τα χημικά προϊόντα στα οποία μπορεί να εφαρμοστεί η μέθοδος. Ενδέχεται να απαιτούνται διαφορετικές σειρές χημικών ουσιών αναφοράς για τα διάφορα στάδια της διαδικασίας επικύρωσης, καθώς και για τις διάφορες μεθόδους δοκιμών και χρήσεις των δοκιμών (14).

Καταλληλότητα: περιγραφή της σχέσης της δοκιμής με την επίδραση που ενδιαφέρει και του κατά πόσον αυτή έχει σημασία και είναι χρήσιμη για συγκεκριμένο σκοπό. Πρόκειται για τον βαθμό στον οποίο η δοκιμή μετρά ή προβλέπει σωστά τη βιολογική επίδραση που ενδιαφέρει. Η καταλληλότητα εμπεριέχει συνεκτίμηση της ορθότητας (συμφωνίας) της μεθόδου δοκιμών (14).

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια μέθοδος δοκιμών μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (14).

Δερματική ευαισθητοποίηση: ανοσολογική διαδικασία που είναι αποτέλεσμα της τοπικής έκθεσης ευπαθούς ατόμου σε επαγωγικό χημικό αλλεργιογόνο, το οποίο προκαλεί δερματική ανοσοαπόκριση που μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ευαισθητοποίησης εξ επαφής.

Δείκτης διέγερσης (SI): αριθμητική τιμή η οποία υπολογίζεται προκειμένου να εκτιμηθεί το δερματικό ευαισθητοποιητικό δυναμικό μιας ελεγχόμενης ουσίας και ισούται με την αναλογία του πολλαπλασιασμού στις ομάδες που υποβάλλονται σε αγωγή με την ουσία προς τον πολλαπλασιασμό στην ομάδα που υποβάλλεται ταυτόχρονα σε αγωγή με τον φορέα.

Ελεγχόμενη ουσία (καλούμενη επίσης «ελεγχόμενη χημική ουσία»): κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

Επικυρωμένη μέθοδος δοκιμών: μέθοδος δοκιμών για την οποία έχουν ολοκληρωθεί μελέτες επικύρωσης προκειμένου να προσδιοριστούν η καταλληλότητα (συμπεριλαμβανομένης της ορθότητας) και η αξιοπιστία της για συγκεκριμένο σκοπό. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι επιδόσεις επικυρωμένης μεθόδου δοκιμών από πλευράς ορθότητας και αξιοπιστίας ενδέχεται να μην επαρκούν για να κριθεί αποδεκτή για τον προτεινόμενο σκοπό (14).

▼B

B.43. **ΜΕΛΕΤΗ ΝΕΥΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΤΡΩΚΤΙΚΑ**

1. **Η ΜΕΘΟΔΟΣ**

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών TG 424 (1997) του ΟΟΣΑ.

Η μέθοδος έχει μελετηθεί για να επιτρέπει τη συγκέντρωση των αναγκαίων στοιχείων για την επιβεβαίωση ή τον περαιτέρω χαρακτηρισμό των νευροτοξικών ιδιοτήτων των χημικών ουσιών σε ενήλικα ζώα. Είναι δυνατόν να συνδυαστεί με υφιστάμενες μεθόδους δοκιμών για μελέτες τοξικότητας επαναλαμβανόμενης δόσης ή να εφαρμοστεί ως αυτοτελής μελέτη. Συνιστάται η χρήση του καθοδηγητικού εγγράφου του ΟΟΣΑ για τις στρατηγικές και μεθόδους δοκιμών νευροτοξικότητας (1) ως βοηθήματος για το σχεδιασμό μελετών βασιζόμενων στην παρούσα μέθοδο δοκιμών. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία όταν μελετώνται τροποποιήσεις των διαδικασιών παρατήρησης και δοκιμών που συνιστώνται για τη συνήθη χρήση της μεθόδου. Το εν λόγω καθοδηγητικό έγγραφο προορίζεται να διευκολύνει την επιλογή άλλων διαδικασιών για εφαρμογή σε ειδικές περιστάσεις.

Η εκτίμηση των νευροτοξικών επιδράσεων στην ανάπτυξη δεν αποτελεί αντικείμενο της παρούσας μεθόδου.

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Είναι σημαντικό να λαμβάνονται υπόψη στην εκτίμηση και αξιολόγηση των τοξικών ιδιοτήτων των χημικών ουσιών οι πιθανές νευροτοξικές επιδράσεις. Η μέθοδος δοκιμών συστηματικής τοξικότητας επαναλαμβανόμενης δόσης περιλαμβάνει ήδη παρατηρήσεις που επιτρέπουν τον αποκλεισμό ή μη της πιθανής νευροτοξικότητας. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το σχεδιασμό μελετών με σκοπό τη συγκέντρωση περισσότερων πληροφοριών ή την επιβεβαίωση των νευροτοξικών επιδράσεων που παρατηρούνται στις μελέτες συστηματικής τοξικότητας επαναλαμβανόμενης δόσης. Ωστόσο, από ~~ορισμένα~~ από μελέτες της πιθανότητας νευροτοξικότητας για ορισμένες κατηγορίες χημικών ουσιών ενδέχεται να προκύπτει ότι αυτές αξιολογούνται καλύτερα με την παρούσα μέθοδο, χωρίς να χρειάζεται να υπάρχουν ενδείξεις νευροτοξικότητας από προηγούμενες μελέτες συστηματικής τοξικότητας επαναλαμβανόμενης δόσης. Τέτοιες μελέτες περιλαμβάνουν για παράδειγμα:

— τη παρατήρηση νευρολογικών συμπτωμάτων ή νευροπαθολογικών βλαβών σε άλλες μελέτες τοξικότητας πλην των μελετών συστηματικής τοξικότητας επαναλαμβανόμενης δόσης ή

— τη δομική σχέση ή άλλα στοιχεία που συνδέουν την ελεγχόμενη ουσία με γνωστά νευροτοξικά.

Υπάρχουν επίσης και άλλες περιπτώσεις όπου ενδείκνυται η χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών· για περισσότερες λεπτομέρειες, βλ. δημοσίευση (1).

Η παρούσα μέθοδος έχει μελετηθεί κατά τρόπον ώστε να μπορεί να προσαρμόζεται σε συγκεκριμένες ανάγκες σχετικές με την επιβεβαίωση παθολογοανατομικών ευρημάτων νευροτοξικότητας και νευροτοξικών διαταραχών της συμπεριφοράς από τη χρήση ενός χημικού, καθώς και με το χαρακτηρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των νευροτοξικών αντιδράσεων.

▼B

Παλαιότερα, η νευροτοξικότητα ταυτιζόταν με τη νευροπάθεια που συνεπάγεται νευροπαθολογικές βλάβες ή νευρολογικές δυσλειτουργίες, όπως επιληπτικές κρίσεις, παράλυση ή τρόμο. Παρόλο που η νευροπάθεια αποτελεί σημαντική εκδήλωση νευροτοξικότητας, σήμερα είναι πλέον σαφές ότι υπάρχουν πολλά άλλα σημεία τοξικής επίδρασης στο νευρικό σύστημα (π.χ. απώλεια συντονισμού των κινήσεων, περιορισμό των αισθήσεων, δυσλειτουργίες της μάθησης και της μνήμης), που ενδεχομένως δεν αποκαλύπτουν αποκαλύπτονται σε μελέτες νευροπάθειας ή άλλου τύπου.

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών νευροτοξικότητας έχει μελετηθεί για να ανιχνεύει σοβαρές επίδρασης στη συμπεριφορά και παθολογικές επιδράσεις στο νευρικό σύστημα ενηλίκων τρωκτικών. Ενώ οι επιδράσεις στη συμπεριφορά, ακόμη και αν δεν συνοδεύονται από μορφολογικές αλλαγές, μπορούν να αποκαλύψουν δυσμενή επίδραση στον οργανισμό, δεν συνδέονται όλες οι διαταραχές της συμπεριφοράς ειδικά με το νευρικό σύστημα. Κατά συνέπεια, οι παρατηρούμενες αλλαγές θα πρέπει να αξιολογούνται σε συνάρτηση με ιστοπαθολογικά, αιματολογικά ή βιοχημικά δεδομένα, καθώς και με δεδομένα για άλλους τύπους συστηματικής τοξικότητας. Οι εξετάσεις που απαιτεί η παρούσα μέθοδος για το χαρακτηρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των νευροτοξικών αντιδράσεων περιλαμβάνουν ειδικές ιστοπαθολογικές εξετάσεις και διαδικασίες μελέτης της συμπεριφοράς, που μπορούν να υποστηριχθούν με ηλεκτροφυσιολογικές ή/και βιοχημικές εξετάσεις (1)(2)(3)(4).

Τα νευροτοξικά μπορούν να δράσουν στο νευρικό σύστημα σε αρκετούς στόχους και με ποικίλους μηχανισμούς. Δεδομένου ότι δεν υπάρχει μία και μόνη σειρά δοκιμών ικανή να επιτρέψει την πλήρη εκτίμηση των νευροτοξικών ιδιοτήτων όλων των ουσιών, ενδέχεται να είναι αναγκαία η διεξαγωγή άλλων δοκιμών *in vivo* ή *in vitro* ειδικών για τον τύπο της παρατηρούμενης ή προβλεπόμενης νευροτοξικότητας.

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί, σύμφωνα με τις οδηγίες που παρέχονται στο καθοδηγητικό έγγραφο του ΟΟΣΑ για Στρατηγικές και μεθόδους δοκιμών Νευροτοξικότητας (1), για το σχεδιασμό μελετών με τις οποίες επιδιώκεται ο περαιτέρω χαρακτηρισμός ή η αύξηση της ευαισθησίας του ποσοτικού προσδιορισμού της σχέσης δόσης-απόκρισης ή η ακριβέστερη εκτίμηση του NOAEL ή η επαλήθευση γνωστών κινδύνων ή υπονοιών για κινδύνους από τη χημική ουσία. Για παράδειγμα, είναι δυνατόν να σχεδιαστούν μελέτες για τη διαλεύκανση και την αξιολόγηση του ή των νευροτοξικών μηχανισμών ή για τη συμπλήρωση δεδομένων που έχουν προκύψει από την εφαρμογή των βασικών διαδικασιών μελέτης της συμπεριφοράς και νευροπαθολογικών παρατηρήσεων. Οι εν λόγω μελέτες δεν πρέπει να αναπαράγουν δεδομένα που συγκεντρώνονται με την χρήση των τυπικών διαδικασιών τις οποίες συνιστά η μέθοδος, εάν τα δεδομένα αυτά είναι ήδη διαθέσιμα και δεν θεωρούνται απαραίτητα για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της μελέτης.

Η παρούσα μελέτη νευροτοξικότητας, χρησιμοποιούμενη μόνη ή σε συνδυασμό με άλλες, παρέχει στοιχεία με τα οποία είναι δυνατόν:

— να διαπιστωθεί αν η ελεγχόμενη χημική ουσία προκαλεί μόνιμες ή ανατάξιμες βλάβες στο νευρικό σύστημα·

— να συμβάλλουν Θ στο χαρακτηρισμός των βλαβών του νευρικού συστήματος που συνδέονται με την έκθεση στη χημική ουσία, καθώς και στη κατανόηση των υπεύθυνων μηχανισμών·

▼B

— να προσδιοριστούν οι σχέσεις δόσης-απόκρισης και χρόνου-απόκρισης, προκειμένου να υπολογιστεί το NOAEL (το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθορισμό κριτηρίων ασφάλειας για τις χημικές ουσίες).

Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται από το στόμα. Ενδέχεται άλλες οδοί χορήγησης (π.χ. από το δέρμα ή με την εισπνοή) να είναι καταλληλότερες και απαιτούν τροποποίηση των συνιστώμενων διαδικασιών. Τα κριτήρια επιλογής της οδού χορήγησης εξαρτώνται από τον τύπο της έκθεσης του ανθρώπου και τα διαθέσιμα τοξικολογικά στοιχεία ή στοιχεία κινητικής.

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

Δυσμενής επίδραση: κάθε απόκλιση από τη βασική γραμμή, που συνδέεται με την αγωγή και μειώνει την ικανότητα ενός οργανισμού να επιζεί, να αναπαράγεται ή να προσαρμόζεται στο περιβάλλον του.

Δόση: η χορηγούμενη ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας· εκφράζεται σε βάρος ουσίας (g, mg) ή σε βάρος ουσίας ανά μονάδα βάρους του πειραματόζωου (π.χ. mg/kg) ή σε σταθερές συγκεντρώσεις στο σιτηρέσιο (ppm).

Δοσολογία: γενικός όρος που περικλείει τη δόση, τη συχνότητα χορήγησης και τη διάρκεια της δόσης.

Νευροτοξικότητα: δυσμενής μεταβολή της δομής ή της λειτουργίας του νευρικού συστήματος που οφείλεται στην έκθεση σε χημικούς, βιολογικούς ή φυσικούς παράγοντες.

Νευροτοξικό: κάθε χημικός, βιολογικός ή φυσικός παράγοντας που μπορεί να προκαλέσει νευροτοξικότητα.

NOAEL: από τα αρχικά του αγγλικού «no-observed-adverse effect level», που σημαίνει το υψηλότερο επίπεδο δόσης στην οποία δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις σχετιζόμενες με την αγωγή.

1.3 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Μια σειρά δόσεων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας χορηγούνται από το στόμα σε πολλές ομάδες τρωκτικών εργαστηριακής χρήσης. Συνήθως απαιτούνται επαναλαμβανόμενες δόσεις, ενώ η δοσολογία μπορεί να είναι κάθε 28 ημερών, σε χρονικά διαστήματα μικρότερα του ενός έτους (90 ημέρες) ή σε χρονικά διαστήματα του ενός έτους (ή περισσότερο). Οι διαδικασίες που καθορίζονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για μελέτες οξείας τοξικότητας. Τα ζώα υποβάλλονται σε εξετάσεις που επιτρέπουν τη διαπίστωση ή το χαρακτηρισμό διαταραχών της συμπεριφοράς ή/και νευρολογικών. Στη διάρκεια κάθε περιόδου παρατήρησης αξιολογείται μια σειρά επιδράσεων στη συμπεριφορά που θα μπορούσαν να οφείλονται σε νευροτοξικά. Στο τέλος της δοκιμής, μια υποομάδα ζώων από κάθε φύλο και κάθε ομάδα υποβάλλονται σε έγχυση *in situ* και ακολουθεί παρασκευή τομών εγκεφάλου, νωτιαίου μυελού και περιφερειακών νεύρων για εξέταση.

Όταν η μελέτη διεξάγεται αυτοτελώς για τον αποκλεισμό ή μη της νευροτοξικότητας ή για το χαρακτηρισμό νευροτοξικών επιδράσεων, τα ζώα κάθε ομάδας που δεν επιλέγονται για έγχυση και επακόλουθη ιστοπαθολογική εξέταση (βλέπε πίνακα 1) μπορούν να υποβληθούν σε ειδικές διαδικασίες μελέτης της συμπεριφοράς και σε νευροπαθολογικές, νευροχημικές ή ηλεκτροφυσιολογικές εξετάσεις, οι οποίες συμπληρώνουν τα ευρήματα από τις τυπικές εξετάσεις που απαιτεί η παρούσα μέθοδος (1). Οι συμπληρωματικές αυτές διαδικασίες είναι ιδιαίτερα χρήσιμες στις περιπτώσεις όπου εμπειρικές παρατηρήσεις ή αναμενόμενες επιδράσεις υποδεικνύουν ένα συγκεκριμένο τύπο ή στόχο νευροτοξικότητας μιας χημικής ουσίας. Μια άλλη δυνατότητα είναι η χρήση των υπόλοιπων ζώων για τις εκτιμήσεις που απαιτούν οι μέθοδοι δοκιμών τοξικότητας επαναλαμβανόμενης δόσης σε τρωκτικά.

▼B

Όταν η παρούσα μέθοδος δοκιμών συνδυάζεται με άλλες μεθόδους, απαιτείται ικανός αριθμός ζώων για να ικανοποιούνται οι απαιτήσεις για τις παρατήρησης και των δύο μεθόδων.

1.4 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

1.4.1 **Επιλογή είδους ζώων**

Το προτιμώμενο είδος τρωκτικού είναι ο επίμυς, αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη τρωκτικών, με αιτιολόγηση της επιλογής τους. Πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή νεαρά ενήλικα ζώα που ανήκουν σε φυλές κοινής εργαστηριακής χρήσης. Τα θηλυκά ζώα πρέπει να μην έχουν ποτέ γεννήσει ούτε να εγκυμονούν. Η χορήγηση των δόσεων θα πρέπει κατά κανόνα να αρχίζει το ταχύτερο δυνατόν μετά τον απογαλακτισμό, κατά προτίμηση όταν τα ζώα είναι ηλικίας το πολύ έξι εβδομάδων και, πάντως, πριν συμπληρώσουν τις εννέα εβδομάδες. Όταν ωστόσο η μελέτη αυτή συνδυάζεται με άλλες, μπορεί να χρειάζεται προσαρμογή της απαίτησης για την ηλικία. Κατά την έναρξη της μελέτης, η διακύμανση του βάρους των χρησιμοποιούμενων ζώων δεν πρέπει να υπερβαίνει το ± 20 % του μέσου βάρους κάθε φύλου. Στις περιπτώσεις όπου διεξάγεται μια βραχεία μελέτη επαναλαμβανόμενης δόσης ως προκαταρτική μακροχρόνιας μελέτης, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ζώα της ίδιας φυλής και προέλευσης, στις δύο μελέτες.

1.4.2 **Συνθήκες στέγασης και διατροφής**

Η θερμοκρασία του θαλάμου πειραματόζωων πρέπει να είναι 22 °C (±3 °C). Αν και η σχετική υγρασία πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου, εν τούτοις ο στόχος θα πρέπει να είναι μια τιμή 50-60 %. Ο φωτισμός πρέπει να είναι τεχνητός, με εναλλαγή φωτός-σκότους ανά 12ωρο. Οι δυνατοί, διακεκομμένοι θόρυβοι θα πρέπει να περιορίζονται στο ελάχιστο. Για τη διατροφή των ζώων μπορούν να χρησιμοποιούνται τα συνήθη εργαστηριακά σιτηρέσια, με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού. Όταν η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται με την τροφή, στη παρούσα μέθοδο, η ανάγκη παρασκευής κατάλληλου μίγματος είναι δυνατόν να επηρεάσει την επιλογή του σιτηρεσίου. Τα ζώα μπορούν να στεγάζονται χωριστά ή σε μικρές ομάδες του ίδιου φύλου.

1.4.3 **Προετοιμασία των ζώων**

Υγιή νεαρά ζώα κατανέμονται τυχαία στις ομάδες αγωγής και ομάδες μάρτυρες. Η διάταξη των κλουβιών θα πρέπει να είναι τέτοια ώστε να ελαχιστοποιεί την πιθανότητα επιδράσεων οφειλόμενων στη θέση των κλουβιών. Τα ζώα σημαίνονται με τρόπο που επιτρέπει την αναγνώριση του καθενός και παραμένουν στα κλουβιά τους τουλάχιστον για πέντε ημέρες πριν από την έναρξη της μελέτης, ώστε να εγκλιματιστούν στις εργαστηριακές συνθήκες.

1.4.4 **Οδός χορήγησης και παρασκευή των δόσεων**

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών αφορά ειδικά τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας από το στόμα. Η ουσία μπορεί να χορηγηθεί με καθετήρα σίτισης, με την τροφή, με το νερό ή σε κάψουλες. Ενδέχεται άλλες οδοί χορήγησης (π.χ. από το δέρμα ή με την εισπνοή) να είναι καταλληλότερες και απαιτούν τροποποίηση των συνιστώμενων διαδικασιών. Τα κριτήρια επιλογής της οδού χορήγησης εξαρτώνται από τον τύπο της έκθεσης του ανθρώπου και τα διαθέσιμα τοξικολογικά στοιχεία ή στοιχεία κινητικής. Θα πρέπει να αναφέρονται οι λόγοι της επιλογής άλλης οδού χορήγησης, καθώς και οι συνακόλουθες τροποποιήσεις των διαδικασιών της παρούσας μεθόδου.

▼B

Εάν είναι απαραίτητο, μπορεί να παρασκευαστεί διάλυμα ή εναιώρημα της ελεγχόμενης ουσίας σε κατάλληλο φορέα. Συνιστάται να χρησιμοποιούνται, πρωτίστως, υδατικά διαλύματα/εναιωρήματα, με δεύτερα κατά σειρά προτίμησης τα διαλύματα/εναιωρήματα σε έλαιο (π.χ. αραβοσιτέλαιο) και τελευταία τα διαλύματα/εναιωρήματα σε άλλους φορείς. Οι τοξικολογικές ιδιότητες του φορέα πρέπει να είναι γνωστές. Επιπλέον, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα ακόλουθα χαρακτηριστικά του: επίδραση στην απορρόφηση, την κατανομή, το μεταβολισμό ή την κατακράτηση της ελεγχόμενης ουσίας, η οποία μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα μεταβολή των τοξικολογικών ιδιοτήτων της, και επίδραση στην κατανάλωση τροφής/νερού από τα ζώα ή στη θρέψη τους.

1.5 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.5.1 **Αριθμός και φύλο των ζώων**

Όταν η μελέτη διεξάγεται αυτοτελώς, κάθε ομάδα αγωγής και ομάδα μάρτυρας πρέπει να αποτελείται τουλάχιστον από 20 ζώα (10 θηλυκά και 10 αρσενικά) για την αξιολόγηση των λεπτομερών κλινικών και λειτουργικών παρατηρήσεων. Στο τέλος της μελέτης, επιλέγονται τουλάχιστον πέντε αρσενικά και πέντε θηλυκά ζώα μεταξύ των παραπάνω 10 αρσενικών και 10 θηλυκών, υποβάλλονται σε έγχυση *in situ* και χρησιμοποιούνται για λεπτομερή νευροϊστοπαθολογική εξέταση. Εάν ο αριθμός των ζώων μιας δεδομένης ομάδας αγωγής που εξετάζονται για συμπτώματα νευροτοξικότητας είναι περιορισμένος, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται στα επιλεγόμενα για έγχυση. Όταν η μελέτη συνδυάζεται με μελέτη τοξικότητας επαναλαμβανόμενης δόσης, απαιτείται ικανός αριθμός ζώων για να καλύπτονται οι απαιτήσεις και των δύο μελετών. Οι ελάχιστοι αριθμοί ζώων ανά ομάδα για διάφορους συνδυασμούς μελετών παρατίθενται στον πίνακα 1. Εάν έχουν προγραμματιστεί ενδιάμεσες θανατώσεις ή ομάδες ανάρρωσης για την παρατήρηση της εμφάνισης ανατάξιμων, μόνιμων ή όψιμων επιδράσεων μετά την αγωγή ή εάν μελετάται το ενδεχόμενο συμπληρωματικών παρατηρήσεων, ο αριθμός των ζώων θα πρέπει να αυξάνεται, ώστε να επαρκεί για την παρατήρηση και την ιστοπαθολογία.

1.5.2 **Ομάδες αγωγής και ομάδα μάρτυρας**

Κατά κανόνα χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τρεις ομάδες αγωγής και μία ομάδα μάρτυρας. Εάν όμως από την αξιολόγηση άλλων δεδομένων, δεν αναμένονται επιδράσεις με μια επαναλαμβανόμενη δόση 1 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα, είναι δυνατόν να διεξαχθεί οριακή δοκιμή. Εάν δεν υπάρχουν κατάλληλα στοιχεία, είναι δυνατόν να διεξαχθεί μελέτη εύρεσης πεδίου τιμών για να βοηθήσει στον καθορισμό των δόσεων που θα χορηγηθούν. Ο τρόπος χρήσης των ζώων της ομάδας μάρτυρα, εκτός του ότι αυτά δεν υποβάλλονται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία, πρέπει κατά τα άλλα να είναι πανομοιότυπος με των ζώων των ομάδων αγωγής. Σε περίπτωση χρήσης φορέα για τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας, αυτός θα πρέπει να χορηγείται στην ομάδα μάρτυρα στο μεγαλύτερο χρησιμοποιούμενο όγκο.

1.5.3 **Έλεγχος αξιοπιστίας**

Το εργαστήριο που αναλαμβάνει τη μελέτη θα πρέπει να αποδεικνύει την ικανότητά του να τη διεξάγει, καθώς και την ευαισθησία των διαδικασιών που εφαρμόζει. Τα σχετικά δεδομένα θα πρέπει να καταδεικνύουν την ικανότητα ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού, κατά περίπτωση, των μεταβολών των διαφόρων τελικών σημείων που συνιστά η μέθοδος να παρατηρούνται, όπως η αυτόνομη λειτουργία, η αισθητικότητα, η ισχύς των άκρων και η κινητικότητα. Πληροφορίες για χημικές ουσίες που προκαλούν νευροτοξικές αντιδράσεις διαφόρων τύπων και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως θετικοί μάρτυρες παρέχονται στις δημοσιεύσεις (2) έως (9). Εφόσον τα βασικά σημεία των πειραματικών διαδικασιών παραμένουν αμετάβλητα, μπορεί να χρησιμοποιείται το ιστορικό δεδομένων, το οποίο συνιστάται να ανανεώνεται κατά διαστήματα. Όταν το εργαστήριο τροποποιεί βασικά σημεία του τρόπου εργασίας ή των διαδικασιών της δοκιμής, θα πρέπει να παρουσιάσει νέα δεδομένα που αποδεικνύουν τη διατήρηση της ευαισθησίας των διαδικασιών.

▼B

1.5.4 **Επιλογή δόσεων**

Οι δόσεις θα πρέπει να επιλέγονται λαμβάνοντας υπόψη τα δεδομένα που τυχόν έχουν προηγουμένως παρατηρηθεί, που αφορούν την τοξικότητα ή την κινητική της. ελεγχόμενης χημικής ένωσης ή άλλων ομοειδών ουσιών. Το υψηλότερο επίπεδο δόσης θα πρέπει να επιλέγεται με σκοπό την πρόκληση νευροτοξικών ή σαφών συστηματικών επιδράσεων. Στη συνέχεια, επιλέγεται μια φθίνουσα σειρά επιπέδων δόσης με σκοπό τον προσδιορισμό της ενδεχόμενης σχέσης δόσης-απόκρισης και του NOAEL/στη χαμηλότερη δόση. Οι δόσεις θα πρέπει καταρχήν να καθορίζονται κατά τρόπον ώστε να επιτρέπουν τη διάκριση μεταξύ πρωτογενών τοξικών επιδράσεων στο νευρικό σύστημα και συστηματικής τοξικότητας. Δύο έως τρία επίπεδα δόσης είναι συχνά η καλύτερη λύση, ενώ είναι προτιμότερο να προστίθεται μια τέταρτη ομάδα αγωγής αντί να διαφέρουν τα επίπεδα πολύ μεταξύ τους (π.χ. διαφορά μεγαλύτερη από 1 προς 10). Εάν υπάρχει βάσιμη εκτίμηση της έκθεσης του ανθρώπου, θα πρέπει να λαμβάνεται και αυτή υπόψη.

1.5.5 **Οριακή δοκιμή**

Εάν σε μελέτη με δόση τουλάχιστον 1 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα, με εφαρμογή των διαδικασιών που περιγράφονται στα προηγούμενα, δεν παρατηρηθούν εμφανείς νευροτοξικές επιδράσεις και εφόσον δεν αναμένεται τοξικότητα με βάση στοιχεία για ουσίες ανάλογης χημικής δομής, τότε μπορεί να κριθεί περιττή η διεξαγωγή πλήρους μελέτης με τρεις διαφορετικές δόσεις. Η προβλεπόμενη έκθεση του ανθρώπου ενδέχεται να δείχνει ότι είναι αναγκαίο να χρησιμοποιηθεί στην οριακή δοκιμή υψηλότερη δόση από το στόμα. Σε περίπτωση χορήγησης από άλλη οδό, όπως εισπνοή ή εφαρμογή στο δέρμα, το μέγιστα εφικτό επίπεδο έκθεσης μπορεί να εξαρτάται από τις φυσικές και χημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης ουσίας. Για τη χρήση της μεθόδου σε μελέτη οξείας τοξικότητας, η δόση στην οριακή δοκιμή θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 2000 mg/kg.

1.5.6 **Χορήγηση των δόσεων**

Η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται στα ζώα κάθε ημέρα της εβδομάδας για περίοδο τουλάχιστον 28 ημερών. Η χρήση πενθήμερου δοσολογικού σχήματος ή μικρότερης περιόδου έκθεσης πρέπει να αιτιολογείται. Σε περίπτωση χορήγησης της ελεγχόμενης ουσίας με σωλήνα, αυτή χορηγείται εφάπαξ με τη βοήθεια ρινογαστρικού καθετήρα σίτισης ή κατάλληλου σωλήνα διασωλήνωσης. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Ο όγκος δεν πρέπει κατά κανόνα να υπερβαίνει το 1ml/100g βάρους σώματος, αλλά στην περίπτωση των υδατικών διαλυμάτων μπορεί να μελετηθεί το ενδεχόμενο χορήγησης 2 ml/100g βάρους σώματος. Με εξαίρεση τις ερεθιστικές ή διαβρωτικές ουσίες, των οποίων οι επιδράσεις συνήθως ενισχύονται όταν αυξάνεται η συγκέντρωση, η διακύμανση του όγκου των δόσεων θα πρέπει να ελαχιστοποιείται με αλλαγή της συγκέντρωσης, ώστε ο όγκος να παραμένει σταθερός σε όλα τα επίπεδα δόσης.

Σε περίπτωση χορήγησης της ουσίας με την τροφή ή το νερό, είναι σημαντικό να διασφαλίζεται ότι οι χρησιμοποιούμενες ποσότητες ελεγχόμενης ουσίας δεν παρεμποδίζουν τη φυσιολογική θρέψη των ζώων ή το μεταβολισμό του νερού. Όταν η ουσία χορηγείται με την τροφή, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί είτε μια σταθερή συγκέντρωση στο σιτηρέσιο (ppm) είτε ένα σταθερό επίπεδο δόσης ως προς το βάρος του ζώου. Η επιλεγόμενη εναλλακτική δυνατότητα πρέπει να προσδιορίζεται. Στην περίπτωση των ουσιών που χορηγούνται με σωλήνα σίτισης, οι δόσεις θα πρέπει να χορηγούνται την ίδια περίπου ώρα κάθε ημέρα και να αναπροσαρμόζονται ανάλογα με το βάρος του ζώου, ώστε το επίπεδό τους να διατηρείται σταθερό. Στις περιπτώσεις όπου διεξάγεται μια βραχεία μελέτη επαναλαμβανόμενης δόσης ως προκαταρτική μακροχρόνιας μελέτης, θα πρέπει να χρησιμοποιείται παρόμοιο σιτηρέσιο και στις δύο. Στην περίπτωση των μελετών οξείας τοξικότητας, εάν η εφάπαξ χορήγηση δεν είναι εφικτή, η δόση μπορεί να χορηγηθεί τμηματικά εντός περιόδου που δεν υπερβαίνει τις 24 ώρες.

▼B

1.6 ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ

1.6.1 **Συχνότητα παρατήρησης και εξετάσεων**

Στις μελέτες επαναλαμβανόμενης δόσης η περίοδος παρατήρησης θα πρέπει να καλύπτει την περίοδο δοσολογίας. Στις μελέτες οξείας τοξικότητας θα πρέπει να εφαρμόζεται περίοδος παρατήρησης 14 ημερών μετά την αγωγή. Όταν χρησιμοποιούνται δορυφορικές ομάδες ζώων που δεν εκτίθενται στην ουσία για ένα ορισμένο διάστημα μετά την αγωγή, οι παρατηρήσεις θα πρέπει να καλύπτουν και αυτό το διάστημα.

Η συχνότητα παρατήρησης θα πρέπει να είναι επαρκής, ώστε να μεγιστοποιείται η πιθανότητα ανίχνευσης διαταραχών της συμπεριφοράς ή/και νευρολογικών. Τα ζώα θα πρέπει κατά προτίμηση να εξετάζονται την ίδια ώρα κάθε ημέρα, λαμβάνοντας υπόψη το χρόνο κορύφωσης των αναμενόμενων επιδράσεων μετά τη χορήγηση της δόσης. Η συχνότητα κλινικής παρατήρησης και λειτουργικής εξέτασης συνοψίζεται στον πίνακα 2. Εάν δεδομένα κινητικής ή άλλα, προερχόμενα από προηγούμενη μελέτη, επιβάλλουν την επιλογή διαφορετικών χρόνων για τις παρατηρήσεις, τις εξετάσεις και τις διαδικασίες μετά την παρατήρηση, μπορεί να καθοριστεί διαφορετικό χρονοδιάγραμμα, ώστε να συγκεντρωθούν όσο το δυνατόν περισσότερα στοιχεία. Οι αλλαγές στο χρονοδιάγραμμα θα πρέπει να αιτιολογούνται.

1.6.1.1 *Παρατήρηση της γενικής κατάστασης της υγείας και της θνησιμότητας/νοσηρότητας*

Όλα τα ζώα θα πρέπει να εξετάζονται με προσοχή τουλάχιστον μία φορά ημερησίως, όσον αφορά τη γενική κατάσταση της υγείας τους, και τουλάχιστον δύο φορές ημερησίως, όσον αφορά τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα.

1.6.1.2 *Λεπτομερής κλινική εξέταση*

Όλα τα ζώα που επιλέγονται για λεπτομερή κλινική εξέταση (βλέπε πίνακα 1) θα πρέπει να εξετάζονται μία φορά πριν από την πρώτη έκθεση (ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση των υποκειμένων) και κατόπιν σε διάφορα διαστήματα ανάλογα με τη διάρκεια της μελέτης (βλέπε πίνακα 2). Η λεπτομερής κλινική εξέταση των δορυφορικών ομάδων ανάρρωσης θα πρέπει να διενεργείται στο τέλος της περιόδου ανάρρωσης. Η λεπτομερής κλινική εξέταση θα πρέπει να διενεργείται έξω από το κλουβί, σε τυποποιημένο χώρο. Οι κλινικές παρατήρησης θα πρέπει να καταγράφονται με προσοχή, με τη βοήθεια ενός συστήματος βαθμολόγησης, που περιλαμβάνει κριτήρια ή βαθμολογική κλίμακα για κάθε ποσοτική εκτίμηση. Τα χρησιμοποιούμενα κριτήρια ή κλίμακες πρέπει να έχουν οριστεί επακριβώς από το εργαστήριο δοκιμών. Θα πρέπει να καταβάλλεται προσπάθεια, ώστε οι μεταβολές των συνθηκών δοκιμής (πλην εκείνων που συνδέονται συστηματικά με την αγωγή) να περιορίζονται στο ελάχιστο και η εξέταση να εκτελείται από έμπειρους εξεταστές, που δεν γνωρίζουν την αγωγή στην οποία έχουν υποβληθεί τα ζώα.

Συνιστάται η εξέταση να είναι δομημένη, με τρόπο ώστε καλά καθορισμένα κριτήρια (μεταξύ των οποίων περιλαμβάνεται ο καθορισμός του εύρους «φυσιολογικών τιμών»), να εφαρμόζονται συστηματικά σε κάθε ζώο και σε κάθε χρόνο παρατήρησης. Οι «φυσιολογικές τιμές» πρέπει να είναι επαρκώς τεκμηριωμένες. Καταγράφονται όλα τα παρατηρούμενα συμπτώματα και, εάν είναι εφικτό, η έντασή τους. Οι κλινικές παρατηρήσεις θα πρέπει να περιλαμβάνουν, χωρίς η απαρίθμηση να είναι περιοριστική, τις αλλαγές στο δέρμα, στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους, την εμφάνιση εκκρίσεων και την αυτόνομη λειτουργία (π.χ., δακρύρροια, ανόρθωση του τριχώματος, αλλαγή του μεγέθους της κόρης των οφθαλμών, ασυνήθης ρυθμός αναπνοής ή/και αναπνοή από το στόμα, ανωμαλίες στην ούρηση και στις κενώσεις, αποχρωματισμός των ούρων).

▼B

Θα πρέπει επίσης να σημειώνονται οι ασυνήθεις παρατηρήσεις που αφορούν τη θέση του σώματος, την κινητικότητα (π.χ. αύξηση ή μείωση της διάθεσης εξερεύνησης του τυποποιημένου χώρου) και το συντονισμό των κινήσεων. Θα *πρέπει* να καταγράφονται ακόμη οι αλλαγές στη βάδιση (π.χ. ταλάντευση, αταξία), στη στάση του σώματος (π.χ. κύρτωση της ράχης) και στην αντίδραση στη μεταχείριση, την τοποθέτηση και σε άλλα ερεθίσματα από το περιβάλλον, καθώς και η εμφάνιση μυοκλωνίας, υπερτονίας, σπασμών, τρόμου και στερεότυπων κινήσεων (π.χ. υπερβολική περιποίηση του σώματος, ασυνήθεις κινήσεις του κεφαλιού, διαγραφή συνεχών κύκλων), η περίεργη συμπεριφορά (π.χ. δήγματα ή υπερβολική λείξη, αυτοακρωτηριασμός, οπισθοδρόμηση, φώνηση) και η επιθετικότητα.

1.6.1.3 *Λειτουργικές εξετάσεις*

Όπως και στην περίπτωση της λεπτομερούς κλινικής εξέτασης, όλα τα ζώα που επιλέγονται για λειτουργικές εξετάσεις θα πρέπει να εξετάζονται μία φορά πριν από την έκθεση και, κατόπιν, τακτικά (βλέπε πίνακα 1). Η συχνότητα των λειτουργικών εξετάσεων εξαρτάται και αυτή από τη διάρκεια της μελέτης (βλέπε πίνακα 2). Εκτός από τις περιόδους παρατήρησης που καθορίζονται στον πίνακα 2, οι δορυφορικές ομάδες ανάρρωσης θα πρέπει επίσης να υποβάλλονται σε λειτουργικές εξετάσεις, όσο το δυνατόν πλησιέστερα στο χρόνο θανάτωσης. Οι λειτουργικές εξετάσεις θα πρέπει να περιλαμβάνουν εκτίμηση των διαφόρων τρόπων αισθητικότητας [π.χ. ακοής, όρασης και ιδιοδεκτικής αισθητικότητας(5)(6)(7)], εκτίμηση της ισχύος των άκρων (8) και της κινητικότητας (9). Η κινητικότητα θα πρέπει να μετράται με αυτόματη συσκευή, ικανή να ανιχνεύει τόσο τη μείωση, όσο και την αύξησή της. Εφόσον χρησιμοποιείται άλλο σύστημα μέτρησης, θα πρέπει να παρέχει ποσοτικά δεδομένα και να διαθέτει αποδεδειγμένη ευαισθησία και αξιοπιστία. Κάθε συσκευή θα πρέπει να ελέγχεται για να διασφαλίζεται η αξιοπιστία στο χρόνο και η συνέπεια μεταξύ των συσκευών. Περισσότερες λεπτομέρειες για τις διαδικασίες που μπορούν να εφαρμόζονται, παρέχονται στη σχετική βιβλιογραφία. Εάν δεν υπάρχουν δεδομένα για πιθανές νευροτοξικές επιδράσεις (π.χ. σχέση δομής-δραστικότητας, επιδημιολογικά δεδομένα, αποτελέσματα άλλων τοξικολογικών μελετών), θα πρέπει να μελετάται το ενδεχόμενο προσθήκης πιο εξειδικευμένων εξετάσεων για αισθητικότητα και κινητικότητα ή για τις λειτουργίες της μάθησης και της μνήμης με σκοπό τη λεπτομερέστερη διερεύνηση των πιθανών επιδράσεων. Περισσότερες πληροφορίες για τις εν λόγω ειδικές εξετάσεις και τη χρήση τους παρέχονται στη δημοσίευση (1).

Κατ' εξαίρεση, τα ζώα που παρουσιάζουν συμπτώματα τοξικότητας σε βαθμό ώστε αυτά να παρεμποδίζουν τις λειτουργικές εξετάσεις, μπορούν να παραλείπονται. Η απόσυρση ζώων από μια λειτουργική εξέταση θα πρέπει να αιτιολογείται.

1.6.2 **Βάρος σώματος και κατανάλωση τροφής/νερού**

Στις μελέτες διάρκειας έως 90 ημερών, θα πρέπει να ζυγίζονται όλα τα ζώα τουλάχιστον ανά εβδομάδα και να μετράται η κατανάλωση τροφής (κατανάλωση νερού, εάν η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται μέσω αυτού) επίσης τουλάχιστον ανά εβδομάδα. Στις μακροχρόνιες μελέτες, θα πρέπει να ζυγίζονται όλα τα ζώα τουλάχιστον ανά εβδομάδα για τις πρώτες 13 εβδομάδες και, κατόπιν, τουλάχιστον ανά 4 εβδομάδες. Η κατανάλωση τροφής (κατανάλωση νερού, εάν η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται μέσω αυτού) θα πρέπει να μετράται τουλάχιστον ανά εβδομάδα για τις πρώτες 13 εβδομάδες και, κατόπιν, ανά τρίμηνο περίπου, εκτός εάν η κατάσταση της υγείας ή οι μεταβολές του βάρους των ζώων επιβάλλουν άλλη συχνότητα.

▼B

1.6.3 **Οφθαλμολογία**

Στις μελέτες διάρκειας, άνω των 28 ημερών, πρέπει να υποβάλλονται σε οφθαλμολογική εξέταση, με οφθαλμοσκόπιο ή άλλο κατάλληλο όργανο, αν όχι όλα τα ζώα, τουλάχιστον εκείνα της ομάδας υψηλής δόσης και της ομάδας μάρτυρα πριν από τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας και στο τέλος της μελέτης. Εφόσον διαπιστώνονται αλλαγές στους οφθαλμούς ή εάν το επιβάλλουν τα κλινικά συμπτώματα, θα πρέπει να εξετάζονται όλα τα ζώα. Στις μακροχρόνιες μελέτες, θα πρέπει επίσης να διενεργείται οφθαλμολογική εξέταση μετά 13 εβδομάδες. Δεν απαιτείται οφθαλμολογική εξέταση εάν υπάρχουν ήδη σχετικά δεδομένα από άλλες μελέτες με ανάλογη διάρκεια και ανάλογα επίπεδα δόσης.

1.6.4 **Αιματολογία και κλινική βιοχημεία**

Στις περιπτώσεις όπου η μελέτη νευροτοξικότητας διεξάγεται σε συνδυασμό με μελέτη συστηματικής τοξικότητας επαναλαμβανόμενης δόσης, πρέπει να διενεργούνται οι αιματολογικές και βιοχημικές εξετάσεις που καθορίζονται στη μέθοδο της συγκεκριμένης μελέτης συστηματικής τοξικότητας. Τα δείγματα θα πρέπει να συλλέγονται κατά τρόπον ώστε να ελαχιστοποιούνται οι πιθανές επιδράσεις στη συμπεριφορά του νευρικού συστήματος.

1.6.5 **Ιστοπαθολογία**

Η νευροπαθολογική εξέταση θα πρέπει να σχεδιάζεται για να συμπληρώνει και να διευρύνει τις παρατηρήσεις της φάσης *in vivo* της μελέτης. Ιστοί από τουλάχιστον 5 ζώα/φύλο/ομάδα (βλέπε πίνακα 1 και επόμενη παράγραφο) μονιμοποιούνται *in situ,* με τη βοήθεια αναγνωρισμένων τεχνικών έγχυσης και μονιμοποίησης (βλέπε δημοσίευση (3) κεφ. 5 και δημοσίευση (4) κεφ. 50). Όλες οι μακροσκοπικές αλλοιώσεις θα πρέπει να καταγράφονται. Όταν η μελέτη διεξάγεται αυτοτελώς για τον αποκλεισμό ή μη της νευροτοξικότητας ή για το χαρακτηρισμό νευροτοξικών επιδράσεων, τα υπόλοιπα ζώα μπορούν να υποβληθούν σε ειδικές διαδικασίες μελέτης της συμπεριφοράς (10)(11) και σε νευροπαθολογικές (10ΧΠ)(12)(13), νευροχημικές (10)(11)(14)(15) ή ηλεκτροφυσιολογικές (10)(11)(16)(17) εξέτασης, οι οποίες συμπληρώνουν τις διαδικασίες και εξετάσεις που περιγράφονται στην παρούσα κατευθυντήρια γραμμή, ή να προστεθούν στον αριθμό των υποκειμένων της ιστοπαθολογικής εξέτασης. Οι συμπληρωματικές αυτές διαδικασίες είναι ιδιαίτερα χρήσιμες στις περιπτώσεις όπου εμπειρικές παρατηρήσεις ή οι αναμενόμενες επιδράσεις υποδεικνύουν ένα συγκεκριμένο τύπο ή στόχο νευροτοξικότητας (2)(3). Μια άλλη δυνατότητα είναι η χρήση των υπόλοιπων ζώων για τις παθολογικές εκτιμήσεις ρουτίνας που απαιτούν οι μέθοδοι δοκιμών επαναλαμβανόμενης δόσης.

Μετά από στερέωση σε παραφίνη, όλα τα ιστοτεμάχια βάφονται με χρώση γενικής χρήσεως, όπως αιματοξυλίνη και ηωσίνη (H&E), και ακολουθεί μικροσκοπική εξέταση. Εάν υπάρχουν συμπτώματα ή υπόνοιες περιφερειακής νευροπάθειας, θα πρέπει να εξετάζονται δείγματα περιφερειακών νεύρων, στερεωμένα σε πλαστική ύλη. Τα κλινικά συμπτώματα ενδέχεται επίσης να συνηγορούν υπέρ της εξέτασης πρόσθετων θέσεων ή της χρήσης ειδικών χρώσεων. Οδηγίες για πρόσθετες θέσεις προς εξέταση παρέχονται στις δημοσιεύσεις (3)(4). Χρήσιμες είναι επίσης οι ειδικές χρώσεις που αποκαλύπτουν συγκεκριμένους τύπους παθολογικών αλλοιώσεων (18).

▼B

Η ιστολογική εξέταση πρέπει να καλύπτει αντιπροσωπευτικές τομές του κεντρικού και του περιφερειακού νευρικού συστήματος (βλέπε δημοσίευση (3) κεφ. 5 και δημοσίευση (4) κεφ. 50). Οι εξεταζόμενες περιοχές κατά κανόνα περιλαμβάνουν τον προσεγκέφαλο, τον διεγκέφαλο, συμπεριλαμβανομένης μιας τομής διαμέσου του ιπποκάμπου, τον μεσεγκέφαλο, την παρεγκεφαλίδα, τη γέφυρα, τον προμήκη μυελό, τον οφθαλμό με το οπτικό νεύρο και τον αμφιβληστροειδή, το νωτιαίο μυελό στο ύψος του αυχενικού και του οσφυϊκού ογκώματος, τα γάγγλια ραχιαίας ρίζας, τις ίνες ραχιαίας και κοιλιακής ρίζας, το πρώτο ισχιακό νεύρο, το πρώτο κνημιαίο νεύρο (στο γόνατο) και τους κλάδους του κνημιαίου νεύρου στον γαστροκνήμιο μυ. Οι τομές νωτιαίου μυελού και περιφερειακών νεύρων θα πρέπει να είναι διασταυρούμενες και εγκάρσιες και διαμήκεις. Θα πρέπει να δίδεται προσοχή στην αγγείωση του νευρικού συστήματος. Θα πρέπει επίσης να εξετάζεται ένα δείγμα σκελετικού μυός, ιδίως του γαστροκνήμιου. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτούν οι θέσεις του κεντρικού και του περιφερειακού νευρικού συστήματος με κυτταρική και ινώδη δομή, που είναι γνωστό ότι προσβάλλονται ιδιαίτερα από τα νευροτοξικά.

Οδηγίες για τυπικές νευροπαθολογικές αλλοιώσεις που οφείλονται σε έκθεση σε τοξικούς παράγοντες παρέχονται στις δημοσιεύσεις (3)(4). Για την ιστολογική εξέταση συνιστάται κλιμακωτή διαδικασία, η οποία αρχίζει με σύγκριση των τομών που προέρχονται από την ομάδα υψηλής δόσης με τις τομές από την ομάδα μάρτυρα. Εάν δεν παρατηρηθούν νευροπαθολογικές αλλοιώσεις, δεν χρειάζεται άλλη εξέταση. Εάν παρατηρηθούν αλλοιώσεις στα δείγματα από την ομάδα υψηλής δόσης, όλα τα δείγματα πιθανώς προσβεβλημένων ιστών που προέρχονται από τις ομάδες μεσαίας και χαμηλής δόσης λαμβάνουν κωδικό αριθμό και εξετάζονται διαδοχικά.

Εάν η ποιοτική εξέταση δείξει νευροπαθολογικές αλλοιώσεις, όλες οι περιοχές του νευρικού συστήματος που εμφανίζουν τις εν λόγω αλλοιώσεις πρέπει να υποβληθούν σε δεύτερη εξέταση. Τομές από όλες τις πιθανώς προσβεβλημένες περιοχές, προερχόμενες από όλες τις δοσολογικές ομάδες, λαμβάνουν κωδικό αριθμό και εξετάζονται με τυχαία επιλογή, χωρίς γνώση του κωδικού αριθμού. Καταγράφονται η συχνότητα και η σοβαρότητα κάθε βλάβης. Μετά τη βαθμολόγηση όλων των περιοχών από όλες τις δοσολογικές ομάδες, είναι δυνατόν να αποκαλυφθεί η ταυτότητα των δειγμάτων και να ακολουθήσει στατιστική ανάλυση με σκοπό την εκτίμηση των σχέσεων δόσης-απόκρισης. Για κάθε βλάβη, θα πρέπει να περιγράφονται παραδείγματα των διαφόρων βαθμών σοβαρότητας.

Τα νευροπαθολογικά ευρήματα θα πρέπει να συσχετίζονται με τις παρατηρήσεις και μετρήσεις της συμπεριφοράς, καθώς και με άλλα δεδομένα από προηγούμενες ή ταυτόχρονες μελέτες συστηματικής τοξικότητας με αντικείμενο την ελεγχόμενη ουσία.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Πρέπει να παρέχονται τα δεδομένα για κάθε ζώο χωριστά. Επιπλέον, το σύνολο των δεδομένων πρέπει να συνοψίζεται σε πίνακα, όπου θα εμφαίνονται, για κάθε ομάδα αγωγής και μάρτυρα, ο αριθμός ζώων κατά την έναρξη της δοκιμής, ο αριθμός ζώων που βρέθηκαν νεκρά στη διάρκεια της δοκιμής ή θανατώθηκαν για να μην υποφέρουν και ο χρόνος θανάτου ή ευθανασίας, ο αριθμός ζώων που παρουσίασαν συμπτώματα τοξικότητας, περιγραφή αυτών των συμπτωμάτων, με αναφορά του χρόνου εκδήλωσης, της διάρκειας, του είδους και της σοβαρότητας των τοξικών-επιδράσεων, ο αριθμός ζώων που παρουσίασαν βλάβη(-ες), με αναφορά του είδους και της σοβαρότητας της/τους.

▼B

2.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα της μελέτης θα πρέπει να αξιολογούνται με κριτήρια τη συχνότητα, τη σοβαρότητα και το συσχέτιση των επιδράσεων στη συμπεριφορά, των νευροπαθολογικών επιδράσεων (επίσης, των νευροχημικών ή ηλεκτροφυσιολογικών επιδράσεων, εάν η μελέτη περιλάμβανε συμπληρωματικές εξετάσεις) και τυχόν άλλων δυσμενών επιδράσεων που παρατηρήθηκαν. Τα αριθμητικά αποτελέσματα θα πρέπει, όπου είναι δυνατόν, να αξιολογούνται με κατάλληλη και αναγνωρισμένη στατιστική μέθοδο, η οποία πρέπει να επιλέγεται κατά το σχεδιασμό της μελέτης.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ**

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη ουσία:

— σύσταση (συμπεριλαμβάνονται η ισομερείωση, η καθαρότητα και οι φυσικές και χημικές ιδιότητες)

— στοιχεία ταυτότητας.

Φορέας (κατά περίπτωση):

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα.

Πειραματόζωα:

— είδος/φυλή που χρησιμοποιήθηκε·

— αριθμό, ηλικία και φύλο των ζώων·

— προέλευση των ζώων, συνθήκες στέγασης, εγκλιματισμό, σιτηρέσιο κλπ.·

— βάρος κάθε ζώου κατά την έναρξη της δοκιμής.

Συνθήκες δοκιμής:

— λεπτομέρειες για το τύπο της ελεγχόμενης ουσίας/παρασκεύασμα σιτηρεσίου, τη συγκέντρωση που επιτεύχθηκε, τη σταθερότητα και την ομοιογένειά του·

— προδιαγραφές των δόσεων που χορηγήθηκαν, με λεπτομέρειες για το φορέα, τον όγκο και τη φυσική μορφή του υλικού που χορηγήθηκε·

— λεπτομέρειες για τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας·

— αιτιολόγηση της επιλογής των επιπέδων δόσης·

— αιτιολόγηση της οδού και της διάρκειας έκθεσης·

— μετατροπή από συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας στο σιτηρέσιο/πόσιμο νερό (ppm) σε πραγματική δόση (mg/kg βάρους σώματος/ημέρα), εάν έχει εφαρμογή·

— λεπτομέρειες για την ποιότητα της τροφής και του νερού.

Διαδικασίες παρατήρησης και δοκιμών:

— λεπτομέρειες για την επιλογή ζώων από κάθε ομάδα για έγχυση·

— λεπτομέρειες για τα συστήματα βαθμολόγησης, μεταξύ των οποίων κριτήρια και κλίμακες βαθμολόγησης για κάθε μέτρηση στο πλαίσιο της λεπτομερούς κλινικής εξέτασης·

▼B

— λεπτομέρειες για τις λειτουργικές εξετάσεις με σκοπό την εκτίμηση των διαφόρων τρόπων αισθητικότητας (π.χ. ακοής, όρασης και ιδιοδεκτικής αισθητικότητας), της ισχύος των άκρων και της κινητικότητας (με λεπτομερείς πληροφορίες για τις αυτόματες συσκευές μέτρησης της κινητικότητας), καθώς και για τυχόν άλλες διαδικασίες που εφαρμόστηκαν·

— λεπτομέρειες για τις οφθαλμολογικές εξετάσεις και, κατά περίπτωση, τις αιματολογικές και τις βιοχημικές αναλύσεις, με αναφορά των αντίστοιχων βασικών τιμών·

— λεπτομέρειες για τις ειδικές διαδικασίες μελέτης της συμπεριφοράς και ιστολογικές, νευροχημικές ή ηλεκτροφυσιολογικές εξετάσεις.

Αποτελέσματα:

— βάρη των ζώων με τις μεταβολές τους, συμπεριλαμβανομένου του βάρους κατά τη θανάτωση·

— κατανάλωση τροφής και νερού, κατά περίπτωση·

— δεδομένα για τις τοξικές αντιδράσεις κατά φύλο και δόση, συμπεριλαμβανομένων των συμπτωμάτων τοξικότητας και της θνησιμότητας·

— φύση, σοβαρότητα και διάρκεια (χρόνος εκδήλωσης και εξέλιξη) των λεπτομερών κλινικών παρατηρήσεων (ανατάξιμων και μη)·

— λεπτομερή αναφορά των αποτελεσμάτων όλων των λειτουργικών εξετάσεων·

— ευρήματα από τη νεκροψία-νεκροτομία·

— λεπτομερή περιγραφή όλων των νευρολογικών, νευροπαθολογικών και νευροχημικών ή ηλεκτροφυσιολογικών ευρημάτων, εφόσον υπάρχουν·

— δεδομένα απορρόφησης και μεταβολισμού, εφόσον υπάρχουν·

— στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, κατά περίπτωση.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων:

— στοιχεία για τη σχέση δόσης-απόκρισης·

— συνεκτίμηση τυχόν άλλων τοξικών επιδράσεων για τη συναγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τις νευροτοξικές ιδιότητες της ελεγχόμενης ουσίας·

— επίπεδο στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις.

Συμπεράσματα:

— Συνιστάται να περιλαμβάνεται γνωμάτευση για τη συνολική νευροτοξικότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

4 **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. ΟΟΣΑ, Παρίσι, υπό εκπόνηση

2. Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In preparation.

3. World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.

4. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds. Williams and Wilkins, Baltimore/London.

▼B

5. Tupper, D.E. and Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurological Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999-1003.

6. Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9,691-704.

7. Moser, V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. Toxic. Appl. Pharmacol., 108, 267-283.

8. Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd; W.C. and Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, 233-236.

9. Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 599-609.

10. Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds. (1992). Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.

11. Chang, L.W., ed. (1995). Principles of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York.

12. Broxup, B. (1991). Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. J. Amer. Coll. Toxicol., 10, 689-695.

13. Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. Fund. Appl.Toxicol., 18, 343-352.

14. O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. Eurotoxicol. Teratol., 10, 445-452.

15. O'Callaghan J.P. and Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. J. Pharmacol. Exp. Ther., 244, 368-378.

16. Fox. D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, pp 299-335.

17. Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, pp. 726-742.

18. Bancroft, J.D. and Steven A. (1990). Theory and Prance of Histological Techniques. Chapter 17, Neuropathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

▼B

Πίνακας 1:

Ελάχιστος απαιτούμενος αριθμός ζώων ανά ομάδα όταν η μελέτη νευροτοξικότητας διεξάγεται χωριστά ή σε συνδυασμό με άλλες μελέτες

	ΔΙΕΞΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΝΕΥΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ:			
	αυτοτελώς	σε συνδυασμό με τη μελέτη 28 ημερών	σε συνδυασμό με τη μελέτη 90 ημερών	σε συνδυασμό με τη μελέτη χρόνιας τοξικότητας
Συνολικός αριθμός ζώων ανά ομάδα	10 αρσενικά και 10 θηλυκά	10 αρσενικά και 10 θηλυκά	15 αρσενικά και 15 θηλυκά	25 αρσενικά και 25 θηλυκά
Αριθμός ζώων για λειτουργικές εξετάσεις, που περιλαμβάνουν λεπτομερή(-είς) κλινική(-ές) παρατηρήσεις	10 αρσενικά και 10 θηλυκά	10 αρσενικά και 10 θηλυκά	10 αρσενικά και 10 θηλυκά	10 αρσενικά και 10 θηλυκά
Αριθμός ζώων για έγχυση και νευροϊστοπαθολογική εξέταση	5 αρσενικά και 5 θηλυκά	5 αρσενικά και 5 θηλυκά	5 αρσενικά και 5 θηλυκά	5 αρσενικά και 5 θηλυκά
Αριθμός ζώων για παρατήρηση και αιματολογικές, βιοχημικές, ιστοπαθολογικές και λοιπές εξετάσεις σε μελέτη τοξικότητας επαναλαμβανόμενης δόσης/υποχρόνιας/χρόνιας, όπως υποδεικνύεται στις αντίστοιχες *Κατευθυντήριες γραμμές*		5 αρσενικά και 5 θηλυκά	10 αρσενικά † και 10 θηλυκά †	20 αρσενικά † και 20 θηλυκά †
Συμπληρωματικές παρατηρήσεις, κατά περίπτωση	5 αρσενικά και 5 θηλυκά			

† Συμπεριλαμβάνονται τα πέντε ζώα που έχουν επιλεγεί για λειτουργικές εξετάσεις και λεπτομερή κλινική εξέταση στο πλαίσιο της μελέτης νευροτοξικότητας.

▼B

Πίνακας 2:

Συχνότητα της κλινικής παρατήρησης και των λειτουργικών εξετάσεων

Είδος εξέτασης		Μελέτη			
		οξείας τοξικότητας	28 ημερών	90 ημερών	χρόνιας τοξικότητας
Όλα τα ζώα	Γενική κατάσταση της υγείας	μία φορά ημερησίως	μία φορά ημερησίως	μία φορά ημερησίως	μία φορά ημερησίως
	Θνησιμότητα/ νοσηρότητα	δύο φορές ημερησίως	δύο φορές ημερησίως	δύο φορές ημερησίως	δύο φορές ημερησίως
Ζώα που έχουν επιλεγεί για λειτουργικές εξετάσεις	Λεπτομερής(-είς) κλινική(-ές) παρατηρήσεις	— πριν από την πρώτη έκθεση — εντός 8 ωρών από τη χορήγηση της δόσης, κατά τον προβλεπόμενο χρόνο κορύφωσης της επίδρασης — την 7η και 14η ημέρα από τη χορήγηση της δόσης	— πριν από την πρώτη έκθεση — κατόπιν, ανά εβδομάδα	— πριν από την πρώτη έκθεση — μία φορά κατά την πρώτη ή δεύτερη εβδομάδα έκθεσης — κατόπιν, ανά μήνα	— πριν από την πρώτη έκθεση — μία φορά στο τέλος του πρώτου μήνα έκθεσης — κατόπιν, ανά τρεις μήνες
	Λειτουργικές εξετάσεις	— πριν από την πρώτη έκθεση — εντός 8 ωρών από τη χορήγηση της δόσης, κατά τον προβλεπόμενο χρόνο κορύφωσης της επίδρασης — την 7η και 14η ημέρα από τη χορήγηση της δόσης	— πριν από την πρώτη έκθεση — στη διάρκεια της τέταρτης εβδομάδας της αγωγής, όσο το δυνατόν πλησιέστερα στο τέλος της περιόδου έκθεσης	— πριν από την πρώτη έκθεση — μία φορά κατά την πρώτη ή δεύτερη εβδομάδα έκθεσης — κατόπιν, ανά μήνα	— πριν από την πρώτη έκθεση — μία φορά στο τέλος του πρώτου μήνα έκθεσης — κατόπιν, ανά τρεις μήνες

▼B

B.44. **ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ: ΜΕΘΟΔΟΣ *IN VIVO***

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή TG 427 (2004) του ΟΟΣΑ.

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ενώ η έκθεση σε πολλές χημικές ουσίες συντελείται κυρίως μέσω του δέρματος, εν τούτοις στις περισσότερες τοξικολογικές μελέτες που διεξάγονται σε πειραματόζωα η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται από το στόμα. Η μελέτη διαδερμικής απορρόφησης *in vivo*, που περιγράφεται στην παρούσα κατευθυντήρια γραμμή, παρέχει τον απαραίτητο συνδετικό κρίκο για την παρέκταση των δεδομένων από μελέτες χορήγησης από το στόμα, όταν εκτιμάται η ασφάλεια μετά από δερματική έκθεση.

Για να μπορέσει μια ουσία να εισχωρήσει στην κυκλοφορία του αίματος, πρέπει προηγουμένως να διασχίσει πολλές κυτταρικές στιβάδες του δέρματος. Για τις περισσότερες ουσίες, η στιβάδα που καθορίζει την ταχύτητα απορρόφησης είναι η κερατίνη στιβάδα, η οποία αποτελείται από νεκρά κύτταρα. Η διαπερατότητα μέσω του δέρματος εξαρτάται, αφενός από το κατά πόσον η χημική ουσία είναι λιπόφιλη και, αφετέρου από το πάχος της εξωτερικής στιβάδας της επιδερμίδας, καθώς και από παράγοντες όπως το μοριακό βάρος και η συγκέντρωση της ουσίας. Γενικά, το δέρμα των επιμύων και των κουνελιών είναι πιο διαπερατό από του ανθρώπου, ενώ η διαπερατότητα του δέρματος των ινδικών χοιριδίων και των πιθήκων είναι παραπλήσια με εκείνη του ανθρώπου.

Οι μέθοδοι μέτρησης της διαδερμικής απορρόφησης υποδιαιρούνται σε δύο κατηγορίες: *in vivo* και *in vitro*. Η μέθοδος *in vivo* είναι ικανή να παρέχει ικανοποιητικά στοιχεία σχετικά με τη δερματική απορρόφηση σε διάφορα είδη πειραματόζωων. Οι μέθοδοι *in vitro* αναπτύχθηκαν πιο πρόσφατα και βασίζονται στη μεταφορά προς ένα ρευστό υποδοχής διαμέσου ζωικού ή ανθρώπινου δέρματος πλήρους ή ελαττωμένου πάχους. Η μέθοδος *in vitro* περιγράφεται σε χωριστή μέθοδο δοκιμών (1). Για την επιλογή της πιο ενδεδειγμένης μεθόδου σε μια δεδομένη περίπτωση, συνιστάται να χρησιμοποιείται ως βοήθημα το καθοδηγητικό έγγραφο του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή μελετών δερματικής απορρόφησης (2), δεδομένου ότι παρέχει λεπτομερέστερες πληροφορίες σχετικά με την καταλληλότητα και των δύο κατηγοριών μεθόδων, *in vivo* και *in vitro*.

Με τη μέθοδο *in vivo* που περιγράφεται στο παρόν έγγραφο είναι δυνατόν να προσδιοριστεί η διείσδυση της ελεγχόμενης ουσίας στο συστηματικό διαμέρισμα μέσω του δέρματος. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται ευρέως από πολλών ετών (3)(4)(5)(6)(7). Οι μελέτες διαδερμικής απορρόφησης *in vitro* μπορεί να ενδείκνυνται σε πολλές περιπτώσεις, εν τούτοις όμως υπάρχουν καταστάσεις όπου μόνο μια μελέτη *in vivo* μπορεί να προσφέρει τα αναγκαία δεδομένα.

Η μέθοδος *in vivo* πλεονεκτεί κατά το ότι χρησιμοποιούνται ένα άθικτο από φυσιολογική και μεταβολική άποψη σύστημα και ένα είδος ζώου κοινό σε πολλές μελέτες τοξικότητας και ότι μπορεί να τροποποιηθεί, προκειμένου να εφαρμοστεί σε άλλα είδη ζώων. Τα μειονεκτήματά της συνίστανται στη χρήση ζωντανών ζώων, στην ανάγκη χρήσης ραδιοσημασμένου υλικού για να διευκολυνθεί η λήψη αξιόπιστων αποτελεσμάτων, στις δυσχέρειες του προσδιορισμού του πρώιμου σταδίου απορρόφησης και στις διαφορές ως προς τη διαπερατότητα του δέρματος μεταξύ του προτιμώμενου ζωικού είδους (επίμυς) και του ανθρώπου. Το δέρμα των ζώων είναι γενικά πιο διαπερατό, με αποτέλεσμα την ενδεχόμενη υπερεκτίμηση της διαδερμικής απορρόφησης στον άνθρωπο (6)(8)(9). Οι καυστικές/διαβρωτικές ουσίες δεν θα πρέπει να ελέγχονται σε ζωντανά ζώα.

▼B

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

Μη απορροφώμενη δόση: αντιπροσωπεύει την ποσότητα που εκπλύνεται από την επιφάνεια του δέρματος μετά την έκθεση και τις ποσότητες που ενδεχομένως ανευρίσκονται στο διαπερατό επίθεμα, συμπεριλαμβανομένης της δόσης που ενδεχομένως αποδεικνύεται ότι εξατμίζεται από το δέρμα στη διάρκεια της έκθεσης.

Απορροφώμενη δόση (*in vivo*): περιλαμβάνει την ποσότητα που ανευρίσκεται στα ούρα, στα υγρά έκπλυσης του κλωβού, στα κόπρανα, στον εκπνεόμενο αέρα (εφόσον έχει μετρηθεί), στο αίμα, σε ιστούς (εφόσον έχουν ληφθεί) και στο υπόλοιπο του πτώματος του ζώου, μετά την αφαίρεση του δέρματος του σημείου εφαρμογής της δόσης.

Απορροφήσιμη δόση: αντιπροσωπεύει τη δόση που ανευρίσκεται στην επιφάνεια ή στη μάζα του δέρματος μετά από έκπλυση.

1.3 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Η ελεγχόμενη ουσία, κατά προτίμηση ραδιοσημασμένη, εφαρμόζεται στο αποτριχωμένο δέρμα των ζώων σε ένα ή περισσότερα κατάλληλα επίπεδα δόσης με τη μορφή αντιπροσωπευτικού, εν χρήσει παρασκευάσματος. Το ελεγχόμενο παρασκεύασμα αφήνεται σε επαφή με το δέρμα για καθορισμένο χρονικό διάστημα κάτω από κατάλληλο επίθεμα (διαπερατό, ημιπερατό ή στεγανό) για να αποφευχθεί η κατάποση του παρασκευάσματος. Στο τέλος του χρόνου έκθεσης, αφαιρείται το επίθεμα, καθαρίζεται το δέρμα με κατάλληλο προϊόν, το επίθεμα και τα υλικά καθαρισμού φυλάσσονται για ανάλυση και τοποθετείται νέο επίθεμα. Πριν και μετά την περίοδο έκθεσης, καθώς και στη διάρκειά της, τα ζώα στεγάζονται σε ατομικούς κλωβούς μεταβολισμού, από τους οποίους συλλέγονται για ανάλυση τα περιττώματα και ο εκπνεόμενος αέρας κατά τις εν λόγω περιόδους. Η συλλογή του εκπνεόμενου αέρα μπορεί να παραλείπεται στις περιπτώσεις όπου υπάρχουν επαρκή στοιχεία, από τα οποία προκύπτει ότι σχηματίζονται ελάχιστες ή μηδενικές ποσότητες πτητικού ραδιενεργού μεταβολίτη. Κάθε μελέτη περιλαμβάνει κατά κανόνα έκθεση πολλών ομάδων ζώων στο ελεγχόμενο παρασκεύασμα. Τα ζώα μίας ομάδας θανατώνονται στο τέλος της περιόδου έκθεσης, ενώ εκείνα των άλλων ομάδων αργότερα, σε προγραμματισμένα χρονικά διαστήματα (2). Στο τέλος του χρόνου δειγματοληψίας, θανατώνονται τα εναπομένοντα ζώα, συλλέγεται αίμα για ανάλυση, αφαιρείται το δέρμα του σημείου εφαρμογής για ανάλυση και το πτώμα του ζώου υποβάλλεται σε ανάλυση για την ανίχνευση τυχόν υλών που δεν απεκκρίθηκαν. Τα δείγματα υποβάλλονται σε δοκιμασίες με τα ενδεδειγμένα μέσα και υπολογίζεται κατ' εκτίμηση ο βαθμός διαδερμικής απορρόφησης (6)(8)(9).

1.4 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.4.1 **Επιλογή ζωικού είδους**

Το συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο είδος είναι ο επίμυς, αλλά μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν φυλές και είδη χωρίς τρίχωμα, τα οποία παρουσιάζουν ρυθμούς δερματικής απορρόφησης πλησιέστερους προς εκείνους του ανθρώπου (3)(6)(7)(8)(9). Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται νεαρά ενήλικα υγιή ζώα του ίδιου φύλου (αρσενικά ως προκαθορισμένο από τη μέθοδο φύλο) από φυλές πειραματόζωων κοινής χρήσεως. Όταν αρχίζει η μελέτη, οι διαφορές βάρους μεταξύ των χρησιμοποιούμενων ζώων δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν το ± 20 % του μέσου βάρους. Για παράδειγμα, κατάλληλοι είναι αρσενικοί επίμυες βάρους 200 - 250 γραμμαρίων, ιδίως στο άνω ήμισυ αυτού του εύρους βαρών.

▼B

1.4.2 **Αριθμός και φύλο των ζώων**

Για κάθε ελεγχόμενο παρασκεύασμα και κάθε προγραμματισμένο χρόνο τερματισμού, θα πρέπει να χρησιμοποιείται μία ομάδα αποτελούμενη από τουλάχιστον τέσσερα ζώα του ίδιου φύλου. Κάθε ομάδα ζώων θανατώνεται μετά την πάροδο διαφορετικού χρονικού διαστήματος, λόγου χάριν στο τέλος της περιόδου έκθεσης (συνήθως 6 ή 24 ώρες) και μετέπειτα (π.χ. μετά 48 και 72 ώρες). Εάν υπάρχουν στοιχεία που καταδεικνύουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των αρσενικών και των θηλυκών ζώων ως προς τη δερματική τοξικότητα, θα πρέπει να επιλέγεται το πιο ευαίσθητο φύλο. Σε αντίθετη περίπτωση, μπορεί να χρησιμοποιείται οποιοδήποτε φύλο.

1.4.3 **Συνθήκες στέγασης και διατροφής**

Η θερμοκρασία του θαλάμου πειραματόζωων πρέπει να είναι 22 °C (±3 °C). Αν και η σχετική υγρασία πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου, εν τούτοις ο στόχος θα πρέπει να είναι μια τιμή 50-60 %. Ο φωτισμός θα πρέπει να είναι τεχνητός, με φωτοπερίοδο 12ώρου. Για τη διατροφή των ζώων μπορούν να χρησιμοποιούνται τα συνήθη εργαστηριακά σιτηρέσια, τα οποία θα πρέπει να προσφέρονται σε αφθονία και με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού. Στη διάρκεια της μελέτης και, κατά προτίμηση, και του εγκλιματισμού, τα ζώα στεγάζονται σε ατομικούς κλωβούς μεταβολισμού. Δεδομένου ότι η διασπορά τροφής και η έκχυση νερού υπονομεύουν τα αποτελέσματα, θα πρέπει να ελαχιστοποιείται το ενδεχόμενο τέτοιων συμβάντων

1.4.4 **Προετοιμασία των ζώων**

Τα ζώα σημαίνονται για να είναι δυνατή η αναγνώριση του καθενός και παραμένουν στους κλωβούς τους πέντε ημέρες τουλάχιστον πριν από την έναρξη της μελέτης, ώστε να εγκλιματιστούν στις συνθήκες του εργαστηρίου.

Μετά τη λήξη της περιόδου εγκλιματισμού και ένα 24ωρο περίπου πριν από την εφαρμογή της δόσης, αφαιρείται με κουρά το τρίχωμα ενός τμήματος του δέρματος κάθε ζώου στην περιοχή των ώμων και της ράχης. Οι ιδιότητες διαπερατότητας του δέρματος που έχει υποστεί βλάβη διαφέρουν σε σύγκριση με το άθικτο δέρμα και, για τον λόγο αυτό, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγεται η εκδορά του δέρματος. Μετά την κουρά και ένα 24ωρο περίπου πριν από την εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας στο δέρμα (βλέπε σημείο 1.4.7), η επιφάνεια του δέρματος πρέπει να σφουγγίζεται με ακετόνη για να απομακρυνθεί το σμήγμα. Δεν συνιστάται επιπλέον καθαρισμός με σαπούνι και νερό, επειδή τα ενδεχόμενα υπολείμματα σαπουνιού μπορούν να ενισχύσουν την απορρόφηση της ελεγχόμενης ουσίας. Η επιφάνεια δέρματος πρέπει να είναι αρκετά μεγάλη, ώστε να επιτρέπει τον αξιόπιστο υπολογισμό της απορροφώμενης ποσότητας ελεγχόμενης χημικής ουσίας ανά cm^2 δέρματος, κατά προτίμηση 10 cm^2 τουλάχιστον. Αυτό είναι εφικτό με επίμυες βάρους 200-250 γραμμαρίων. Μετά την προετοιμασία, τα ζώα επαναφέρονται στους κλωβούς μεταβολισμού

1.4.5 **Ελεγχόμενη ουσία**

Η ελεγχόμενη ουσία συνίσταται στη χημική οντότητα, τα χαρακτηριστικά διείσδυσης της οποίας πρόκειται να μελετηθούν. Θεωρητικά, η ελεγχόμενη ουσία θα πρέπει να είναι ραδιοσημασμένη.

1.4.6 **Ελεγχόμενο παρασκεύασμα**

Το παρασκεύασμα της ελεγχόμενης ουσίας (π.χ. αναραίωτο, αραιωμένο ή μορφοποιημένο υλικό, το οποίο περιέχει την ελεγχόμενη ουσία και εφαρμόζεται στο δέρμα) θα πρέπει να είναι το ίδιο (ή ρεαλιστικό υποκατάστατο) με εκείνο στο οποίο μπορεί να εκτεθούν άνθρωποι ή άλλα πιθανά είδη στόχου. Κάθε διαφορά από το «εν χρήσει» παρασκεύασμα πρέπει να αιτιολογείται. Εάν είναι απαραίτητο, παρασκευάζονται διαλύματα ή εναιωρήματα της ελεγχόμενης ουσίας σε κατάλληλο φορέα. Σε περίπτωση χρήσης άλλων φορέων πλην του νερού, θα πρέπει να είναι γνωστά τα χαρακτηριστικά απορρόφησης και η πιθανή αλληλεπίδρασή τους με την ελεγχόμενη ουσία.

▼B

1.4.7 **Εφαρμογή στο δέρμα**

Ορίζεται σημείο εφαρμογής, με συγκεκριμένη έκταση, στην επιφάνεια του δέρματος. Στο σημείο αυτό εφαρμόζεται κατόπιν ομοιόμορφα γνωστή ποσότητα του ελεγχόμενου παρασκευάσματος. Η εν λόγω ποσότητα πρέπει κατά κανόνα να μιμείται την πιθανή έκθεση του ανθρώπου, συνήθως 1-5 mg/cm^2 δέρματος στην περίπτωση των στερεών και έως 10 ml/cm^2 προκειμένου για υγρά. Η ενδεχόμενη εφαρμογή άλλων ποσοτήτων θα πρέπει να δικαιολογείται από τις προβλεπόμενες συνθήκες χρήσης, τους στόχους της μελέτης ή από τα φυσικά χαρακτηριστικά του ελεγχόμενου παρασκευάσματος. Μετά την εφαρμογή, το σημείο αγωγής πρέπει να προστατεύεται από τις κινήσεις περιποίησης του ζώου. Παράδειγμα τυπικής διάταξης παρέχεται στο σχήμα 1. Το σημείο εφαρμογής προστατεύεται κατά κανόνα με μη στεγανό επίθεμα (π.χ. διαπερατό επίθεμα από γάζα νάιλον). Στις περιπτώσεις εφαρμογών επ' άπειρον, όμως, το σημείο εφαρμογής πρέπει να καλύπτεται αεροστεγώς. Εάν η εξάτμιση μερικώς πτητικών ελεγχόμενων ουσιών μειώνει το ποσοστό ανάκτησης της ελεγχόμενης ουσίας σε απαράδεκτο βαθμό (βλέπε επίσης σημείο 1.4.10 πρώτο εδάφιο), είναι απαραίτητη η παγίδευση της εξατμιζόμενης ουσίας με φίλτρο ζωικού άνθρακα, το οποίο καλύπτει τη διάταξη εφαρμογής (βλέπε σχήμα 1). Είναι σημαντικό να μην προκαλεί η διάταξη βλάβες στο δέρμα ούτε να απορροφά το ελεγχόμενο παρασκεύασμα ή να αντιδρά με αυτό. Τα ζώα επαναφέρονται στους ατομικούς κλωβούς μεταβολισμού για συλλογή των περιττωμάτων.

1.4.8 **Διάρκεια έκθεσης και δειγματοληψία**

Διάρκεια έκθεσης είναι το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την εφαρμογή του ελεγχόμενου παρασκευάσματος μέχρι την απομάκρυνσή του με έκπλυση του δέρματος. Θα πρέπει να επιλέγεται κατάλληλη περίοδος έκθεσης (συνήθως 6 ή 24 ώρες), με βάση την προβλεπόμενη διάρκεια της έκθεσης του ανθρώπου. Μετά την περίοδο έκθεσης, τα ζώα παραμένουν στους κλωβούς μεταβολισμού μέχρι τον προγραμματισμένο τερματισμό. Τα ζώα θα πρέπει να παρατηρούνται για τον εντοπισμό σημείων τοξικότητας/αφύσικων αντιδράσεων σε τακτά διαστήματα σε όλη τη διάρκεια της μελέτης. Στο τέλος της περιόδου έκθεσης το δέρμα που υποβλήθηκε σε αγωγή θα πρέπει να παρατηρείται για τον εντοπισμό ορατών σημείων ερεθισμού.

Οι κλωβοί μεταβολισμού θα πρέπει να επιτρέπουν τη χωριστή συλλογή των ούρων και των κοπράνων σε όλη τη διάρκεια της μελέτης. Θα πρέπει επίσης να επιτρέπουν τη συλλογή διοξειδίου του άνθρακα 14C και πτητικών ενώσεων του άνθρακα 14C, τα οποία θα πρέπει να υποβάλλονται σε ανάλυση, εάν παράγονται σε σημαντικές ποσότητες (πάνω από 5 %). Τα ούρα, τα κόπρανα και τα ρευστά της παγίδας (π.χ. διοξείδιο του άνθρακα 14C και πτητικές ενώσεις του άνθρακα 14C) θα πρέπει να συλλέγονται χωριστά από κάθε ομάδα σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας. Εάν υπάρχουν επαρκή στοιχεία, από τα οποία προκύπτει ότι σχηματίζονται ελάχιστες ή μηδενικές ποσότητες πτητικού ραδιενεργού μεταβολίτη, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ανοικτοί κλωβοί.

Στη διάρκεια της περιόδου έκθεσης, τα περιττώματα συλλέγονται 24 ώρες, το αργότερο, μετά την πρώτη επαφή με το δέρμα και, κατόπιν, καθημερινά μέχρι το τέλος του πειράματος. Κατά κανόνα, αρκούν τρία χρονικά διαστήματα συλλογής περιττωμάτων, αλλά η προβλεπόμενη χρήση του ελεγχόμενου παρασκευάσματος ή τα διαθέσιμα δεδομένα κινητικής ενδέχεται να υπαγορεύουν πιο ενδεδειγμένες ή πρόσθετες χρονικές στιγμές για μελέτη.

Στο τέλος της περιόδου έκθεσης αφαιρείται η προστατευτική διάταξη από κάθε ζώο και φυλάσσεται χωριστά για ανάλυση. Το υποβληθέν σε αγωγή δέρμα όλων των ζώων πρέπει να εκπλύνεται τουλάχιστον τρεις φορές με προϊόν καθαρισμού, με τη βοήθεια κατάλληλων βαμβακοφόρων στειλεών και με προσοχή, ώστε να μην μολύνονται άλλα μέρη του σώματος. Το προϊόν καθαρισμού θα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικό των συνήθων πρακτικών υγιεινής, π.χ. σαπούνι διαλυμένο σε νερό. Τέλος, το δέρμα θα πρέπει να στεγνώνεται. Όλοι οι βαμβακοφόροι στειλεοί και τα υγρά της έκπλυσης πρέπει να φυλάσσονται για ανάλυση. Στα ζώα των ομάδων που θα υποβληθούν σε ανάλυση σε μεταγενέστερες χρονικές στιγμές, πρέπει να τοποθετείται νέο επίθεμα για την προστασία του υποβληθέντος σε αγωγή σημείου, πριν επιστρέψουν στους ατομικούς κλωβούς.

▼B

1.4.9 **Διαδικασίες τερματισμού**

Τα ζώα κάθε ομάδας θα πρέπει να θανατώνονται την προγραμματισμένη χρονική στιγμή και να συλλέγεται αίμα για ανάλυση. Θα πρέπει να αφαιρείται το προστατευτικό επίθεμα ή διάταξη για ανάλυση. Το δέρμα του σημείου εφαρμογής, καθώς και ένα ανάλογης έκτασης τμήμα αποτριχωμένου δέρματος, στο οποίο δεν εφαρμόστηκε δόση, θα πρέπει να αφαιρούνται από κάθε ζώο για χωριστή ανάλυση. Το δέρμα του σημείου εφαρμογής μπορεί να διατμηθεί, προκειμένου να αποχωριστεί η κερατίνη στιβάδα από την υποκείμενη επιδερμίδα, ώστε να συγκεντρωθούν περισσότερα στοιχεία σχετικά με την κατανομή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Ο προσδιορισμός αυτής της κατανομής με την πάροδο κάποιου χρόνου από την περίοδο έκθεσης θα πρέπει να παρέχει ορισμένες ενδείξεις για την πορεία κάθε ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην κερατίνη στιβάδα. Για τη διευκόλυνση της διάτμησης του δέρματος (μετά την τελική έκπλυσή του και τη θανάτωση του ζώου), αφαιρείται κάθε προστατευτικό επίθεμα. Το δέρμα του σημείου εφαρμογής μαζί με έναν δακτύλιο περιβάλλοντος δέρματος εκτέμνεται από τον επίμυ και στερεώνεται σε πλάκα. Στην επιφάνεια του δέρματος τοποθετείται με ελαφρά πίεση ένα τεμάχιο κολλητικής ταινίας το οποίο, κατόπιν, αποκολλάται μαζί με μέρος της κερατίνης στιβάδας. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται με διαδοχικά τεμάχια κολλητικής ταινίας, μέχρις ότου αυτή δεν προσκολλάται πλέον στην επιφάνεια του δέρματος, αφού έχει απομακρυνθεί το σύνολο της κερατίνης στιβάδας. Για κάθε ζώο, όλα τα τεμάχια κολλητικής ταινίας μπορούν να συνενώνονται σε ένα δοχείο, στο οποίο προστίθεται μέσο πέψης ιστών για να διαλυθεί η κερατίνη στιβάδα. Αφού αφαιρεθεί ενδεχομένως κάθε πιθανός ιστός στόχου για χωριστή μέτρηση, το υπόλοιπο του πτώματος του ζώου υποβάλλεται σε ανάλυση για τον προσδιορισμό της δόσης που έχει απορροφήσει. Θα πρέπει να φυλάσσονται για ανάλυση τα πτώματα όλων των ζώων. Αρκεί συνήθως ο προσδιορισμός της συνολικής περιεκτικότητας. Είναι δυνατόν να αφαιρούνται όργανα στόχου για χωριστή ανάλυση (εάν αυτό υποδεικνύεται από άλλες μελέτες). Τα ούρα που περιέχονται στην ουροδόχο κύστη κατά το χρόνο της προγραμματισμένης θανάτωσης θα πρέπει να προστίθενται στην ποσότητα που έχει συλλεχθεί προηγουμένως. Μετά τη συλλογή των περιττωμάτων από τους κλωβούς μεταβολισμού κατά το χρόνο της προγραμματισμένης θανάτωσης, οι κλωβοί και οι παγίδες τους θα πρέπει να εκπλύνονται με κατάλληλο διαλύτη. Θα πρέπει να υποβάλλονται ομοίως σε ανάλυση τα άλλα σκεύη και όργανα που έχουν πιθανώς μολυνθεί.

1.4.10 **Ανάλυση**

Σε όλες τις μελέτες θα πρέπει να επιτυγχάνεται επαρκής ανάκτηση (δηλ. μέσος όρος 100 ± 10 % της ραδιενέργειας) Τα εκτός του πεδίου αυτού ποσοστά ανάκτησης πρέπει να αιτιολογούνται. Η ποσότητα της χορηγηθείσας δόσης σε κάθε δείγμα θα πρέπει να προσδιορίζεται με δεόντως επικυρωμένες διαδικασίες.

Οι στατιστικές εκτιμήσεις θα πρέπει να περιλαμβάνουν μέτρο της διασποράς για τα πολλαπλά δείγματα σε κάθε εφαρμογή.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Οι κατωτέρω μετρήσεις θα πρέπει να εκτελούνται για κάθε ζώο, σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας για την ελεγχόμενη χημική ουσία ή/και τους μεταβολίτες της. Επιπλέον των ατομικών δεδομένων, θα πρέπει να αναφέρονται, ως μέσοι όροι, δεδομένα χωρισμένα σε ομάδες ανάλογα με το χρόνο δειγματοληψίας.

— ποσότητα που συνδέεται με τις προστατευτικές διατάξεις·

— ποσότητα που μπορεί να απομακρυνθεί από το δέρμα·

— ποσότητα που ανευρίσκεται στη μάζα/επιφάνεια του δέρματος και δεν μπορεί να εκπλυθεί από αυτό·

▼B

— ποσότητα στο δείγμα αίματος·

— ποσότητα στα περιττώματα και στον εκπνεόμενο αέρα (κατά περίπτωση)·

— ποσότητα που παρέμεινε στο πτώμα του ζώου και στα όργανα τα οποία ενδεχομένως αφαιρέθηκαν για να υποβληθούν σε χωριστή ανάλυση.

Από την ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας ή/και μεταβολιτών που ανευρίσκεται στα περιττώματα, στον εκπνεόμενο αέρα, στο αίμα και στο πτώμα του ζώου είναι δυνατόν να προσδιοριστεί η συνολική ποσότητα που απορροφήθηκε σε κάθε χρονική στιγμή. Είναι επίσης δυνατόν να υπολογιστεί η ποσότητα ελεγχόμενης χημικής ουσίας που απορροφήθηκε ανά cm^2 δέρματος, το οποίο εκτέθηκε σε αυτήν, στη διάρκεια της περιόδου έκθεσης

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ**

3.1 ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση για τη δοκιμή πρέπει να καλύπτει τις απαιτήσεις που ορίζονται στο πρωτόκολλο, μεταξύ των οποίων η αιτιολόγηση της χρήσης του συστήματος δοκιμής, και να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη ουσία:

— στοιχεία ταυτότητας (π.χ. αριθ. CAS, εφόσον είναι γνωστός, προέλευση, καθαρότητα [ραδιοχημική καθαρότητα], γνωστές ξένες προσμίξεις, αριθ. παρτίδας)·

— φυσική υπόσταση, φυσικοχημικές ιδιότητες (π.χ. pH, πτητικότητα, διαλυτότητα, σταθερότητα, μοριακό βάρος και log Pow [συντελεστής κατανομής σε μίγμα οκτανόλης/νερού]).

Ελεγχόμενο παρασκεύασμα:

— μορφοποίηση και αιτιολόγηση της χρήσης του·

— λεπτομέρειες για το ελεγχόμενο παρασκεύασμα, εφαρμοσθείσα ποσότητα, επιτευχθείσα συγκέντρωση, φορέας, σταθερότητα και ομοιογένεια.

Πειραματόζωα ελέγχου:

— είδος/φυλή που χρησιμοποιήθηκε·

— αριθμός, ηλικία και φύλο των ζώων

— προέλευση των ζώων, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσια κλπ.·

— βάρος κάθε ζώου κατά την έναρξη της δοκιμής.

Συνθήκες δοκιμής:

— λεπτομέρειες για τη χορήγηση του ελεγχόμενου παρασκευάσματος (σημείο εφαρμογής, μέθοδοι δοκιμασίας, στεγανό/διαπερατό επίθεμα, όγκος, εκχύλιση, ανίχνευση)·

— λεπτομέρειες για την ποιότητα της τροφής και του νερού.

Αποτελέσματα:

— τυχόν σημεία τοξικότητας·

— δεδομένα για την απορρόφηση, σε μορφή πίνακα (εκφραζόμενη σε ταχύτητα, ποσότητα ή ποσοστό επί τοις εκατό)·

▼B

— συνολική ανάκτηση στο πείραμα·

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων, σύγκριση με τυχόν διαθέσιμα δεδομένα σχετικά με τη διαδερμική απορρόφηση της ελεγχόμενης χημικής ένωσης.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Μέθοδος δοκιμών Β.45. Δερματική απορρόφηση: μέθοδος *in vitro*.

2. OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

3. ECETOC (1993) Percutaneous Absorption. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Monograph No. 20.

4. Zendzian RP (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. *J. Am. Coll. Toxicol*. 8(5), 829-835.

5. Kemppainen BW, Reifenrath WG (1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.

6. EPA (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.

7. EPA (1998) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pedsticides and Toxic Substances.

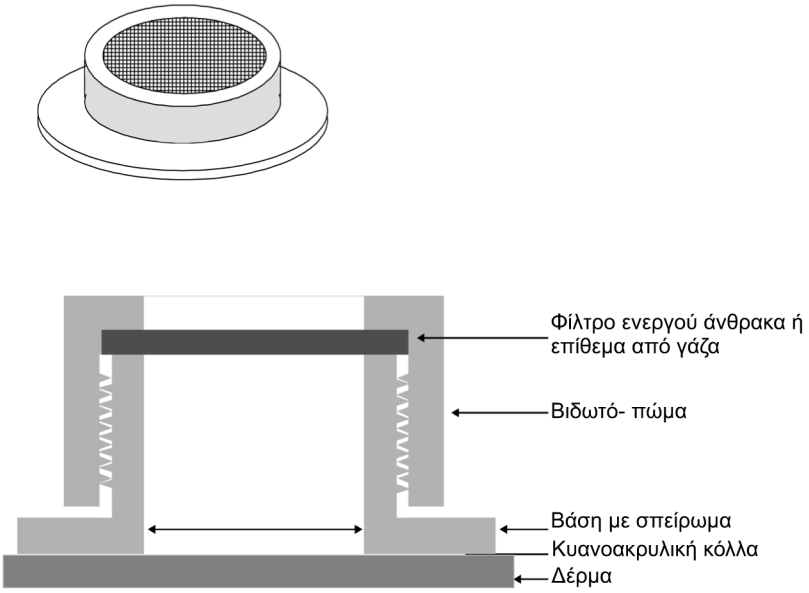
8. Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic*. 28, 369-373.

9. Feldman RJ and Maibach HI (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest Dermatol*. 54, 399-404.

▼B

Σχήμα 1

Παράδειγμα σχεδίου τυπικής διάταξης που χρησιμοποιείται για την οριοθέτηση και την προστασία του σημείου εφαρμογής στο δέρμα κατά τις μελέτες διαδερμικής απορρόφησης *in vivo*



▼B

B.45. **ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ: ΜΕΘΟΔΟΣ *IN VITRO***

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή TG 428 (2004) του ΟΟΣΑ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μέθοδος σχεδιάστηκε για να παρέχει στοιχεία σχετικά με την απορρόφηση μιας ελεγχόμενης ουσίας που εφαρμόζεται σε εκτετμημένο δέρμα. Μπορεί είτε να συνδυαστεί με τη μέθοδο δερματικής απορρόφησης *in vivo* (1) είτε να εφαρμόζεται χωριστά. Συνιστάται να χρησιμοποιείται ως βοήθημα για το σχεδιασμό μελετών βασιζόμενων στην παρούσα μέθοδο το καθοδηγητικό έγγραφο του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή μελετών δερματικής απορρόφησης (2). Το καθοδηγητικό έγγραφο εκπονήθηκε με σκοπό να διευκολύνει την επιλογή κατάλληλων διαδικασιών *in vitro* για χρήση σε συγκεκριμένες περιστάσεις, ώστε να εξασφαλίζεται η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με την παρούσα μέθοδο.

Οι μέθοδοι μέτρησης της απορρόφησης και της ελευθέρωσης από το δέρμα υποδιαιρούνται σε δύο κατηγορίες: *in vivo* και *in vitro*. Οι μέθοδοι *in vivo* για τη δερματική απορρόφηση είναι καθιερωμένες και παρέχουν στοιχεία φαρμακοκινητικής για σειρά ειδών ζώων. Μία μέθοδος δοκιμής *in vivo* περιγράφεται χωριστά (1). Για τη μέτρηση της δερματικής απορρόφησης χρησιμοποιούνται επίσης από πολλών ετών μέθοδοι *in vitro*. Αν και δεν έχουν διεξαχθεί επίσημες μελέτες επικύρωσης των μεθόδων *in vitro* που καλύπτει η παρούσα μέθοδος δοκιμών, οι ειδικοί του ΟΟΣΑ συμφώνησαν το 1999 ότι είχε αξιολογηθεί επαρκής όγκος δεδομένων για την υποστήριξη της μεθόδου *in vitro* (3). Λεπτομερέστερα στοιχεία που τεκμηριώνουν την υποστήριξη αυτή, συμπεριλαμβανομένου σημαντικού αριθμού άμεσων συγκρίσεων μεταξύ των μεθόδων *in vitro* και *in vivo*, παρέχονται στο καθοδηγητικό έγγραφο (2). Έχουν δημοσιευθεί ορισμένες μονογραφίες όπου γίνεται επισκόπηση του θέματος αυτού, οι οποίες παρέχουν λεπτομερή βασικά στοιχεία σχετικά με τη χρήση μεθόδων *in vitro* (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12). Με τις μεθόδους *in vitro* μετριέται η διάχυση των χημικών ουσιών στο εσωτερικό του δέρματος και μέσω αυτού σε ρευστό υποδοχής, μπορεί δε να χρησιμοποιηθεί μη βιώσιμο δέρμα για τη μέτρηση μόνο της διάχυσης ή μεταβολικώς ενεργό δέρμα, που έχει ληφθεί πρόσφατα, για την ταυτόχρονη μέτρηση της διάχυσης και του δερματικού μεταβολισμού. Οι μέθοδοι αυτές χρησιμοποιούνται ιδιαίτερα ως τεχνική διαλογής (screen) για τη σύγκριση της ελευθέρωσης χημικών ουσιών από διαφορετικά σκευάσματα εντός και διαμέσου του δέρματος, ενώ παρέχουν επίσης χρήσιμα μοντέλα για την αξιολόγηση της διαδερμικής απορρόφησης στον άνθρωπο.

Η μέθοδος δοκιμής *in vitro* ενδέχεται να μην μπορεί να εφαρμοστεί σε όλες τις περιπτώσεις και για όλες τις κατηγορίες χημικών ουσιών. Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί για μια πρώτη ποιοτική αξιολόγηση της διείσδυσης στο δέρμα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να χρειάζεται να συμπληρωθεί με δεδομένα *in vivo*. Για την περαιτέρω μελέτη των καταστάσεων όπου θα ήταν πρόσφορη η μέθοδος *in vitro*, θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως βοήθημα το καθοδηγητικό έγγραφο (2). Πρόσθετα λεπτομερή στοιχεία για την υποστήριξη της απόφασης παρέχει η δημοσίευση (3).

Στην παρούσα μέθοδο εκτίθενται οι γενικές αρχές της μέτρησης της δερματικής απορρόφησης και ελευθέρωσης μιας ελεγχόμενης ουσίας με χρήση εκτετμημένου δέρματος. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί δέρμα από πολλά είδη θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου. Οι ιδιότητες διαπερατότητας του δέρματος διατηρούνται και μετά την εκτομή από το σώμα, επειδή ο κύριος φραγμός στη διάχυση είναι η μη βιώσιμη κερατίνη στιβάδα και δεν έχει διαπιστωθεί ενεργός μεταφορά χημικών ουσιών μέσω του δέρματος. Έχει καταδειχθεί ότι το δέρμα είναι ικανό να μεταβολίζει ορισμένες χημικές ουσίες κατά τη διαδερμική απορρόφηση (6), αλλά η διεργασία αυτή δεν είναι περιοριστικός παράγοντας για την ταχύτητα απορρόφησης από την άποψη της πραγματικής απορροφώμενης δόσης, αν και ενδέχεται να επηρεάζει το είδος του υλικού που εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος.

▼B

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Μη απορροφώμενη δόση: αντιπροσωπεύει την ποσότητα που εκπλύνεται από την επιφάνεια του δέρματος μετά την έκθεση και τις ποσότητες που ενδεχομένως ανευρίσκονται στο διαπερατό κάλυμμα, συμπεριλαμβανομένης της δόσης που ενδεχομένως αποδεικνύεται ότι εξατμίζεται από το δέρμα στη διάρκεια της έκθεσης.

Απορροφώμενη δόση (*in vitro*): η μάζα ελεγχόμενης ουσίας που εισχωρεί στο ρευστό υποδοχής ή στη συστηματική κυκλοφορία μέσα σε καθορισμένο χρονικό διάστημα.

Απορροφήσιμη δόση (*in vitro*): αντιπροσωπεύει τη δόση που ανευρίσκεται στην επιφάνεια ή στη μάζα του δέρματος μετά από έκπλυση.

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Η ελεγχόμενη ουσία, που μπορεί να είναι ραδιοσημασμένη, εφαρμόζεται στην επιφάνεια δείγματος δέρματος, το οποίο χωρίζει τους δύο θαλάμους μιας κυψέλης διάχυσης. Η χημική ουσία αφήνεται πάνω στο δέρμα για καθορισμένο χρονικό διάστημα και σε καθορισμένες συνθήκες και, κατόπιν, απομακρύνεται με κατάλληλη διαδικασία καθαρισμού. Από το ρευστό υποδοχής λαμβάνονται δείγματα σε διάφορους χρόνους σε όλη τη διάρκεια του πειράματος, τα οποία υποβάλλονται σε ανάλυση για την ελεγχόμενη χημική ουσία ή/και τους μεταβολίτες της.

Όταν χρησιμοποιούνται μεταβολικώς ενεργά συστήματα, μπορεί να εκτελείται ανάλυση των μεταβολιτών της ελεγχόμενης ουσίας με κατάλληλες μεθόδους. Στο τέλος του πειράματος, προσδιορίζονται ποσοτικά, κατά περίπτωση, η κατανομή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και των μεταβολιτών της.

Η απορρόφηση της ελεγχόμενης ουσίας στη διάρκεια δεδομένου χρονικού διαστήματος μετριέται σε κατάλληλες συνθήκες, οι οποίες περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο και στο καθοδηγητικό έγγραφο (2), με ανάλυση του ρευστού υποδοχής και του δέρματος που υποβλήθηκε σε αγωγή. Η ελεγχόμενη ουσία που παραμένει στο δέρμα θα πρέπει να θεωρείται ότι απορροφάται, εκτός εάν είναι δυνατόν να καταδειχθεί η δυνατότητα προσδιορισμού της απορρόφησης μόνον από τις τιμές του ρευστού υποδοχής. Η ανάλυση των υπολοίπων συστατικών στοιχείων (υλικό που εκπλύνεται από το δέρμα και παραμένει μέσα στις στιβάδες του) επιτρέπει να αξιολογηθούν περισσότερα δεδομένα, συμπεριλαμβανομένης της συνολικής κατανομής της ελεγχόμενης ουσίας και της επί τοις εκατό ανάκτησής της.

Για να καταδειχθούν οι επιδόσεις και η αξιοπιστία του συστήματος δοκιμής στο εργαστήριο που εκτελεί τη δοκιμή, θα πρέπει να είναι διαθέσιμα τα αποτελέσματα δοκιμών με κατάλληλες χημικές ουσίες αναφοράς και να συμφωνούν με τη βιβλιογραφία που αφορά τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο. Η απαίτηση αυτή θα μπορούσε να ικανοποιηθεί είτε με την υποβολή κατάλληλης ουσίας αναφοράς σε δοκιμή (κατά προτίμηση λιπόφιλης σε ανάλογο βαθμό με τη ελεγχόμενη ουσία) ταυτόχρονα με την ελεγχόμενη ουσία είτε με την παροχή επαρκών ιστορικών στοιχείων για σειρά ουσιών αναφοράς διαφορετικής λιποφιλίας (π.χ. καφεΐνη, βενζοϊκό οξύ και τεστοστερόνη)

1.4. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

1.4.1 **Κυψέλη διάχυσης**

Η κυψέλη διάχυσης αποτελείται από έναν θάλαμο δότη και έναν θάλαμο υποδοχής, μεταξύ των οποίων τοποθετείται το δέρμα (παράδειγμα τυπικού σχεδίου παρέχεται στο σχήμα 1). Η κυψέλη θα πρέπει να εξασφαλίζει ικανοποιητική στεγανότητα γύρω από το δέρμα και να επιτρέπει την ευχερή δειγματοληψία και την καλή ανάμιξη του διαλύματος υποδοχής που έρχεται σε επαφή με την πίσω πλευρά του δέρματος, καθώς και ικανοποιητικό έλεγχο της θερμοκρασίας της κυψέλης και του περιεχομένου της. Τόσο οι στατικές κυψέλες όσο και οι κυψέλες συνεχούς κυκλοφορίας είναι αποδεκτές. Οι θάλαμοι δότες αφήνονται κατά κανόνα ακάλυπτοι στη διάρκεια της έκθεσης σε πεπερασμένη δόση ελεγχόμενου παρασκευάσματος. Στην περίπτωση όμως των επ' άπειρο εφαρμογών και ορισμένων σεναρίων με πεπερασμένες δόσεις, οι θάλαμοι δότες μπορούν να καλύπτονται.

▼B

1.4.2. **Ρευστό υποδοχής**

Προτιμάται η χρήση φυσιολογικώς αγωγών ρευστών υποδοχής, αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα ρευστά υπό τον όρο ότι η επιλογή τους αιτιολογείται. Θα πρέπει να αναφέρεται η ακριβής σύνθεση του ρευστού υποδοχής. Η διαλυτότητα της ελεγχόμενης ουσίας στο ρευστό υποδοχής θα πρέπει να είναι αποδεδειγμένα επαρκής, ώστε αυτό να μην δρα ως φραγμός στην απορρόφηση. Επί πλέον, το ρευστό υποδοχής δεν θα πρέπει να θίγει τη ακεραιότητα του δερματικού παρασκευάσματος. Στα συστήματα συνεχούς κυκλοφορίας, η ταχύτητα ροής δεν πρέπει να παρεμποδίζει τη διάχυση της ελεγχόμενης ουσίας στο ρευστό υποδοχής. Στα στατικά συστήματα κυψέλης, θα πρέπει να αναδεύεται συνεχώς το ρευστό και να λαμβάνονται από αυτό δείγματα τακτικά. Εάν μελετάται ο μεταβολισμός, το ρευστό υποδοχής πρέπει να συντηρεί τη βιωσιμότητα του δέρματος σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.

1.4.3 **Παρασκευάσματα δέρματος**

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί δέρμα ανθρώπου ή ζώων. Είναι γνωστό ότι η χρήση ανθρώπινου δέρματος υπόκειται σε εθνικούς και διεθνείς προβληματισμούς ηθικής φύσεως και δεοντολογικούς όρους. Αν και προτιμάται το βιώσιμο δέρμα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και μη βιώσιμο, με την προϋπόθεση ότι είναι δυνατόν να καταδειχθεί η ακεραιότητά του. Είναι αποδεκτή είτε η επιδερμική μεμβράνη (αποχωρισμένη με ενζυματική, θερμική ή χημική κατεργασία) ή το δέρμα διατετμημένου πάχους (πάχος 200-400 μm συνήθως), που λαμβάνεται με τη βοήθεια δερματοτόμου. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί δέρμα πλήρους πάχους, αλλά το υπέρμετρο πάχος (πάνω από 1 mm περίπου) θα πρέπει να αποφεύγεται, εκτός εάν απαιτείται ειδικά για τον προσδιορισμό της ελεγχόμενης ουσίας σε στιβάδες του δέρματος. Η επιλογή του είδους οργανισμού, της ανατομικής θέσης του δέρματος και της τεχνικής της παρασκευής του δείγματος πρέπει να αιτιολογείται. Απαιτούνται αποδεκτά δεδομένα από τέσσερα τουλάχιστον πανομοιότυπα δείγματα για κάθε ελεγχόμενο παρασκεύασμα.

1.4.4 **Ακεραιότητα των παρασκευασμάτων δέρματος**

Η ορθή παρασκευή των δοκιμίων δέρματος είναι καθοριστικής σημασίας. Οι ακατάλληλοι χειρισμοί είναι δυνατόν να προκαλέσουν βλάβες στην κερατίνη στιβάδα και, για τον λόγο αυτό, πρέπει να εξακριβώνεται η ακεραιότητα του δερματικού παρασκευάσματος. Όταν διερευνάται ο μεταβολισμός στο δέρμα, πρέπει να χρησιμοποιείται δέρμα πρόσφατης εκτομής το συντομότερο δυνατόν και σε συνθήκες που είναι γνωστό ότι συντηρούν τη μεταβολική δραστηριότητα. Ως γενική κατεύθυνση, το δέρμα πρόσφατης εκτομής πρέπει να χρησιμοποιείται εντός 24 ωρών, αλλά η αποδεκτή περίοδος αποθήκευσης μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με το ενζυματικό σύστημα που υπεισέρχεται στον μεταβολισμό και με τις θερμοκρασίες αποθήκευσης (13). Όταν τα παρασκευάσματα δέρματος έχουν αποθηκευθεί πριν από τη χρήση τους, πρέπει να παρατίθενται στοιχεία από τα οποία προκύπτει ότι διατηρήθηκε η φραγματική λειτουργία.

1.4.5 **Ελεγχόμενη ουσία**

Η ελεγχόμενη ουσία συνίσταται στη χημική οντότητα, τα χαρακτηριστικά διείσδυσης της οποίας πρόκειται να μελετηθούν. Θεωρητικά, η ελεγχόμενη ουσία θα πρέπει να είναι ραδιοσημασμένη.

1.4.6 **Ελεγχόμενο παρασκεύασμα**

Το παρασκεύασμα της ελεγχόμενης ουσίας (π.χ. αναραίωτο, αραιωμένο ή μορφοποιημένο υλικό, το οποίο περιέχει την ελεγχόμενη ουσία και εφαρμόζεται στο δέρμα) θα πρέπει να είναι το ίδιο (ή ρεαλιστικό υποκατάστατο) με εκείνο στο οποίο μπορεί να εκτεθούν άνθρωποι ή άλλα πιθανά είδη στόχου. Κάθε διαφορά από το «εν χρήσει» παρασκεύασμα πρέπει να αιτιολογείται.

▼B

1.4.7 **Συγκεντρώσεις και σκευάσματα της ελεγχόμενης ουσίας**

Κατά κανόνα, χρησιμοποιούνται περισσότερες από μία συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας, οι οποίες καλύπτουν τον ανώτατο βαθμό πιθανής έκθεσης του ανθρώπου. Ομοίως, θα πρέπει να εξετάζεται η δυνατότητα ελέγχου μιας σειράς τυπικών σκευασμάτων.

1.4.8 **Εφαρμογή στο δέρμα**

Στις κανονικές συνθήκες έκθεσης του ανθρώπου σε χημικά προϊόντα, συναντώνται συνήθως πεπερασμένες δόσεις. Ως εκ τούτου, θα πρέπει να εφαρμόζεται ποσότητα που μιμείται την έκθεση του ανθρώπου, κατά κανόνα 1-5 mg/cm^2 δέρματος στην περίπτωση των στερεών και έως 10 $\mu l/cm^2$ προκειμένου για υγρά. Η εν λόγω ποσότητα θα πρέπει να δικαιολογείται από τις προβλεπόμενες συνθήκες χρήσης, τους στόχους της μελέτης ή από τα φυσικά χαρακτηριστικά του ελεγχόμενου παρασκευάσματος. Για παράδειγμα, οι εφαρμογές στην επιφάνεια του δέρματος μπορεί να είναι άπειρες στις περιπτώσεις όπου εφαρμόζονται μεγάλες ποσότητες ανά μονάδα επιφανείας.

1.4.9 **Θερμοκρασία**

Η παθητική διάχυση χημικών ουσιών (και, συνεπώς, η απορρόφησή τους από το δέρμα) επηρεάζεται από τη θερμοκρασία. Ο θάλαμος διάχυσης και το δέρμα θα πρέπει να διατηρούνται σε σταθερή θερμοκρασία, σε τιμή που πλησιάζει τη φυσιολογική θερμοκρασία του δέρματος των 32 ±1 °C. Τα διάφορα σχέδια κυψέλης απαιτούν διαφορετικές θερμοκρασίες υδατόλουτρου ή θερμαντήρα για να εξασφαλιστεί ότι η θερμοκρασία του υποδοχέα/δέρματος βρίσκεται στα φυσιολογικά επίπεδα. Η υγρασία θα πρέπει κατά προτίμηση να κυμαίνεται μεταξύ 30 και 70 %.

1.4.10 **Διάρκεια έκθεσης και δειγματοληψία**

Το δέρμα μπορεί να εκτίθεται στο ελεγχόμενο παρασκεύασμα σε όλη τη διάρκεια του πειράματος ή για μικρότερα χρονικά διαστήματα (δηλ. για τη μίμηση συγκεκριμένου τύπου έκθεσης του ανθρώπου). Η περίσσεια ελεγχόμενου παρασκευάσματος θα πρέπει να εκπλύνεται από το δέρμα με κατάλληλο προϊόν καθαρισμού και τα υγρά της έκπλυσης να συλλέγονται για ανάλυση. Η διαδικασία απομάκρυνσης του ελεγχόμενου παρασκευάσματος εξαρτάται από τις προβλεπόμενες συνθήκες χρήσης και θα πρέπει να αιτιολογείται. Κατά κανόνα, απαιτείται 24ωρη περίοδος δειγματοληψίας για τον επαρκή χαρακτηρισμό του τύπου απορρόφησης. Δεδομένου ότι η ακεραιότητα του δέρματος ενδέχεται να αρχίσει να υποβαθμίζεται μετά από 24 ώρες, ο χρόνος δειγματοληψίας δεν θα πρέπει κανονικά να υπερβαίνει τις 24 ώρες. Για τις ελεγχόμενες ουσίες που διεισδύουν στο δέρμα με ταχύ ρυθμό, μπορεί να μην χρειάζεται υπέρβαση, αλλά στην περίπτωση των ουσιών που διεισδύουν αργά στο δέρμα, ενδέχεται να απαιτούνται μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα. Η συχνότητα δειγματοληψίας στο ρευστό υποδοχής θα πρέπει να επιτρέπει τη γραφική παράσταση των χαρακτηριστικών απορρόφησης της ελεγχόμενης ουσίας.

1.4.11 **Διαδικασίες τερματισμού**

Πρέπει να υποβάλλονται σε ανάλυση όλα τα συστατικά στοιχεία του συστήματος δοκιμής και να προσδιορίζεται η ανάκτηση. Αυτά περιλαμβάνουν τον θάλαμο δότη, την έκπλυση της επιφάνειας του δέρματος, το παρασκεύασμα δέρματος και το ρευστό/θάλαμο υποδοχής. Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να αποχωρίζεται η επιφάνεια δέρματος που εκτέθηκε από εκείνη που βρισκόταν κάτω από τη φλάντζα της κυψέλης και να διαχωρίζεται το δέρμα σε κερατίνη στιβάδα, επιδερμίδα και χόριο για να υποβληθούν σε ανάλυση χωριστά.

1.4.12 **Ανάλυση**

Σε όλες τις μελέτες θα πρέπει να επιτυγχάνεται επαρκής ανάκτηση (θα πρέπει να επιδιώκεται ανάκτηση ραδιενέργειας 100+/-10 % κατά μέσον όρο και να αιτιολογείται η τυχόν απόκλιση). Η ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας στο ρευστό υποδοχής, στο παρασκεύασμα δέρματος και στα υγρά έκπλυσης της επιφάνειας του δέρματος και της συσκευής θα πρέπει να προσδιορίζεται με κατάλληλη τεχνική.

▼B

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Θα πρέπει να παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης του ρευστού υποδοχής, η κατανομή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο σύστημα ελέγχου και τα χαρακτηριστικά της απορρόφησης σε συνάρτηση με τον χρόνο. Όταν χρησιμοποιούνται συνθήκες έκθεσης σε πεπερασμένες δόσεις, θα πρέπει να υπολογίζονται η ποσότητα που εκπλύθηκε από το δέρμα, η ποσότητα που συνδέθηκε με το δέρμα (και με τις διάφορες στιβάδες του, εάν συμπεριελήφθησαν στην ανάλυση) και η ποσότητα που αναβρέθηκε στο ρευστό υποδοχής (ταχύτητα και ποσότητα ή ποσοστό επί τοις εκατό της δόσης που εφαρμόστηκε). Η δερματική απορρόφηση μπορεί μερικές φορές να εκφράζεται με χρήση μόνο των δεδομένων για το ρευστό υποδοχής. Ωστόσο, εάν η ελεγχόμενη ουσία παραμένει στο δέρμα στο τέλος της μελέτης, μπορεί να πρέπει να συμπεριληφθεί στην συνολική απορροφώμενη ποσότητα (βλ. δημοσίευση (3), παράγραφο 66). Όταν χρησιμοποιούνται συνθήκες έκθεσης σε άπειρη δόση, τα δεδομένα ενδέχεται να επιτρέπουν να υπολογιστεί σταθερά διαπερατότητας (Kp). Στην τελευταία αυτή περίπτωση, το απορροφώμενο ποσοστό επί τοις εκατό δεν έχει σημασία.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση για τη δοκιμή πρέπει να καλύπτει τις απαιτήσεις που ορίζονται στο πρωτόκολλο, μεταξύ των οποίων αιτιολόγηση της χρήσης του συστήματος δοκιμής, και να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη ουσία:

— φυσική υπόσταση, φυσικοχημικές ιδιότητες (τουλάχιστον μοριακό βάρος και log Pow [συντελεστής κατανομής σε μίγμα οκτανόλης/νερού]), καθαρότητα (ραδιοχημική καθαρότητα),

— στοιχεία ταυτότητας (π.χ. αριθ. παρτίδας),

— διαλυτότητα στο ρευστό υποδοχής.

Ελεγχόμενο παρασκεύασμα:

— μορφοποίηση και αιτιολόγηση της χρήσης του,

— ομοιογένεια.

Συνθήκες δοκιμής:

— προέλευση και ανατομική θέση του δέρματος, μέθοδος παρασκευής του δοκιμίου, συνθήκες αποθήκευσης πριν από τη χρήση του, τυχόν προκατεργασία (καθαρισμός, αγωγή με αντιβιοτικά κ.λπ.), μετρήσεις της δερματικής ακεραιότητας, μεταβολική κατάσταση, αιτιολόγηση της χρήσης του·

— σχέδιο της κυψέλης, σύνθεση του ρευστού υποδοχής, ταχύτητα ροής του ρευστού υποδοχής ή χρόνοι και διαδικασίες δειγματοληψίας·

— λεπτομέρειες για την εφαρμογή του ελεγχόμενου παρασκευάσματος και τον ποσοτικό προσδιορισμό της δόσης που εφαρμόστηκε·

— διάρκεια έκθεσης·

— λεπτομέρειες για την απομάκρυνση του ελεγχόμενου παρασκευάσματος από το δέρμα, π.χ. έκπλυση του δέρματος·

— λεπτομέρειες για την ανάλυση του δέρματος και για τις τεχνικές διάτμησης που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν για να καταδειχθεί η κατανομή στο δέρμα·

▼B

— διαδικασίες έκπλυσης της κυψέλης και του εξοπλισμού·

— μέθοδοι δοκιμασίας, τεχνικές εκχύλισης, όρια ανίχνευσης και επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου.

Αποτελέσματα:

— συνολική ανάκτηση στο πείραμα (εφαρμοζόμενη δόση = υγρά έκπλυσης του δέρματος + δέρμα + ρευστό υποδοχής + υγρά έκπλυσης της κυψέλης)

— παρουσίαση σε πίνακα της επιμέρους ανάκτησης σε κάθε διαμέρισμα της κυψέλης·

— χαρακτηριστικά της απορρόφησης·

— δεδομένα για την απορρόφηση, σε μορφή πίνακα (εκφραζόμενη σε ταχύτητα, ποσότητα ή ποσοστό επί τοις εκατό).

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Μέθοδος δοκιμών Β.44. Δερματική απορρόφηση: μέθοδος *in vivo*.

2. OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

3. OECD (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OECD, Paris.

4. Kemppainen BW and Reifenrath WG. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.

5. Bronaugh RL and Collier, SW. (1991). Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Studies, in *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Application*s, RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, pp. 237-241.

6. Bronaugh RL and Maibach HI. (1991). *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Application*s. CRC Press, Boca Raton.

7. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (1993). Monograph No. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.

8. Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W (1999). Test Guidelines for *In Vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, Fd Chem Tox, 37, 191-205.

9. Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No. 65.

10. Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings JR *et a*l. (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

▼B

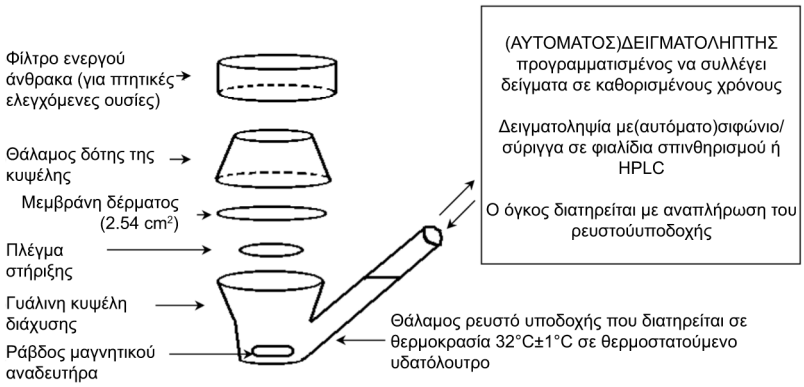
11. Schaefer H and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

12. Roberts MS and Walters KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.

13. Jewell, C., Heylings, JR., Clowes, HM. And Williams, FM. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene *in vitro*. Arch Toxicol 74: 356-365.

Σχήμα 1

Παράδειγμα τυπικού σχεδίου στατικής κυψέλης διάχυσης για μελέτες διαδερμικής απορρόφησης *in vitro*



▼**M8**

Β.46. ΔΕΡΜΑΤΙΚΟΣ ΕΡΕΘΙΣΜΟΣ *IN VITRO*: ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ΣΕ ΑΝΑΣΥΣΤΑΘΕΙΣΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΕΠΙΔΕΡΜΙΔΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 439 του ΟΟΣΑ (2015). Ο ερεθισμός του δέρματος αναφέρεται στην πρόκληση αναστρέψιμης βλάβης στο δέρμα μετά από εφαρμογή υπό δοκιμή χημικής ουσίας για διάστημα έως 4 ωρών [όπως ορίζεται στο Παγκόσμια Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Ουσιών των Ηνωμένων Εθνών (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)] (1) και στον κανονισμό (ΕΕ) 1272/2008 για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων (CLP) της Ευρωπαϊκής Ένωσης [1]]. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών προβλέπει μια διαδικασία *in vitro* που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της επικινδυνότητας ερεθιστικών χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) της κατηγορίας 2 του GHS του ΟΗΕ και του κανονισμού CLP (2). Σε περιοχές που δεν έχουν υιοθετήσει την προαιρετική κατηγορία 3 του GHS του ΟΗΕ (ήπια ερεθιστικά), η παρούσα μέθοδος δοκιμών μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό μη ταξινομημένων χημικών ουσιών. Ως εκ τούτου, ανάλογα με το κανονιστικό πλαίσιο και το σύστημα ταξινόμησης που χρησιμοποιείται, η παρούσα μέθοδος δοκιμών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της ερεθιστικότητας χημικών ουσιών για το δέρμα, είτε ως αυτοτελής δοκιμή υποκατάστασης για δοκιμές ερεθισμού του δέρματος *in vivo* είτε ως δοκιμή μερικής υποκατάστασης στο πλαίσιο στρατηγικής δοκιμών (3).

2. Η αξιολόγηση του ερεθισμού του δέρματος αποτελεί τυπική περίπτωση χρήσης πειραματόζωων (μέθοδος δοκιμών Β.4, ισοδύναμη με την TG 404 του ΟΟΣΑ που εγκρίθηκε αρχικά το 1981 και αναθεωρήθηκε το 1992, το 2002 και το 2015) (4). Για τη διεξαγωγή δοκιμών διαβρωτικότητας, έχουν εγκριθεί τρεις επικυρωμένες μέθοδοι δοκιμών *in vitro* ως μέθοδος δοκιμών ΕΕ Β.40 (ισοδύναμη με την TG 430 του ΟΟΣΑ), ως μέθοδος δοκιμών Β.40α (ισοδύναμη με την TG 431 του ΟΟΣΑ) και ως μέθοδος δοκιμών Β.65 (ισοδύναμη με την TG 435 του ΟΟΣΑ) (5) (6) (7). Σε έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ σχετικά με τις ολοκληρωμένες προσεγγίσεις στη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση (IATA) για τον ερεθισμό/διάβρωση του δέρματος περιγράφονται ορισμένες ενότητες για την ομαδοποίηση πηγών πληροφοριών και εργαλείων ανάλυσης, και παρέχεται καθοδήγηση σχετικά με i) τον τρόπο ενσωμάτωσης και χρήσης των υφιστάμενων δεδομένων δοκιμών και δεδομένων εκτός δοκιμών για την αξιολόγηση του δυναμικού των χημικών ουσιών για ερεθισμό και διάβρωση του δέρματος, και ii) μια προτεινόμενη προσέγγιση σε περίπτωση που απαιτείται η διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών (3).

3. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών αφορά την παράμετρο της υγείας του ανθρώπου «ερεθισμός του δέρματος». Βασίζεται στο σύστημα δοκιμών *in vitro* σε ανασυσταθείσα ανθρώπινη επιδερμίδα (RhE), το οποίο μιμείται σε μεγάλο βαθμό τις βιοχημικές και φυσιολογικές ιδιότητες των ανώτερων στιβάδων του ανθρώπινου δέρματος, δηλαδή της επιδερμίδας. Το σύστημα δοκιμών RhE χρησιμοποιεί μη μετασχηματισμένα κερατινοκύτταρα ανθρώπινης προέλευσης ως πηγή κυττάρων για την ανασύσταση ενός επιδερμικού μοντέλου αντιπροσωπευτικής ιστολογίας και κυτταρικής αρχιτεκτονικής. Υπάρχουν διαθέσιμα πρότυπα επιδόσεων που διευκολύνουν την επικύρωση και την αξιολόγηση παρεμφερών και τροποποιημένων μεθόδων δοκιμών RhE, σύμφωνα με τις αρχές του εγγράφου καθοδήγησης αριθ. 34 του ΟΟΣΑ (8) (9). Η αντίστοιχη κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών εγκρίθηκε αρχικά το 2010, επικαιροποιήθηκε το 2013 προκειμένου να συμπεριλάβει πρόσθετα μοντέλα RhE, και επικαιροποιήθηκε το 2015 προκειμένου να περιλαμβάνει αναφορά στο έγγραφο καθοδήγησης IATA και να εισαγάγει τη χρήση εναλλακτικής διαδικασίας για τη μέτρηση της βιωσιμότητας.

4. Έχουν ολοκληρωθεί μελέτες προεπικύρωσης, βελτιστοποίησης και επικύρωσης για τέσσερα μοντέλα δοκιμών *in vitro* που διατίθενται στο εμπόριο (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) με βάση το σύστημα δοκιμών RhE (ευαισθησία 80 %, ειδικότητα

[1] Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων, την τροποποίηση και την κατάργηση των οδηγιών 67/548/ΕΟΚ και 1999/45/ΕΚ και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006, ΕΕ L 353/1 της 31.12.2008.

▼M8

70 % και ορθότητα 75 %). Τα εν λόγω τέσσερα μοντέλα δοκιμών περιλαμβάνονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών και απαριθμούνται στο προσάρτημα 2, στο οποίο παρέχονται επίσης πληροφορίες σχετικά με το είδος της μελέτης επικύρωσης που χρησιμοποιήθηκε για την επικύρωση των αντίστοιχων μεθόδων δοκιμών. Όπως αναφέρεται στο προσάρτημα 2, η επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς (VRM) έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη της παρούσας μεθόδου δοκιμών και των προτύπων επιδόσεων (8).

5. Η αμοιβαία αποδοχή δεδομένων του ΟΟΣΑ θα διασφαλίζεται για μοντέλα δοκιμών που έχουν επικυρωθεί σύμφωνα με τα πρότυπα επιδόσεων (8), μόνον εφόσον τα εν λόγω μοντέλα δοκιμών έχουν επανεξεταστεί και εγκριθεί από τον ΟΟΣΑ. Τα μοντέλα δοκιμών που περιλαμβάνονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών και στην αντίστοιχη TG του ΟΟΣΑ μπορούν να χρησιμοποιηθούν αδιακρίτως για τη συμμόρφωση προς τις απαιτήσεις των χωρών όσον αφορά τα αποτελέσματα δοκιμών από μεθόδους δοκιμών *in vitro* για τον ερεθισμό του δέρματος, ενώ αξιοποιείται παράλληλα η αμοιβαία αποδοχή δεδομένων.

6. Οι ορισμοί των όρων που χρησιμοποιούνται στο παρόν έγγραφο παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

7. Ένας περιορισμός της μεθόδου δοκιμών, όπως καταδείχθηκε από την πλήρη προοπτική μελέτη επικύρωσης για την αξιολόγηση και τον χαρακτηρισμό των μεθόδων δοκιμών RhE (16), είναι ότι δεν επιτρέπει την κατάταξη των χημικών ουσιών στην προαιρετική κατηγορία 3 του GHS του ΟΗΕ (ήπια ερεθιστικά) (1). Συνεπώς, ο τρόπος χρήσης της παρούσας μεθόδου δοκιμών θα καθοριστεί βάσει του κανονιστικού πλαισίου των χωρών μελών. Όσον αφορά την ΕΕ, η κατηγορία 3 δεν έχει περιληφθεί στον κανονισμό CLP. Για την πλήρη αξιολόγηση των τοπικών επιδράσεων στο δέρμα μετά από εφάπαξ έκθεση του δέρματος, ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ για τις ολοκληρωμένες προσεγγίσεις για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση (3). Είναι γνωστό ότι η χρήση ανθρώπινου δέρματος υπόκειται σε εθνικούς και διεθνείς προβληματισμούς ηθικής φύσεως και δεοντολογικούς όρους.

8. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών αφορά την παράμετρο της υγείας του ανθρώπου «ερεθισμός του δέρματος». Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν παρέχει επαρκείς πληροφορίες σχετικά με τη διάβρωση του δέρματος, αλλά η μέθοδος δοκιμών Β.40α (ισοδύναμη με την TG 431 του ΟΟΣΑ) σχετικά με τη διάβρωση του δέρματος βασίζεται στο ίδιο σύστημα δοκιμών RhE, μέσω της χρήσης άλλου πρωτοκόλλου (6). Η παρούσα μέθοδος βασίζεται σε μοντέλα RhE όπου χρησιμοποιούνται ανθρώπινα κερατινοκύτταρα, τα οποία, συνεπώς, αποτελούν *in vitro* το στοχευόμενο όργανο του επιθυμητού είδους. Επιπλέον, καλύπτει το αρχικό στάδιο της αλληλουχίας διεργασιών / του μηχανισμού δράσης της φλεγμονής (βλάβη των κυττάρων και των ιστών που έχει ως αποτέλεσμα εντοπισμένο τραύμα) που επιτελείται κατά τον ερεθισμό *in vivo*. Κατά την επικύρωση στην οποία στηρίζεται η παρούσα μέθοδος δοκιμών ελέγχθηκε ένα ευρύ φάσμα χημικών ουσιών, η δε βάση δεδομένων της μελέτης επικύρωσης καλύπτει συνολικά 58 χημικές ουσίες (16) (18) (23). Η μέθοδος δοκιμών εφαρμόζεται σε στερεά, υγρά, ημιστερεά και κηρούς. Τα υγρά μπορούν να είναι υδατικά ή μη και τα στερεά μπορεί να είναι υδατοδιαλυτά ή μη. Τα στερεά πρέπει, κατά το δυνατόν, να μετατρέπονται σε λεπτόκοκκη σκόνη πριν από την εφαρμογή· δεν απαιτείται άλλη προκατεργασία του δείγματος. Αέρια και αερολύματα δεν έχουν ακόμη αξιολογηθεί με μελέτη επικύρωσης (29). Παρότι η τεχνολογία RhE μπορεί θεωρητικά να χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή αερίων και αερολυμάτων, αυτά δεν μπορούν να εξεταστούν με την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

9. Πριν από τη χρήση της μεθόδου δοκιμών σε μείγμα για την παραγωγή δεδομένων για συγκεκριμένο κανονιστικό σκοπό, θα πρέπει να εξετάζεται αν –και, εάν ναι, για ποιον λόγο– μπορεί να αποδώσει αποτελέσματα κατάλληλα για τον επιδιωκόμενο σκοπό. Τέτοια εξέταση δεν χρειάζεται όταν οι κανονιστικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τον έλεγχο του μείγματος. Εντούτοις, λόγω του γεγονότος ότι τα μείγματα καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα κατηγοριών και συστάσεων, καθώς και του ότι οι πληροφορίες σχετικά με τις δοκιμές μειγμάτων είναι επί του παρόντος περιορισμένες, όταν υπάρχουν στοιχεία

▼M8

που δείχνουν ότι η μέθοδος δοκιμών δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε συγκεκριμένη κατηγορία μειγμάτων (π.χ. βάσει στρατηγικής όπως προτείνεται από τους Eskes *et al.*, 2012 (30)), η μέθοδος δοκιμών δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τη συγκεκριμένη κατηγορία μειγμάτων. Παρόμοια μέριμνα θα πρέπει να λαμβάνεται σε περίπτωση που διαπιστωθεί ότι συγκεκριμένες χημικές κατηγορίες ή φυσικοχημικές ιδιότητες δεν μπορούν να εφαρμοστούν στην παρούσα μέθοδο δοκιμών.

10. Υπό δοκιμή χημικές ουσίες που απορροφούν το φως στο ίδιο φάσμα με το άλας φορμαζάνης MTT και υπό δοκιμή χημικές ουσίες ικανές να ανάγουν άμεσα τη χρωστική ζωτικής χρώσης MTT (σε άλας φορμαζάνης MTT) μπορεί να παρεμποδίζουν τις μετρήσεις κυτταρικής βιωσιμότητας, καθιστώντας αναγκαία τη χρήση προσαρμοσμένων μαρτύρων για διορθώσεις (βλ. παραγράφους 28-34).

11. Για τις ελεγχόμενες χημικές ουσίες των οποίων η ταξινόμηση είναι αναμφίβολη, αναμένεται να αρκεί μία μόνο σειρά μετρήσεων με τριπλό δείγμα ιστού. Όταν όμως το αποτέλεσμα είναι οριακό, όπως π.χ. σε περίπτωση ασυμφωνίας μεταξύ των μετρήσεων πανομοιότυπων δειγμάτων και/ή μια μέση τιμή βιωσιμότητας ίση με 50 ± 5 %, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο εκτέλεσης δεύτερης σειράς μετρήσεων, ακόμη και τρίτης σειράς, σε περίπτωση ασυμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο πρώτων σειρών.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

12. Η υπό δοκιμή χημική ουσία εφαρμόζεται τοπικά σε τρισδιάστατο μοντέλο RhE, το οποίο αποτελείται από μη μετασχηματισμένα επιδερμικά κερατινοκύτταρα ανθρώπινης προέλευσης που έχουν καλλιεργηθεί ώστε να σχηματίσουν πολυστρωματικό μοντέλο της ανθρώπινης επιδερμίδας με υψηλή διαφοροποίηση. Το μοντέλο αυτό συνίσταται από τις εξής οργανωμένες στιβάδες: βασική, ακανθώδη και κοκκώδη, καθώς και από πολυστρωματική κεράτινη στιβάδα που περιέχει μεσοκυττάρια στρώματα λιπιδίων που αντιπροσωπεύουν τις κυριότερες κατηγορίες λιπιδίων, ανάλογα με εκείνα που συναντώνται *in vivo*.

13. Ο επαγόμενος από χημική ουσία ερεθισμός του δέρματος, ο οποίος εκδηλώνεται κυρίως με ερύθημα και οίδημα, είναι αποτέλεσμα μιας ακολουθίας συμβάντων που αρχίζει με διείσδυση της χημικής ουσίας διαμέσου της κεράτινης στιβάδας, σε βάθος όπου μπορεί να προκαλέσει βλάβη στις υποκείμενες στιβάδες κερατινοκυττάρων και άλλων δερματικών κυττάρων. Τα κύτταρα που υφίστανται βλάβη ελευθερώνουν φλεγμονικούς μεσολαβητές ή επάγουν μια φλεγμονική αλληλουχία αντιδράσεων στο χόριο, ιδίως στα στρωματικά και τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων. Το παρατηρούμενο ερύθημα και οίδημα οφείλεται ακριβώς στη διαστολή και την αυξημένη διαπερατότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων (29). Επισημαίνεται ότι οι μέθοδοι δοκιμών που βασίζονται σε RhE, ελλείψει κάθε νεοαγγείωσης στο σύστημα δοκιμών *in vitro*, μετρούν τα εναρκτήρια συμβάντα της αλληλουχίας, π.χ. τη βλάβη στα κύτταρα/ιστούς (16) (17), με χρήση της κυτταρικής βιωσιμότητας ως ένδειξης.

14. Η κυτταρική βιωσιμότητα σε μοντέλα RhE μετράται με βάση την ενζυμική μετατροπή της χρωστικής ζωτικής χρώσης MTT [βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο, κυανό του θειαζολυλίου, αριθ. CAS 298-93-1], σε κυανό άλας φορμαζάνης, το οποίο προσδιορίζεται ποσοτικά μετά την εκχύλισή του από τους ιστούς (31). Οι ερεθιστικές χημικές ουσίες αναγνωρίζονται από την ικανότητά τους να μειώνουν την κυτταρική βιωσιμότητα σε επίπεδα χαμηλότερα από καθορισμένα κατώφλια (≤ 50 %, στην περίπτωση της κατηγορίας 2 του GHS του ΟΗΕ / του κανονισμού CLP). Ανάλογα με το κανονιστικό πλαίσιο και την εφαρμοσιμότητα της μεθόδου δοκιμών, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που οδηγούν σε κυτταρική βιωσιμότητα υψηλότερη από τα επίπεδα κατωφλίου μπορούν να θεωρούνται μη ερεθιστικές (δηλ. τιμή > 50 % συνεπάγεται «Καμία κατηγορία»).

▼M8

ΑΠΟΔΕΙΞΗ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

15. Πριν εντάξουν στην καθημερινή πρακτική οποιοδήποτε από τα τέσσερα επικυρωμένα μοντέλα δοκιμών που συμμορφώνονται με την παρούσα μέθοδο δοκιμών (προσάρτημα 2), τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα, χρησιμοποιώντας τις δέκα ουσίες ελέγχου ικανότητας που απαριθμώνται στον πίνακα 1. Σε περιπτώσεις όπου, για παράδειγμα, μια απαριθμούμενη ουσία δεν είναι διαθέσιμη, μπορεί να χρησιμοποιείται άλλη ουσία για την οποία υπάρχουν επαρκή δεδομένα αναφοράς *in vivo* και *in vitro* [π.χ. από τον κατάλογο χημικών ουσιών αναφοράς (8)], υπό την προϋπόθεση ότι εφαρμόζονται τα ίδια κριτήρια επιλογής που περιγράφονται στον πίνακα 1. Η χρήση εναλλακτικής ουσίας ελέγχου ικανότητας θα πρέπει να αιτιολογείται.

16. Στο πλαίσιο της δοκιμής απόδειξης ικανότητας, συνιστάται να ελέγχουν οι χρήστες τις ιδιότητες φραγμού των ιστών, κατά τις προδιαγραφές του παραγωγού του μοντέλου RhE, μετά την παραλαβή τους. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία στις περιπτώσεις μεταφοράς των ιστών σε μεγάλες αποστάσεις/με μεγάλη διάρκεια. Μετά την επιτυχή εδραίωση της μεθόδου δοκιμών και αφού επιτευχθεί και αποδειχθεί η ικανότητα χρήσης της, ο εν λόγω έλεγχος δεν είναι απαραίτητος ως συνήθης πρακτική. Παρόλα αυτά, όταν η μέθοδος δοκιμών εισάγεται στη συνήθη πρακτική, συνιστάται να συνεχίζεται η αξιολόγηση των ιδιοτήτων φραγμού σε τακτά διαστήματα.

Πίνακας 1

Ουσίες ελέγχου ικανότητας [1]

Ουσία	Αριθ. CAS	Βαθμολογία σε δοκιμές *in vivo* [2]	Φυσική κατάσταση	Κατηγορία GHS του ΟΗΕ
ΜΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΜΕΝΕΣ ΟΥΣΙΕΣ («Καμία κατηγορία» κατά GHS του ΟΗΕ)				
ναφθαλινοξικό οξύ	86-87-3	0	Στερεό	Καμία
ισοπροπανόλη	67-63-0	0,3	Υγρό	Καμία
στεατικό μεθύλιο	112-61-8	1	Στερεό	Καμία
βουτυρικό επτύλιο	5870-93-9	1,7	Υγρό	Καμία (*προαιρετική κατ. 3*) [3]
σαλικυλικό εξύλιο	6259-76-3	2	Υγρό	Καμία (*προαιρετική κατ. 3*) [3]
ΤΑΞΙΝΟΜΗΜΕΝΕΣ ΟΥΣΙΕΣ (κατηγορία 2 κατά GHS του ΟΗΕ)				
κυκλαμιναλδεΰδη	103-95-7	2,3	Υγρό	Κατ. 2
1-βρωμοεξάνιο	111-25-1	2,7	Υγρό	Κατ. 2
υδροξείδιο του καλίου (υδατικό διάλυμα 5 %)	1310-58-3	3	Υγρό	Κατ. 2
1-μεθυλο-3-φαινυλο-1-πιπεραζίνη	5271-27-2	3,3	Στερεό	Κατ. 2
επτανάλη	111-71-7	3,4	Υγρό	Κατ. 2

(1) Οι ουσίες ελέγχου ικανότητας αποτελούν υποσύνολο των ουσιών που χρησιμοποιούνται στη μελέτη επικύρωσης και η επιλογή τους βασίζεται στα ακόλουθα κριτήρια: i) οι χημικές ουσίες κυκλοφορούν στο εμπόριο· ii) αντιπροσωπεύουν την πλήρη βαθμολογική κλίμακα ερεθιστικότητας Draize (από μη ερεθιστικό έως ισχυρό ερεθιστικό)· iii) έχουν σαφώς καθορισμένη χημική δομή· iv) είναι αντιπροσωπευτικές της χημικής λειτουργικότητας που χρησιμοποιήθηκε στη διαδικασία επικύρωσης· v) παρείχαν αναπαραγώγιμα αποτελέσματα *in vitro* σε πολλαπλές δοκιμές και πολλαπλά εργαστήρια· vi) συνδέονται με ορθή πρόβλεψη *in vitro*, και vii) δεν τους αποδίδονται άκρως τοξικά χαρακτηριστικά (π.χ. καρκινογόνες ή τοξικές για το αναπαραγωγικό σύστημα) και το κόστος απόρριψης δεν θεωρείται απαγορευτικό.

(2) Βαθμολογία *in vivo* σύμφωνα με τη μέθοδο δοκιμών B.4 (4).

(3) Στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών, η προαιρετική κατηγορία 3 (ήπια ερεθιστικά) κατά GHS του ΟΗΕ (1) θεωρείται «Καμία κατηγορία».

▼**M8**

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

17. Στη συνέχεια παρατίθεται περιγραφή των στοιχείων και των διαδικασιών μιας μεθόδου δοκιμών RhE για αξιολόγηση του ερεθισμού του δέρματος (βλ. επίσης προσάρτημα 3 για τις παραμέτρους που σχετίζονται με το κάθε μοντέλο). Υπάρχουν διαθέσιμες τυποποιημένες διαδικασίες (SOP) για τα τέσσερα μοντέλα που συμμορφώνονται με την παρούσα μέθοδο δοκιμών (32) (33) (34) (35).

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ RHE

Γενικοί όροι

18. Πρέπει να χρησιμοποιούνται μη μετασχηματισμένα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα για την ανασύσταση του επιθηλίου. Πρέπει να υπάρχουν πολλαπλές στιβάδες βιώσιμων επιθηλιακών κυττάρων (βασική, ακανθώδης, κοκκώδης) κάτω από λειτουργική κεράτινη στιβάδα. Η κεράτινη στιβάδα πρέπει να είναι πολυστρωματική και να διαθέτει τα αναγκαία λιπιδικά χαρακτηριστικά ώστε να δημιουργεί ισχυρό λειτουργικό φραγμό, ανθεκτικό στην ταχεία διείσδυση κυτταροτοξικών χημικών ουσιών συγκριτικής αξιολόγησης, π.χ. δωδεκυλοσουλφονικού νατρίου (SDS) ή Triton X-100. Η λειτουργία φραγμού πρέπει να καταδεικνύεται και είναι δυνατόν να εκτιμηθεί με προσδιορισμό είτε της συγκέντρωσης στην οποία μια χημική ουσία συγκριτικής αξιολόγησης μειώνει τη βιωσιμότητα των ιστών κατά 50 % (IC_{50}), μετά από καθορισμένο χρόνο έκθεσης, είτε του χρόνου έκθεσης που απαιτείται για να μειωθεί η κυτταρική βιωσιμότητα κατά 50 % (ET_{50}) μετά την εφαρμογή καθορισμένης συγκέντρωσης της χημικής ουσίας συγκριτικής αξιολόγησης. Οι ιδιότητες συγκράτησης του μοντέλου RhE πρέπει να αποτρέπουν τη διέλευση του υλικού γύρω από την κεράτινη στιβάδα μέχρι τον βιώσιμο ιστό, η οποία θα συνεπαγόταν ατελή μοντελοποίηση της έκθεσης του δέρματος. Το μοντέλο RhE πρέπει να μην έχει μολυνθεί από βακτήρια, ιούς, μυκοπλάσματα ή μύκητες.

Λειτουργικοί όροι

Βιωσιμότητα

19. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της βιωσιμότητας χρησιμοποιείται η δοκιμασία MTT (31). Τα βιώσιμα κύτταρα του ιστικού μορφώματος RhE μπορούν να ανάγουν τη χρωστική ζωτικής χρώσης MTT σε κυανό ίζημα άλατος φορμαζάνης MTT, το οποίο εκχυλίζεται στη συνέχεια από τον ιστό με χρήση ισοπροπανόλης (ή παρεμφερούς διαλύτη). Η οπτική πυκνότητα (OD) του διαλύτη εκχύλισης πρέπει να είναι αρκούντως χαμηλή, δηλ. μικρότερη από 0,1. Το εκχυλιζόμενο άλας φορμαζάνης MTT μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά είτε με χρήση τυπικής μέτρησης απορρόφησης (OD) είτε μέσω διαδικασίας HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας (36). Οι χρήστες του μοντέλου RhE πρέπει να εξασφαλίζουν ότι κάθε παρτίδα του μοντέλου RhE πληροί καθορισμένα κριτήρια για τον αρνητικό μάρτυρα. Ο φορέας ανάπτυξης/προμηθευτής του μοντέλου RhE θα πρέπει να προσδιορίζει πεδίο τιμών αποδοχής (ανώτερο και κατώτερο όριο) για τις τιμές OD αρνητικού μάρτυρα (στις συνθήκες της μεθόδου δοκιμών ερεθισμού του δέρματος). Τα πεδία τιμών αποδοχής για τα τέσσερα επικυρωμένα μοντέλα RhE που περιλαμβάνονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών φαίνονται στον πίνακα 2. Ένας χρήστης HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας θα πρέπει να χρησιμοποιεί τα πεδία τιμών OD αρνητικού μάρτυρα που φαίνονται στον πίνακα 2 ως κριτήριο αποδοχής για τον αρνητικό μάρτυρα. Πρέπει να τεκμηριώνεται ότι οι ιστοί που υποβάλλονται σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα είναι σταθεροί σε καλλιέργεια (δίνουν παραπλήσιες τιμές στις μετρήσεις βιωσιμότητας) για τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης της δοκιμής.

Πίνακας 2

Πεδία τιμών αποδοχής για τις τιμές OD αρνητικού μάρτυρα των μοντέλων δοκιμών που περιλαμβάνονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών

	Κατώτερο όριο αποδοχής	Ανώτερο όριο αποδοχής
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 0,8	≤ 2,8

▼**M8**

	Κατώτερο όριο αποδοχής	Ανώτερο όριο αποδοχής
SkinEthic™ RHE	≥ 0,8	≤ 3,0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	≥ 0,7	≤ 2,5

Λειτουργία φραγμού

20. Η κεράτινη στιβάδα και η λιπιδική της σύσταση πρέπει να ανθίστανται επαρκώς στην ταχεία διείσδυση κυτταροτοξικών χημικών ουσιών συγκριτικής αξιολόγησης (π.χ. SDS ή Triton X-100), όπως εκτιμάται με τη βοήθεια της τιμής IC_{50} ή ET_{50} (πίνακας 3).

Μορφολογία

21. Το μοντέλο RhE πρέπει να υποβάλλεται σε ιστολογική εξέταση, από την οποία να προκύπτει δομή όμοια με εκείνη της ανθρώπινης επιδερμίδας (συμπεριλαμβανομένης της ύπαρξης πολυστρωματικής κεράτινης στιβάδας).

Αναπαραγωγιμότητα

22. Τα αποτελέσματα για τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες της μεθόδου δοκιμών πρέπει να καταδεικνύουν διαχρονική αναπαραγωγιμότητα.

Ποιοτικός έλεγχος

23. Το μοντέλο RhE θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο εφόσον ο φορέας ανάπτυξης/προμηθευτής αποδεικνύει ότι κάθε παρτίδα του μοντέλου RhE ανταποκρίνεται σε καθορισμένα κριτήρια αποδέσμευσης παρτίδων παραγωγής, τα σημαντικότερα από τα οποία είναι εκείνα που αφορούν τη *βιωσιμότητα* (παράγραφος 19), τη *λειτουργία φραγμού* (παράγραφος 20) και τη *μορφολογία* (παράγραφος 21). Τα στοιχεία αυτά θα πρέπει να γνωστοποιούνται στους χρήστες της μεθόδου δοκιμών ώστε αυτοί να μπορούν να τα συμπεριλάβουν στην έκθεση δοκιμής. Ο φορέας ανάπτυξης/προμηθευτής του μοντέλου RhE θα πρέπει να εφαρμόζει πεδίο τιμών αποδοχής (ανώτερο και κατώτερο όριο) για τα IC_{50} ή ET_{50}. Δεκτά για την αξιόπιστη πρόβλεψη της ταξινόμησης ως προς τον ερεθισμό μπορούν να γίνουν μόνο αποτελέσματα που έχουν ληφθεί με ιστούς οι οποίοι πληρούν τα κριτήρια. Τα πεδία τιμών αποδοχής για τα τέσσερα μοντέλα δοκιμών που περιλαμβάνονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών φαίνονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3

Κριτήρια ποιοτικού ελέγχου για την αποδέσμευση παρτίδων των μοντέλων δοκιμών που περιλαμβάνονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών

	Κατώτερο όριο αποδοχής	Ανώτερο όριο αποδοχής
EpiSkin™ (SM) (αγωγή 18 ωρών με SDS) (32)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (33)	ET_{50} = 4,0 ώρες	ET_{50} = 8,7 ώρες
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (34)	ET_{50} = 4,0 ώρες	ET_{50} = 10,0 ώρες
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (αγωγή 18 ωρών με SDS) (35)	IC_{50} = 1,4 mg/ml	IC_{50} = 4,0 mg/ml

▼M8

Εφαρμογή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των χημικών ουσιών-μαρτύρων

24. Σε κάθε μέτρηση πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τρία πανομοιότυπα δείγματα για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία και για τους μάρτυρες. Προκειμένου τόσο για υγρές όσο και για στερεές χημικές ουσίες, πρέπει να εφαρμόζεται επαρκής ποσότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ώστε να καλύπτεται ομοιόμορφα η επιφάνεια της επιδερμίδας και, ταυτόχρονα, να αποφεύγονται οι πλεονάζουσες δόσεις, δηλαδή ποσότητα από 26 έως 83 μl/cm^2 ή mg/cm^2 (βλ. προσάρτημα 3) Στην περίπτωση των στερεών χημικών ουσιών, η επιφάνεια της επιδερμίδας πρέπει να υγραίνεται με απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό πριν από την εφαρμογή, ώστε να βελτιώνεται η επαφή της με την ελεγχόμενη χημική ουσία. Τα στερεά θα πρέπει, κατά το δυνατόν, να ελέγχονται σε μορφή λεπτόκοκκης σκόνης. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ως βοήθημα επίστρωσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί πλέγμα από νάιλον (βλ. προσάρτημα 3). Στο τέλος της περιόδου έκθεσης, η υπό δοκιμή χημική ουσία πρέπει να εκπλένεται επιμελώς από την επιφάνεια της επιδερμίδας με υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα ή με διάλυμα NaCl 0,9 %. Ανάλογα με τα χρησιμοποιούμενα μοντέλα δοκιμών RhE, η περίοδος έκθεσης κυμαίνεται από 15 έως 60 λεπτά και η θερμοκρασία επώασης από 20 έως 37 °C. Αυτές οι περίοδοι και θερμοκρασίες έκθεσης βελτιστοποιούνται για καθεμία από τις μεθόδους δοκιμών RhE και αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά εγγενή χαρακτηριστικά των μοντέλων δοκιμών (π.χ. λειτουργία φραγμού) (βλ. προσάρτημα 3).

25. Σε κάθε σειρά δοκιμών θα πρέπει να χρησιμοποιείται παράλληλος αρνητικός (NC) και θετικός μάρτυρας (PC) για να αποδεικνύεται ότι η βιωσιμότητα (με τον NC), η λειτουργία φραγμού και η προκύπτουσα ιστική ευαισθησία (με τον PC) των ιστών περιλαμβάνονται εντός καθορισμένου ιστορικού πεδίου τιμών αποδοχής. Ο συνιστώμενος θετικός μάρτυρας είναι υδατικό διάλυμα SDS 5 %. Οι συνιστώμενες ως αρνητικοί μάρτυρες ουσίες είναι είτε το νερό είτε αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (PBS).

Μετρήσεις της κυτταρικής βιωσιμότητας

26. Σύμφωνα με τη διαδικασία δοκιμής, είναι απολύτως απαραίτητο η μέτρηση της βιωσιμότητας να πραγματοποιείται όχι αμέσως μετά την έκθεση στην υπό δοκιμή χημική ουσία, αλλά αφού προηγηθεί επώαση του εκπλυθέντος ιστού σε πρόσφατο θρεπτικό υλικό για αρκούντως μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την αγωγή. Το χρονικό αυτό διάστημα επιτρέπει τόσο την αποκατάσταση από ασθενείς κυτταροτοξικές επιδράσεις όσο και την εκδήλωση σαφών κυτταροτοξικών επιδράσεων. Το στάδιο βελτιστοποίησης των δύο από τα μοντέλα δοκιμών που βασίζονται σε RhE και στα οποία στηρίζεται η παρούσα μέθοδος δοκιμών κατέδειξε ότι ο βέλτιστος χρόνος επώασης μετά την αγωγή είναι 42 ώρες (11) (12) (13) (14) (15).

27. Η δοκιμασία MTT αποτελεί τυποποιημένη ποσοτική μέθοδο η οποία πρέπει να χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών. Είναι συμβατή με τη χρήση σε τρισδιάστατο ιστικό μόρφωμα. Το δείγμα ιστού φέρεται σε διάλυμα MTT κατάλληλης συγκέντρωσης (π.χ. 0,3 έως 1 mg/mL), όπου αφήνεται να παραμείνει επί τρίωρο. Τα βιώσιμα κύτταρα μετατρέπουν την MTT σε κυανή φορμαζάνη. Στη συνέχεια, το σχηματιζόμενο κυανό προϊόν φορμαζάνης εκχυλίζεται από τον ιστό με διαλύτη (π.χ. ισοπροπανόλη, όξινο διάλυμα ισοπροπανόλης) και η συγκέντρωση της φορμαζάνης μετράται με προσδιορισμό της OD σε μήκος κύματος 570 nm, με φίλτρο μέγιστης ζώνης διάβασης ± 30 nm, ή μέσω διαδικασίας HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας (βλ. παράγραφο 34) (36).

28. Οι οπτικές ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ή η χημική της δράση επί της MTT (π.χ. οι χημικές ουσίες μπορεί να παρεμποδίσουν ή να αναστρέψουν τον σχηματισμό του χρώματος, ή και να τον προκαλέσουν) ενδέχεται να παρεμποδίσουν τη δοκιμασία, με αποτέλεσμα εσφαλμένη εκτίμηση της βιωσιμότητας. Αυτό ενδέχεται να συμβεί όταν μια συγκεκριμένη ελεγχόμενη χημική ουσία δεν απομακρυνθεί τελείως από τον ιστό με την έκπλυση ή διαπεράσει την επιδερμίδα. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία δρα απευθείας επί της MTT (π.χ. αναγωγικό της MTT), είναι εκ φύσεως

▼M8

έγχρωμη ή χρωματίζεται κατά την αγωγή του ιστού, πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσθετοι μάρτυρες για την ανίχνευση και διόρθωση της παρεμπόδισης της τεχνικής μετρήσεων της βιωσιμότητας από την υπό δοκιμή ουσία (βλ. παραγράφους 29 και 33). Ο τρόπος διόρθωσης της άμεσης αναγωγής της ΜΤΤ και της παρεμποδιστικής δράσης των έγχρωμων ουσιών περιγράφεται λεπτομερώς στις SOP των τεσσάρων επικυρωμένων μοντέλων δοκιμών που περιλαμβάνονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών (32) (33) (34) (35).

29. Για τον προσδιορισμό των άμεσων αναγωγικών της ΜΤΤ, κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να προστίθεται σε πρόσφατο διάλυμα ΜΤΤ. Εάν το μείγμα ΜΤΤ που περιέχει την υπό δοκιμή χημική ουσία αποκτήσει κυανό/ιώδες χρώμα, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται ότι ανάγει άμεσα την ΜΤΤ και, επομένως, θα πρέπει να διενεργείται περαιτέρω λειτουργικός έλεγχος σε μη βιώσιμους ιστούς RhE, ανεξάρτητα από τη χρήση τυπικής μέτρησης απορρόφησης (OD) ή διαδικασίας HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας. Σε αυτόν τον πρόσθετο λειτουργικό έλεγχο χρησιμοποιούνται αδρανοποιημένοι ιστοί με υπολειμματική μόνο μεταβολική δραστηριότητα, οι οποίοι, ωστόσο, απορροφούν την υπό δοκιμή χημική ουσία σε βαθμό παρόμοιο με τους βιώσιμους ιστούς. Κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία που ανάγει την ΜΤΤ εφαρμόζεται σε τουλάχιστον δύο αδρανοποιημένα πανομοιότυπα δείγματα ιστού τα οποία υποβάλλονται σε όλα τα στάδια της διαδικασίας δοκιμής προκειμένου να προκληθεί μη ειδική αναγωγή της ΜΤΤ (NSMTT) (32) (33) (34) (35). Ένας μοναδικός μάρτυρας NSMTT ανά υπό δοκιμή χημική ουσία αρκεί, ανεξάρτητα από τον αριθμό των ανεξάρτητων δοκιμών/σειρών δοκιμών που διεξάγονται. Στη συνέχεια εκτιμάται η πραγματική βιωσιμότητα των ιστών ως η εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών που μετρήθηκε με ζωντανούς ιστούς που εκτέθηκαν στο αναγωγικό της ΜΤΤ μείον την εκατοστιαία μη ειδική αναγωγή της ΜΤΤ που μετρήθηκε με τους αδρανοποιημένους ιστούς που εκτέθηκαν στο ίδιο αναγωγικό της ΜΤΤ, υπολογιζόμενη σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα που ελέγχθηκε ταυτόχρονα με την υπό διόρθωση δοκιμή (%NSMTT).

30. Για τον προσδιορισμό της πιθανής παρεμπόδισης από έγχρωμες υπό δοκιμή χημικές ουσίες ή υπό δοκιμή χημικές ουσίες που χρωματίζονται όταν έρχονται σε επαφή με νερό ή ισοπροπανόλη και τη λήψη απόφασης σχετικά με την ανάγκη χρήσης πρόσθετων μαρτύρων, θα πρέπει να εκτελείται φασματική ανάλυση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο νερό (περιβάλλον κατά την έκθεση) και/ή σε ισοπροπανόλη (διάλυμα εκχύλισης). Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία στο νερό και/ή σε ισοπροπανόλη απορροφά το φως σε φάσμα μηκών κύματος 570 ± 30 nm, πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσθετοι μάρτυρες χρωστικής, ή, εναλλακτικά, θα πρέπει να χρησιμοποιείται διαδικασία HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας, οπότε και δεν χρειάζονται τέτοιοι μάρτυρες (βλ. παραγράφους 33 και 34). Κατά την πραγματοποίηση της τυπικής μέτρησης απορρόφησης (OD), κάθε έγχρωμη υπό δοκιμή χημική ουσία με παρεμποδιστική δράση εφαρμόζεται τουλάχιστον σε δύο πανομοιότυπα δείγματα βιώσιμου ιστού, τα οποία υποβάλλονται σε όλα τα στάδια της δοκιμής, αλλά τα οποία επωάζονται με θρεπτικό μέσο αντί διαλύματος ΜΤΤ κατά το στάδιο της επώασης της ΜΤΤ προκειμένου να χρησιμεύσουν ως μάρτυρας μη ειδικού χρώματος (NSC_{living}). Ο έλεγχος μάρτυρα NSC_{living} πρέπει να διενεργείται ταυτόχρονα με τον έλεγχο της έγχρωμης υπό δοκιμή χημικής ουσίας και, σε περίπτωση πολλαπλών δοκιμών, πρέπει να διεξάγεται ανεξάρτητος έλεγχος NSC_{living} με κάθε εκτελούμενη δοκιμή (σε κάθε σειρά δοκιμών) λόγω της εγγενούς βιολογικής μεταβλητότητας των ζωντανών ιστών. Στη συνέχεια εκτιμάται η πραγματική βιωσιμότητα των ιστών ως η εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών που μετρήθηκε με ζωντανούς ιστούς που εκτέθηκαν στην παρεμποδιστική υπό δοκιμή χημική ουσία και επωάστηκαν με το διάλυμα ΜΤΤ, μείον την εκατοστιαία μη ειδική εμφάνιση χρώματος που μετρήθηκε με τους ζωντανούς ιστούς που εκτέθηκαν στην παρεμποδιστική υπό δοκιμή χημική ουσία και επωάστηκαν με θρεπτικό μέσο χωρίς ΜΤΤ ταυτόχρονα με την υπό διόρθωση δοκιμή ($\%NSC_{living}$).

31. Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες που διαπιστώνεται ότι προκαλούν άμεση αναγωγή της ΜΤΤ (βλ. παράγραφο 29) και παρεμπόδιση λόγω χρώματος (βλ. παράγραφο 30) θα απαιτηθεί επίσης ένα τρίτο σύνολο μαρτύρων, πέραν των μαρτύρων NSMTT και NSC_{living} που περιγράφηκαν στις προηγούμενες παραγράφους, κατά την τυπική μέτρηση απορρόφησης (OD). Αυτό συμβαίνει συνήθως σε περιπτώσεις σκουρόχρωμων υπό δοκιμή χημικών ουσιών

▼M8

που παρεμποδίζουν τη δοκιμασία MTT (π.χ. κυανές, ιώδεις, μαύρες), διότι το εγγενές χρώμα τους παρεμποδίζει την αξιολόγηση της ικανότητάς τους να ανάγουν απευθείας την MTT όπως περιγράφεται στην παράγραφο 29. Οι εν λόγω υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορεί να δεσμεύονται από ζωντανούς και αδρανοποιημένους ιστούς και, συνεπώς, ο μάρτυρας NSMTT μπορεί να διορθώσει τη δοκιμή όχι μόνο ως προς την πιθανή άμεση αναγωγή της MTT από την υπό δοκιμή χημική ουσία αλλά και ως προς την παρεμπόδιση λόγω χρώματος που οφείλεται στη δέσμευση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας από τους αδρανοποιημένους ιστούς. Κατ' αυτόν τον τρόπο ενδέχεται να προκύψει διπλή διόρθωση ως προς την παρεμπόδιση λόγω χρώματος, δεδομένου ότι ο μάρτυρας NSC_{living} διορθώνει ήδη τη δοκιμή ως προς τηνπαρεμπόδιση λόγω χρώματος που οφείλεται στη δέσμευση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας από τους ζωντανούς ιστούς. Για την αποφυγή πιθανής διπλής διόρθωσης ως προς την παρεμπόδιση λόγω χρώματος, πρέπει να χρησιμοποιείται τρίτος μάρτυρας μη ειδικής εμφάνισης χρώματος σε αδρανοποιημένους ιστούς (NSC_{killed}). Σε αυτόν τον πρόσθετο μάρτυρα, η υπό δοκιμή χημική ουσία εφαρμόζεται σε τουλάχιστον δύο πανομοιότυπα δείγματα αδρανοποιημένου ιστού, τα οποία υποβάλλονται σε όλα τα στάδια της διαδικασίας δοκιμής αλλά τα οποία επωάζονται με θρεπτικό μέσο αντί διαλύματος MTT κατά το στάδιο της επώασης MTT. Ένας μοναδικός μάρτυρας NSC_{killed} ανά υπό δοκιμή χημική ουσία αρκεί, ανεξάρτητα από τον αριθμό των ανεξάρτητων δοκιμών δοκιμών/σειρών δοκιμών που εκτελούνται, αλλά θα πρέπει να χρησιμοποιείται ταυτόχρονα με τον μάρτυρα NSMTT και, ει δυνατόν, με την ίδια παρτίδα ιστών. Στη συνέχεια εκτιμάται η πραγματική βιωσιμότητα των ιστών ως η εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών που μετρήθηκε με ζωντανούς ιστούς που εκτέθηκαν στην υπό δοκιμή χημική ουσία μείον τον %NSMTT μείον τον $\%NSC_{living}$ συν την εκατοστιαία μη ειδική εμφάνιση χρώματος που μετρήθηκε με τους αδρανοποιημένους ιστούς που εκτέθηκαν στην παρεμποδιστική υπό δοκιμή χημική ουσία και επωάστηκαν με θρεπτικό μέσο χωρίς MTT, υπολογιζόμενη σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα που χρησιμοποιήθηκε ταυτόχρονα με την υπό διόρθωση δοκιμή ($\%NSC_{killed}$).

32. Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι οι παρεμποδίσεις λόγω μη ειδικής αναγωγής της MTT και λόγω μη ειδικού χρώματος ενδέχεται να έχουν ως αποτέλεσμα να αυξηθούν οι μετρήσεις από το εκχύλισμα ιστού πάνω από την περιοχή τιμών γραμμικότητας του φασματοφωτόμετρου. Με βάση τα παραπάνω, κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθορίζει τη γραμμική περιοχή τιμών του φασματοφωτόμετρού του με φορμαζάνη MTT (CAS # 57360-69-7) από εμπορική πηγή, προτού ξεκινήσει τις δοκιμές χημικών ουσιών για κανονιστικούς σκοπούς. Η τυπική μέτρηση απορρόφησης (OD) με χρήση φασματοφωτόμετρου είναι κατάλληλη για την αξιολόγηση άμεσων αναγωγικών της MTT και υπό δοκιμή χημικών ουσιών που προκαλούν παρεμπόδιση λόγω χρώματος, όταν οι OD των εκχυλισμάτων ιστών που λαμβάνονται με την υπό δοκιμή χημική ουσία χωρίς διόρθωση ως προς την άμεση αναγωγή της MTT και/ή την παρεμπόδιση λόγω χρώματος περιλαμβάνονται εντός της γραμμικής περιοχής τιμών του φασματοφωτόμετρου ή όταν η μη διορθωμένη εκατοστιαία βιωσιμότητα που μετράται με την υπό δοκιμή χημική ουσία είναι ήδη ≤ 50 %. Εντούτοις, τα αποτελέσματα για υπό δοκιμή χημικές ουσίες με τις οποίες προκύπτει %NSMTT και/ή $\%NSC_{living}$ ≥ 50 % του αρνητικού μάρτυρα θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με επιφυλακτικότητα, διότι αυτή είναι η τιμή αποκοπής που χρησιμοποιείται για τη διάκριση μεταξύ ταξινομημένων και μη ταξινομημένων χημικών ουσιών (βλ. παράγραφο 36).

33. Όσον αφορά έγχρωμες υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν είναι συμβατές με την τυπική μέτρηση απορρόφησης (OD) λόγω υπερβολικά έντονης παρεμπόδισης με τη δοκιμασία MTT, μπορεί να χρησιμοποιείται η εναλλακτική διαδικασία HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας για τη μέτρηση της φορμαζάνης MTT (βλ. παράγραφο 34) (36). Το σύστημα HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας επιτρέπει τον διαχωρισμό της φορμαζάνης MTT από την υπό δοκιμή χημική ουσία πριν από τον ποσοτικό προσδιορισμό της (36). Για αυτόν τον λόγο, δεν χρειάζονται ποτέ μάρτυρες NSC_{living} ή NSC_{killed} όταν χρησιμοποιείται HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρία, ανεξάρτητα από την υπό δοκιμή χημική ουσία. Θα πρέπει ωστόσο να χρησιμοποιούνται μάρτυρες NSMTT εάν υπάρχει υπόνοια ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία ανάγει άμεσα την MTT ή έχει χρώμα που παρεμποδίζει την αξιολόγηση της ικανότητας άμεσης αναγωγής της MTT (όπως περιγράφεται στην παράγραφο 29). Όταν γίνεται χρήση HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας για τη μέτρηση της φορμαζάνης MTT, η εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών υπολογίζεται ως το ποσοστό του εμβαδού της κορυφής της φορμαζάνης MTT που μετράται με ζωντανούς ιστούς που εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική

▼M8

ουσία σε σχέση με την κορυφή της φορμαζάνης MTT που μετράται με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα. Όσον αφορά υπό δοκιμή χημικές ουσίες που είναι ικανές να ανάγουν άμεσα την MTT, η πραγματική βιωσιμότητα των ιστών υπολογίζεται ως η εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών που μετράται με ζωντανούς ιστούς που εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία, μείον το %NSMTT. Τέλος, πρέπει να επισημανθεί ότι οι άμεσοι αναγωγείς της MTT, οι οποίοι μπορεί επίσης να έχουν παρεμποδιστική δράση λόγω χρώματος και οι οποίοι κατακρατούνται στους ιστούς μετά την αγωγή και ανάγουν την MTT σε τέτοιο βαθμό ώστε να δίνουν OD (με τυπική μέτρηση OD) ή εμβαδά κορυφών (με χρήση UPLC/HPLC-φασματοφωτομετρίας) των υπό δοκιμή εκχυλισμάτων ιστών που είναι εκτός της περιοχής γραμμικότητας του φασματοφωτόμετρου, δεν μπορούν να αξιολογηθούν, αν και δεν αναμένεται να εμφανίζονται παρά σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις.

34. Η HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρία μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί με όλα τα είδη υπό δοκιμή χημικών ουσιών (έγχρωμων, μη έγχρωμων, αναγωγικών της MTT και μη αναγωγικών της MTT) για τη μέτρηση της φορμαζάνης MTT (36). Λόγω της ποικιλίας των συστημάτων HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας, πριν από τη χρήση ενός τέτοιου συστήματος για τον ποσοτικό προσδιορισμό της φορμαζάνης MTT από εκχυλίσματα ιστών θα πρέπει να καταδεικνύεται η καταλληλότητά του για τον συγκεκριμένο σκοπό διά της εκπλήρωσης των κριτηρίων αποδοχής για σειρά τυποποιημένων παραμέτρων συμμόρφωσης που βασίζονται στις παραμέτρους που περιγράφονται στην καθοδήγηση της αμερικανικής Υπηρεσίας Τροφίμων και Φαρμάκων για τον κλάδο σχετικά με την επικύρωση των βιοαναλυτικών μεθόδων (36)(37). Οι εν λόγω κύριες παράμετροι και τα κριτήρια αποδοχής τους παρατίθενται στο προσάρτημα 4. Εφόσον εκπληρούνται τα κριτήρια αποδοχής που καθορίζονται στο προσάρτημα 4, το σύστημα HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας θεωρείται κατάλληλο και έτοιμο για μέτρηση της φορμαζάνης MTT υπό τις πειραματικές συνθήκες που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών.

Κριτήρια αποδοχής

35. Για κάθε μέθοδο δοκιμών στην οποία χρησιμοποιούνται έγκυρες παρτίδες μοντέλου RhE (βλ. παράγραφο 23), η OD των ιστών που υποβάλλονται σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα πρέπει να αντιστοιχεί στην ποιότητα των ιστών στους οποίους εφαρμόστηκαν όλα τα στάδια της αποστολής και παραλαβής και όλες οι διεργασίες του πρωτοκόλλου. Οι τιμές OD των μαρτύρων δεν πρέπει να είναι χαμηλότερες από τα ιστορικά καθορισμένα όρια. Παρομοίως, ιστοί που υποβάλλονται σε αγωγή με τον θετικό μάρτυρα, δηλ. υδατικό διάλυμα SDS 5 %, θα πρέπει να δείχνουν την ικανότητά τους να αποκρίνονται σε ερεθιστική χημική ουσία στις συνθήκες της μεθόδου δοκιμών (βλ. προσάρτημα 3 και, για περισσότερες πληροφορίες, τις SOP των τεσσάρων μοντέλων δοκιμών που περιλαμβάνονται στην παρούσα TG (32) (33) (34) (35)). Οι σχετικές και κατάλληλες μετρήσεις της μεταβλητότητας μεταξύ πανομοιότυπων δειγμάτων ιστών, δηλαδή οι τυπικές αποκλίσεις (SD), θα πρέπει να περιλαμβάνονται εντός των ορίων αποδοχής που καθορίστηκαν για το χρησιμοποιούμενο μοντέλο δοκιμών (βλ. προσάρτημα 3).

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων και μοντέλο πρόβλεψης

36. Οι τιμές OD που προκύπτουν για κάθε ελεγχόμενη χημική ουσία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό του επί τοις εκατό ποσοστού βιωσιμότητας με κανονικοποίηση ως προς τον αρνητικό μάρτυρα, ο οποίος ορίζεται ίσος με 100 %. Όταν γίνεται χρήση HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας, η εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών υπολογίζεται ως το ποσοστό του εμβαδού της κορυφής της φορμαζάνης MTT που μετράται με ζωντανούς ιστούς που εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία σε σχέση με την κορυφή της φορμαζάνης MTT που μετράται με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα. Η τιμή αποκοπής για την ποσοστιαία κυτταρική βιωσιμότητα, η οποία διακρίνει τις ερεθιστικές από τις μη ταξινομούμενες υπό δοκιμή χημικές ουσίες, και οι στατιστικές διαδικασίες που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και τον προσδιορισμό των ερεθιστικών χημικών ουσιών, πρέπει να καθορίζονται επακριβώς, να τεκμηριώνονται και να είναι αποδεδειγμένα κατάλληλες (για πληροφορίες, βλ. SOP των μοντέλων δοκιμών). Οι τιμές αποκοπής για την πρόβλεψη του ερεθισμού είναι οι εξής:

▼M8

— Η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται ότι υπόκειται σε ταξινόμηση και επισήμανση σύμφωνα με το GHS του ΟΗΕ / τον κανονισμό CLP (κατηγορία 2 ή κατηγορία 1) όταν η μέση εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών μετά την έκθεση και την επώαση μετά την αγωγή είναι μικρότερη ή ίση (≤) με 50 %. Δεδομένου ότι με τα μοντέλα δοκιμών RhE που καλύπτονται από την παρούσα μέθοδο δοκιμών δεν είναι εφικτή η διάκριση μεταξύ των κατηγοριών 1 και 2 του GHS του ΟΗΕ / του κανονισμού CLP, για να προσδιοριστεί η τελική ταξινόμησή της χρειάζονται συμπληρωματικές πληροφορίες σχετικά με τη διάβρωση του δέρματος [βλ. επίσης το έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ για την ΙΑΤΑ (3)]. Σε περίπτωση που διαπιστωθεί ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι μη διαβρωτική (π.χ. με βάση τη μέθοδο δοκιμών ΤΜ.40, Β.40α ή Β.65) και ότι η βιωσιμότητα των ιστών μετά την έκθεση και την επώαση μετά την αγωγή είναι μικρότερη ή ίση (≤) με 50 %, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται ερεθιστική για το δέρμα σύμφωνα με την κατηγορία 2 του GHS του ΟΗΕ / του κανονισμού CLP.

— Ανάλογα με το ρυθμιστικό πλαίσιο των κρατών μελών, η υπό δοκιμή χημική ουσία μπορεί να θεωρηθεί μη ερεθιστική για το δέρμα σύμφωνα με την κατάταξη «Καμία κατηγορία» του GHS του ΟΗΕ / του κανονισμού CLP εάν η βιωσιμότητα των ιστών μετά την έκθεση και την επώαση μετά την αγωγή υπερβαίνει (>) το 50 %.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Δεδομένα

37. Για κάθε μέτρηση, πρέπει να αναφέρονται, σε μορφή πίνακα, τα δεδομένα που προέκυψαν για κάθε επιμέρους πανομοιότυπο δείγμα ιστών (π.χ. τιμές OD και υπολογισθείσα εκατοστιαία κυτταρική βιωσιμότητα για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία, καθώς και ταξινόμηση), συμπεριλαμβανομένων δεδομένων από επαναληπτικά πειράματα, κατά περίπτωση. Επιπλέον, πρέπει να αναφέρονται, για κάθε μέτρηση, οι μέσες τιμές ± SD. Για κάθε ελεγχόμενη χημική ουσία πρέπει να αναφέρονται οι παρατηρούμενες αλληλεπιδράσεις με το αντιδραστήριο ΜΤΤ και τις έγχρωμες ελεγχόμενες χημικές ουσίες.

Έκθεση δοκιμής

38. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία και μάρτυρες:

— Μονοσυστατική ουσία: ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμίξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

— Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγμα: περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες,

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και τυχόν πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

— προέλευση, αριθμός παρτίδας εάν είναι διαθέσιμος,

— κατεργασία των υπό δοκιμή χημικών ουσιών/μαρτύρων πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, κονιοποίηση),

— σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, καταληκτική ημερομηνία χρήσης ή ημερομηνία νέας ανάλυσης, εάν είναι γνωστή,

— συνθήκες φύλαξης.

Μοντέλο RhE και πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκαν (και αιτιολόγησή της επιλογής, κατά περίπτωση)

▼**M8**

Συνθήκες δοκιμής:

— μοντέλο XRhE που χρησιμοποιήθηκε (περιλαμβανομένου του αριθμού παρτίδας),

— στοιχεία βαθμονόμησης για τη συσκευή μέτρησης (π.χ. φασματοφωτόμετρο), μήκος κύματος και ζώνη διάβασης (κατά περίπτωση) που χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό της φορμαζάνης MTT, και περιοχή τιμών γραμμικότητας της συσκευής μέτρησης, περιγραφή της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της φορμαζάνης MTT,

— περιγραφή των στοιχείων που αποδεικνύουν ότι το σύστημα HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας πληροί τα κριτήρια καταλληλότητας, κατά περίπτωση, πλήρη στοιχεία τεκμηρίωσης για το συγκεκριμένο μοντέλο RhE που χρησιμοποιήθηκε, συμπεριλαμβανομένων των επιδόσεών του. Αυτά πρέπει να περιλαμβάνουν τουλάχιστον τα ακόλουθα:

i) βιωσιμότητα,

ii) λειτουργία φραγμού,

iii) μορφολογία,

iv) αναπαραγωγιμότητα και ικανότητα πρόβλεψης,

v) ποιοτικούς έλεγχους του μοντέλου,

— παραπομπή σε ιστορικά δεδομένα για το μοντέλο. Σε αυτά θα πρέπει να περιλαμβάνονται, μεταξύ άλλων, και ιστορικά δεδομένα για τις παρτίδες ώστε να τεκμηριώνεται η αποδοχή των δεδομένων ποιοτικού ελέγχου,

— κατάδειξη της τεχνικής ικανότητας διεξαγωγής της μεθόδου δοκιμών προτού χρησιμοποιηθεί στην καθημερινή πρακτική μέσω ελέγχου των ουσιών ελέγχου ικανότητας.

Διαδικασία δοκιμής:

— λεπτομέρειες της διαδικασίας δοκιμής που χρησιμοποιήθηκε (περιλαμβανομένων των διαδικασιών έκπλυσης που χρησιμοποιήθηκαν μετά την περίοδο έκθεσης), χρησιμοποιηθείσα δόση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και των μαρτύρων,

— διάρκεια και θερμοκρασία περιόδου έκθεσης και επώασης μετά την έκθεση,

— αναφορά των χρησιμοποιηθέντων μαρτύρων για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που είναι άμεσα αναγωγικά της MTT ή /και έγχρωμες, κατά περίπτωση,

— αριθμός των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που χρησιμοποιήθηκαν ανά υπό δοκιμή χημική ουσία και μάρτυρα (θετικός μάρτυρας, αρνητικός μάρτυρας και NSMTT, NSC_{living} και NSC_{killed}, κατά περίπτωση),

— περιγραφή των κριτηρίων απόφασης/μοντέλου πρόβλεψης που εφαρμόστηκαν με βάση το χρησιμοποιηθέν μοντέλο RhE,

— περιγραφή τυχόν τροποποιήσεων της διαδικασίας δοκιμών (περιλαμβανομένων των διαδικασιών έκπλυσης).

Κριτήρια της σειράς δοκιμών και της αποδοχής δοκιμής:

— μέσες τιμές και πεδία τιμών αποδοχής του θετικού και αρνητικού μάρτυρα βάσει ιστορικών δεδομένων, αποδεκτή μεταβλητότητα μεταξύ πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού για τους θετικούς και τους αρνητικούς μάρτυρες,

▼**M8**

— αποδεκτή μεταβλητότητα μεταξύ πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού για την υπό δοκιμή χημική ουσία.

Αποτελέσματα:

— δεδομένα σε μορφή πίνακα για την επιμέρους υπό δοκιμή χημική ουσία για κάθε σειρά δοκιμών και κάθε μέτρηση πανομοιότυπου δείγματος, περιλαμβανομένης της OD ή του εμβαδού κορυφής της φορμαζάνης MTT, της εκατοστιαίας βιωσιμότητας ιστών, της μέσης εκατοστιαίας βιωσιμότητας ιστών και των SD,

— κατά περίπτωση, αποτελέσματα των μαρτύρων που χρησιμοποιήθηκαν για τα άμεσα αναγωγικά της MTT και/ή τις έγχρωμες υπό δοκιμή χημικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένης της τιμής OD ή του εμβαδού κορυφής της φορμαζάνης MTT, του %NSMTT, του $\%NSC_{living}$, του $\%NSC_{killed}$, των SD και της τελικής ορθής εκατοστιαίας βιωσιμότητας των ιστών,

— αποτελέσματα που προέκυψαν με την υπό δοκιμή χημική ουσία/-ες και τους μάρτυρες σε σχέση με τα καθορισμένα κριτήρια αποδοχής για τη σειρά δοκιμών και τη δοκιμή,

— περιγραφή άλλων επιδράσεων που παρατηρήθηκαν,

— ταξινόμηση στην οποία κατέληξε η δοκιμή, με αναφορά του μοντέλου πρόβλεψης / των κριτηρίων απόφασης που χρησιμοποιήθηκαν.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) EURL-ECVAM (2009). Statement on the «Performance Under UN GHS of Three *In Vitro* Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards», Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 9 April 2009. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf

(3) OECD (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) Κεφάλαιο B.4 του παρόντος παραρτήματος: Οξείας μορφής ερεθισμός/διάβρωση του δέρματος.

(5) Κεφάλαιο B.40 του παρόντος παραρτήματος: Διάβρωση του δέρματος *in vitro*: Διαδερμική ηλεκτρική αντίσταση (TER).

(6) Κεφάλαιο B.40α του παρόντος παραρτήματος: Διάβρωση του δέρματος *in vitro*: Μέθοδος δοκιμών σε ανασυσταθείσα ανθρώπινη επιδερμίδα (RhE)

(7) Κεφάλαιο B.65 του παρόντος παραρτήματος: Μέθοδος δοκιμών φραγμού μεμβράνης *in vitro*.

▼**M8**

(8) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human *Epidermis* (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 220). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001). A Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, Results and Evaluation by the Management Team, *Toxicol. in Vitro* 15, 57-93.

(11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002). Refinement of the EPISKIN Protocol for the Assessment of Acute Skin Irritation of Chemicals: Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study, *Toxicol. in Vitro* 16, 765–770.

(12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests, *ALTEX* 21, 107–114.

(13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test, *ATLA* 33, 351-367.

(14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinsteen, G. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model Within the Framework of the ECVAM Validation Process, *ATLA* 33, 329-349.

(15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002). Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, *ATLA* 30, 109-129.

(16) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA* 35, 559-601.

(17) Hoffmann S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1-α.

(18) Eskes C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals, *ATLA* 35, 603-619.

(19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. and Leclaire, J. (2007). *In Vitro* Acute Skin Irritancy of Chemicals Using the Validated EPISKIN Model in a Tiered Strategy - Results and Performances with 184 Cosmetic Ingredients, *ALTEX*, 14, 351-358.

▼**M8**

(20) EURL-ECVAM (2007). Statement on the Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525_C.pdf

(21) EURL-ECVAM. (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to *In Vitro* Skin Irritation Testing. *ΣΗΜΕΙΩΣΗ Αυτά είναι τα αρχικά πρότυπα επιδόσεων που χρησιμοποιήθηκαν για την επικύρωση των δύο μεθόδων δοκιμών. Τα εν λόγω πρότυπα επιδόσεων δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πλέον, καθώς υπάρχει διαθέσιμη επικαιροποιημένη έκδοση (8).*

(22) EURL-ECVAM. (2008). Statement on the Scientific Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC_Statement_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf

(23) OECD (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, (No 137), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. and Hata K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol, *J Toxicol* Sci, 34, 327-334

(25) Katoh, M. and Hata K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439, *AATEX*, 16, 111-122

(26) OECD (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 159), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(27) OECD (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 155), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(28) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. and Omori, T. (2012). Validation Study of the *In Vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33-50.

(29) Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004). *In Vitro* Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models, *Toxicol. In Vitro* 18, 231-243.

(30) Eskes, C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.*Toxicol*.Pharmacol. 62, 393-403).

(31) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

▼**M8**

(32) EpiSkin™ (February 2009). SOP, Version 1.8ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals

(33) EpiDerm™ (Revised March 2009). SOP, Version 7.0, Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200).

(34) SkinEthic™ RHE (February 2009) SOP, Version 2.0, SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation.

(35) LabCyte (June 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3, Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model «LabCyte EPI-MODEL24»

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., and McNamee, P. Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. Manuscript in preparation.

(37) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

(38) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, in: Practical Contact Dermatitis, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

(39) EURL-ECVAM (2009). Performance Standards for *In Vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). *ΣΗΜΕΙΩΣΗ Αυτή είναι η ισχύουσα έκδοση των προτύπων επιδόσεων ECVAM, η οποία επικαιροποιήθηκε το 2009 ενόψει της εφαρμογής του GHS του ΟΗΕ. Τα εν λόγω πρότυπα επιδόσεων δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πλέον, διότι υπάρχει πλέον διαθέσιμη επικαιροποιημένη έκδοση (8) η οποία σχετίζεται με την παρούσα ΤG.*

(40) EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In Vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8 July 2009.

(41) ΕC (2001). Οδηγία 2001/59/ΕΚ της Επιτροπής, της 6ης Αυγούστου 2001, σχετικά με την προσαρμογή στην τεχνική πρόοδο, για εικοστή όγδοη φορά, της οδηγίας 67/548/ΕΟΚ του Συμβουλίου περί προσεγγίσεως των νομοθετικών, κανονιστικών και διοικητικών διατάξεων που αφορούν στην ταξινόμηση, συσκευασία και επισήμανση των επικίνδυνων ουσιών, Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης L225, 1-333.

▼**M8**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ορθότητα: ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί μέτρο των επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς τη «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας μεθόδου δοκιμών (9).

Κυτταρική βιωσιμότητα: παράμετρος με την οποία μετράται η συνολική δραστηριότητα κυτταρικού πληθυσμού, π.χ. ως ικανότητα των κυτταρικών μιτοχονδριακών αφυδρογονασών να ανάγουν τη χρωστική ζωτικής χρώσης MTT [βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο, κυανό του θειαζολυλίου], η οποία, ανάλογα με τη μετρούμενη παράμετρο και τον χρησιμοποιούμενο σχεδιασμό δοκιμής, συσχετίζεται με τον συνολικό αριθμό και/ή την ζωτικότητα των ζωντανών κυττάρων

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Συμφωνία: μέτρο των επιδόσεων των μοντέλων δοκιμών με τα οποία λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Ο όρος χρησιμοποιείται ενίοτε εναλλακτικά προς τον όρο «ορθότητα», και ορίζεται ως το ποσοστό επί του συνόλου των υπό δοκιμή χημικών ουσιών που έχουν ταξινομηθεί ορθά ως θετικές ή αρνητικές. Η συμφωνία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον επιπολασμό των θετικών ουσιών στα είδη των υπό δοκιμή χημικών ουσιών που ελέγχονται (9).

ET_{50}: η τιμή αυτή μπορεί να υπολογιστεί κατ' εκτίμηση με τον προσδιορισμό του χρόνου έκθεσης που απαιτείται για να μειωθεί η κυτταρική βιωσιμότητα κατά 50 % μετά την εφαρμογή καθορισμένης συγκέντρωσης της ουσίας συγκριτικής αξιολόγησης, βλ. επίσης IC_{50}.

GHS (Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα των Ηνωμένων Εθνών για την ταξινόμηση και επισήμανση των χημικών προϊόντων): σύστημα που προτείνει την ταξινόμηση των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) με βάση τυποποιημένα είδη και βαθμούς φυσικής επικινδυνότητας και επικινδυνότητας για την υγεία και το περιβάλλον και καλύπτει τα αντίστοιχα στοιχεία γνωστοποίησης, όπως εικονογράμματα, προειδοποιητικές λέξεις, δηλώσεις επικινδυνότητας, δηλώσεις προφύλαξης και δελτία δεδομένων ασφαλείας, με τα οποία γνωστοποιούνται πληροφορίες σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις με σκοπό την προστασία των ανθρώπων (εργοδοτών, εργαζομένων, μεταφορέων, καταναλωτών και διασωστών) και του περιβάλλοντος (1).

HPLC: υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης.

IATA: Integrated Approach on Testing and Assessment (Ολοκληρωμένη προσέγγιση για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση).

IC_{50}: η τιμή αυτή μπορεί να υπολογιστεί κατ' εκτίμηση με τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης στην οποία μια χημική ουσία συγκριτικής αξιολόγησης μειώνει τη βιωσιμότητα των ιστών κατά 50 % (IC_{50}) μετά από καθορισμένο χρόνο έκθεσης, βλ. επίσης ET_{50}.

Πλεονάζουσα δόση: ποσότητα ελεγχόμενης χημικής ουσίας που εφαρμόζεται στην επιδερμίδα και υπερβαίνει την απαιτούμενη για την πλήρη και ομοιόμορφη κάλυψη της επιδερμικής επιφάνειας.

Μείγμα: ένα μείγμα ή διάλυμα που αποτελείται από δύο ή περισσότερες ουσίες.

Μονοσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας ένα κύριο συστατικό περιέχεται σε ποσοστό τουλάχιστον 80 % κ.β.

▼M8

MTT: βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο, βρωμιούχο τετραζόλιο-κυανό του θειαζολυλίου.

Πολυσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας περισσότερα από ένα κύρια συστατικά περιέχονται σε συγκέντρωση ≥ 10 % κ.β. και < 80 % κ.β. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα μεταποιητικών διεργασιών. Η διαφορά μεταξύ μείγματος και πολυσυστατικής ουσίας είναι ότι το μείγμα λαμβάνεται με ανάμειξη δύο ή περισσότερων ουσιών, χωρίς χημική αντίδραση. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα χημικών αντιδράσεων.

NSC_{killed}: (Non-Specific Colour in killed tissues) μάρτυρας μη ειδικού χρώματος σε αδρανοποιημένους ιστούς.

NSC_{living}: (Non-Specific Colour in living tissues) μάρτυρας μη ειδικού χρώματος σε ζωντανούς ιστούς.

NSMTT: (Non-Specific MTT reduction) μη ειδική αναγωγή της MTT.

Πρότυπα επιδόσεων (Performance standards, PS): πρότυπα που βασίζονται σε επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών και παρέχουν τη βάση για την αξιολόγηση της συγκρισιμότητας προτεινόμενης μεθόδου δοκιμών η οποία είναι μηχανιστικά και λειτουργικά παρεμφερής. Τα πρότυπα επιδόσεων περιλαμβάνουν i) βασικά στοιχεία της μεθόδου δοκιμών, ii) κατάλογο ελάχιστων ουσιών αναφοράς, οι οποίες έχουν επιλεγεί μεταξύ των χημικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για την απόδειξη των αποδεκτών επιδόσεων της επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς, και (iii) τα συγκρίσιμα επίπεδα ορθότητας και αξιοπιστίας, που βασίζονται στα επιτευχθέντα για την επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών και τα οποία πρέπει να επιδεικνύει η προτεινόμενη μέθοδος δοκιμών όταν αξιολογείται με χρήση του καταλόγου ελαχίστων ουσιών αναφοράς (9).

PC: (Positive Control) θετικός μάρτυρας, πανομοιότυπο δείγμα που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και υποβάλλεται σε αγωγή με χημική ουσία που είναι γνωστό ότι προκαλεί θετική απόκριση. Για να διασφαλίζεται η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας της απόκρισης του θετικού μάρτυρα σε συνάρτηση με τον χρόνο, το μέγεθος της θετικής απόκρισης δεν θα πρέπει να είναι υπερβολικό.

Καταλληλότητα: περιγραφή της σχέσης της δοκιμής με την υπό μελέτη επίδραση και του κατά πόσον αυτή έχει σημασία και είναι χρήσιμη για συγκεκριμένο σκοπό. Πρόκειται για τον βαθμό στον οποίο η δοκιμή μετρά ή προβλέπει σωστά τη βιολογική επίδραση υπό μελέτη. Η καταλληλότητα εμπεριέχει συνεκτίμηση της ορθότητας (συμφωνίας) της μεθόδου δοκιμών (9).

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια μέθοδος δοκιμών μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (9).

Δοκιμή υποκατάστασης: δοκιμή που έχει σχεδιαστεί για να υποκαταστήσει δοκιμή χρησιμοποιούμενη στην καθημερινή πρακτική και αποδεκτή για τον προσδιορισμό της επικινδυνότητας και/ή την εκτίμηση κινδύνου και η οποία, όπως έχει διαπιστωθεί, εξασφαλίζει ισοδύναμη ή βελτιωμένη προστασία της υγείας του ανθρώπου ή των ζώων ή του περιβάλλοντος, κατά περίπτωση, σε σύγκριση με την αποδεκτή δοκιμή, για όλες τις πιθανές περιπτώσεις δοκιμής και υπό δοκιμή χημικές ουσίες (9).

Σειρά δοκιμών: μια σειρά περιλαμβάνει μία ή περισσότερες υπό δοκιμή χημικές ουσίες που υποβάλλονται σε δοκιμή ταυτόχρονα με αρνητικό μάρτυρα και θετικό μάρτυρα.

Ευαισθησία: το ποσοστό του συνόλου των θετικών/δραστικών ελεγχόμενων χημικών ουσιών που ταξινομούνται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των μεθόδων δοκιμών (9).

▼**M8**

In vivo *ερεθισμός του δέρματος*: η πρόκληση αναστρέψιμων βλαβών στο δέρμα μετά την εφαρμογή υπό δοκιμή ουσίας για χρονικό διάστημα έως 4 ωρών. Ο ερεθισμός του δέρματος είναι τοπικά εμφανιζόμενη αντίδραση του επηρεαζόμενου δερματικού ιστού και παρουσιάζεται σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά τη διέγερση (38). Οφείλεται σε τοπική φλεγμονώδη αντίδραση του εγγενούς (μη ειδικού) ανοσοποιητικού συστήματος του δερματικού ιστού. Το κύριο χαρακτηριστικό της είναι ότι πρόκειται για αναστρέψιμη διαδικασία που περιλαμβάνει φλεγμονώδεις αντιδράσεις και τα περισσότερα κλινικά συμπτώματα του ερεθισμού (ερύθημα, οίδημα, κνησμό και πόνο) που συνδέονται με φλεγμονή.

Ειδικότητα: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών/αδρανών ελεγχόμενων χημικών ουσιών που ταξινομούνται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των μεθόδων δοκιμών (9).

Ουσία: ένα χημικό στοιχείο και οι ενώσεις του σε φυσική κατάσταση ή όπως λαμβάνονται με οποιαδήποτε παραγωγική διεργασία, στα οποία συμπεριλαμβάνονται όλα τα πρόσθετα που απαιτούνται για να διατηρείται η σταθερότητά του, καθώς και τυχόν προσμείξεις που προκύπτουν από τη χρησιμοποιούμενη διεργασία, αλλά από τα οποία εξαιρούνται οι διαλύτες που είναι δυνατόν να διαχωριστούν χωρίς να επηρεαστεί η σταθερότητα της ουσίας ούτε να μεταβληθεί η σύνθεσή της.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών..

UPLC: υγροχρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης.

UVCB: ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, πολύπλοκα προϊόντα αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά.

▼**M8**

Προσάρτημα 2

ΜΟΝΤΕΛΑ ΔΟΚΙΜΩΝ ΠΟΥ ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΜΕΘΟΔΟ ΔΟΚΙΜΩΝ

Αρ.	Ονομασία μοντέλου δοκιμών	Είδος μελέτης επικύρωσης	Παραπομπές
1	EpiSkin™	Πλήρης προοπτική μελέτη επικύρωσης (2003-2007). Τα στοιχεία του εν λόγω μοντέλου χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των βασικών στοιχείων της μεθόδου δοκιμών των αρχικών και των επικαιροποιημένων προτύπων επιδόσεων ECVAM PS (39) (40) (21) (*). Επιπλέον, τα δεδομένα της μεθόδου που σχετίζονται με τη διάκριση μεταξύ ταξινομούμενων και μη ταξινομούμενων ουσιών αποτέλεσαν κατά κύριο λόγο τη βάση για τον προσδιορισμό της ειδικότητας και της ευαισθησίας των αρχικών προτύπων επιδόσεων (*).	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (*αρχικό*): Αρχικά, το μοντέλο δοκιμών υποβλήθηκε σε πλήρη προοπτική επικύρωση μαζί με το υπ' αριθ. 1 από το 2003-2007. Τα στοιχεία του εν λόγω μοντέλου χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των βασικών στοιχείων των μεθόδων δοκιμών των αρχικών και των επικαιροποιημένων προτύπων επιδόσεων ECVAM PS (39) (40) (21) (*). **EpiDerm™ SIT (EPI-200):** Μια τροποποίηση του αρχικού EpiDerm™ επικυρώθηκε με χρήση των αρχικών προτύπων επιδόσεων ECVAM (21) το 2008 (*)	(2) (10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40) (2) (21) (22) (23) (33)
3	SkinEthic™ RHE	Μελέτη επικύρωσης με βάση τα αρχικά πρότυπα επιδόσεων ECVAM (21) του 2008 (*).	(2) (21) (22) (23) (31)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Μελέτη επικύρωσης (2011-2012) με βάση τα πρότυπα επιδόσεων της TG 439 του ΟΟΣΑ (8) που βασίζονται στα επικαιροποιημένα πρότυπα επιδόσεων ECVAM PS (*) (39) (40).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) και πρότυπα επιδόσεων της εν λόγω TG (8) (*)

(*) Τα αρχικά πρότυπα επιδόσεων ECVAM (21) αναπτύχθηκαν το 2007 με την ολοκλήρωση της προοπτικής μελέτης επικύρωσης (16) στο πλαίσιο της οποίας αξιολογήθηκαν οι επιδόσεις των μοντέλων δοκιμών αρ. 1 και 2 με βάση το σύστημα ταξινόμησης που περιγράφεται στην 28η τροποποίηση της οδηγίας της ΕΕ για τις επικίνδυνες ουσίες (41). Το 2008 θεσπίστηκαν το GHS του ΟΗΕ (1) και ο κανονισμός CLP της ΕΕ, βάσει των οποίων η τιμή αποκοπής για τη διάκριση των μη ταξινομούμενων από τις ταξινομούμενες ουσίες μετατοπίστηκε ουσιαστικά από βαθμολογία *in vivo* 2,0 σε 2,3. Για λόγους προσαρμογής στην εν λόγω κανονιστική απαίτηση, το 2009 επικαιροποιήθηκαν οι τιμές ορθότητας και ο κατάλογος χημικών ουσιών αναφοράς των προτύπων επιδόσεων ECVAM (2) (39) (40). Όπως τα αρχικά πρότυπα επιδόσεων, έτσι και τα επικαιροποιημένα πρότυπα επιδόσεων βασίστηκαν εν πολλοίς σε δεδομένα από τα μοντέλα αρ. 1 και 2 (16), αλλά και σε πρόσθετα δεδομένα σχετικά με χημικές ουσίες αναφοράς από το μοντέλο αρ. 3. Το 2010, τα επικαιροποιημένα πρότυπα επιδόσεων ECVAM χρησιμοποιήθηκαν για τον καθορισμό των προτύπων επιδόσεων που σχετίζονται με την εν λόγω TG (8). Για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου δοκιμής, ως επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς (VRM) θεωρείται το EpiSkin™, λόγω του γεγονότος ότι χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη όλων των κριτηρίων των προτύπων επιδόσεων. Αναλυτικές πληροφορίες σχετικά με τις μελέτες επικύρωσης, μια συλλογή των δεδομένων που παρήχθησαν καθώς και το ιστορικό των απαιτούμενων προσαρμογών των προτύπων επιδόσεων λόγω της εφαρμογής του GHS του ΟΗΕ / του κανονισμού CLP διατίθενται στο επεξηγηματικό γενικό έγγραφο ECVAM/BfR της αντίστοιχης TG 439 του ΟΟΣΑ (23).

SIT: (Skin Irritation Test) δοκιμή ερεθισμού του δέρματος.

RHE: (Reconstructed Human Epidermis) ανασυσταθείσα ανθρώπινη επιδερμίδα.

▼**M8**

Προσάρτημα 3

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ ΓΙΑ ΚΑΘΕΝΑ ΑΠΟ ΤΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΔΟΚΙΜΩΝ ΠΟΥ ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΜΕΘΟΔΟ ΔΟΚΙΜΩΝ

Τα μοντέλα RhE ακολουθούν πολύ όμοια πρωτόκολλα, αξίζει δε να σημειωθεί ότι χρησιμοποιούν όλα περίοδο 42 ωρών μετά την επώαση (32) (33) (34) (35). Οι αποκλίσεις αφορούν κυρίως τις εξής τρεις παραμέτρους που σχετίζονται με διαφορετικές λειτουργίες φραγμού των μοντέλων δοκιμών: α) χρόνος και όγκος πριν την επώαση, β) εφαρμογή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και γ) όγκος μετά την επώαση.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
Α) Πριν την επώαση				
Χρόνος επώασης	18- 24 ώρες	18-24 ώρες	< 2 ώρες	15-30 ώρες
Όγκος θρεπτικού μέσου	2 ml	0,9 ml	0,3 ή 1 ml	0,5 ml
Β) Εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας				
Για υγρά	10 μl (26 μl/cm^2)	30 μl (47 μl/cm^2)	16 μl (32 μl/cm^2)	25 μl (83 μl/cm^2)
Για στερεά	10 mg (26 mg/cm^2) + DW (5 μl)	25 mg (39 mg/cm^2) + DPBS (25 μl)	16 mg (32 mg/cm^2) + DW (10 μl)	25 mg (83 mg/cm^2) + DW (25 μl)
Χρήση πλέγματος από νάιλον	Δεν χρησιμοποιείται	Εφόσον απαιτείται	Εφαρμόζεται	Δεν χρησιμοποιείται
Συνολικός χρόνος εφαρμογής	15 λεπτά	60 λεπτά	42 λεπτά	15 λεπτά
Θερμοκρασία εφαρμογής	RT	α) σε RT για 25 λεπτά β) στους 37°C για 35 λεπτά	RT	RT
Γ) Όγκος μετά την επώαση				
Όγκος θρεπτικού μέσου	2 ml	0,9 ml x 2	2 ml	1 ml
Δ) Μέγιστη αποδεκτή απόκλιση				
Τυπική απόκλιση μεταξύ πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού	SD18	SD18	SD18	SD18

RT: θερμοκρασία δωματίου
DW: απεσταγμένο νερό
DPBS: αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών Dulbecco

▼**M8**

Προσάρτημα 4

ΒΑΣΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΚΑΙ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΠΟΔΟΧΗΣ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΗΤΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ HPLC/UPLC-ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΓΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΦΟΡΜΑΖΑΝΗΣ MTT ΠΟΥ ΕΚΧΥΛΙΖΕΤΑΙ ΑΠΟ ΙΣΤΟΥΣ RHE

Παράμετρος	Πρωτόκολλο από την καθοδήγηση της FDA (36) (37)	Κριτήρια αποδοχής
Επιλεκτικότητα	Ανάλυση ισοπροπανόλης, ζωντανού τυφλού δείγματος (εκχύλισμα ισοπροπανόλης από ζωντανούς ιστούς RhE χωρίς καμία αγωγή), αδρανοποιημένου τυφλού δείγματος (εκχύλισμα ισοπροπανόλης από αδρανοποιημένους ιστούς RhE χωρίς καμία αγωγή)	εμβαδόν$_{παρεμβολής}$ ≤ 20 % του εμβαδού$_{LLOQ}$ ([1])
Ακρίβεια	Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου (φορμαζάνη MTT στα 1,6 μg/ml, 16 μg/ml και 160 μg/ml) σε ισοπροπανόλη (n=5)	CV ≤ 15 % ή ≤ 20 % για το LLOQ
Ορθότητα	Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ισοπροπανόλη (n=5)	%Dev ≤ 15 % ή ≤ 20 % για το LLOQ
Φαινόμενο μήτρας	Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ζωντανό τυφλό δείγμα (n=5)	85 % ≤ φαινόμενο μήτρας % ≤ 115 %
Μεταφορά υλικού	Ανάλυση ισοπροπανόλης μετά από πρότυπο ULOQ ([2])	εμβαδόν$_{παρεμβολής}$ ≤ 20 % του εμβαδού$_{LLOQ}$
Αναπαραγωγιμότητα (εντός ημέρας)	3 ανεξάρτητες καμπύλες βαθμονόμησης (με βάση 6 διαδοχικές αραιώσεις φορμαζάνης MTT 1:3 σε ισοπροπανόλη, ξεκινώντας από το ULOQ, δηλαδή 200 μg/ml), μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ισοπροπανόλη (n=5)	Καμπύλες βαθμονόμησης: %Dev ≤ 15 % ή ≤ 20 % για το LLOQ
Αναπαραγωγιμότητα (μεταξύ ημερών)	1η ημέρα: 1 καμπύλη βαθμονόμησης και μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ισοπροπανόλη (n=3) 2η ημέρα: 1 καμπύλη βαθμονόμησης και μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ισοπροπανόλη (n=3) 3η ημέρα: 1 καμπύλη βαθμονόμησης και μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ισοπροπανόλη (n=3)	Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου: %Dev ≤ 15 % και CV ≤ 15 %
Βραχυπρόθεσμη σταθερότητα της φορμαζάνης MTT σε εκχύλισμα ιστών RhE	Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ζωντανό τυφλό δείγμα (n=3) αναλυόμενοι την ημέρα της παρασκευής και μετά από 24 ώρες φύλαξης σε θερμοκρασία δωματίου	%Dev ≤ 15 %
Μακροπρόθεσμη σταθερότητα της φορμαζάνης MTT σε εκχύλισμα ιστών RhE, εφόσον απαιτείται	Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ζωντανό τυφλό δείγμα (n=3) αναλυόμενοι την ημέρα της παρασκευής και μετά από αρκετές ημέρες φύλαξης σε καθορισμένη θερμοκρασία (π.χ. 4°C, -20°C, -80°C)	%Dev ≤ 15 %

([1]) LLOQ: Κατώτερο όριο ποσοτικού προσδιορισμού, ορισμένο ώστε να καλύπτει βιωσιμότητα ιστού 1-2 %, δηλαδή 0,8 μg/ml.
([2]) ULOQ: Ανώτερο όριο ποσοτικού προσδιορισμού, ορισμένο ώστε να είναι τουλάχιστον δύο φορές υψηλότερο από την υψηλότερη αναμενόμενη συγκέντρωση φορμαζάνης MTT σε εκχυλίσματα ισοπροπανόλης από αρνητικούς μάρτυρες, δηλαδή 200 μg/ml.

▼M7

Β.47. ΜΈΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΏΝ ΑΔΙΑΦΆΝΕΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΠΕΡΑΤΌΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΒΌΕΙΟΥ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΟΎΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΌ Ι) ΧΗΜΙΚΏΝ ΟΥΣΙΏΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΎΝ ΣΟΒΑΡΉ ΟΦΘΑΛΜΙΚΉ ΒΛΆΒΗ ΚΑΙ ΙΙ) ΧΗΜΙΚΏΝ ΟΥΣΙΏΝ ΠΟΥ ΔΕΝ ΕΠΙΒΆΛΛΕΤΑΙ ΝΑ ΤΑΞΙΝΟΜΗΘΟΎΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΟΦΘΑΛΜΙΚΌ ΕΡΕΘΙΣΜΌ Ή ΤΗ ΣΟΒΑΡΉ ΟΦΘΑΛΜΙΚΉ ΒΛΆΒΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 437 του ΟΟΣΑ (2013). Η μέθοδος δοκιμών αδιαφάνειας και διαπερατότητας του βόειου κερατοειδούς (Bovine Corneal Opacity and Permeability/BCOP) αξιολογήθηκε από τη Διυπηρεσιακή Συντονιστική Επιτροπή για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (ICCVAM) των Ηνωμένων Πολιτειών, σε σύμπραξη με το Ευρωπαϊκό Κέντρο για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (ECVAM) και το Ιαπωνικό Κέντρο για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (JaCVAM), το 2006 και το 2010 (1)(2). Κατά την πρώτη αξιολόγηση, αξιολογήθηκε η χρησιμότητα της μεθόδου δοκιμών BCOP για τον προσδιορισμό χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη (1). Κατά τη δεύτερη αξιολόγηση, αξιολογήθηκε η χρησιμότητα της μεθόδου δοκιμών BCOP για τον προσδιορισμό χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) που δεν ταξινομούνται ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη (2). Η βάση δεδομένων επικύρωσης της BCOP περιείχε συνολικά 113 ουσίες και 100 μείγματα (2) (3). Από τις εν λόγω αξιολογήσεις και την επανεξέτασή τους από ομότιμους κριτές διαπιστώθηκε ότι με τη μέθοδο δοκιμών μπορούν να προσδιοριστούν σωστά τα χημικά προϊόντα (τόσο οι ουσίες όσο και τα μείγματα) που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη (κατηγορίας 1), καθώς και εκείνα που δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη, όπως ορίζονται στο Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης Χημικών Προϊόντων (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals/GHS) των Ηνωμένων Εθνών (4) και στον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων (Classification, Labelling and Packaging/CLP) ([1]) και, ως εκ τούτου, η μέθοδος εγκρίθηκε ως επιστημονικά έγκυρη και για τους δύο σκοπούς. Σοβαρή οφθαλμική βλάβη είναι η πρόκληση βλάβης στους ιστούς των οφθαλμών ή η σοβαρή μείωση της όρασης, η οποία εμφανίζεται μετά την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην εμπρόσθια επιφάνεια του οφθαλμού και δεν είναι πλήρως αναστρέψιμη εντός 21 ημερών από την εφαρμογή της ουσίας. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη ταξινομούνται ως κατηγορίας 1 του GHS των Ηνωμένων Εθνών. Οι χημικές ουσίες που δεν ταξινομούνται ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη ορίζονται ως εκείνες που δεν πληρούν τις απαιτήσεις για να ταξινομηθούν ως κατηγορίας 1 ή 2 (2Α ή 2Β) του GHS των Ηνωμένων Εθνών, δηλ. οι αναφερόμενες ως «καμίας κατηγορίας» του GHS των Ηνωμένων Εθνών. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών περιλαμβάνει τη συνιστώμενη χρήση και τους περιορισμούς της μεθόδου δοκιμών BCOP βάσει των αξιολογήσεών της. Οι βασικές διαφορές μεταξύ του αρχικού κειμένου των κατευθυντήριων γραμμών του ΟΟΣΑ, του 2009, και της επικαιροποιημένης έκδοσης του 2013 περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, τις εξής: τη χρήση της μεθόδου δοκιμών BCOP για τον χαρακτηρισμό χημικών ουσιών για τις οποίες δεν απαιτείται ταξινόμηση σύμφωνα με το GHS των Ηνωμένων Εθνών (παράγραφοι 2 και 7)· διευκρινίσεις σχετικά με την εφαρμοσιμότητα της μεθόδου δοκιμών BCOP στον έλεγχο αλκοολών, κετονών και στερεών (παράγραφοι 6 και 7), καθώς και ουσιών και μειγμάτων (παράγραφος 8)· διευκρινίσεις σχετικά με τον τρόπο ελέγχου των επιφανειοδραστικών (τασιενεργών) ουσιών και των μειγμάτων που περιέχουν επιφανειοδραστικές ουσίες (παράγραφος 28)· επικαιροποιήσεις και διευκρινίσεις σχετικά με τους θετικούς μάρτυρες (παράγραφοι 39 και 40)· επικαιροποίηση των κριτηρίων της μεθόδου δοκιμών BCOP για τη λήψη αποφάσεων (παράγραφος 47)· επικαιροποίηση των κριτηρίων αποδοχής της μελέτης (παράγραφος 48)· επικαιροποίηση των στοιχείων της έκθεσης δοκιμής (παράγραφος 49)· επικαιροποίηση του προσαρτήματος 1 που περιέχει τους ορισμούς· προσθήκη του προσαρτήματος 2 για την ικανότητα πρόβλεψης της μεθόδου δοκιμών BCOP στο πλαίσιο διαφόρων συστημάτων ταξινόμησης· επικαιροποίηση του προσαρτήματος 3 που περιέχει κατάλογο των χημικών ουσιών ελέγχου ικανότητας· και επικαιροποίηση του προσαρτήματος 4 σχετικά με τη διάταξη συγκράτησης κερατοειδούς στη μέθοδο BCOP (παράγραφος 1) και το αδιαφανόμετρο (παράγραφοι 2 και 3).

([1]) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων, την τροποποίηση και την κατάργηση των οδηγιών 67/548/ΕΟΚ και 1999/45/ΕΚ και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006, ΕΕ L 353 της 31.12.2008, σ. 1.

▼M7

Επί του παρόντος είναι γενικά αποδεκτό ότι, στο προβλέψιμο μέλλον, καμία μεμονωμένη δοκιμή οφθαλμικού ερεθισμού in vitro δεν θα μπορεί να αντικαταστήσει την in vivo οφθαλμική δοκιμή Draize στην πρόβλεψη σε ολόκληρο το φάσμα ερεθιστικότητας από τις διαφορετικές τάξεις χημικών ουσιών. Εντούτοις, στοχευμένοι συνδυασμοί διαφόρων εναλλακτικών μεθόδων δοκιμών στο πλαίσιο (κλιμακωτής) στρατηγικής δοκιμών θα μπορούσαν ενδεχομένως να αντικαταστήσουν την οφθαλμική δοκιμή Draize (5). Η καθοδική προσέγγιση (top-down) (5) έχει σχεδιαστεί για να χρησιμοποιείται όταν, βάσει των διαθέσιμων πληροφοριών, μια χημική ουσία αναμένεται να έχει υψηλό δυναμικό ερεθιστικότητας, ενώ η ανοδική προσέγγιση (bottom-up) (5) έχει σχεδιαστεί για να χρησιμοποιείται όταν, βάσει των διαθέσιμων πληροφοριών, μια χημική ουσία δεν αναμένεται να προκαλέσει ερεθισμό των οφθαλμών σε βαθμό τέτοιον ώστε να επιβάλλεται η ταξινόμησή της. Η μέθοδος δοκιμών BCOP είναι μέθοδος δοκιμών in vitro που μπορεί να χρησιμοποιείται, υπό ορισμένες περιστάσεις και με ειδικούς περιορισμούς, για την ταξινόμηση και την επισήμανση των χημικών ουσιών ως προς τον κίνδυνο για τους οφθαλμούς. Αν και δεν θεωρείται έγκυρη ως αυτοτελές υποκατάστατο της οφθαλμικής δοκιμής in vivo σε κουνέλια, η μέθοδος δοκιμών BCOP συνιστάται ως πρώτο στάδιο στρατηγικής δοκιμών, όπως η καθοδική προσέγγιση που προτείνουν οι Scott et al. (5), για τον προσδιορισμό χημικών ουσιών που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη, δηλ. χημικών ουσιών που πρέπει να ταξινομούνται ως κατηγορίας 1 του GHS των Ηνωμένων Εθνών, χωρίς περαιτέρω δοκιμή (4). Η μέθοδος δοκιμών BCOP συνιστάται επίσης για τον προσδιορισμό χημικών ουσιών για τις οποίες δεν απαιτείται ταξινόμηση ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη, όπως ορίζονται στο GHS των Ηνωμένων Εθνών («καμίας κατηγορίας» του GHS των Ηνωμένων Εθνών) (4), στο πλαίσιο στρατηγικής δοκιμών όπως η ανοδική προσέγγιση (5). Ωστόσο, για τις χημικές ουσίες οι οποίες, όπως προβλέπεται βάσει της μεθόδου δοκιμών BCOP, δεν προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη ή δεν ταξινομούνται ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό/τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη, θα απαιτούνται πρόσθετες δοκιμές (in vitro και/ή in vivo) για να κριθεί η οριστική τους ταξινόμηση.

Σκοπός της παρούσας μεθόδου δοκιμών είναι η περιγραφή των διαδικασιών που εφαρμόζονται για την αξιολόγηση του δυναμικού οφθαλμικού κινδύνου από την υπό δοκιμή ουσία, όπως αυτό μετράται από την ικανότητά της να προκαλεί αδιαφάνεια (θολερότητα) και αύξηση της διαπερατότητας σε απομονωμένο βόειο κερατοειδή. Οι τοξικές επιδράσεις στον κερατοειδή μετρώνται μέσω: i) της μειωμένης οπτικής διαπερατότητας (αδιαφάνεια) και ii) της αυξημένης διέλευσης της χρωστικής νατριούχου φλουορεσκεΐνης (διαπερατότητα). Οι αξιολογήσεις της αδιαφάνειας και της διαπερατότητας του κερατοειδούς κατόπιν έκθεσης σε υπό δοκιμή χημική ουσία συνδυάζονται για να εξαχθεί βαθμολογία ερεθιστικότητας in vitro (In Vitro Irritancy Score/IVIS), η οποία χρησιμοποιείται για την ταξινόμηση του βαθμού ερεθιστικότητας της υπό δοκιμή ουσίας.

Οι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών βασίζεται στο πρωτόκολλο της ICCVAM για τη μέθοδο δοκιμών BCOP (6) (7), το οποίο αναπτύχθηκε αρχικά βάσει στοιχείων που ελήφθησαν από το πρωτόκολλο του ινστιτούτου Institute for In Vitro Sciences (IIVS) και το πρωτόκολλο INVITTOX 124 (8). Το τελευταίο αποτελεί το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη προεπικύρωσης που διενεργήθηκε κατά την περίοδο 1997-1998 με χορηγό την Ευρωπαϊκή Κοινότητα. Και τα δύο αυτά πρωτόκολλα βασίζονται στη μέθοδο δοκιμών BCOP που δημοσιεύτηκε για πρώτη φορά από τους Gautheron et al. (9).

Η μέθοδος δοκιμών BCOP μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό χημικών ουσιών που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη, όπως ορίζονται στο GHS των Ηνωμένων Εθνών, δηλ. χημικών ουσιών που πρέπει να ταξινομούνται ως κατηγορίας 1 του GHS των Ηνωμένων Εθνών (4). Όταν χρησιμοποιείται για τον σκοπό αυτό, η μέθοδος δοκιμών BCOP έχει συνολική ορθότητα 79 % (150/191), ποσοστό ψευδοθετικής έκβασης 25 % (32/126) και ποσοστό ψευδοαρνητικής έκβασης 14 % (9/65), σε σύγκριση με την ταξινόμηση βάσει δεδομένων από τη μέθοδο οφθαλμικών δοκιμών in vivo σε κουνέλια σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης GHS των Ηνωμένων Εθνών (3) (βλ. προσάρτημα 2, πίνακας 1). Όταν εξαιρούνται από τη βάση δεδομένων οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες ορισμένων τάξεων, χημικών (δηλ. αλκοόλες, κετόνες) ή φυσικών (στερεά), η μέθοδος δοκιμών BCOP έχει συνολική ορθότητα 85 % (111/131), ποσοστό ψευδοθετικής έκβασης 20 % (16/81) και ποσοστό ψευδοαρνητικής έκβασης

▼M7

8 % (4/50) στο σύστημα ταξινόμησης GHS των Ηνωμένων Εθνών (3). Οι πιθανές αδυναμίες της μεθόδου δοκιμών BCOP, όταν χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό χημικών ουσιών που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη (κατηγορία 1 του GHS των Ηνωμένων Εθνών), οφείλονται στα υψηλά ποσοστά ψευδοθετικής έκβασης για τις αλκοόλες και τις κετόνες και ψευδοαρνητικής έκβασης για τα στερεά, που παρατηρήθηκαν στη βάση δεδομένων επικύρωσης (1)(2)(3). Επειδή, ωστόσο, η υπερπρόβλεψη με τη μέθοδο δοκιμών BCOP δεν αφορά όλες τις αλκοόλες και κετόνες και ορισμένες προβλέπονται σωστά ως ουσίες της κατηγορίας 1 του GHS των Ηνωμένων Εθνών, αυτές οι δύο οργανικές δραστικές ομάδες δεν θεωρούνται εκτός του πεδίου εφαρμογής της μεθόδου δοκιμών. Εναπόκειται στον χρήστη της παρούσας μεθόδου δοκιμών να κρίνει αν η ενδεχόμενη υπερπρόβλεψη για αλκοόλη ή κετόνη είναι αποδεκτή ή αν πρέπει να διεξαχθούν περαιτέρω δοκιμές βασισμένες σε ανάλυση βάρους της απόδειξης. Όσον αφορά τα ποσοστά ψευδοαρνητικής έκβασης για τα στερεά, πρέπει να σημειωθεί ότι τα στερεά μπορεί να οδηγήσουν σε μεταβλητές και ακραίες συνθήκες έκθεσης στην in vivo δοκιμή οφθαλμικού ερεθισμού Draize, με αποτέλεσμα να προκύψουν άστοχες προβλέψεις του πραγματικού ερεθιστικού τους δυναμικού (10). Επισημαίνεται, επίσης, ότι καμία από τις ψευδοαρνητικές αποκρίσεις που εντοπίστηκαν στη βάση δεδομένων επικύρωσης της ICCVAM (2)(3), στο πλαίσιο του προσδιορισμού χημικών ουσιών που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη (κατηγορίας 1 του GHS των Ηνωμένων Εθνών), δεν είχε ως αποτέλεσμα τιμή IVIS ≤ 3, η οποία είναι το κριτήριο που χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό μιας υπό δοκιμή ουσίας ως «καμίας κατηγορίας» του GHS των Ηνωμένων Εθνών. Επιπλέον, μια ψευδοαρνητική έκβαση της δοκιμής BCOP στο πλαίσιο αυτό δεν είναι κρίσιμης σημασίας, διότι όλες οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δίνουν τιμή 3 < IVIS ≤ 55 υποβάλλονται ακολούθως σε άλλες, επαρκώς επικυρωμένες δοκιμές in vitro ή, ως έσχατη επιλογή, σε δοκιμές σε κουνέλια, ανάλογα με τις κανονιστικές απαιτήσεις, με τη χρήση στρατηγικής διαδοχικών δοκιμών με βάση ανάλυση βάρους της απόδειξης. Δεδομένου ότι η μέθοδος δοκιμών BCOP προβλέπει σωστά ότι ορισμένες στερεές χημικές ουσίες είναι κατηγορίας 1 του GHS των Ηνωμένων Εθνών, ούτε αυτή η φυσική κατάσταση θεωρείται εκτός του πεδίου εφαρμογής της μεθόδου δοκιμών. Οι ερευνητές μπορούν να εξετάζουν το ενδεχόμενο χρήσης της παρούσας μεθόδου δοκιμών για όλους τους τύπους χημικών ουσιών, οπότε και οι τιμές IVIS > 55 θα πρέπει να γίνονται δεκτές ως ενδεικτικές απόκρισης η οποία προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη που θα πρέπει να ταξινομηθεί ως κατηγορίας 1 του GHS των Ηνωμένων Εθνών χωρίς περαιτέρω δοκιμή. Πάντως, όπως έχει ήδη αναφερθεί, τυχόν θετικά αποτελέσματα για αλκοόλες ή κετόνες πρέπει να ερμηνεύονται προσεκτικά λόγω πιθανής υπερπρόβλεψης.

Η μέθοδος δοκιμών BCOP μπορεί επίσης να χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό χημικών ουσιών για τις οποίες δεν απαιτείται ταξινόμηση ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη βάσει του συστήματος ταξινόμησης GHS των Ηνωμένων Εθνών (4). Όταν χρησιμοποιείται για τον σκοπό αυτό, η μέθοδος δοκιμών BCOP έχει συνολική ορθότητα 69 % (135/196), ποσοστό ψευδοθετικής έκβασης 69 % (61/89) και ποσοστό ψευδοαρνητικής έκβασης 0 % (0/107), σε σύγκριση με την ταξινόμηση βάσει δεδομένων από τη μέθοδο οφθαλμικών δοκιμών in vivo σε κουνέλια σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης GHS των Ηνωμένων Εθνών (3) (βλ. προσάρτημα 2, πίνακας 2). Το ποσοστό ψευδοθετικής έκβασης που έχει προκύψει (για χημικές ουσίες «καμίας κατηγορίας» του GHS των Ηνωμένων Εθνών in vivo, οι οποίες δίνουν IVIS > 3, βλ. παράγραφο 47) είναι σημαντικά υψηλό, αλλά όχι κρίσιμης σημασίας σε αυτό το πλαίσιο, εφόσον όλες οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δίνουν τιμές 3 < IVIS ≤ 55 θα υποβάλλονται στη συνέχεια σε άλλες, επαρκώς επικυρωμένες δοκιμές in vitro ή, ως έσχατη επιλογή, σε δοκιμές σε κουνέλια, ανάλογα με τις κανονιστικές απαιτήσεις, με τη χρήση στρατηγικής διαδοχικών δοκιμών με βάση ανάλυση βάρους της απόδειξης. Η μέθοδος δοκιμών BCOP δεν παρουσιάζει ειδικές αδυναμίες όσον αφορά τη διεξαγωγή δοκιμών με αλκοόλες, κετόνες και στερεά, όταν ο σκοπός είναι ο χαρακτηρισμός χημικών ουσιών για τις οποίες δεν απαιτείται ταξινόμηση ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη («καμίας κατηγορίας» του GHS των Ηνωμένων Εθνών) (3). Οι ερευνητές μπορούν να εξετάζουν το ενδεχόμενο χρήσης της παρούσας μεθόδου δοκιμών για όλους τους τύπους χημικών ουσιών, οπότε και τα αρνητικά αποτελέσματα (IVIS ≤ 3) θα πρέπει να γίνονται δεκτά ως ένδειξη ότι δεν απαιτείται ταξινόμηση («καμία κατηγορία» του GHS των Ηνωμένων Εθνών). Εφόσον με τη μέθοδο δοκιμών BCOP είναι δυνατόν να προσδιοριστεί σωστά μόνο το 31 % των χημικών ουσιών για τις οποίες δεν απαιτείται ταξινόμηση ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη, η μέθοδος αυτή δεν θα πρέπει να είναι η πρώτη επιλογή για την έναρξη μιας ανοδικής προσέγγισης (5), εάν είναι διαθέσιμες άλλες επικυρωμένες και αποδεκτές μέθοδοι in vitro με παρόμοια υψηλή ευαισθησία, αλλά ανώτερη ειδικότητα.

▼M7

Η βάση δεδομένων επικύρωσης της BCOP περιείχε συνολικά 113 ουσίες και 100 μείγματα (2) (3). Η μέθοδος δοκιμών BCOP κρίνεται, συνεπώς, εφαρμόσιμη στον έλεγχο τόσο ουσιών όσο και μειγμάτων.

Η μέθοδος δοκιμών BCOP δεν συνιστάται για τον προσδιορισμό υπό δοκιμή χημικών ουσιών που θα πρέπει να ταξινομηθούν ως ερεθιστικές για τους οφθαλμούς (κατηγορία 2 ή 2A του GHS των Ηνωμένων Εθνών) ή ως ήπια ερεθιστικές για τους οφθαλμούς (κατηγορία 2B του GHS των Ηνωμένων Εθνών), λόγω του σημαντικού αριθμού χημικών ουσιών της κατηγορίας 1 του GHS των Ηνωμένων Εθνών που υποταξινομούνται ως κατηγορίας 2, 2A ή 2B και χημικών ουσιών «καμίας κατηγορίας» του GHS των Ηνωμένων Εθνών που υπερταξινομούνται ως κατηγορίας 2, 2A ή 2B (2)(3). Για τον σκοπό αυτό, ενδέχεται να απαιτούνται περαιτέρω δοκιμές με άλλη κατάλληλη μέθοδο.

Όλες οι διαδικασίες με βόειους οφθαλμούς και κερατοειδείς θα πρέπει να είναι σύμφωνες προς τους κανονισμούς και τις διαδικασίες που εφαρμόζονται στην εγκατάσταση δοκιμών για τον χειρισμό υλικών ζωικής προέλευσης, συμπεριλαμβανομένων, μεταξύ άλλων, των ιστών και ιστικών υγρών. Συνιστάται η τήρηση των γενικών εργαστηριακών προφυλάξεων (11).

Στη μέθοδο δοκιμών BCOP δεν λαμβάνονται υπόψη οι κακώσεις του επιπεφυκότος και της ίριδας, αλλά εξετάζονται οι επιδράσεις στον κερατοειδή, που είναι ο μείζων παράγων ταξινόμησης in vivo όσον αφορά το GHS των Ηνωμένων Εθνών. Ο αναστρέψιμος χαρακτήρας των βλαβών του κερατοειδούς δεν μπορεί να αξιολογηθεί αυτοτελώς στη μέθοδο δοκιμών BCOP. Έχει προταθεί ως δυνατότητα, βάσει των οφθαλμικών μελετών σε κουνέλια, η χρήση της αξιολόγησης του αρχικού βάθους της κάκωσης του κερατοειδούς για τον εντοπισμό ορισμένων τύπων μη αναστρέψιμων επιδράσεων (12). Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω επιστημονικές γνώσεις για να γίνει κατανοητός ο τρόπος με τον οποίο επέρχονται μη αναστρέψιμες επιδράσεις που δεν συνδέονται με μια αρχική σοβαρή βλάβη. Τέλος, η μέθοδος δοκιμών BCOP δεν καθιστά εφικτή την αξιολόγηση του δυναμικού συστημικής τοξικότητας που συνδέεται με την έκθεση των οφθαλμών.

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών θα επικαιροποιείται ανά διαστήματα με βάση τις νέες πληροφορίες και τα δεδομένα. Για παράδειγμα, μια ιστοπαθολογική εξέταση ενδέχεται να είναι χρήσιμη όταν απαιτείται πληρέστερος χαρακτηρισμός της βλάβης του κερατοειδούς. Όπως επισημαίνεται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 160 του ΟΟΣΑ (13), συνιστάται στους χρήστες να φυλάσσουν τους κερατοειδείς και να ετοιμάζουν δείγματα ιστοπαθολογικής εξέτασης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη βάσης δεδομένων και κριτηρίων λήψης αποφάσεων που θα μπορούσαν να βελτιώσουν περαιτέρω την ορθότητα της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Τα εργαστήρια που εφαρμόζουν για πρώτη φορά την παρούσα μέθοδο δοκιμών θα πρέπει να χρησιμοποιούν τις χημικές ουσίες ελέγχου ικανότητας που προβλέπονται στο προσάρτημα 3. Τα εργαστήρια μπορούν να χρησιμοποιούν αυτές τις χημικές ουσίες για να αποδεικνύουν την τεχνική ικανότητά τους όσον αφορά την εφαρμογή της μεθόδου δοκιμών BCOP πριν από την υποβολή δεδομένων που έχουν προκύψει από αυτή για την ταξινόμηση των κινδύνων στο πλαίσιο κανονιστικών ρυθμίσεων.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η μέθοδος δοκιμών BCOP είναι οργανοτυπικό μοντέλο που εξασφαλίζει βραχυχρόνια διατήρηση της κανονικής φυσιολογικής και βιοχημικής λειτουργίας του βόειου κερατοειδούς in vitro. Στη συγκεκριμένη μέθοδο δοκιμών, η βλάβη που προκαλείται από την υπό δοκιμή χημική ουσία αξιολογείται με ποσοτικές μετρήσεις των μεταβολών της αδιαφάνειας και της διαπερατότητας του κερατοειδούς, με τη χρήση αδιαφανομέτρου και φασματοφωτομέτρου ορατού φωτός, αντιστοίχως. Αμφότερες οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της IVIS, η οποία χρησιμοποιείται για την κατάταξη σε κατηγορία ταξινόμησης κινδύνου ερεθιστικότητας in vitro, με σκοπό την πρόβλεψη του δυναμικού οφθαλμικού ερεθισμού in vivo που ενέχει η υπό δοκιμή χημική ουσία (βλ. κριτήρια λήψης αποφάσεων στην παράγραφο 48).

Στη μέθοδο δοκιμών BCOP χρησιμοποιούνται κερατοειδείς που απομονώνονται από τους οφθαλμούς προσφάτως σφαχθέντων βοοειδών. Η κερατοειδική αδιαφάνεια μετράται ποσοτικά ως η ποσότητα φωτός που διέρχεται μέσω του κερατοειδούς. Η διαπερατότητα μετράται ποσοτικά ως η ποσότητα χρωστικής νατριούχου φλουορεσκεΐνης που διέρχεται από το πλήρες πάχος του κερατοειδούς, όπως ανιχνεύεται στο θρεπτικό μέσο του οπίσθιου θαλάμου. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες εφαρμόζονται στην επιθηλιακή επιφάνεια του κερατοειδούς με

▼M7

προσθήκη στον εμπρόσθιο θάλαμο της διάταξης συγκράτησης του κερατοειδούς. Στο προσάρτημα 4 παρατίθεται περιγραφή και διάγραμμα διάταξης συγκράτησης κερατοειδούς που χρησιμοποιείται στη μέθοδο δοκιμών BCOP. Οι διατάξεις συγκράτησης κερατοειδούς κυκλοφορούν στο εμπόριο ή κατασκευάζονται κατά παραγγελία.

Προέλευση και ηλικία των οφθαλμών βοοειδών και επιλογή ζωικού είδους

Τα βοοειδή που αποστέλλονται στα σφαγεία θανατώνονται συνήθως για κατανάλωση από τον άνθρωπο ή για άλλες εμπορικές χρήσεις. Οι κερατοειδείς που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο δοκιμών BCOP προέρχονται μόνο από υγιή ζώα που θεωρούνται κατάλληλα για είσοδο στην ανθρώπινη τροφική αλυσίδα. Δεδομένου ότι το βάρος των βοοειδών ποικίλλει ανάλογα με τη φυλή, την ηλικία και το φύλο, δεν υπάρχει συνιστώμενο βάρος του ζώου κατά τη σφαγή.

Όταν χρησιμοποιούνται οφθαλμοί ζώων διαφορετικών ηλικιών ενδέχεται να προκύψουν διακυμάνσεις των διαστάσεων του κερατοειδούς. Κερατοειδείς με οριζόντια διάμετρο > 30,5 mm και κεντρικό πάχος (CCT) ≥ 1100 μm λαμβάνονται γενικά από βοοειδή ηλικίας άνω των οκτώ ετών, ενώ κερατοειδείς με οριζόντια διάμετρο < 28,5 mm και CCT < 900 μm από βοοειδή ηλικίας κάτω των πέντε ετών (14). Για τον λόγο αυτό, συνήθως δεν χρησιμοποιούνται οφθαλμοί βοοειδών ηλικίας άνω των 60 μηνών. Κατά παράδοση δεν χρησιμοποιούνται ούτε οφθαλμοί βοοειδών ηλικίας κάτω των 12 μηνών, διότι αυτοί δεν έχουν αναπτυχθεί πλήρως και το πάχος και η διάμετρος του κερατοειδούς υπολείπονται σημαντικά των τιμών που αναφέρονται για οφθαλμούς ενήλικων βοοειδών. Εντούτοις, επιτρέπεται η χρήση κερατοειδών νεαρών ζώων (δηλ. ηλικίας 6 έως 12 μηνών), επειδή παρουσιάζει ορισμένα πλεονεκτήματα, όπως η αυξημένη διαθεσιμότητα, το περιορισμένο ηλικιακό εύρος και οι μειωμένοι κίνδυνοι πιθανής έκθεσης των εργαζομένων στη σπογγώδη εγκεφαλοπάθεια των βοοειδών (15). Δεδομένου ότι θα είναι χρήσιμη η περαιτέρω αξιολόγηση της επίδρασης του μεγέθους ή του πάχους του κερατοειδούς στην αποκρισιμότητα σε διαβρωτικές και ερεθιστικές χημικές ουσίες, συνιστάται στους χρήστες να αναφέρουν την εκτιμώμενη ηλικία και/ή το βάρος των ζώων από τα οποία προέρχονται οι κερατοειδείς που χρησιμοποιούνται στις μελέτες.

Συλλογή και μεταφορά των οφθαλμών στο εργαστήριο

Οι οφθαλμοί συλλέγονται από υπαλλήλους των σφαγείων. Για την αποτροπή μηχανικών και άλλου είδους βλαβών στους οφθαλμούς, οι τελευταίοι θα πρέπει να εξορύσσονται το ταχύτερο δυνατό μετά τον θάνατο του ζώου και να ψύχονται αμέσως μετά την εξόρυξή τους και κατά τη μεταφορά. Για την αποφυγή έκθεσης των οφθαλμών σε πιθανώς ερεθιστικές χημικές ουσίες, οι υπάλληλοι των σφαγείων δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούν απορρυπαντικά κατά την έκπλυση της κεφαλής των ζώων.

Οι οφθαλμοί θα πρέπει να εμβαπτίζονται τελείως σε ψυχρό αλατούχο διάλυμα Hanks (Hanks' Balanced Salt Solution/HBSS) εντός δοχείου κατάλληλου μεγέθους και να μεταφέρονται στο εργαστήριο κατά τρόπο ώστε να ελαχιστοποιείται η φθορά και/ή η βακτηριακή μόλυνση. Επειδή οι οφθαλμοί συλλέγονται κατά τη διαδικασία σφαγής, ενδέχεται να εκτεθούν σε αίμα και άλλα βιολογικά υλικά, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων και άλλων μικροοργανισμών. Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να διασφαλίζεται η ελαχιστοποίηση του κινδύνου μόλυνσης (π.χ. με τη διατήρηση του δοχείου που περιέχει τους οφθαλμούς σε υγρό πάγο κατά τη συλλογή και μεταφορά και με την προσθήκη αντιβιοτικών στο διάλυμα HBSS που χρησιμοποιείται για τη φύλαξη των οφθαλμών κατά τη μεταφορά [π.χ. 100 IU πενικιλίνης/mL και 100 μg στρεπτομυκίνης/mL])

Το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ της συλλογής των οφθαλμών και της χρήσης των κερατοειδών στη μέθοδο δοκιμών BCOP θα πρέπει να είναι το μικρότερο δυνατόν (συνήθως συλλογή και χρήση την ίδια ημέρα) και θα πρέπει να αποδεικνύεται ότι δεν υπονομεύει τα αποτελέσματα της δοκιμής. Τα αποτελέσματα αυτά βασίζονται στα κριτήρια επιλογής των οφθαλμών, καθώς και στις αποκρίσεις των θετικών και των αρνητικών μαρτύρων. Όλοι οι οφθαλμοί που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή θα πρέπει να προέρχονται από την ίδια ομάδα οφθαλμών που συλλέχθηκαν συγκεκριμένη ημέρα.

Κριτήρια επιλογής των οφθαλμών που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο δοκιμών BCOP

Μόλις οι οφθαλμοί φτάσουν στο εργαστήριο, εξετάζονται προσεκτικά για ελαττώματα όπως αυξημένη αδιαφάνεια, αμυχές και νεοαγγείωση. Πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο κερατοειδείς χωρίς ελαττώματα αυτού του είδους.

▼M7

Η ποιότητα κάθε κερατοειδούς αξιολογείται και σε μεταγενέστερα στάδια της δοκιμής. Οι κερατοειδείς με αδιαφάνεια μεγαλύτερη από επτά μονάδες αδιαφάνειας ή ισοδύναμη για τα χρησιμοποιούμενα αδιαφανόμετρα και διατάξεις συγκράτησης κερατοειδούς, μετά από μια αρχική περίοδο εξισορρόπησης μίας ώρας, πρέπει να απορρίπτονται (*ΣΗΜΕΙΩΣΗ:* το αδιαφανόμετρο θα πρέπει να βαθμονομείται με τα πρότυπα αδιαφάνειας που χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό των μονάδων αδιαφάνειας, βλ. προσάρτημα 4).

Κάθε ομάδα μεταχείρισης (υπό δοκιμή χημική ουσία, παράλληλοι αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες) αποτελείται από τουλάχιστον τρεις οφθαλμούς. Στη μέθοδο δοκιμών BCOP, για τους αρνητικούς μάρτυρες θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τρεις κερατοειδείς. Δεδομένου ότι όλοι οι κερατοειδείς εκτέμνονται από τον πλήρη βολβό και στερεώνονται στους θαλάμους της διάταξης συγκράτησης κερατοειδούς, υπάρχει το ενδεχόμενο να προκύψουν τεχνητά σφάλματα αδιαφάνειας και διαπερατότητας για τους επιμέρους κερατοειδείς (συμπεριλαμβανομένου του αρνητικού μάρτυρα), λόγω του χειρισμού. Επιπλέον, στους υπολογισμούς της IVIS, οι τιμές αδιαφάνειας και διαπερατότητας που λαμβάνονται για τους κερατοειδείς οι οποίοι αποτελούν τους αρνητικούς μάρτυρες χρησιμοποιούνται για τη διόρθωση των τιμών αδιαφάνειας και διαπερατότητας των κερατοειδών που υποβάλλονται σε μεταχείριση με την υπό δοκιμή χημική ουσία και τον θετικό μάρτυρα.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Προετοιμασία των οφθαλμών

Κερατοειδείς χιτώνες χωρίς ελαττώματα ανατέμνονται κατά τρόπο ώστε να παραμένει δακτύλιος σκληρού χιτώνα 2 έως 3 mm με σκοπό τη διευκόλυνση του μετέπειτα χειρισμού, λαμβανομένης μέριμνας για την αποφυγή φθορών στο κερατοειδικό επιθήλιο και ενδοθήλιο. Οι απομονωθέντες κερατοειδείς στερεώνονται σε ειδικές διατάξεις συγκράτησης κερατοειδούς που αποτελούνται από εμπρόσθιο και οπίσθιο διαμέρισμα, τα οποία εφάπτονται με το επιθήλιο και το ενδοθήλιο του κερατοειδούς, αντιστοίχως. Αμφότεροι οι θάλαμοι πληρούται μέχρι υπερχείλισης με προθερμασμένο θρεπτικό μέσο ελάχιστων τροφικών απαιτήσεων του Eagle χωρίς ερυθρό της φαινόλης (Eagle's Minimum Essential Medium/EMEM) (πρώτα ο οπίσθιος θάλαμος), με τρόπο που εξασφαλίζει ότι δεν σχηματίζονται φυσαλίδες. Η διάταξη αφήνεται εν συνεχεία να σταθεροποιηθεί στους 32 ± 1 °C για τουλάχιστον μία ώρα, ούτως ώστε να εξισορροπηθεί η θερμοκρασία των κερατοειδών με τη θερμοκρασία του θρεπτικού μέσου και να επιτευχθεί, στο μέτρο του δυνατού, φυσιολογική μεταβολική δραστηριότητα (η θερμοκρασία της επιφάνειας του κερατοειδούς in vivo είναι κατά προσέγγιση 32 °C).

Μετά την παρέλευση του διαστήματος εξισορρόπησης, προστίθεται πρόσφατα παρασκευασμένο προθερμασμένο EMEM χωρίς ερυθρό της φαινόλης σε αμφότερους τους θαλάμους και σημειώνονται οι τιμές γραμμής βάσης της αδιαφάνειας για κάθε κερατοειδή. Οι κερατοειδείς που εμφανίζουν μακροσκοπικές βλάβες ιστού (π.χ. αμυχές, μελάγχρωση, νεοαγγείωση) ή αδιαφάνεια μεγαλύτερη από επτά μονάδες αδιαφάνειας, ή ισοδύναμη για τα χρησιμοποιούμενα αδιαφανόμετρα και διατάξεις συγκράτησης κερατοειδούς, απορρίπτονται. Τουλάχιστον τρεις κερατοειδείς επιλέγονται ως αρνητικοί μάρτυρες (ή μάρτυρες με διαλύτη). Οι εναπομένοντες κερατοειδείς κατανέμονται στη συνέχεια σε ομάδες μεταχείρισης ή θετικών μαρτύρων.

Επειδή η θερμοχωρητικότητα του νερού είναι υψηλότερη από του αέρα, το νερό παρέχει πιο σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας για επώαση. Κατά συνέπεια, για τη διατήρηση της διάταξης συγκράτησης κερατοειδούς και του περιεχομένου της σε θερμοκρασία 32 ± 1 °C συνιστάται η χρήση υδατόλουτρου. Εντούτοις, μπορούν να χρησιμοποιούνται και επωαστήρες αέρα, με προφυλάξεις για τη διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας (π.χ. με προθέρμανση των διατάξεων συγκράτησης και των θρεπτικών μέσων).

Εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας

Χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικά πρωτόκολλα μεταχείρισης, ένα για υγρά και επιφανειοδραστικές ουσίες (στερεές ή υγρές) και ένα για μη επιφανειοδραστικά στερεά.

Τα υγρά υποβάλλονται στη δοκιμή χωρίς αραίωση. Τα ημιστερεά, οι κρέμες και οι κηροί υποβάλλονται κατά κανόνα στη δοκιμή ως υγρά. Οι αμιγείς επιφανειοδραστικές ουσίες υποβάλλονται στη δοκιμή σε συγκέντρωση 10 % (κ.β.) σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου 0,9 %, απεσταγμένο νερό ή άλλο διαλύτη, για τον οποίο έχει αποδειχθεί ότι δεν έχει δυσμενείς επιδράσεις στο σύστημα δοκιμής. Για διαφορετικές αραιώσεις πρέπει να παρέχεται κατάλληλη αιτιολόγηση.

▼M7

Τα μείγματα που περιέχουν επιφανειοδραστικές ουσίες μπορούν να υποβάλλονται σε δοκιμή αναραίωτα ή αραιωμένα σε κατάλληλη συγκέντρωση ανάλογα με τα αντίστοιχα σενάρια έκθεσης in vivo. Θα πρέπει να παρέχεται κατάλληλη αιτιολόγηση για την υπό δοκιμή αραίωση. Οι κερατοειδείς εκτίθενται στα υγρά και στα επιφανειοδραστικά επί 10 λεπτά. Σε περίπτωση διαφορετικής διάρκειας έκθεσης, πρέπει να παρέχεται κατάλληλη επιστημονική αιτιολόγηση. Βλ. προσάρτημα 1 για ορισμό των επιφανειοδραστικών ουσιών και των μειγμάτων που περιέχουν επιφανειοδραστικές ουσίες.

Τα μη επιφανειοδραστικά στερεά υποβάλλονται κατά κανόνα στη δοκιμή ως διαλύματα ή εναιωρήματα σε συγκέντρωση 20 % (κ.β.) σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου 0,9 %, απεσταγμένο νερό ή άλλο διαλύτη, για τον οποίο έχει αποδειχθεί ότι δεν έχει δυσμενείς επιδράσεις στο σύστημα δοκιμής. Υπό ορισμένες περιστάσεις και με την κατάλληλη επιστημονική αιτιολόγηση, τα στερεά επιτρέπεται να υποβάλλονται στη δοκιμή και ως έχουν, με απευθείας εφαρμογή στην επιφάνεια του κερατοειδούς με τη μέθοδο του ανοικτού θαλάμου (βλ. παράγραφο 32). Οι κερατοειδείς εκτίθενται στα στερεά επί τέσσερις ώρες, αλλά, όπως και στην περίπτωση των υγρών και των επιφανειοδραστικών ουσιών, επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται διαφορετικά διαστήματα έκθεσης κατόπιν κατάλληλης επιστημονικής αιτιολόγησης.

Είναι δυνατόν να χρησιμοποιούνται διαφορετικές μέθοδοι μεταχείρισης, ανάλογα με τη φυσική μορφή και τα χημικά χαρακτηριστικά της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (π.χ. στερεά, υγρά, παχύρευστα έναντι μη παχύρευστων υγρών). Ο κρίσιμος παράγοντας είναι να εξασφαλίζεται ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία καλύπτει επαρκώς την επιφάνεια του επιθηλίου και ότι απομακρύνεται ικανοποιητικά κατά την έκπλυση. Για μη παχύρευστες έως ελαφρώς παχύρευστες υπό δοκιμή χημικές ουσίες χρησιμοποιείται συνήθως μέθοδος κλειστού θαλάμου, ενώ για ημιπαχύρευστες και παχύρευστες, καθώς και για τα στερεά ως έχουν χρησιμοποιείται κατά κανόνα μέθοδος ανοικτού θαλάμου.

Στη μέθοδο κλειστού θαλάμου, ποσότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που επαρκεί για την κάλυψη του επιθηλίου του κερατοειδούς (750 μl), εισάγεται στον εμπρόσθιο θάλαμο μέσω των δοσιμετρικών οπών στην επάνω επιφάνειά του και, εν συνεχεία, οι οπές σφραγίζονται με τα πώματα του θαλάμου καθ' όλη τη διάρκεια της έκθεσης. Είναι σημαντικό να διασφαλίζεται η έκθεση κάθε κερατοειδούς στην υπό δοκιμή χημική ουσία για το ενδεδειγμένο χρονικό διάστημα.

Στη μέθοδο ανοικτού θαλάμου, πριν από τη μεταχείριση αφαιρούνται από τον εμπρόσθιο θάλαμο ο δακτύλιος ασφάλισης της θυρίδας και η γυάλινη θυρίδα. Ο μάρτυρας ή η υπό δοκιμή χημική ουσία (750 μl ή ποσότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που επαρκεί για την πλήρη κάλυψη του κερατοειδούς) εφαρμόζεται απευθείας στην επιφάνεια του επιθηλίου του κερατοειδούς με τη βοήθεια μικροσιφωνίου. Εάν είναι δύσκολο να αναρροφηθεί η υπό δοκιμή χημική ουσία, μπορεί να εισαχθεί υπό πίεση σε σιφώνιο θετικής εκτόπισης για να διευκολυνθεί η δοσιμέτρηση. Το ρύγχος του σιφωνίου θετικής εκτόπισης εισάγεται στο άκρο έκχυσης της σύριγγας κατά τρόπο ώστε το υλικό να φέρεται υπό πίεση στο ρύγχος εκτόπισης. Ταυτοχρόνως, πιέζεται το έμβολο της σύριγγας ενόσω το έμβολο του σιφωνίου έλκεται προς τα επάνω. Εάν εμφανιστούν φυσαλίδες αέρα στο ρύγχος του σιφωνίου, η υπό δοκιμή ουσία απομακρύνεται (εξωθείται) και η διαδικασία επαναλαμβάνεται έως ότου το ρύγχος πληρωθεί χωρίς να σχηματίζονται φυσαλίδες αέρα. Εάν χρειαστεί, μπορεί να χρησιμοποιηθεί συνήθης σύριγγα (χωρίς βελόνα), η οποία επιτρέπει τη μέτρηση επακριβούς όγκου της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και την ευκολότερη εφαρμογή στο επιθήλιο του κερατοειδούς. Μετά τη δοσιμέτρηση, η γυάλινη θυρίδα επανατοποθετείται στον εμπρόσθιο θάλαμο για να δημιουργηθεί εκ νέου κλειστό σύστημα.

Επώαση μετά την έκθεση

Μετά την παρέλευση του διαστήματος έκθεσης, η υπό δοκιμή χημική ουσία, ο αρνητικός μάρτυρας ή ο θετικός μάρτυρας απομακρύνεται από τον εμπρόσθιο θάλαμο και το επιθήλιο εκπλένεται τουλάχιστον τρεις φορές (ή έως ότου πάψουν να παρατηρούνται οπτικές ενδείξεις παρουσίας της υπό δοκιμή ουσίας) με ΕΜΕΜ (που περιέχει ερυθρό της φαινόλης). Για την έκπλυση χρησιμοποιείται θρεπτικό μέσο που περιέχει ερυθρό της φαινόλης, διότι η αλλαγή του χρώματος του ερυθρού της φαινόλης δείχνει την αποτελεσματικότητα της έκπλυσης όξινων ή αλκαλικών υπό δοκιμή χημικών ουσιών. Οι κερατοειδείς εκπλένονται περισσότερες από τρεις φορές εάν το ερυθρό της φαινόλης εξακολουθεί να αποχρωματίζεται (προς κίτρινο ή ιώδες) ή εάν παραμένει ορατή η υπό δοκιμή χημική ουσία. Όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία απομακρυνθεί πλήρως από το θρεπτικό

▼M7

μέσο, οι κερατοειδείς υποβάλλονται σε τελική έκπλυση με EMEM (χωρίς ερυθρό της φαινόλης). Το EMEM (χωρίς ερυθρό της φαινόλης) χρησιμοποιείται ως διάλυμα τελικής έκπλυσης ούτως ώστε να διασφαλίζεται η απομάκρυνση του ερυθρού της φαινόλης από τον εμπρόσθιο θάλαμο πριν από τη μέτρηση της αδιαφάνειας. Στη συνέχεια, ο εμπρόσθιος θάλαμος πληρώνεται εκ νέου με φρέσκο EMEM που δεν περιέχει ερυθρό της φαινόλης.

Όσον αφορά τα υγρά και τις επιφανειοδραστικές ουσίες, μετά την έκπλυσή τους οι κερατοειδείς επωάζονται για δύο επιπλέον ώρες στους 32 ± 1 °C. Σε ορισμένες περιπτώσεις ενδέχεται να είναι σκόπιμη η παράταση της επώασης μετά την έκθεση, κάτι το οποίο κρίνεται κατά περίπτωση. Οι κερατοειδείς που υποβάλλονται σε μεταχείριση με στερεά εκπλένονται σχολαστικά στο τέλος του τετράωρου διαστήματος έκθεσης, αλλά δεν απαιτείται περαιτέρω επώαση.

Στο τέλος του διαστήματος επώασης μετά την έκθεση σε υγρά και επιφανειοδραστικά και στο τέλος του τετράωρου διαστήματος έκθεσης σε μη επιφανειοδραστικά στερεά, καταγράφεται η αδιαφάνεια και η διαπερατότητα κάθε κερατοειδούς. Επίσης, κάθε κερατοειδής εξετάζεται οπτικά και καταγράφονται οι σχετικές με τη δοκιμή παρατηρήσεις (π.χ. απογύμνωση ιστού, κατάλοιπα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, ανομοιογενής αδιαφάνεια). Οι παρατηρήσεις αυτές είναι πιθανότατα σημαντικές καθώς ενδέχεται να αντικατοπτρίζονται στις διακυμάνσεις των ενδείξεων του αδιαφανομέτρου.

Χημικές ουσίες που χρησιμεύουν ως μάρτυρες

Σε κάθε πείραμα περιλαμβάνονται παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες ή μάρτυρες με διαλύτη/φορέα και θετικοί μάρτυρες.

Κατά τον έλεγχο υγρής ουσίας χωρίς αραίωση, στη μέθοδο δοκιμών BCOP περιλαμβάνεται παράλληλος αρνητικός μάρτυρας (π.χ. διάλυμα χλωριούχου νατρίου 0,9 % ή απεσταγμένο νερό), ούτως ώστε να ανιχνεύονται μη ειδικές αλλαγές στο σύστημα δοκιμής και να παρέχεται γραμμή βάσης για τα τελικά σημεία της δοκιμής. Κατά τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται επίσης ότι οι συνθήκες δοκιμής δεν προκαλούν άτοπη απόκριση ερεθισμού.

Κατά τον έλεγχο αραιωμένου υγρού, επιφανειοδραστικής ουσίας ή στερεού, στη μέθοδο δοκιμών BCOP περιλαμβάνεται παράλληλη ομάδα-μάρτυρας με διαλύτη/φορέα, ούτως ώστε να ανιχνεύονται μη ειδικές αλλαγές στο σύστημα δοκιμής και να παρέχεται γραμμή βάσης για τα τελικά σημεία της δοκιμής. Μπορεί να χρησιμοποιείται μόνο διαλύτης/φορέας για τον οποίο έχει αποδειχθεί ότι δεν έχει δυσμενείς επιδράσεις στο σύστημα δοκιμής.

Σε κάθε πείραμα περιλαμβάνεται ως παράλληλος θετικός μάρτυρας μια χημική ουσία που είναι γνωστό ότι επάγει θετική απόκριση, για να επαληθεύεται η ακεραιότητα του συστήματος δοκιμής και η ορθή συμπεριφορά του. Για να διασφαλίζεται, ωστόσο, η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας της απόκρισης του θετικού μάρτυρα σε συνάρτηση με τον χρόνο, το μέγεθος της απόκρισης ερεθισμού δεν θα πρέπει να είναι υπερβολικό.

Παραδείγματα θετικών μαρτύρων για υγρές υπό δοκιμή χημικές ουσίες είναι 100 % αιθανόλη ή 100 % διμεθυλοφορμαμίδιο. Παράδειγμα θετικού μάρτυρα για στερεές υπό δοκιμή χημικές ουσίες είναι το διάλυμα ιμιδαζολίου 20 % (κ.β.) σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου 0,9 %.

Οι χημικές ουσίες συγκριτικής αξιολόγησης είναι χρήσιμες για την αξιολόγηση του δυναμικού οφθαλμικής ερεθιστικότητας άγνωστων χημικών ουσιών συγκεκριμένης χημικής τάξης ή κατηγορίας προϊόντων ή για την αξιολόγηση του σχετικού δυναμικού ερεθιστικότητας ενός ερεθιστικού των οφθαλμών εντός συγκεκριμένου εύρους αποκρίσεων ερεθισμού.

Μετρούμενα τελικά σημεία

Η αδιαφάνεια προσδιορίζεται από την ποσότητα φωτός που διέρχεται μέσω του κερατοειδούς. Η αδιαφάνεια του κερατοειδούς μετράται ποσοτικά με τη χρήση αδιαφανομέτρου, με το οποίο λαμβάνονται τιμές αδιαφάνειας μετρούμενες σε συνεχή κλίμακα.

Η διαπερατότητα προσδιορίζεται από την ποσότητα χρωστικής νατριούχου φλουορεσκεΐνης που διαπερνά όλες τις κυτταρικές στιβάδες του κερατοειδούς (δηλ. από το επιθήλιο στην εξωτερική επιφάνεια του κερατοειδούς έως το ενδοθήλιο στην εσωτερική επιφάνειά του). Στον εμπρόσθιο θάλαμο της διάταξης συγκράτησης κερατοειδούς, ο οποίος βρίσκεται σε επαφή με το επιθήλιο του κερατοειδούς, προστίθεται 1 ml διαλύματος νατριούχου φλουορεσκεΐνης (4 ή 5 mg/ml κατά τον έλεγχο υγρών και επιφανειοδραστικών ουσιών ή μη επιφανειοδραστικών στερεών, αντιστοίχως), ενώ ο οπίσθιος θάλαμος, που βρίσκεται σε

▼M7

επαφή με το ενδοθήλιο του κερατοειδούς, πληρούται με πρόσφατα παρασκευασμένο EMEM. Η διάταξη συγκράτησης επωάζεται εν συνεχεία σε οριζόντια θέση επί 90 ± 5 min σε θερμοκρασία 32 ± 1 °C. Η ποσότητα νατριούχου φλουορεσκεΐνης που εισέρχεται στον οπίσθιο θάλαμο μετράται ποσοτικά με φασματοφωτομετρία ορατού/υπεριώδους. Οι φασματοφωτομετρικές μετρήσεις που λαμβάνονται στα 490 nm καταγράφονται ως τιμές οπτικής πυκνότητας (OD_{490}) ή απορρόφησης, μετρούμενες σε συνεχή κλίμακα. Οι τιμές διαπερατότητας για τη φλουορεσκεΐνη προσδιορίζονται βάσει των τιμών OD_{490} που λαμβάνονται με φασματοφωτόμετρο ορατού φωτός με πρότυπο μήκος διαδρομής 1 cm.

Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί συσκευή ανάγνωσης πλακών μικροτιτλοδότησης 96 μικροκοιλοτήτων, υπό τον όρο ότι i) μπορεί να εξακριβωθεί η κλίμακα γραμμικότητας της συσκευής ανάγνωσης πλακών για τον προσδιορισμό τιμών OD_{490} για τη φλουορεσκεΐνη· και ii) χρησιμοποιείται ο ορθός όγκος δειγμάτων φλουορεσκεΐνης στην πλάκα 96 μικροκοιλοτήτων για την επίτευξη τιμών OD_{490} ισοδύναμων με το πρότυπο μήκος διαδρομής 1 cm [αυτό απαιτεί ενδεχομένως εντελώς πλήρεις μικροκοιλότητες (συνήθως 360 μL)].

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αξιολόγηση των δεδομένων

Μετά τη διόρθωση των τιμών αδιαφάνειας και μέσης διαπερατότητας (OD_{490}) για να ληφθούν υπόψη η αδιαφάνεια υποβάθρου και οι τιμές διαπερατότητας OD_{490} που αντιστοιχούν στον αρνητικό μάρτυρα, οι μέσες τιμές αδιαφάνειας και διαπερατότητας OD_{490} για κάθε ομάδα μεταχείρισης θα πρέπει να συνδυάζονται σε εμπειρικό τύπο για τον υπολογισμό της βαθμολογίας ερεθιστικότητας in vitro (IVIS) για κάθε ομάδα μεταχείρισης, ως εξής:

IVIS = μέση τιμή αδιαφάνειας + (15 × μέση τιμή διαπερατότητας OD_{490})

Οι Sina et al. (16) αναφέρουν ότι ο συγκεκριμένος τύπος προέκυψε στο πλαίσιο ενδοεργαστηριακών και διεργαστηριακών μελετών. Τα δεδομένα που προέκυψαν για μια σειρά 36 ενώσεων στο πλαίσιο πολυεργαστηριακής μελέτης υποβλήθηκαν σε πολυμεταβλητή ανάλυση για τον καθορισμό της εξίσωσης βέλτιστης προσαρμογής δεδομένων in vivo και in vitro. Η ανάλυση αυτή διενεργήθηκε από επιστήμονες δύο διαφορετικών εταιρειών, οι οποίοι κατέληξαν σε σχεδόν ταυτόσημες εξισώσεις.

Οι τιμές αδιαφάνειας και διαπερατότητας θα πρέπει επίσης να αξιολογούνται χωριστά, ούτως ώστε να διαπιστώνεται αν η υπό δοκιμή χημική ουσία προκαλεί διαβρωτικότητα ή σοβαρό ερεθισμό μέσω ενός μόνο από τα δύο τελικά σημεία (βλ. κριτήρια απόφασης).

Κριτήρια απόφασης

Οι τιμές αποκοπής (cut-off values) IVIS για τον χαρακτηρισμό των υπό δοκιμή χημικών ουσιών που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη (κατηγορία 1 του GHS των Ηνωμένων Εθνών) και των υπό δοκιμή χημικών ουσιών για τις οποίες δεν απαιτείται ταξινόμηση ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη («καμίας κατηγορίας» του GHS των Ηνωμένων Εθνών) είναι οι ακόλουθες:

IVIS	GHS των Ηνωμένων Εθνών
≤ 3	Καμία κατηγορία
> 3· ≤ 55	Δεν είναι δυνατόν να γίνει πρόβλεψη
> 55	Κατηγορία 1

Κριτήρια αποδοχής της μελέτης

Μια δοκιμή θεωρείται αποδεκτή εάν για τον θετικό μάρτυρα προκύπτει IVIS που βρίσκεται εντός δύο τυπικών αποκλίσεων από την τρέχουσα ιστορική μέση τιμή, η οποία πρέπει να επικαιροποιείται τουλάχιστον ανά τρίμηνο ή κάθε φορά που εκτελείται αποδεκτή δοκιμή σε εργαστήρια όπου δεν διεξάγονται συχνά δοκιμές (δηλ. με συχνότητα μικρότερη από μία φορά μηνιαίως). Οι αποκρίσεις του αρνητικού μάρτυρα ή του μάρτυρα με διαλύτη/φορέα θα πρέπει να έχουν ως αποτέλεσμα τιμές αδιαφάνειας και διαπερατότητας μικρότερες από τα καθορισμένα ανώτερα όρια τιμών αδιαφάνειας και διαπερατότητας υποβάθρου για

▼M7

βόειους κερατοειδείς που υποβάλλονται σε μεταχείριση με τον αντίστοιχο αρνητικό μάρτυρα ή μάρτυρα με διαλύτη/φορέα. Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες των οποίων η ταξινόμηση δεν επιδέχεται αμφισβήτηση, αρκεί μία μόνο σειρά μετρήσεων (ένας «γύρος»), αποτελούμενη από τρεις τουλάχιστον κερατοειδείς. Ωστόσο, όταν τα αποτελέσματα της πρώτης σειράς μετρήσεων είναι οριακά, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο εκτέλεσης δεύτερης σειράς (χωρίς, ωστόσο, αυτό να είναι υποχρεωτικό) ή ακόμη και τρίτης, σε περίπτωση ασυμφωνίας μεταξύ των μέσων τιμών IVIS των δύο πρώτων σειρών μετρήσεων. Στο πλαίσιο αυτό, ένα αποτέλεσμα πρώτης σειράς μετρήσεων θεωρείται οριακό, εάν οι προβλέψεις από τους 3 κερατοειδείς δεν συμφωνούν μεταξύ τους, με αποτέλεσμα:

— οι 2 από τους 3 κερατοειδείς να οδηγούν σε προβλέψεις που δεν συμφωνούν με τον μέσο όρο των τριών κερατοειδών, Ή

— ο 1 από τους 3 κερατοειδείς να οδηγεί σε πρόβλεψη που δεν συμφωνεί με τον μέσο όρο των τριών κερατοειδών ΚΑΙ το αποκλίνον αποτέλεσμα υπερβαίνει το όριο αποκοπής των 55 μονάδων κατά περισσότερο από 10 μονάδες IVIS.

— Εάν η επαναληπτική σειρά μετρήσεων επιβεβαιώσει την πρόβλεψη της αρχικής σειράς (με βάση τη μέση τιμή IVIS), η τελική απόφαση μπορεί να ληφθεί χωρίς περαιτέρω δοκιμές. Εάν η επαναληπτική σειρά μετρήσεων οδηγήσει σε διαφορετική πρόβλεψη από αυτήν της αρχικής σειράς (με βάση τη μέση τιμή IVIS), θα πρέπει να διενεργηθεί μια τρίτη και τελική σειρά μετρήσεων για την επίλυση του προβλήματος των ασαφών προβλέψεων και την ταξινόμηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Είναι ενδεχομένως επιτρεπτό να μη διεξάγονται περαιτέρω δοκιμές για ταξινόμηση και επισήμανση, σε περίπτωση που κάποια σειρά μετρήσεων καταλήγει σε πρόβλεψη κατηγορίας 1 του GHS των Ηνωμένων Εθνών.

Έκθεση δοκιμής

Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία, εφόσον αυτά έχουν σημασία για τη διενέργεια της μελέτης:

Υπό δοκιμή χημικές ουσίες και μάρτυρες

— Χημική/-ές ονομασία/-ες, όπως ο συντακτικός τύπος που χρησιμοποιείται από την υπηρεσία Chemical Abstracts Service (CAS), συνοδευόμενη/-ες από άλλες ονομασίες, εάν είναι γνωστές· αριθμός μητρώου CAS (RN), εάν είναι γνωστός·

— καθαρότητα και σύνθεση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας/του μάρτυρα (σε κατά βάρος εκατοστιαία αναλογία), εφόσον τα στοιχεία αυτά είναι διαθέσιμα·

— φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως η φυσική κατάσταση, η πτητικότητα, το pH, η σταθερότητα, η χημική κατηγορία, η υδατοδιαλυτότητα, που έχουν σημασία για τη διενέργεια της μελέτης·

— κατεργασία της υπό δοκιμή χημικής ουσίας/του μάρτυρα πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, κονιοποίηση)·

— σταθερότητα, εφόσον είναι γνωστή.

Πληροφορίες σχετικά με τον χορηγό και την εγκατάσταση δοκιμών

— όνομα και διεύθυνση του χορηγού, της εγκατάστασης δοκιμών και του διευθυντή της μελέτης.

Συνθήκες της μεθόδου δοκιμών

— Χρησιμοποιούμενο αδιαφανόμετρο (π.χ. μοντέλο και προδιαγραφές) και ρυθμίσεις του οργάνου·

— στοιχεία σχετικά με τη βαθμονόμηση των συσκευών που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση της αδιαφάνειας και της διαπερατότητας (π.χ. αδιαφανόμετρο και φασματοφωτόμετρο), για να εξασφαλιστεί η γραμμικότητα των μετρήσεων·

— τύπος των χρησιμοποιούμενων διατάξεων συγκράτησης κερατοειδούς (π.χ. μοντέλο και προδιαγραφές)·

▼M7

— περιγραφή άλλων χρησιμοποιούμενων οργάνων·

— διαδικασία που χρησιμοποιείται για τη διασφάλιση της ακεραιότητας της μεθόδου δοκιμών (δηλ. ορθότητα και αξιοπιστία) με την πάροδο του χρόνου (π.χ. περιοδικές δοκιμές των ουσιών ελέγχου ικανότητας).

Κριτήρια αποδοχής της δοκιμής

— αποδεκτά πεδία τιμών για τους παράλληλους αρνητικούς και θετικούς μάρτυρες βάσει ιστορικών δεδομένων·

— εάν υπάρχει, το αποδεκτό εύρος τιμών για τους παράλληλους μάρτυρες συγκριτικής αξιολόγησης βάσει ιστορικών δεδομένων.

Συλλογή και προετοιμασία των οφθαλμών

— Προσδιορισμός της πηγής των οφθαλμών (δηλ. εγκατάσταση από την οποία συλλέχθηκαν)·

— η διάμετρος του κερατοειδούς ως μέτρο της ηλικίας του ζώου-πηγής και της καταλληλότητας για τη δοκιμή·

— συνθήκες αποθήκευσης και μεταφοράς των οφθαλμών (π.χ. ημερομηνία και ώρα συλλογής των οφθαλμών, χρονικό διάστημα πριν από την έναρξη της δοκιμής, θρεπτικά μέσα και συνθήκες θερμοκρασίας κατά τη μεταφορά και τα τυχόν χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά)·

— προετοιμασία & στερέωση των βόειων κερατοειδών, συμπεριλαμβανομένων δηλώσεων σχετικά με την ποιότητά τους, τη θερμοκρασία των διατάξεων συγκράτησης κερατοειδούς και τα κριτήρια επιλογής των κερατοειδών που χρησιμοποιήθηκαν για τη δοκιμή.

Διαδικασία δοκιμής

— αριθμός επαναλήψεων (replicates)·

— στοιχεία ταυτότητας των χρησιμοποιούμενων αρνητικών και θετικών μαρτύρων (και, κατά περίπτωση, των μαρτύρων με διαλύτη και των μαρτύρων συγκριτικής αξιολόγησης)·

— συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εφαρμογή, χρόνος έκθεσης και χρόνος επώασης μετά την έκθεση·

— περιγραφή των χρησιμοποιούμενων κριτηρίων αξιολόγησης και λήψης αποφάσεων·

— περιγραφή των χρησιμοποιούμενων κριτηρίων αποδοχής της μελέτης·

— περιγραφή τυχόν τροποποιήσεων της διαδικασίας δοκιμής·

— περιγραφή των χρησιμοποιούμενων κριτηρίων απόφασης.

Αποτελέσματα

— παρουσίαση, σε μορφή πίνακα, των δεδομένων από τα επιμέρους δοκίμια (π.χ. τιμές αδιαφάνειας και OD_{490} και βαθμολογία IVIS για την υπό δοκιμή χημική ουσία, για τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες και για τους μάρτυρες συγκριτικής αξιολόγησης [εάν έχουν περιληφθεί], των δεδομένων από πολλαπλά επαναληπτικά πειράματα, ανάλογα με την περίπτωση, καθώς και των μέσων τιμών ± τυπική απόκλιση για κάθε πείραμα)·

— περιγραφή άλλων επιδράσεων που παρατηρήθηκαν.

— συναχθείσα ταξινόμηση in vitro βάσει του GHS των Ηνωμένων Εθνών, κατά περίπτωση.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Συμπέρασμα

▼**M7**

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) ICCVAM (2006). Test Method Evaluation Report — In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.

(2) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. NIH Publication No.10-7553. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm.

(3) OECD (2013). Streamlined Summary Document supporting the Test Guideline 437 for eye irritation/corrosion. Series on Testing and Assessment, No.189, OECD, Paris.

(4) UN (2011). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30 Rev 4, New York and Geneva: Ηνωμένα Έθνη. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html.

(5) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P. και Zuang, V. (2010). A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol. in Vitro* 24:1-9.

(6) ICCVAM (2006). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. Στο: ICCVAM Test Method Evaluation Report — *in vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.

(7) ICCVAM (2010). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. Στο: ICCVAM Test Method Evaluation Report — Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm.

(8) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay — SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).

(9) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An in vitro assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.

(10) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? *Toxicol. in Vitro* 20:78-81.

(11) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: [http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf].

▼**M7**

(12) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

(13) OECD (2011). Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-severe Irritants. Series on Testing and Assessment, Αρ. 160. Εγκρίθηκε στις 25 Οκτωβρίου 2011. Παρίσι: Οργανισμός Οικονομικής Συνεργασίας και Ανάπτυξης.

(14) Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.

(15) Collee, J. and Bradley, R. (1997). BSE: A decade on — Part I. The Lancet 349: 636-641.

(16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., and Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam. Appl. Toxicol.* 26:20-31.

(17) Κεφάλαιο B.5 του παρόντος παραρτήματος, Οξείας μορφής ερεθισμός/διάβρωση των οφθαλμών.

(18) ICCVAM (2006). Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].

(19) OECD (1998). Series on Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring. No. 1: OECD Principles on Good Laboratory Practice (revised in 1997).

Διατίθεται στη διαδικτυακή διεύθυνση: http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en_2649_34381_2346175_1_1_1_1,00.html

▼M7

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ορθότητα: η εγγύτητα της συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί κριτήριο επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών και μια από τις πτυχές της «καταλληλότητας». Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς τη «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας μεθόδου δοκιμών.

Χημική ουσία συγκριτικής αξιολόγησης: χημική ουσία που χρησιμοποιείται ως πρότυπο για σύγκριση με μια υπό δοκιμή χημική ουσία. Οι χημικές ουσίες συγκριτικής αξιολόγησης θα πρέπει να διαθέτουν τις ακόλουθες ιδιότητες: i) σταθερή/-ές και αξιόπιστη/-ες προέλευση/-εις, ii) δομική και λειτουργική ομοιότητα προς τη χημική τάξη των υπό δοκιμή χημικών ουσιών, iii) γνωστά φυσικά/χημικά χαρακτηριστικά, iv) δεδομένα τεκμηρίωσης γνωστών επιδράσεων, και v) γνωστή ισχύ στο εύρος της επιθυμητής απόκρισης.

Ανοδική (bottom-up) προσέγγιση: κλιμακωτή προσέγγιση που χρησιμοποιείται για χημικές ουσίες για τις οποίες υπάρχουν υπόνοιες ότι δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη. Η προσέγγιση αυτή αρχίζει με τον προσδιορισμό των χημικών ουσιών που δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν (αρνητική έκβαση) με βάση άλλες χημικές ουσίες (θετική έκβαση).

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Κερατοειδής: το διαφανές τμήμα του πρόσθιου τμήματος του οφθαλμικού βολβού, το οποίο καλύπτει την ίριδα και την κόρη και επιτρέπει την είσοδο φωτός στο εσωτερικό του οφθαλμού.

Αδιαφάνεια κερατοειδούς: μέτρηση του βαθμού θολερότητας του κερατοειδούς κατόπιν έκθεσης στην υπό δοκιμή ουσία. Η αυξημένη αδιαφάνεια είναι ενδεικτική βλάβης του κερατοειδούς. Η αδιαφάνεια αξιολογείται υποκειμενικά, όπως στην οφθαλμική δοκιμή Draize σε κουνέλια, ή αντικειμενικά με όργανο όπως το «αδιαφανόμετρο».

Διαπερατότητα κερατοειδούς: ποσοτική μέτρηση της βλάβης στο επιθήλιο του κερατοειδούς μέσω προσδιορισμού της ποσότητας χρωστικής νατριούχου φλουορεσκεΐνης που διέρχεται διαμέσου όλων των κυτταρικών στιβάδων του κερατοειδούς.

Οφθαλμικός ερεθισμός: πρόκληση αλλοιώσεων του οφθαλμού, οι οποίες εμφανίζονται μετά την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην εμπρόσθια επιφάνειά του και είναι πλήρως αναστρέψιμες εντός 21 ημερών από την εφαρμογή της ουσίας. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά προς τους όρους «αναστρέψιμες επιδράσεις στους οφθαλμούς» και «κατηγορία 2 του GHS των Ηνωμένων Εθνών» (4).

Ποσοστό ψευδοαρνητικής έκβασης: το ποσοστό του συνόλου των θετικών χημικών ουσιών που εσφαλμένα χαρακτηρίζονται ως αρνητικές με μια μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί έναν από τους δείκτες επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών.

Ποσοστό ψευδοθετικής έκβασης: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών χημικών ουσιών που εσφαλμένα χαρακτηρίζονται ως θετικές με μια μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί έναν από τους δείκτες επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών.

Κίνδυνος: εγγενής ιδιότητα ενός παράγοντα ή μιας κατάστασης που μπορεί να έχει δυσμενείς επιδράσεις όταν οργανισμός, σύστημα ή (υπο)πληθυσμός εκτεθεί στον συγκεκριμένο παράγοντα.

Βαθμολογία ερεθιστικότητας in vitro (In Vitro Irritancy Score/IVIS): εμπειρικός τύπος που χρησιμοποιείται στη μέθοδο δοκιμών BCOP και στον οποίο οι μέσες τιμές αδιαφάνειας και διαπερατότητας για κάθε ομάδα μεταχείρισης συνδυάζονται σε ενιαία βαθμολογία in vitro κάθε ομάδας μεταχείρισης. IVIS = μέση τιμή αδιαφάνειας + (15 × μέση τιμή διαπερατότητας).

Μη αναστρέψιμες επιδράσεις στους οφθαλμούς: Βλ. «Σοβαρή οφθαλμική βλάβη».

▼M7

Μείγμα: ένα μείγμα ή διάλυμα που αποτελείται από δύο ή περισσότερες ουσίες οι οποίες δεν αντιδρούν μέσα σε αυτό (4).

Αρνητικός μάρτυρας: δείγμα επανάληψης (replicate) που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και δεν υποβάλλεται σε μεταχείριση. Το δείγμα αυτό εξετάζεται μαζί με τα δείγματα που έχουν υποβληθεί σε μεταχείριση με την υπό δοκιμή χημική ουσία και με άλλα δείγματα-μάρτυρες, ούτως ώστε να διαπιστώνεται αν ο διαλύτης αλληλεπιδρά με το σύστημα δοκιμής.

Δεν ταξινομείται: οι χημικές ουσίες που δεν ταξινομούνται ως ερεθιστικά για τους οφθαλμούς (κατηγορία 2, 2A ή 2B του GHS των Ηνωμένων Εθνών) ούτε ως ουσίες που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη (κατηγορία 1 του GHS των Ηνωμένων Εθνών). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά προς τον όρο «καμία κατηγορία του GHS των Ηνωμένων Εθνών».

Αδιαφανόμετρο: όργανο που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της «αδιαφάνειας του κερατοειδούς» μέσω ποσοτικής αξιολόγησης της ποσότητας του φωτός που διέρχεται από τον κερατοειδή. Το σύνηθες όργανο περιλαμβάνει δύο διαμερίσματα, το καθένα από τα οποία διαθέτει δική του φωτεινή πηγή και φωτοκύτταρο. Το ένα διαμέρισμα χρησιμοποιείται για τον κερατοειδή που έχει υποβληθεί σε μεταχείριση, ενώ το άλλο χρησιμοποιείται για τη βαθμονόμηση και τον μηδενισμό των ενδείξεων του οργάνου. Το φως από έναν λαμπτήρα αλογόνου διοχετεύεται μέσω διαμερίσματος-μάρτυρα (κενός θάλαμος χωρίς θυρίδες ούτε υγρό) σε φωτοκύτταρο και συγκρίνεται με το φως που διοχετεύεται σε φωτοκύτταρο μέσω του πειραματικού διαμερίσματος, το οποίο περικλείει τον θάλαμο που περιέχει τον κερατοειδή. Συγκρίνεται η διαφορά οπτικής διαπερατότητας από τα φωτοκύτταρα και εμφανίζεται σε ψηφιακή οθόνη μια αριθμητική τιμή αδιαφάνειας.

Θετικός μάρτυρας: δείγμα επανάληψης που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και υποβάλλεται σε μεταχείριση με χημική ουσία που είναι γνωστό ότι προκαλεί θετική απόκριση. Για να διασφαλίζεται η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας της απόκρισης του θετικού μάρτυρα σε συνάρτηση με τον χρόνο, το μέγεθος της θετικής απόκρισης δεν θα πρέπει να είναι υπερβολικό.

Αναστρέψιμες επιδράσεις στους οφθαλμούς: Βλ. «Οφθαλμικός ερεθισμός».

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια μέθοδος δοκιμών μπορεί να διεξάγεται με υψηλή αναπαραγωγιμότητα διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, καθώς και της ενδοεργαστηριακής επαναληψιμότητας.

Σοβαρή οφθαλμική βλάβη: πρόκληση βλάβης στους οφθαλμικούς ιστούς ή σοβαρής μείωσης της όρασης, κατόπιν εφαρμογής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην πρόσθια επιφάνεια του οφθαλμού, η οποία δεν είναι πλήρως αναστρέψιμη εντός 21 ημερών από την εφαρμογή. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά προς τους όρους «μη αναστρέψιμες επιδράσεις στους οφθαλμούς» και «κατηγορία 1 του GHS των Ηνωμένων Εθνών» (4).

Μάρτυρας με διαλύτη/φορέα: δείγμα που δεν υποβάλλεται σε μεταχείριση και περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής, συμπεριλαμβανομένου του διαλύτη ή του φορέα. Το δείγμα αυτό υποβάλλεται σε δοκιμή μαζί με τα δείγματα που έχουν υποβληθεί σε μεταχείριση με την υπό δοκιμή χημική ουσία και με άλλα δείγματα-μάρτυρες, με σκοπό τον καθορισμό της βασικής απόκρισης των δειγμάτων που υποβάλλονται σε μεταχείριση με την υπό δοκιμή χημική ουσία διαλυμένη στον ίδιο διαλύτη ή φορέα. Όταν το εν λόγω δείγμα υποβάλλεται σε δοκιμή με παράλληλο αρνητικό μάρτυρα, καταδεικνύει επίσης αν ο διαλύτης ή ο φορέας αλληλεπιδρά με το σύστημα δοκιμής.

Ουσία: τα χημικά στοιχεία και οι ενώσεις τους σε φυσική κατάσταση ή όπως λαμβάνονται με οποιαδήποτε παραγωγική διεργασία, στα οποία συμπεριλαμβάνονται όλα τα πρόσθετα που απαιτούνται για να διατηρείται η σταθερότητα του προϊόντος, καθώς και τυχόν προσμείξεις που προκύπτουν από τη χρησιμοποιούμενη διεργασία, αλλά από τα οποία εξαιρούνται οι διαλύτες που είναι δυνατόν να διαχωριστούν χωρίς να επηρεαστεί η σταθερότητα της ουσίας ούτε να μεταβληθεί η σύνθεσή της (4).

▼M7

Επιφανειοδραστική ουσία: ονομάζεται επίσης τασιενεργή ουσία και είναι ουσία, όπως τα απορρυπαντικά, που μπορεί να μειώσει την επιφανειακή τάση ενός υγρού και, ως εκ τούτου, του επιτρέπει να σχηματίζει αφρό ή να διεισδύει σε στερεά· είναι επίσης γνωστή ως διαβρεκτικό μέσο.

Μείγμα που περιέχει επιφανειοδραστικές ουσίες: στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών, είναι ένα μείγμα που περιέχει μία ή περισσότερες επιφανειοδραστικές ουσίες σε τελική συγκέντρωση > 5 %.

Καθοδική (top-down) προσέγγιση: κλιμακωτή προσέγγιση που χρησιμοποιείται για χημική ουσία για την οποία υπάρχουν υπόνοιες ότι προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη. Η προσέγγιση αυτή αρχίζει με τον προσδιορισμό των χημικών ουσιών που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη (θετικό αποτέλεσμα) σε σχέση με άλλες χημικές ουσίες (αρνητικό αποτέλεσμα).

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Κλιμακωτή στρατηγική δοκιμών: στρατηγική δοκιμών κατά στάδια, στο πλαίσιο της οποίας όλες οι υφιστάμενες πληροφορίες για μια υπό δοκιμή χημική ουσία εξετάζονται με συγκεκριμένη σειρά, με χρήση διαδικασίας βάρους της απόδειξης σε κάθε στάδιο, προκειμένου να διαπιστώνεται, πριν από τη μετάβαση στο επόμενο στάδιο, αν διατίθενται επαρκείς πληροφορίες για να ληφθεί απόφαση περί ταξινόμησης κινδύνου. Εάν σε υπό δοκιμή χημική ουσία μπορεί να αποδοθεί δυναμικό ερεθιστικότητας βάσει των υφιστάμενων πληροφοριών, δεν απαιτούνται περαιτέρω δοκιμές. Εάν βάσει των υφιστάμενων πληροφοριών δεν είναι εφικτή η απόδοση δυναμικού ερεθιστικότητας σε υπό δοκιμή χημική ουσία, εφαρμόζεται κλιμακωτή διαδικασία διαδοχικών δοκιμών σε ζώα έως ότου καταστεί εφικτή η βέβαιη ταξινόμηση της ουσίας.

Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Προϊόντων των Ηνωμένων Εθνών (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) (GHS των Ηνωμένων Εθνών): σύστημα που προτείνει την ταξινόμηση των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) με βάση τυποποιημένα είδη και βαθμούς φυσικών κινδύνων και κινδύνων για την υγεία και το περιβάλλον και καλύπτει τα αντίστοιχα επικοινωνιακά στοιχεία, όπως εικονογράμματα, προειδοποιητικές λέξεις, δηλώσεις επικινδυνότητας, δηλώσεις προφύλαξης και δελτία δεδομένων ασφαλείας, για τη μετάδοση πληροφοριών σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις των εν λόγω προϊόντων με σκοπό την προστασία των ανθρώπων (εργοδοτών, εργαζομένων, μεταφορέων, καταναλωτών και διασωστών) και του περιβάλλοντος (4).

Κατηγορία 1 του GHS των Ηνωμένων Εθνών: Βλ. «Σοβαρή οφθαλμική βλάβη».

Κατηγορία 2 του GHS των Ηνωμένων Εθνών: Βλ. «Οφθαλμικός ερεθισμός».

«Καμία κατηγορία» του GHS των Ηνωμένων Εθνών: τα χημικά προϊόντα που δεν πληρούν τις απαιτήσεις για να ταξινομηθούν ως κατηγορίας 1 ή 2 (2A ή 2B) του GHS των Ηνωμένων Εθνών. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά προς τον όρο «δεν ταξινομείται».

Επικυρωμένη μέθοδος δοκιμών: μέθοδος δοκιμών για την οποία έχουν ολοκληρωθεί μελέτες επικύρωσης προκειμένου να προσδιοριστούν η καταλληλότητα (συμπεριλαμβανομένης της ορθότητας) και η αξιοπιστία της για συγκεκριμένο σκοπό. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι επιδόσεις μιας επικυρωμένης μεθόδου δοκιμών όσον αφορά την ορθότητα και την αξιοπιστία ενδέχεται να μην επαρκούν για να κριθεί αποδεκτή για τον προτεινόμενο σκοπό.

Βάρος της απόδειξης: διαδικασία εξέτασης της ισχύος και των αδυναμιών διαφόρων πληροφοριών για τη συναγωγή και την τεκμηρίωση συμπεράσματος σχετικά με το δυναμικό κινδύνου που ενέχει μια χημική ουσία.

▼M7

Προσάρτημα 2

ΠΡΟΒΛΕΠΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ BCOP

Πίνακας 1

Προβλεπτική ικανότητα της μεθόδου δοκιμών BCOP για τον προσδιορισμό χημικών ουσιών που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη [κατ. 1 του GHS των ΗΕ/CLP της ΕΕ 1 έναντι των λοιπών κατηγοριών (κατ. 2 + «καμία κατηγορία»)· κατ. I της EPA των ΗΠΑ έναντι των λοιπών κατηγοριών (κατ. II + κατ. III + κατ. IV)]

Σύστημα ταξινόμησης	αριθ.	Ορθότητα		Ευαισθησία		Ψευδοαρνητική έκβαση		Ειδικότητα		Ψευδοθετική έκβαση	
		%	αριθ.	%	αριθ.	%	αριθ.	%	αριθ.	%	αριθ.
GHS των Ηνωμένων Εθνών CLP της ΕΕ	191	78,53	150/191	86,15	56/65	13,85	9/65	74,60	94/126	25,40	32/126
EPA των ΗΠΑ	190	78,95	150/190	85,71	54/63	14,29	9/63	75,59	96/127	24,41	31/127

Πίνακας 2

Προβλεπτική ικανότητα της μεθόδου δοκιμών BCOP για τον χαρακτηρισμό χημικών ουσιών που δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη («μη ερεθιστικά») [«καμία κατηγορία» του GHS των ΗΕ/CLP της ΕΕ έναντι των λοιπών κατηγοριών του (κατ. 1 + κατ. 2)· κατ. IV της EPA των ΗΠΑ έναντι των λοιπών κατηγοριών της (κατ. I + κατ. II + κατ. III)]

Σύστημα ταξινόμησης	αριθ.	Ορθότητα		Ευαισθησία		Ψευδοαρνητική έκβαση		Ειδικότητα		Ψευδοθετική έκβαση	
		%	αριθ.	%	αριθ.	%	αριθ.	%	αριθ.	%	αριθ.
GHS των Ηνωμένων Εθνών CLP της ΕΕ	196	68,88	135/196	100	107/107	0	0/107	31,46	28/89	68,54	61/89
EPA των ΗΠΑ	190	82,11	156/190	93,15	136/146	6,85	10/146	45,45	20/44	54,55	24/44

▼M7

Προσάρτημα 3

ΟΥΣΙΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΔΟΚΙΜΩΝ BCOP

Πριν εντάξουν την παρούσα μέθοδο δοκιμών στη συνήθη πρακτική τους, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα προσδιορίζοντας σωστά την ταξινόμηση του κινδύνου για τους οφθαλμούς από τις 13 χημικές ουσίες που συνιστώνται στον πίνακα 1. Οι ουσίες αυτές επιλέχθηκαν ως αντιπροσωπευτικές του φάσματος αποκρίσεων όσον αφορά τους κινδύνους για τους οφθαλμούς, με βάση τα αποτελέσματα της οφθαλμικής δοκιμής in vivo σε κουνέλια (TG 405) (17) και το σύστημα ταξινόμησης GHS των Ηνωμένων Εθνών (δηλ. κατηγορίες 1, 2A, 2B και «δεν ταξινομείται») (4). Άλλα κριτήρια επιλογής αφορούσαν τη διαθεσιμότητα των χημικών ουσιών στο εμπόριο και την ύπαρξη υψηλής ποιότητας δεδομένων αναφοράς in vivo, καθώς και υψηλής ποιότητας δεδομένων in vitro από τη μέθοδο δοκιμών BCOP. Δεδομένα αναφοράς είναι διαθέσιμα στο απλουστευμένο συνοπτικό έγγραφο (Streamlined Summary Document) (3) και στο έγγραφο επισκόπησης των διαθέσιμων δεδομένων (Background Review Document) της ICCVAM για τη μέθοδο δοκιμών BCOP (2)(18).

Πίνακας 1

Συνιστώμενες χημικές ουσίες για την απόδειξη της τεχνικής ικανότητας ως προς τη μέθοδο δοκιμών BCOP

Χημική ουσία	Αριθμός CAS	Χημική κατηγορία (1)	Φυσική μορφή	Ταξινόμηση In Vivo (2)	Ταξινόμηση βάσει της BCOP
Χλωριούχο βενζαλκόνιο (5 %)	8001-54-5	Ένωση κατιόντων υδριδίων	Υγρό	Κατηγορία 1	Κατηγορία 1
Χλωρεξιδίνη	55-56-1	Αμίνη, αμιδίνη	Στερεό	Κατηγορία 1	Κατηγορία 1
Διβενζοϋλο-L-τρυγικό οξύ	2743-38-6	Καρβοξυλικό οξύ, εστέρας	Στερεό	Κατηγορία 1	Κατηγορία 1
Ιμιδαζόλιο	288-32-4	Ετεροκυκλική ένωση	Στερεό	Κατηγορία 1	Κατηγορία 1
Τριχλωροξικό οξύ (30 %)	76-03-9	Καρβοξυλικό οξύ	Υγρό	Κατηγορία 1	Κατηγορία 1
2,6-Διχλωροβενζοϋλο-χλωρίδιο	4659-45-4	Ακυλαλογονίδιο	Υγρό	Κατηγορία 2A	Δεν μπορεί να γίνει ακριβής/αξιόπιστη πρόβλεψη
2-Μεθυλακετοξικός αιθυλεστέρας	609-14-3	Κετόνη, εστέρας	Υγρό	Κατηγορία 2B	Δεν μπορεί να γίνει ακριβής/αξιόπιστη πρόβλεψη
Νιτρικό αμμώνιο	6484-52-2	Ανόργανο άλας	Στερεό	Κατηγορία 2 (3)	Δεν μπορεί να γίνει ακριβής/αξιόπιστη πρόβλεψη
Δικάλιο άλας του EDTA	25102-12-9	Αμίνη, Καρβοξυλικό οξύ (άλας)	Στερεό	Δεν ταξινομείται	Δεν ταξινομείται
Tween 20	9005-64-5	Εστέρας, πολυαιθέρας	Υγρό	Δεν ταξινομείται	Δεν ταξινομείται
2-Μερκαπτοπυριμιδίνη	1450-85-7	Ακυλαλογονίδιο	Στερεό	Δεν ταξινομείται	Δεν ταξινομείται
Φαινυλοβουταζόνη	50-33-9	Ετεροκυκλική ένωση	Στερεό	Δεν ταξινομείται	Δεν ταξινομείται

▼**M7**

Χημική ουσία	Αριθμός CAS	Χημική κατηγορία ([1])	Φυσική μορφή	Ταξινόμηση In Vivo ([2])	Ταξινόμηση βάσει της BCOP
Λαυρυλαιθέρας του πολυοξυαιθυλενίου 23 (BRIJ-35) (10 %)	9002-92-0	Αλκοόλη	Υγρό	Δεν ταξινομείται	Δεν ταξινομείται

Συντμήσεις: CASRN = Αριθμός Μητρώου της υπηρεσίας Chemical Abstracts Service

([1]) Κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία κατατάχθηκε σε χημική κατηγορία σύμφωνα με πρότυπο σύστημα ταξινόμησης, το οποίο βασίζεται στο σύστημα ταξινόμησης Medical Subject Headings (MeSH) της National Library of Medicine (θεματικές επικεφαλίδες ιατρικού περιεχομένου της Εθνικής Ιατρικής Βιβλιοθήκης, διατίθεται στη διαδικτυακή διεύθυνση https://www.nlm.nih.gov/mesh/).

([2]) Βάσει των αποτελεσμάτων της οφθαλμικής δοκιμής in vivo σε κουνέλια (OECD TG 405) (17) και σύμφωνα με το GHS των Ηνωμένων Εθνών (4).

([3]) Η ταξινόμηση ως κατηγορίας 2A ή 2B εξαρτάται από την ερμηνεία του κριτηρίου του GHS των Ηνωμένων Εθνών για τη διάκριση μεταξύ αυτών των δύο κατηγοριών, δηλ. για την κατάταξη στην κατηγορία 2A είναι απαραίτητο να εμφανίζει επιδράσεις την 7η ημέρα 1 από τα 3 ζώα έναντι 2 από τα 3 ζώα. Η μελέτη in vivo περιελάμβανε 3 ζώα. Όλα τα τελικά σημεία, εκτός από το ερύθημα του επιπεφυκότος σε ένα ζώο, επανήλθαν σε μηδενική βαθμολογία την ημέρα 7 ή νωρίτερα. Το ένα ζώο που δεν είχε αναρρώσει πλήρως έως την ημέρα 7 παρουσίαζε ερύθημα επιπεφυκότος βαθμού 1 (την ημέρα 7) που εξαφανίστηκε την ημέρα 10.

▼M7

Προσάρτημα 4

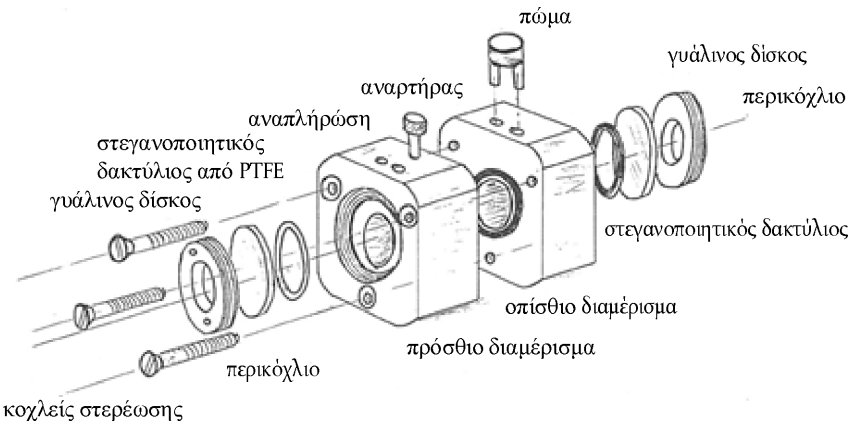
ΔΙΑΤΑΞΗ ΣΥΓΚΡΑΤΗΣΗΣ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΟΥΣ ΣΤΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ BCOP

Οι διατάξεις συγκράτησης κερατοειδούς στο πλαίσιο της μεθόδου δοκιμών BCOP κατασκευάζονται από αδρανές υλικό (π.χ. πολυπροπυλένιο). Οι διατάξεις αποτελούνται από δύο ημίσεα (εμπρόσθιο και οπίσθιο θάλαμο) και διαθέτουν δύο όμοιους κυλινδρικούς εσωτερικούς θαλάμους. Κάθε θάλαμος είναι σχεδιασμένος να έχει χωρητικότητα περίπου 5 ml και καταλήγει σε γυάλινη θυρίδα, μέσω της οποίας καταγράφονται οι μετρήσεις αδιαφάνειας. Καθένας από τους εσωτερικούς θαλάμους έχει διάμετρο 1,7 cm και βάθος 2,2 cm ([1]). Για την αποφυγή διαρροών χρησιμοποιείται στεγανοποιητικός δακτύλιος στον οπίσθιο θάλαμο. Ο κερατοειδής τοποθετείται με την πλευρά του ενδοθηλίου προς τα κάτω, επάνω στον στεγανοποιητικό δακτύλιο του οπισθίου θαλάμου, ενώ ο εμπρόσθιος θάλαμος τοποθετείται στην πλευρά του επιθηλίου του κερατοειδούς. Οι θάλαμοι συγκρατούνται στη θέση τους με τρεις κοχλίες από ανοξείδωτο χάλυβα που βρίσκονται στα εξωτερικά άκρα τους. Κάθε θάλαμος καταλήγει σε γυάλινη θυρίδα που μπορεί να αποσπάται για εύκολη πρόσβαση στον κερατοειδή. Μεταξύ της γυάλινης θυρίδας και του θαλάμου παρεμβάλλεται επίσης στεγανοποιητικός δακτύλιος για την αποφυγή διαρροών. Δύο οπές στο άνω τμήμα κάθε θαλάμου καθιστούν εφικτή την προσθήκη και αφαίρεση θρεπτικού μέσου και των υπό δοκιμή χημικών ουσιών. Οι οπές αυτές κλείνουν με πώματα από καουτσούκ κατά τη διάρκεια της μεταχείρισης και της επώασης. Η διέλευση του φωτός μέσω των διατάξεων συγκράτησης κερατοειδούς μπορεί να μεταβληθεί, καθώς οι συνέπειες της φθοράς ή της συσσώρευσης ειδικών χημικών καταλοίπων στις οπές των εσωτερικών θαλάμων ή στις γυάλινες θυρίδες μπορούν να επηρεάσουν τη σκέδαση ή την ανάκλαση του φωτός. Το αποτέλεσμα θα μπορούσε να είναι αυξήσεις ή μειώσεις της γραμμής βάσης οπτικής διαπερατότητας των διατάξεων συγκράτησης (και, αντιστρόφως, των ενδείξεων γραμμής βάσης αδιαφάνειας του κερατοειδούς) και να εκδηλώνεται ως σημαντικές αλλαγές στις αναμενόμενες τιμές γραμμής βάσης από τις αρχικές μετρήσεις αδιαφάνειας του κερατοειδούς σε επιμέρους θαλάμους (δηλ. οι αρχικές τιμές αδιαφάνειας του κερατοειδούς σε συγκεκριμένες διατάξεις συγκράτησης κερατοειδούς μπορεί συχνά να διαφέρουν κατά περισσότερο από 2 ή 3 μονάδες αδιαφάνειας από τις αναμενόμενες τιμές γραμμής βάσης). Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να εξετάζει το ενδεχόμενο κατάρτισης προγράμματος για την αξιολόγηση των μεταβολών της οπτικής διαπερατότητας των διατάξεων συγκράτησης του κερατοειδούς, ανάλογα με το είδος των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και τη συχνότητα χρήσης των θαλάμων. Για τον καθορισμό των τιμών γραμμής βάσης, οι διατάξεις συγκράτησης του κερατοειδούς μπορούν να ελέγχονται πριν από την εισαγωγή τους σε χρήση, με μέτρηση των τιμών γραμμής βάσης αδιαφάνειας (ή οπτικής διαπερατότητας) των θαλάμων, αφού πληρωθούν με πλήρες θρεπτικό μέσο, χωρίς κερατοειδείς. Στη συνέχεια, οι διατάξεις συγκράτησης κερατοειδούς ελέγχονται περιοδικά για να διαπιστωθούν οι μεταβολές της οπτικής διαπερατότητας κατά τις περιόδους χρήσης. Κάθε εργαστήριο μπορεί να καθορίζει τη συχνότητα ελέγχου των διατάξεων συγκράτησης του κερατοειδούς, με βάση τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες, τη συχνότητα χρήσης και τις παρατηρήσεις αλλαγών στις τιμές γραμμής βάσης αδιαφάνειας του κερατοειδούς. Εάν παρατηρηθούν αξιοσημείωτες αλλαγές στη διέλευση του φωτός μέσω των διατάξεων συγκράτησης του κερατοειδούς, θα πρέπει να μελετηθούν κατάλληλες διαδικασίες καθαρισμού και/ή στίλβωσης της εσωτερικής επιφάνειας των διατάξεων ή η αντικατάστασή τους.

([1]) Οι αναφερόμενες διαστάσεις βασίζονται σε διάταξη συγκράτησης κερατοειδούς που χρησιμοποιείται για αγελάδες ηλικίας 12 έως 60 μηνών. Εάν χρησιμοποιούνται ζώα ηλικίας 6 έως 12 μηνών, η διάταξη συγκράτησης πρέπει να είναι σχεδιασμένη κατά τρόπο ώστε κάθε θάλαμος να έχει χωρητικότητα 4 mL και κάθε εσωτερικός θάλαμος να έχει διάμετρο 1,5 cm και βάθος 2,2 cm. Σε κάθε διάταξη συγκράτησης νέας κατασκευής είναι πολύ σημαντικό η αναλογία της εκτεθειμένης επιφάνειας του κερατοειδούς προς τη χωρητικότητα του οπίσθιου θαλάμου να είναι η ίδια όπως στη συμβατική διάταξη συγκράτησης κερατοειδούς. Αυτό είναι απαραίτητο ούτως ώστε να διασφαλίζεται ο ορθός προσδιορισμός των τιμών διαπερατότητας για τον υπολογισμό της IVIS με τη βοήθεια του προτεινόμενου τύπου.

▼**M7**

Διάταξη συγκράτησης κερατοειδούς: διάγραμμα σε ανάπτυξη



▼M7

Προσάρτημα 5

ΤΟ ΑΔΙΑΦΑΝΟΜΕΤΡΟ

Το αδιαφανόμετρο είναι διάταξη μέτρησης της οπτικής διαπερατότητας. Για παράδειγμα, στην περίπτωση του εξοπλισμό OP-KIT της εταιρείας Electro Design (Riom, Γαλλία), που χρησιμοποιήθηκε για την επικύρωση της μεθόδου δοκιμών BCOP, το φως από έναν λαμπτήρα αλογόνου διοχετεύεται μέσω διαμερίσματος-μάρτυρα (κενός θάλαμος χωρίς θυρίδες ούτε υγρό) σε φωτοκύτταρο και συγκρίνεται με το φως που διοχετεύεται σε φωτοκύτταρο μέσω του πειραματικού διαμερίσματος, το οποίο περικλείει τον θάλαμο που περιέχει τον κερατοειδή. Συγκρίνεται η διαφορά οπτικής διαπερατότητας από τα φωτοκύτταρα και εμφανίζεται σε ψηφιακή οθόνη μια αριθμητική τιμή αδιαφάνειας. εκφραζόμενη σε μονάδες αδιαφάνειας. Επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται άλλα είδη αδιαφανόμετρων με διαφορετική διάταξη (π.χ. που δεν απαιτούν παράλληλες μετρήσεις διαμερίσματος-μάρτυρα και πειραματικού διαμερίσματος), εάν αποδειχθεί ότι τα αποτελέσματά τους είναι παρόμοια με εκείνα του επικυρωμένου εξοπλισμού.

Το αδιαφανόμετρο θα πρέπει να παρέχει γραμμική απόκριση σε ένα εύρος ενδείξεων αδιαφάνειας το οποίο καλύπτει τις τιμές αποκοπής που χρησιμοποιούνται για τις διάφορες ταξινομήσεις που περιγράφονται στο προγνωστικό μοντέλο (δηλ. έως και την τιμή αποκοπής που καθορίζει τη διαβρωτικότητα/ισχυρή ερεθιστικότητα). Για να διασφαλίζονται η γραμμικότητα και η ορθότητα των ενδείξεων έως τις 75-80 μονάδες αδιαφάνειας, είναι απαραίτητη η βαθμονόμηση του αδιαφανομέτρου με σειρά βαθμονομητών. Οι βαθμονομητές τοποθετούνται στον θάλαμο βαθμονόμησης (θάλαμος της διάταξης συγκράτησης του κερατοειδούς που προορίζεται να φέρει τους βαθμονομητές) και ακολουθεί μέτρηση στο αδιαφανόμετρο. Ο θάλαμος βαθμονόμησης είναι κατασκευασμένος έτσι ώστε να φέρει τους βαθμονομητές στην ίδια περίπου απόσταση μεταξύ της φωτεινής πηγής και του φωτοκυττάρου με εκείνη στην οποία θα βρίσκονται οι κερατοειδείς κατά τη διάρκεια των μετρήσεων αδιαφάνειας. Οι τιμές αναφοράς και το αρχικό σημείο ρύθμισης εξαρτώνται από τον τύπο του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται. Η γραμμικότητα των μετρήσεων αδιαφάνειας θα πρέπει να διασφαλίζεται με κατάλληλες διαδικασίες (ειδικές για το όργανο). Για παράδειγμα, στην περίπτωση του εξοπλισμού OP-KIT της εταιρείας Electro Design (Riom, Γαλλία), το αδιαφανόμετρο βαθμονομείται αρχικά σε 0 μονάδες αδιαφάνειας με τη χρήση του θαλάμου βαθμονόμησης χωρίς βαθμονομητή. Κατόπιν, στον θάλαμο βαθμονόμησης τοποθετούνται διαδοχικά τρεις διαφορετικοί βαθμονομητές και μετρώνται οι τιμές αδιαφάνειας. Οι βαθμονομητές 1, 2 και 3 θα πρέπει να δώσουν ενδείξεις αδιαφάνειας ίσες με τις καθορισμένες τιμές των 75, 150 και 225 μονάδων αδιαφάνειας, αντιστοίχως, με απόκλιση ± 5 %.

▼M7

B.48. ΜΈΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΏΝ ΣΕ ΑΠΟΜΟΝΩΜΈΝΟΥΣ ΟΦΘΑΛΜΟΎΣ ΟΡΝΙΘΊΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΌ Ι) ΧΗΜΙΚΏΝ ΟΥΣΙΏΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΎΝ ΣΟΒΑΡΉ ΟΦΘΑΛΜΙΚΉ ΒΛΆΒΗ ΚΑΙ ΙΙ) ΧΗΜΙΚΏΝ ΟΥΣΙΏΝ ΠΟΥ ΔΕΝ ΕΠΙΒΆΛΛΕΤΑΙ ΝΑ ΤΑΞΙΝΟΜΗΘΟΎΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΟΦΘΑΛΜΙΚΌ ΕΡΕΘΙΣΜΌ Ή ΤΗ ΣΟΒΑΡΉ ΟΦΘΑΛΜΙΚΉ ΒΛΆΒΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 438 του ΟΟΣΑ (2013). Η μέθοδος δοκιμών σε απομονωμένους οφθαλμούς ορνιθίων (Isolated Chicken Eye/ICE) αξιολογήθηκε το 2006 και το 2010 από τη Διυπηρεσιακή Συντονιστική Επιτροπή για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (ICCVAM) των ΗΠΑ, σε σύμπραξη με το Ευρωπαϊκό Κέντρο για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (ECVAM) και το Ιαπωνικό Κέντρο για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (JaCVAM) (1)(2). Κατά την πρώτη αξιολόγηση, η μέθοδος ICE εγκρίθηκε ως επιστημονικά έγκυρη μέθοδος δοκιμών προς χρήση ως δοκιμή διαλογής για τον προσδιορισμό χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) που επάγουν σοβαρή οφθαλμική βλάβη (κατηγορία 1), όπως ορίζονται στο Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Προϊόντων (GHS) των Ηνωμένων Εθνών (1) (2) (4) και στον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων (Classification, Labelling and Packaging/CLP) ([1]). Κατά τη δεύτερη αξιολόγηση, η μέθοδος δοκιμών ICE αξιολογήθηκε προς χρήση ως δοκιμή διαλογής για τον προσδιορισμό χημικών ουσιών που δεν ταξινομούνται ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη, όπως ορίζονται στο GHS των Ηνωμένων Εθνών (3) (4). Τα αποτελέσματα της μελέτης επικύρωσης και οι συστάσεις της ομάδας αξιολόγησης από ομότιμους κριτές διατήρησαν σε ισχύ την αρχική σύσταση να χρησιμοποιείται η μέθοδος ICE για την ταξινόμηση χημικών ουσιών που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη (κατηγορία 1 του GHS των Ηνωμένων Εθνών), καθώς η διαθέσιμη βάση δεδομένων παρέμεινε αμετάβλητη στο διάστημα που μεσολάβησε από την αρχική επικύρωση από την ICCVAM. Σε εκείνο το στάδιο, δεν διατυπώθηκαν περαιτέρω συστάσεις για επέκταση του πεδίου εφαρμογής της μεθόδου ICE ώστε να συμπεριληφθούν και άλλες κατηγορίες. Το σύνολο δεδομένων in vitro και in vivo που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη επικύρωσης επαναξιολογήθηκε με έμφαση στην αξιολόγηση της χρησιμότητας της μεθόδου ICE για τον χαρακτηρισμό χημικών ουσιών που δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη (5). Η εν λόγω επαναξιολόγηση κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η μέθοδος δοκιμών ICE μπορεί επίσης να χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό χημικών ουσιών που δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό και τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη, όπως ορίζονται στο GHS των Ηνωμένων Εθνών (4) (5). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών περιλαμβάνει τις συνιστώμενες χρήσεις και τους περιορισμούς της μεθόδου δοκιμών ICE βάσει αυτών των αξιολογήσεων. Οι βασικές διαφορές μεταξύ του αρχικού κειμένου του 2009 και της επικαιροποιημένης έκδοσης του 2013 των κατευθυντήριων γραμμών δοκιμών του ΟΟΣΑ αφορούν, μεταξύ άλλων, τη χρήση της μεθόδου δοκιμών ICE για τον προσδιορισμό χημικών ουσιών που δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης GHS των Ηνωμένων Εθνών, καθώς και επικαιροποίηση των στοιχείων της έκθεσης δοκιμής, του προσαρτήματος 1 με τους ορισμούς και του προσαρτήματος 2 για τις χημικές ουσίες ελέγχου ικανότητας.

Επί του παρόντος είναι γενικά αποδεκτό ότι, στο προβλέψιμο μέλλον, καμία μεμονωμένη δοκιμή οφθαλμικού ερεθισμού in vitro δεν θα μπορεί να αντικαταστήσει την in vivo οφθαλμική δοκιμή Draize στην πρόβλεψη σε ολόκληρο το φάσμα ερεθιστικότητας από τις διαφορετικές τάξεις χημικών ουσιών. Εντούτοις, στοχευμένοι συνδυασμοί διαφόρων εναλλακτικών μεθόδων δοκιμών στο πλαίσιο (κλιμακωτής) στρατηγικής δοκιμών θα μπορούσαν ενδεχομένως να αντικαταστήσουν την οφθαλμική δοκιμή Draize (6). Η καθοδική προσέγγιση (top-down) (7) έχει σχεδιαστεί για να χρησιμοποιείται όταν, βάσει των διαθέσιμων πληροφοριών, μια χημική ουσία αναμένεται να έχει υψηλό δυναμικό ερεθιστικότητας, ενώ η ανοδική προσέγγιση (bottom-up) (7) έχει σχεδιαστεί για να χρησιμοποιείται όταν, βάσει των διαθέσιμων πληροφοριών, μια χημική ουσία δεν αναμένεται να προκαλέσει ερεθισμό των οφθαλμών σε βαθμό τέτοιον ώστε να επιβάλλεται η ταξινόμησή της. Η μέθοδος δοκιμών ICE είναι μέθοδος δοκιμών in vitro

([1]) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων, την τροποποίηση και την κατάργηση των οδηγιών 67/548/ΕΟΚ και 1999/45/ΕΚ και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006, ΕΕ L 353 της 31.12.2008, σ. 1.

▼M7

που μπορεί να χρησιμοποιείται, υπό ορισμένες περιστάσεις και με ειδικούς περιορισμούς, όπως περιγράφεται στις παραγράφους 8 έως 10, για την ταξινόμηση και την επισήμανση των χημικών ουσιών ως προς τον κίνδυνο για τους οφθαλμούς. Αν και δεν θεωρείται έγκυρη ως αυτοτελές υποκατάστατο της οφθαλμικής δοκιμής in vivo σε κουνέλια, η μέθοδος δοκιμών ICE συνιστάται ως πρώτο στάδιο στρατηγικής δοκιμών, όπως η καθοδική προσέγγιση που προτείνουν οι Scott και συν. (7), για τον προσδιορισμό χημικών ουσιών που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη, δηλ. χημικών ουσιών που πρέπει να ταξινομούνται ως κατηγορίας 1 του GHS των Ηνωμένων Εθνών, χωρίς περαιτέρω δοκιμές (4). Η μέθοδος δοκιμών ICE συνιστάται επίσης για τον προσδιορισμό χημικών ουσιών που δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη, όπως ορίζονται στο GHS των Ηνωμένων Εθνών («Καμία κατηγορία») (4) και μπορεί, ως εκ τούτου, να χρησιμοποιείται ως αρχικό στάδιο στο πλαίσιο στρατηγικής δοκιμών με ανοδική προσέγγιση (7). Ωστόσο, για τις χημικές ουσίες οι οποίες, όπως προβλέπεται βάσει της μεθόδου δοκιμών ICE, δεν προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη ή δεν ταξινομούνται ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό/τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη, θα απαιτούνται πρόσθετες δοκιμές (in vitro και/ή in vivo) για να κριθεί η οριστική τους ταξινόμηση. Επιπλέον, θα πρέπει να ζητείται η γνώμη των αρμόδιων ρυθμιστικών αρχών πριν από τη χρήση της μεθόδου ICE στο πλαίσιο ανοδικής προσέγγισης βάσει άλλων συστημάτων ταξινόμησης εκτός από το GHS των Ηνωμένων Εθνών.

Σκοπός της παρούσας μεθόδου δοκιμών είναι η περιγραφή των διαδικασιών που εφαρμόζονται για την αξιολόγηση του δυναμικού οφθαλμικού κινδύνου που ενέχει η υπό δοκιμή ουσία, όπως αυτό μετράται από την ικανότητά της να προκαλεί ή όχι τοξικότητα σε εξορυγμένο οφθαλμό ορνιθίου. Οι τοξικές επιδράσεις στον κερατοειδή μετρώνται με i) ποιοτική αξιολόγηση της αδιαφάνειας, ii) ποιοτική αξιολόγηση της βλάβης στο επιθήλιο βάσει της εφαρμογής φλουορεσκεΐνης στον οφθαλμό (κατακράτηση φλουορεσκεΐνης), iii) ποσοτική μέτρηση της αύξησης του πάχους (οίδημα), και iv) ποιοτική αξιολόγηση της μακροσκοπικής μορφολογικής βλάβης στην επιφάνεια. Οι αξιολογήσεις της αδιαφάνειας, του οιδήματος και της βλάβης του κερατοειδούς κατόπιν έκθεσης στην υπό δοκιμή χημική ουσία διενεργούνται χωριστά και έπειτα συνδυάζονται για την ταξινόμηση της οφθαλμικής ερεθιστικότητας.

Οι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών βασίζεται στο πρωτόκολλο που προτείνεται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 160 του ΟΟΣΑ (8), το οποίο καταρτίστηκε μετά τη διεθνή μελέτη επικύρωσης της ICCVAM (1) (3) (9), με τη συνεισφορά του Ευρωπαϊκού Κέντρου για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων, του Ιαπωνικού Κέντρου για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων και του Τμήματος Τοξικολογίας και Εφαρμοσμένης Φαρμακολογίας του ερευνητικού οργανισμού TNO (Κάτω Χώρες). Το πρωτόκολλο βασίζεται σε στοιχεία που ελήφθησαν από δημοσιευμένα πρωτόκολλα, καθώς και στο πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται επί του παρόντος από τον οργανισμό TNO (10) (11) (12) (13) (14).

Κατά την επικύρωση στην οποία στηρίζεται η παρούσα μέθοδος δοκιμών ελέγχθηκε ένα ευρύ φάσμα χημικών ουσιών και η εμπειρική βάση δεδομένων της μελέτης επικύρωσης καλύπτει 152 χημικά προϊόντα, και συγκεκριμένα 72 ουσίες και 80 μείγματα (5). Η μέθοδος δοκιμών εφαρμόζεται σε στερεά, υγρά, γαλακτώματα και πηκτές. Τα υγρά μπορούν να είναι υδατικά ή μη και τα στερεά μπορεί να είναι υδατοδιαλυτά ή μη. Αέρια και αερολύματα δεν έχουν αξιολογηθεί ακόμη με μελέτη επικύρωσης.

Η μέθοδος δοκιμών ICE μπορεί να χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό χημικών ουσιών που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη, δηλ. χημικών ουσιών που πρέπει να ταξινομούνται ως κατηγορίας 1 του GHS των Ηνωμένων Εθνών (4). Οι περιορισμοί που προσδιορίστηκαν για τη μέθοδο δοκιμών ICE, όταν χρησιμοποιείται για τον σκοπό αυτό, βασίζονται στα υψηλά ποσοστά ψευδοθετικής έκβασης για τις αλκοόλες και τα υψηλά ποσοστά ψευδοαρνητικής έκβασης για τα στερεά και τις επιφανειοδραστικές (τασιενεργές) ουσίες (1) (3) (9). Ωστόσο, τα ποσοστά ψευδοαρνητικής έκβασης σε αυτό το πλαίσιο (ουσίες της κατηγορίας 1 του GHS των Ηνωμένων Εθνών που κρίνεται ότι δεν κατατάσσονται στην κατηγορία αυτή) δεν έχουν κρίσιμη σημασία, δεδομένου ότι όλες οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες με αρνητικό αποτέλεσμα θα υποβάλλονται στη συνέχεια σε άλλες, επαρκώς επικυρωμένες δοκιμές in vitro ή, ως έσχατη επιλογή, σε δοκιμές σε κουνέλια, ανάλογα με τις κανονιστικές απαιτήσεις, με τη χρήση

▼M7

στρατηγικής διαδοχικών δοκιμών με βάση ανάλυση βάρους της απόδειξης. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα στερεά μπορεί να οδηγήσουν σε μεταβλητές και ακραίες συνθήκες έκθεσης στην in vivo δοκιμή οφθαλμικού ερεθισμού Draize, με πιθανό αποτέλεσμα άστοχες προβλέψεις του πραγματικού ερεθιστικού τους δυναμικού (15). Οι ερευνητές μπορούν να εξετάζουν το ενδεχόμενο χρήσης της παρούσας μεθόδου δοκιμών για όλους τους τύπους χημικών ουσιών, οπότε και τα θετικά αποτελέσματα θα πρέπει να γίνονται δεκτά ως ενδεικτικά σοβαρής οφθαλμικής βλάβης, δηλ. ταξινόμηση στην κατηγορία 1 του GHS των Ηνωμένων Εθνών χωρίς περαιτέρω δοκιμές. Πάντως, τα θετικά αποτελέσματα που προκύπτουν με αλκοόλες θα πρέπει να ερμηνεύονται με επιφύλαξη, λόγω κινδύνου υπερπρόβλεψης.

Όταν η μέθοδος δοκιμών ICE χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό χημικών ουσιών που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη (κατηγορία 1 του GHS των Ηνωμένων Εθνών), έχει συνολική ορθότητα 86 % (120/140), ποσοστό ψευδοθετικής έκβασης 6 % (7/113) και ποσοστό ψευδοαρνητικής έκβασης 48 % (13/27), σε σύγκριση με την ταξινόμηση βάσει δεδομένων από τη μέθοδο οφθαλμικών δοκιμών in vivo σε κουνέλια σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης GHS των Ηνωμένων Εθνών (4) (5).

Η μέθοδος δοκιμών ICE μπορεί επίσης να χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό χημικών ουσιών που δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη βάσει του συστήματος ταξινόμησης GHS των Ηνωμένων Εθνών (4). Θα πρέπει να ζητείται η γνώμη των αρμόδιων ρυθμιστικών αρχών πριν από τη χρήση της μεθόδου ICE στο πλαίσιο ανοδικής προσέγγισης βάσει άλλων συστημάτων ταξινόμησης. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών μπορεί να χρησιμοποιείται για όλους τους τύπους χημικών ουσιών, οπότε και τα αρνητικά αποτελέσματα θα μπορούσαν να γίνουν δεκτά για τη μη ταξινόμηση μιας χημικής ουσίας ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό και τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη. Ωστόσο, με βάση ένα αποτέλεσμα από τη βάση δεδομένων επικύρωσης, υπάρχει πιθανότητα υποπρόβλεψης στην περίπτωση των αντιρρυπαντικών επιχρισμάτων που περιέχουν οργανικούς διαλύτες (5).

Όταν η μέθοδος δοκιμών ICE χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό χημικών ουσιών που δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη, έχει συνολική ορθότητα 82 % (125/152), ποσοστό ψευδοθετικής έκβασης 33 % (26/79) και ποσοστό ψευδοαρνητικής έκβασης 1 % (1/73), σε σύγκριση με την ταξινόμηση βάσει δεδομένων από τη μέθοδο οφθαλμικών δοκιμών in vivo σε κουνέλια σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης GHS των Ηνωμένων Εθνών (4) (5). Όταν εξαιρούνται από τη βάση δεδομένων ορισμένες κατηγορίες προϊόντων (δηλ. τα αντιρρυπαντικά επιχρίσματα που περιέχουν οργανικούς διαλύτες), η μέθοδος δοκιμών ICE παρουσιάζει ορθότητα 83 % (123/149), ποσοστό ψευδοθετικής έκβασης 33 % (26/78) και ποσοστό ψευδοαρνητικής έκβασης 0 % (0/71) στο σύστημα ταξινόμησης GHS των Ηνωμένων Εθνών (5).

Η μέθοδος δοκιμών ICE δεν συνιστάται για τον προσδιορισμό υπό δοκιμή χημικών ουσιών που θα πρέπει να ταξινομηθούν ως ερεθιστικά των οφθαλμών (κατηγορία 2 ή 2A του GHS των Ηνωμένων Εθνών) ή ως ήπια ερεθιστικά των οφθαλμών (κατηγορία 2B του GHS των Ηνωμένων Εθνών), λόγω του σημαντικού αριθμού χημικών ουσιών της κατηγορίας 1 του GHS των Ηνωμένων Εθνών που υποταξινομούνται ως κατηγορίας 2, 2A ή 2B και χημικών ουσιών «καμίας κατηγορίας» του GHS των Ηνωμένων Εθνών που υπερταξινομούνται ως κατηγορίας 2, 2A ή 2B. Για τον σκοπό αυτό, ενδέχεται να απαιτούνται περαιτέρω δοκιμές με άλλη κατάλληλη μέθοδο.

Όλες οι διαδικασίες με οφθαλμούς ορνιθίων θα πρέπει να είναι σύμφωνες προς τους κανονισμούς και τις διαδικασίες που εφαρμόζονται στην εγκατάσταση δοκιμών για τον χειρισμό υλικών ανθρώπινης ή ζωικής προέλευσης, συμπεριλαμβανομένων, μεταξύ άλλων, των ιστών και ιστικών υγρών. Συνιστάται η τήρηση των γενικών εργαστηριακών προφυλάξεων (16).

Στη μέθοδο δοκιμών ICE δεν λαμβάνονται υπόψη οι κακώσεις του επιπεφυκότος και της ίριδας που αξιολογούνται στη μέθοδο δοκιμών οφθαλμικής ερεθιστικότητας σε κουνέλια, αλλά εξετάζονται οι επιδράσεις στον κερατοειδή, που είναι ο μείζων παράγων ταξινόμησης in vivo όσον αφορά το GHS των Ηνωμένων Εθνών. Επίσης, μολονότι η αναστρεψιμότητα των βλαβών του κερατοειδούς δεν μπορεί να αξιολογηθεί αυτοτελώς στη μέθοδο δοκιμών ICE, έχει προταθεί ως δυνατότητα, βάσει των οφθαλμικών μελετών σε κουνέλια, η αξιολόγηση του αρχικού βάθους της κάκωσης του κερατοειδούς για την αναγνώριση ορισμένων τύπων μη αναστρέψιμων επιδράσεων (17). Ειδικότερα, απαιτούνται περισσότερες επιστημονικές γνώσεις για να γίνει κατανοητός ο τρόπος με τον οποίο επέρχονται μη αναστρέψιμες επιδράσεις που δεν συνδέονται με μια αρχική σοβαρή

▼M7

κάκωση. Τέλος, η μέθοδος δοκιμών ICE δεν καθιστά εφικτή την αξιολόγηση του δυναμικού συστημικής τοξικότητας που συνδέεται με την έκθεση των οφθαλμών.

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών θα επικαιροποιείται ανά χρονικά διαστήματα με βάση τις νέες πληροφορίες και τα δεδομένα. Για παράδειγμα, μια ιστοπαθολογική εξέταση ενδέχεται να είναι χρήσιμη όταν απαιτείται πληρέστερος χαρακτηρισμός της βλάβης του κερατοειδούς. Για την αξιολόγηση αυτής της δυνατότητας, συνιστάται στους χρήστες να συντηρούν τους οφθαλμούς και να ετοιμάζουν δείγματα για ιστοπαθολογική εξέταση, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη βάσης δεδομένων και κριτηρίων λήψης αποφάσεων που θα μπορούσαν να βελτιώσουν περαιτέρω την ορθότητα της παρούσας μεθόδου δοκιμών. Ο ΟΟΣΑ έχει εκπονήσει έγγραφο καθοδήγησης σχετικά με τη χρήση των μεθόδων δοκιμών οφθαλμικής τοξικότητας in vitro, το οποίο περιλαμβάνει λεπτομερείς διαδικασίες για τη συλλογή δειγμάτων ιστοπαθολογικής εξέτασης και πληροφορίες σχετικά με την υποβολή δειγμάτων και/ή ιστοπαθολογικών δεδομένων (8).

Τα εργαστήρια που διεξάγουν για πρώτη φορά την παρούσα δοκιμή θα πρέπει να χρησιμοποιούν τις χημικές ουσίες ελέγχου ικανότητας που προβλέπονται στο προσάρτημα 2. Ένα εργαστήριο μπορεί να χρησιμοποιεί αυτές τις χημικές ουσίες για να αποδείξει την τεχνική ικανότητά του όσον αφορά την εφαρμογή της μεθόδου δοκιμών ICE, πριν από την υποβολή δεδομένων που προέρχονται από αυτήν για ταξινόμηση κινδύνων βάσει κανονιστικών ρυθμίσεων.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η μέθοδος δοκιμών ICE είναι οργανοτυπικό μοντέλο που εξασφαλίζει βραχυπρόθεσμη διατήρηση των οφθαλμών ορνιθίων in vitro. Στη συγκεκριμένη μέθοδο δοκιμών, η βλάβη που προκαλείται από την υπό δοκιμή χημική ουσία εκτιμάται μέσω προσδιορισμού του οιδήματος και της αδιαφάνειας του κερατοειδούς, καθώς και της κατακράτησης φλουορεσκεΐνης. Με τις δύο τελευταίες παραμέτρους επιτυγχάνεται ποιοτική εκτίμηση, ενώ η ανάλυση του οιδήματος του κερατοειδούς παρέχει ποσοτική εκτίμηση. Κάθε μέτρηση είτε μετατρέπεται σε ποσοτική βαθμολογία που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό συνολικού δείκτη ερεθισμού είτε κατατάσσεται σε ποιοτική κατηγορία, η οποία χρησιμοποιείται για ταξινόμηση ως προς τον οφθαλμικό κίνδυνο in vitro στην κατηγορία 1 ή στην κατηγορία «Δεν ταξινομείται» του GHS των Ηνωμένων Εθνών. Καθεμία από αυτές τις εκβάσεις μπορεί στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί για να προβλεφθεί ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία μπορεί να προκαλέσει σοβαρή οφθαλμική βλάβη in vivo ή ότι δεν επιβάλλεται να ταξινομηθεί ως προς τον κίνδυνο για τους οφθαλμούς (βλ. κριτήρια απόφασης). Ωστόσο, δεν είναι δυνατή η ταξινόμηση των χημικών ουσιών για τις οποίες δεν προβλέπεται ότι προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη ή δεν ταξινομούνται με τη μέθοδο δοκιμών ICE (βλ. παράγραφο 11).

Προέλευση και ηλικία των οφθαλμών ορνιθίων

Έχει παγιωθεί ιστορικά η χρήση, για την παρούσα δοκιμή, οφθαλμών που συλλέγονται από ορνίθια που θανατώνονται σε σφαγείο για κατανάλωση από τον άνθρωπο, γεγονός που συνεπάγεται ότι δεν απαιτείται η χρήση πειραματόζωων. Χρησιμοποιούνται μόνο οφθαλμοί υγιών ζώων που θεωρούνται κατάλληλα για είσοδο στην ανθρώπινη τροφική αλυσίδα.

Αν και δεν έχει διεξαχθεί ελεγχόμενη μελέτη για την αξιολόγηση της βέλτιστης ηλικίας των ορνιθίων, στη συγκεκριμένη μέθοδο δοκιμής χρησιμοποιούνται κατά παράδοση νεαρά ορνίθια που οδηγούνται συνήθως σε σφαγείο πουλερικών (ηλικίας περίπου 7 εβδομάδων και βάρους 1,5-2,5 kg).

Συλλογή και μεταφορά των οφθαλμών στο εργαστήριο

Οι κεφαλές θα πρέπει να αφαιρούνται αμέσως μετά την αναισθητοποίηση των ορνιθίων, συνήθως με ηλεκτροπληξία, και την τομή στον τράχηλο για αφαίμαξη. Τα ορνίθια θα πρέπει να προέρχονται από τοπική πηγή κοντά στο εργαστήριο, ώστε οι κεφαλές τους να μεταφέρονται ταχέως από το σφαγείο στο εργαστήριο για να ελαχιστοποιείται η φθορά ή/και η βακτηριακή μόλυνση. Το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ της συλλογής των κεφαλών των ορνιθίων και της τοποθέτησης των οφθαλμών στον θάλαμο υπερδιαπότισης μετά την εξόρυξη θα πρέπει να περιορίζεται στο ελάχιστο δυνατό (κατά κανόνα δύο ώρες), ώστε να διασφαλίζεται η εκπλήρωση των κριτηρίων αποδοχής της δοκιμής. Όλοι οι οφθαλμοί που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή θα πρέπει να προέρχονται από την ίδια ομάδα οφθαλμών που συλλέχθηκαν συγκεκριμένη ημέρα.

▼M7

Επειδή οι οφθαλμοί ανατέμνονται στο εργαστήριο, οι κεφαλές μεταφέρονται από το σφαγείο άθικτες, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (κατά κανόνα μεταξύ 18 °C και 25 °C, μέσα σε πλαστικά δοχεία που υγραίνονται με απορροφητικό χαρτί εμποτισμένο με ισότονο αλατούχο διάλυμα (φυσιολογικό ορό).

Κριτήρια επιλογής και αριθμός οφθαλμών που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή ICE

Οι οφθαλμοί με υψηλή αρχική χρώση φλουορεσκεΐνης (> 0,5) ή τη βαθμολογία αδιαφάνειας κερατοειδούς (> 0,5) μετά την εξόρυξή τους, απορρίπτονται.

Κάθε ομάδα μεταχείρισης και ομάδα παράλληλων θετικών μαρτύρων αποτελείται από τρεις τουλάχιστον οφθαλμούς. Η ομάδα αρνητικών μαρτύρων ή μαρτύρων με διαλύτη (εάν δεν χρησιμοποιείται φυσιολογικός ορός ως διαλύτης) αποτελείται από τουλάχιστον έναν οφθαλμό.

Όταν η έκβαση της δοκιμής στερεών υλικών είναι «Δεν ταξινομείται» βάσει του GHS, συνιστάται δεύτερη δοκιμή με τρεις οφθαλμούς για την επιβεβαίωση ή την απόρριψη της αρνητικής έκβασης.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Προετοιμασία των οφθαλμών

Τα βλέφαρα εκτέμνονται προσεκτικά κατά τρόπο ώστε να μην προκληθεί βλάβη στον κερατοειδή. Η ακεραιότητα του κερατοειδούς αξιολογείται ταχέως με την ενστάλαξη μιας σταγόνας νατριούχου φλουορεσκεΐνης 2 % (κ.β.) στην επιφάνεια του κερατοειδούς για λίγα δευτερόλεπτα, ακολουθούμενη από έκπλυση του κερατοειδούς με ισότονο αλατούχο διάλυμα. Οι οφθαλμοί που έχουν υποβληθεί σε μεταχείριση με φλουορεσκεΐνη εξετάζονται με σχισμοειδή λυχνία για να διαπιστώνεται αν είναι άθικτος ο κερατοειδής (βαθμολογίες κατακράτησης φλουορεσκεΐνης και αδιαφάνειας κερατοειδούς ≤ 0,5).

Εάν ο κερατοειδής είναι άθικτος, ο οφθαλμός ανατέμνεται περαιτέρω από το κρανίο με προσοχή, ώστε να μην προκληθεί βλάβη στον κερατοειδή. Ο βολβός απομακρύνεται από τον οφθαλμικό κόγχο με χειρουργική λαβίδα, με την οποία συγκρατείται σταθερά η σκληρδαμυκτική μεμβράνη ενώ αποκόπτονται οι οφθαλμικοί μύες με κυρτό αμβλύ ψαλίδι. Είναι σημαντικό να αποφεύγεται η άσκηση υπερβολικής πίεσης ώστε να μην προκαλείται βλάβη στον κερατοειδή (τεχνητά σφάλματα λόγω συμπίεσης).

Κατά την απόσπαση του οφθαλμού από τον οφθαλμικό κόγχο πρέπει να παραμένει συνδεδεμένο ένα ορατό τμήμα του οπτικού νεύρου. Μετά την αφαίρεσή του από τον οφθαλμικό κόγχο, ο οφθαλμός τοποθετείται σε απορροφητικό επίθεμα και αποκόπτονται η σκληρδαμυκτική μεμβράνη και ο λοιπός συνδετικός ιστός.

Ο εξορυγμένος οφθαλμός στερεώνεται σε σφιγκτήρα από ανοξείδωτο χάλυβα με τον κερατοειδή σε κατακόρυφη θέση. Ο σφιγκτήρας μεταφέρεται εν συνεχεία σε θάλαμο της συσκευής υπερδιαπότισης (18). Οι σφιγκτήρες θα πρέπει να τοποθετούνται στη συσκευή υπερδιαπότισης κατά τρόπο ώστε ολόκληρος ο κερατοειδής να αρδεύεται με τη στάγδην παροχή ισότονου αλατούχου διαλύματος (3-4 σταγόνες ανά λεπτό ή 0,1-0,15 ml/min). Η θερμοκρασία των θαλάμων της συσκευής υπερδιαπότισης θα πρέπει να είναι ελεγχόμενη και να ρυθμίζεται στους 32 ± 1,5 °C. Στο προσάρτημα 3 παρατίθεται διάγραμμα τυπικής συσκευής υπερδιαπότισης και σφιγκτήρων για οφθαλμούς, που κυκλοφορούν στο εμπόριο ή κατασκευάζονται κατά παραγγελία. Η συσκευή μπορεί να τροποποιείται ώστε να προσαρμόζεται στις ανάγκες του εκάστοτε εργαστηρίου (π.χ. να δέχεται διαφορετικό αριθμό οφθαλμών).

Μετά την τοποθέτησή τους στη συσκευή υπερδιαπότισης, οι οφθαλμοί επανεξετάζονται με σχισμοειδή λυχνία για να διαπιστωθεί ότι δεν υπέστησαν βλάβη κατά τη διαδικασία ανατομής. Παράλληλα, θα πρέπει επίσης να μετράται το πάχος του κερατοειδούς στην κορυφή του με το παχύμετρο της σχισμοειδούς λυχνίας. Οι οφθαλμοί με i) βαθμολογία κατακράτησης φλουορεσκεΐνης > 0,5, ii) αδιαφάνεια κερατοειδούς > 0,5 ή iii) άλλες ενδείξεις βλάβης θα πρέπει να αντικαθίστανται. Από τους οφθαλμούς που δεν απορρίπτονται λόγω οποιουδήποτε από αυτά τα κριτήρια, κάθε οφθαλμός με πάχος κερατοειδούς που αποκλίνει κατά περισσότερο από 10 % από τη μέση τιμή του συνόλου των οφθαλμών πρέπει να απορρίπτεται. Οι χρήστες θα πρέπει να γνωρίζουν ότι η ένδειξη της σχισμοειδούς λυχνίας για το πάχος του κερατοειδούς μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τη ρύθμιση του πλάτους της σχισμής. Το πλάτος της σχισμής πρέπει να ρυθμίζεται στα 0,095 mm.

▼M7

Όταν όλοι οι οφθαλμοί έχουν εξεταστεί και εγκριθεί, επωάζονται επί 45 έως 60 λεπτά περίπου για την εξισορρόπησή τους με το σύστημα δοκιμής πριν από τη χορήγηση της δόσης. Μετά την παρέλευση του διαστήματος εξισορρόπησης, καταγράφεται η μηδενική μέτρηση αναφοράς ως γραμμή βάσης του πάχους και της αδιαφάνειας του κερατοειδούς (δηλ. χρόνος = 0). Η βαθμολογία κατακράτησης φλουορεσκεΐνης κατά την ανατομή χρησιμοποιείται ως γραμμή βάσης για το συγκεκριμένο τελικό σημείο.

Εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας

Αμέσως μετά τις μηδενικές μετρήσεις αναφοράς, ο οφθαλμός (με τη διάταξη που τον συγκρατεί) απομακρύνεται από τη συσκευή υπερδιαπότισης και τοποθετείται σε οριζόντια θέση και η υπό δοκιμή χημική ουσία εφαρμόζεται στον κερατοειδή.

Οι υγρές υπό δοκιμή χημικές ουσίες υποβάλλονται κατά κανόνα σε δοκιμή χωρίς αραίωση, αλλά μπορούν να αραιωθούν, εάν κριθεί απαραίτητο (π.χ. στο πλαίσιο του σχεδιασμού της μελέτης). Ο προτιμώμενος διαλύτης για την αραίωση των υπό δοκιμή χημικών ουσιών είναι ο φυσιολογικός ορός. Μπορούν πάντως να χρησιμοποιούνται και εναλλακτικοί διαλύτες υπό ελεγχόμενες συνθήκες, αλλά πρέπει να αποδεικνύεται η καταλληλότητά τους.

Οι υγρές υπό δοκιμή ουσίες εφαρμόζονται στον κερατοειδή κατά τρόπο ώστε να καλύπτουν ομοιογενώς ολόκληρη την επιφάνειά του. Ο τυπικός όγκος είναι 0,03 ml.

Εάν είναι εφικτό, οι στερεές ουσίες θα πρέπει να κονιοποιούνται σε όσο το δυνατόν λεπτότερη σκόνη σε ιγδίο με ύπερο ή με συγκρίσιμο εργαλείο άλεσης. Η σκόνη εφαρμόζεται στον κερατοειδή κατά τρόπο ώστε η υπό δοκιμή χημική ουσία να καλύπτει ομοιόμορφα την επιφάνειά του. Η τυπική ποσότητα είναι 0,03 g.

Η υπό δοκιμή χημική ουσία (υγρή ή στερεά) εφαρμόζεται επί 10 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια εκπλένεται από τον οφθαλμό με ισότονο αλατούχο διάλυμα (περίπου 20 ml) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολούθως, ο οφθαλμός (με τη διάταξη που τον συγκρατεί) επαναφέρεται στη συσκευή υπερδιαπότισης στην αρχική κατακόρυφη θέση. Σε περίπτωση ανάγκης, μπορεί να πραγματοποιηθεί συμπληρωματική έκπλυση μετά την εφαρμογή επί 10 δευτερόλεπτα, καθώς και σε μεταγενέστερες χρονικές στιγμές (π.χ. όταν εντοπίζονται υπολείμματα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον κερατοειδή). Γενικά,, η επιπλέον ποσότητα αλατούχου διαλύματος που χρησιμοποιείται για έκπλυση δεν είναι κρίσιμης σημασίας, ενώ αντίθετα είναι σημαντική η παρατήρηση προσκόλλησης της χημικής ουσίας στον κερατοειδή.

Χημικές ουσίες που χρησιμεύουν ως μάρτυρες

Κάθε πείραμα πρέπει να περιλαμβάνει παράλληλους αρνητικούς μάρτυρες ή μάρτυρες με διαλύτη/φορέα και θετικούς μάρτυρες.

Κατά τη δοκιμή υγρών χωρίς αραίωση ή στερεών, ως παράλληλος αρνητικός μάρτυρας στη μέθοδο δοκιμών ICE χρησιμοποιείται φυσιολογικός ορός για την ανίχνευση μη ειδικών αλλαγών στο σύστημα δοκιμής και για να εξασφαλίζεται ότι οι συνθήκες προσδιορισμού δεν προκαλούν άτοπη απόκριση ερεθισμού.

Κατά τη δοκιμή αραιωμένων υγρών, στη μέθοδο δοκιμών περιλαμβάνεται ομάδα παράλληλων μαρτύρων με διαλύτη/φορέα για την ανίχνευση μη ειδικών αλλαγών στο σύστημα δοκιμής και για να εξασφαλίζεται ότι οι συνθήκες προσδιορισμού δεν προκαλούν άτοπη απόκριση ερεθισμού. Όπως αναφέρεται στην παράγραφο 31, μπορεί να χρησιμοποιείται μόνο διαλύτης/φορέας για τον οποίο έχει αποδειχθεί ότι δεν έχει δυσμενείς επιδράσεις στο σύστημα δοκιμής.

Σε κάθε πείραμα περιλαμβάνεται γνωστό ερεθιστικό των οφθαλμών ως παράλληλος θετικός μάρτυρας ούτως ώστε να επιβεβαιώνεται η πρόκληση της κατάλληλης απόκρισης. Δεδομένου ότι ο προσδιορισμός ICE χρησιμοποιείται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών για τον προσδιορισμό διαβρωτικών ή ισχυρών ερεθιστικών, ο θετικός μάρτυρας θα πρέπει να είναι χημική ουσία αναφοράς που επάγει σοβαρή απόκριση με αυτή τη μέθοδο. Ωστόσο, για να διασφαλιστεί η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας της απόκρισης στον θετικό μάρτυρα σε συνάρτηση με τον χρόνο, το μέγεθος της σοβαρής απόκρισης δεν θα

▼M7

πρέπει να είναι υπερβολικό. Θα πρέπει να συγκεντρώνονται επαρκή δεδομένα in vitro για τον θετικό μάρτυρα, ώστε να είναι εφικτός ο υπολογισμός στατιστικά καθορισμένου αποδεκτού εύρους αποκρίσεων σε αυτόν. Εάν για συγκεκριμένο θετικό μάρτυρα δεν διατίθενται επαρκή ιστορικά δεδομένα προερχόμενα από τη μέθοδο δοκιμών ICE, ενδέχεται να χρειάζεται η διεξαγωγή μελετών για την απόκτηση αυτών των στοιχείων.

Παραδείγματα θετικών μαρτύρων για υγρές υπό δοκιμή χημικές ουσίες είναι το οξικό οξύ 10 % και το χλωριούχο βενζαλκόνιο 5 %, ενώ παραδείγματα θετικών μαρτύρων για στερεές υπό δοκιμή χημικές ουσίες είναι το υδροξείδιο του νατρίου και το ιμιδαζόλιο.

Οι χημικές ουσίες συγκριτικής αξιολόγησης είναι χρήσιμες για την αξιολόγηση του δυναμικού οφθαλμικής ερεθιστικότητας άγνωστων χημικών ουσιών συγκεκριμένης χημικής τάξης ή κατηγορίας προϊόντων ή για την αξιολόγηση του σχετικού δυναμικού ερεθιστικότητας ενός ερεθιστικού των οφθαλμών εντός συγκεκριμένου εύρους αποκρίσεων ερεθισμού.

Μετρούμενα τελικά σημεία

Κερατοειδείς αξιολογούνται πριν από τη μεταχείριση και στα 30, 75, 120, 180 και 240 λεπτά (± 5 λεπτά) μετά την έκπλυση που ακολουθεί τη μεταχείριση. Τα χρονικά αυτά σημεία εξασφαλίζουν επαρκή αριθμό μετρήσεων κατά τη διάρκεια της τετράωρης μεταχείρισης, παρέχοντας παράλληλα επαρκή χρονικά περιθώρια μεταξύ των μετρήσεων ώστε να γίνουν οι απαραίτητες παρατηρήσεις σε όλους τους οφθαλμούς.

Τα αξιολογούμενα τελικά σημεία είναι η αδιαφάνεια και το οίδημα του κερατοειδούς, η κατακράτηση φλουορεσκεΐνης και οι μορφολογικές επιδράσεις (π.χ. εντύπωμα ή χαλάρωση του επιθηλίου). Όλα τα τελικά σημεία προσδιορίζονται σε καθένα από τα ανωτέρω χρονικά σημεία με εξαίρεση την κατακράτηση φλουορεσκεΐνης (η οποία προσδιορίζεται μόνο πριν από τη μεταχείριση και 30 λεπτά μετά την έκθεση στην υπό δοκιμή χημική ουσία).

Συνιστάται η λήψη φωτογραφιών για την τεκμηρίωση της αδιαφάνειας του κερατοειδούς, της κατακράτησης φλουορεσκεΐνης, των μορφολογικών επιδράσεων και, εάν διενεργείται, της παθολογοανατομικής εξέτασης.

Μετά την τελική εξέταση στις τέσσερις ώρες, συνιστάται στους χρήστες να διατηρούν τους οφθαλμούς σε κατάλληλο υλικό μονιμοποίησης [π.χ. ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμαλδεΰδης (φορμόλη)] για πιθανή ιστολογική εξέταση [βλ. παράγραφο 14 και βιβλιογραφική παραπομπή (8) για λεπτομέρειες].

Το οίδημα του κερατοειδούς προσδιορίζεται βάσει μετρήσεων του πάχους του κερατοειδούς με οπτικό παχύμετρο σε σχισμοειδή λυχνία, εκφράζεται ως ποσοστό επί τοις εκατό και υπολογίζεται βάσει του ακόλουθου τύπου:

$$\left(\frac{\textit{πάχος κερατοειδούς τη στιγμή } t - \textit{πάχος κερατοειδούς τη στιγμή } = 0}{\textit{πάχος κερατοειδούς τη στιγμή } = 0} \right) \times 100$$

Υπολογίζεται το μέσο ποσοστό οιδήματος του κερατοειδούς για όλους τους οφθαλμούς της δοκιμής και για όλα τα χρονικά σημεία παρατήρησης. Βάσει της υψηλότερης μέσης βαθμολογίας οιδήματος του κερατοειδούς, όπως παρατηρείται ανεξαρτήτως χρονικού σημείου, συνάγεται συνολική βαθμολογία κατηγορίας για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία (βλ. παράγραφο 51).

Η αδιαφάνεια του κερατοειδούς αξιολογείται στην κερατοειδική περιοχή με τη μέγιστη θολερότητα για να βαθμολογηθεί όπως εμφαίνεται στον πίνακα 1. Υπολογίζεται η μέση τιμή αδιαφάνειας κερατοειδούς για όλους τους οφθαλμούς της δοκιμής και για όλα τα χρονικά σημεία παρατήρησης. Βάσει της υψηλότερης μέσης βαθμολογίας της αδιαφάνειας του κερατοειδούς, όπως παρατηρείται ανεξαρτήτως χρονικού σημείου, εξάγεται συνολική βαθμολογία κατηγορίας για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία (βλ. παράγραφο 51).

▼M7

Πίνακας 1

Βαθμολογία αδιαφάνειας κερατοειδούς

Βαθμολογία	Παρατήρηση:
0	Απουσία αδιαφάνειας
0,5	Πολύ αμυδρή αδιαφάνεια
1	Διάσπαρτες ή διάχυτες αδιαφανείς περιοχές, ευκρινώς ορατές λεπτομέρειες της ίριδας
2	Ευδιάκριτη ημιδιαφανής περιοχή· ελαφρώς σκιασμένες λεπτομέρειες της ίριδας
3	Σοβαρή αδιαφάνεια του κερατοειδούς, καμία ορατή λεπτομέρεια της ίριδας· μόλις διακριτό μέγεθος της κόρης
4	Πλήρως αδιαφανής κερατοειδής, μη διακρινόμενη ίριδα

Η κατακράτηση φλουορεσκεΐνης αξιολογείται κατά τον χρόνο παρατήρησης των 30 λεπτών, όπως εμφαίνεται στον πίνακα 2. Η μέση τιμή κατακράτησης φλουορεσκεΐνης για όλους τους οφθαλμούς της δοκιμής υπολογίζεται στο χρονικό σημείο παρατήρησης των 30 λεπτών και χρησιμοποιείται για να εξαχθεί συνολική βαθμολογία κατηγορίας για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία (βλ. παράγραφο

Πίνακας 2

Βαθμολογία κατακράτησης φλουορεσκεΐνης

Βαθμολογία	Παρατήρηση:
0	Δεν παρατηρείται κατακράτηση φλουορεσκεΐνης
0,5	Ασήμαντη χρώση μεμονωμένων κυττάρων
1	Διάσπαρτη χρώση μεμονωμένων κυττάρων σε ολόκληρη την υποβληθείσα σε μεταχείριση επιφάνεια του κερατοειδούς
2	Εστιακή ή συρρέουσα πυκνή χρώση μεμονωμένων κυττάρων
3	Κατακράτηση φλουορεσκεΐνης σε συρροή μεγάλων περιοχών του κερατοειδούς

Στις μορφολογικές επιδράσεις περιλαμβάνεται το «εντύπωμα» των κερατοειδικών επιθηλιακών κυττάρων, η «χαλάρωση» του επιθηλίου, η «τράχυνση» της επιφάνειας του κερατοειδούς και η «προσκόλληση» της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον κερατοειδή. Τα ευρήματα αυτά ποικίλλουν σε σοβαρότητα και ενδέχεται να παρατηρούνται ταυτόχρονα. Η ταξινόμησή τους είναι υποκειμενική ανάλογα με την ερμηνεία του ερευνητή.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αξιολόγηση των δεδομένων

Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της κερατοειδικής αδιαφάνειας, του οιδήματος του κερατοειδούς και της κατακράτησης φλουορεσκεΐνης θα πρέπει να αξιολογούνται χωριστά ώστε να προκύπτει κατηγορία ICE για κάθε τελικό σημείο. Ακολούθως, οι κατηγορίες ICE για κάθε τελικό σημείο συνδυάζονται για την ταξινόμηση της ερεθιστικότητας κάθε υπό έλεγχο χημικής ουσίας.

Κριτήρια απόφασης

Μετά την αξιολόγηση κάθε τελικού σημείου, είναι εφικτή η κατάταξη σε κατηγορίες ICE βάσει προκαθορισμένου εύρους. Η ερμηνεία του οιδήματος του κερατοειδούς (πίνακας 3), της αδιαφάνειάς του (πίνακας 4) και της κατακράτησης φλουορεσκεΐνης (πίνακας 5) βάσει τεσσάρων κατηγοριών ICE πραγματοποιείται σύμφωνα με τις κλίμακες που παρατίθενται παρακάτω. Επισημαίνεται ότι η βαθμολογία οιδήματος του κερατοειδούς που εμφαίνεται στον πίνακα 3 ισχύει

▼M7

μόνο εάν το πάχος μετράται με μικροσκόπιο σχισμοειδούς λυχνίας (π.χ. Haag-Streit BP 900), με παχύμετρο αριθ. 1 και ρύθμιση του πλάτους σχισμής στο $9\frac{1}{2}$, που ισούται με 0,095 mm. Οι χρήστες θα πρέπει να γνωρίζουν ότι η ένδειξη της σχισμοειδούς λυχνίας για το πάχος του κερατοειδούς μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τη ρύθμιση του πλάτους της σχισμής.

Πίνακας 3

Κριτήρια ταξινόμησης ICE για το οίδημα του κερατοειδούς

Μέσο οίδημα κερατοειδούς (%) (*)	Κατηγορία ICE
0 έως 5	I
> 5 έως 12	II
> 12 έως 18 (> 75 min μετά τη μεταχείριση)	II
> 12 έως 18 (≤ 75 min μετά τη μεταχείριση)	III
> 18 έως 26	III
> 26 έως 32 (> 75 min μετά τη μεταχείριση)	III
> 26 έως 32 (≤ 75 min μετά τη μεταχείριση)	IV
> 32	IV

(*) Υψηλότερη μέση βαθμολογία για που παρατηρείται σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή

Πίνακας 4

Κριτήρια ταξινόμησης ICE για την αδιαφάνεια

Υψηλότερη μέση βαθμολογία αδιαφάνειας (*)	Κατηγορία ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-4,0	IV

(*) Μέγιστη μέση βαθμολογία που παρατηρείται σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή (με βάση τη βαθμολογία αδιαφάνειας όπως ορίζεται στον πίνακα 1).

Πίνακας 5

Κριτήρια ταξινόμησης ICE για τη μέση κατακράτηση φλουορεσκεΐνης

Μέση βαθμολογία κατακράτησης φλουορεσκεΐνης στα 30 λεπτά μετά τη μεταχείριση (*)	Κατηγορία ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV

(*) Με βάση βαθμολογία όπως ορίζεται στον πίνακα 2.

Η ταξινόμηση in vitro της υπό δοκιμή χημικής ουσίας καθορίζεται από την κατηγορία του GHS που αντιστοιχεί στον συνδυασμό των κατηγοριών που προκύπτουν για το οίδημα του κερατοειδούς, την κερατοειδική αδιαφάνεια και την κατακράτηση φλουορεσκεΐνης, όπως περιγράφεται στον πίνακα 6.

▼M7

Πίνακας 6

Συνολική in vitro ταξινόμηση

Ταξινόμηση του GHS των ΗΕ	Συνδυασμοί των 3 τελικών σημείων
«Καμία κατηγορία»	3 × I 2 × I, 1 × II
Αδύνατη η διατύπωση πρόβλεψης	Άλλοι συνδυασμοί
Κατηγορία 1	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Αδιαφάνεια κερατοειδούς ≥ 3 στα 30 min (σε τουλάχιστον 2 οφθαλμούς) Αδιαφάνεια κερατοειδούς = 4 σε οποιοδήποτε χρονικό σημείο (σε τουλάχιστον 2 οφθαλμούς) Σοβαρή χαλάρωση του επιθηλίου (σε τουλάχιστον 1 οφθαλμό)

(*) Λιγότερο πιθανοί συνδυασμοί.

Κριτήρια αποδοχής της μελέτης

Μια δοκιμή θεωρείται αποδεκτή εάν οι παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες ή μάρτυρες με φορέα/διαλύτη και οι παράλληλοι θετικοί μάρτυρες ταξινομούνται ως «Καμίας κατηγορίας» του GHS και κατηγορίας 1 του GHS αντίστοιχα.

Έκθεση δοκιμής

Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία, εφόσον αυτά έχουν σημασία για τη διενέργεια της μελέτης:

Υπό δοκιμή χημική ουσία και μάρτυρες:

— Χημική/-ές ονομασία/-ες, όπως ο συντακτικός τύπος που χρησιμοποιείται από την υπηρεσία Chemical Abstracts Service (CAS), συνοδευόμενη/-ες από άλλες ονομασίες, εάν είναι γνωστές·

— αριθμός μητρώου CAS (RN), εάν είναι γνωστός·

— καθαρότητα και σύνθεση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας/του μάρτυρα (σε κατά βάρος εκατοστιαία αναλογία), εφόσον τα στοιχεία αυτά είναι διαθέσιμα·

— φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως η φυσική κατάσταση, η πτητικότητα, το pH, η σταθερότητα, η χημική κατηγορία, η υδατοδιαλυτότητα, που έχουν σημασία για τη διενέργεια της μελέτης·

— κατεργασία της υπό δοκιμή χημικής ουσίας/των μαρτύρων πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, κονιοποίηση)·

— σταθερότητα, εφόσον είναι γνωστή·

Πληροφορίες σχετικά με τον χορηγό και την εγκατάσταση δοκιμών

— όνομα και διεύθυνση του χορηγού, της εγκατάστασης δοκιμών και του διευθυντή της μελέτης·

— προσδιορισμός της πηγής των οφθαλμών (π.χ. εγκατάσταση από την οποία συλλέχθηκαν)·

Συνθήκες της μεθόδου δοκιμών

— Περιγραφή του χρησιμοποιούμενου συστήματος δοκιμής·

▼M7

— Χρησιμοποιούμενο μικροσκόπιο με σχισμοειδή λυχνία (π.χ. μοντέλο) και ρυθμίσεις για το χρησιμοποιούμενο μικροσκόπιο με σχισμοειδή λυχνία·

— Παραπομπή σε ιστορικά αποτελέσματα για αρνητικούς και θετικούς μάρτυρες και, κατά περίπτωση, σε ιστορικά δεδομένα που αποδεικνύουν αποδεκτά πεδία τιμών αναφοράς για παράλληλους μάρτυρες συγκριτικής αξιολόγησης·

— Η διαδικασία που χρησιμοποιείται για τη διασφάλιση της ακεραιότητας (ορθότητα και αξιοπιστία) της μεθόδου δοκιμών με την πάροδο του χρόνου (π.χ. περιοδικές δοκιμές χημικών ουσιών ελέγχου ικανότητας).

Συλλογή και προετοιμασία των οφθαλμών

— Ηλικία και βάρος του ζώου δότη και, αν είναι διαθέσιμα, άλλα ειδικά χαρακτηριστικά των ζώων από τα οποία συλλέχθηκαν οι οφθαλμοί (π.χ. φύλο, φυλή)·

— Συνθήκες αποθήκευσης και μεταφοράς των οφθαλμών (π.χ. ημερομηνία και χρόνος συλλογής των οφθαλμών, χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ της συλλογής των κεφαλών των ορνιθίων και της τοποθέτησης των εξορυχθέντων οφθαλμών σε θάλαμο υπερδιαπότισης)·

— Προετοιμασία και στερέωση των οφθαλμών, συμπεριλαμβανομένων δηλώσεων σχετικά με την ποιότητά τους, τη θερμοκρασία των θαλάμων του οφθαλμού και τα κριτήρια επιλογής των οφθαλμών που χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή.

Διαδικασία δοκιμής

— αριθμός επαναλήψεων (replicates)·

— στοιχεία ταυτότητας των χρησιμοποιούμενων αρνητικών και θετικών μαρτύρων (και, κατά περίπτωση, των μαρτύρων με διαλύτη και των μαρτύρων συγκριτικής αξιολόγησης)·

— δόση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εφαρμογή και χρόνος έκθεσης που χρησιμοποιήθηκε·

— χρονικά σημεία παρατήρησης (πριν και μετά τη μεταχείριση)·

— περιγραφή των χρησιμοποιούμενων κριτηρίων αξιολόγησης και λήψης αποφάσεων·

— περιγραφή των χρησιμοποιούμενων κριτηρίων αποδοχής της μελέτης·

— περιγραφή τυχόν τροποποιήσεων της διαδικασίας δοκιμής.

Αποτελέσματα

— Παρουσίαση, σε μορφή πίνακα, των βαθμών του οιδήματος και της αδιαφάνειας του κερατοειδούς και της κατακράτησης φλουορεσκεΐνης για κάθε οφθαλμό χωριστά και σε κάθε χρονικό σημείο παρατήρησης, περιλαμβανομένων των μέσων τιμών βαθμολόγησης σε κάθε χρονική στιγμή παρατήρησης όλων των εξετασθέντων οφθαλμών·

— οι υψηλότερες μέσες τιμές του οιδήματος και της αδιαφάνειας του κερατοειδούς και της κατακράτησης φλουορεσκεΐνης (από κάθε χρονικό σημείο της παρατήρησης) και της αντίστοιχης κατηγορίας της μεθόδου ICE·

— περιγραφή άλλων παρατηρούμενων επιδράσεων·

— η προκύπτουσα in vitro ταξινόμηση βάσει του GHS·

— κατά περίπτωση, φωτογραφίες του οφθαλμού.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Συμπέρασμα

▼**M7**

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report — In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.

(2) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

(3) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report — Current Status of *in vitro* Test Methods for Identifying Mild/Moderate Ocular Irritants: Η μέθοδος δοκιμών σε απομονωμένους οφθαλμούς ορνιθίων (ICE). Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm.

(4) United Nations (UN) (2011). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fourth revised edition, UN New York and Geneva, 2011. Διατίθεται στη διαδικτυακή διεύθυνση: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html.

(5) Streamlined Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438 on the Isolated Chicken Eye for Eye Irritation/Corrosion. Series on Testing and Assessment no. 188 (Part 1 and Part 2), OECD, Paris.

(6) Κεφάλαιο B.5 του παρόντος παραρτήματος, Οξείας μορφής ερεθισμός/διάβρωση των οφθαλμών.

(7) Scott L, Eskes C, Hoffman S, Adriaens E, Alepee N, Bufo M, Clothier R, Facchini D, Faller C, Guest R, Hamernik K, Harbell J, Hartung T, Kamp H, Le Varlet B, Meloni M, Mcnamee P, Osborn R, Pape W, Pfannenbecker U, Prinsen M, Seaman C, Spielmann H, Stokes W, Trouba K, Vassallo M, Van den Berghe C, Van Goethem F, Vinardell P, Zuang V (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-up and Top-down Approaches. Toxicology *In Vitro* 24, 1-9.

(8) OECD (2011) Guidance Document on «The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-Severe Irritants». Series on Testing and Assessment no. 160, OECD, Paris.

(9) ICCVAM. (2006). Έγγραφο επισκόπησης των διαθέσιμων δεδομένων: Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Διατίθεται στη διαδικτυακή διεύθυνση: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm.

(10) Prinsen, M.K. and Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.

(11) DB-ALM (INVITTOX) (2009). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET) / Isolated Chicken Eye Test, 13pp. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/.

(12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.

(13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol*. 34:291-296.

▼**M7**

(14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.

(15) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? Toxicology *in Vitro* 20,78-81.

(16) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf.

(17) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

(18) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.- Toxicol.*- 19, 471-480.

▼M7

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ορθότητα: η εγγύτητα της συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί κριτήριο επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών και μια από τις πτυχές της «καταλληλότητας». Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς τη «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας μεθόδου δοκιμών.

Χημική ουσία συγκριτικής αξιολόγησης: χημική ουσία που χρησιμοποιείται ως πρότυπο για σύγκριση με μια υπό δοκιμή χημική ουσία. Οι χημικές ουσίες συγκριτικής αξιολόγησης θα πρέπει να διαθέτουν τις ακόλουθες ιδιότητες: i) σταθερή/-ές και αξιόπιστη/-ες προέλευση/-εις, ii) δομική και λειτουργική ομοιότητα προς τη χημική τάξη των υπό δοκιμή χημικών ουσιών, iii) γνωστά φυσικά/χημικά χαρακτηριστικά, iv) δεδομένα τεκμηρίωσης γνωστών επιδράσεων και (v) γνωστή ισχύ στο εύρος της επιθυμητής απόκρισης.

Ανοδική (bottom-up) προσέγγιση: κλιμακωτή προσέγγιση που χρησιμοποιείται για χημικές ουσίες για τις οποίες υπάρχουν υπόνοιες ότι δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη. Η προσέγγιση αυτή αρχίζει με τον προσδιορισμό των χημικών ουσιών που δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν (αρνητική έκβαση) με βάση άλλες χημικές ουσίες (θετική έκβαση).

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Κερατοειδής: το διαφανές τμήμα του πρόσθιου τμήματος του οφθαλμικού βολβού, το οποίο καλύπτει την ίριδα και την κόρη και επιτρέπει την είσοδο φωτός στο εσωτερικό του οφθαλμού.

Αδιαφάνεια κερατοειδούς: μέτρηση του βαθμού θολερότητας του κερατοειδούς κατόπιν έκθεσης στην υπό δοκιμή ουσία. Η αυξημένη αδιαφάνεια είναι ενδεικτική βλάβης του κερατοειδούς.

Οίδημα κερατοειδούς: αντικειμενική μέτρηση, στο πλαίσιο της δοκιμής ICE, του βαθμού διάτασης του κερατοειδούς κατόπιν έκθεσης σε υπό δοκιμή χημική ουσία. Εκφράζεται ως ποσοστό επί τοις εκατό και υπολογίζεται βάσει των αρχικών (πριν τη χορήγηση δόσης) μετρήσεων του πάχους του κερατοειδούς και των μετρήσεων του πάχους που καταγράφονται σε τακτά διαστήματα μετά την έκθεση στην υπό δοκιμή χημική ουσία κατά τη δοκιμή ICE. Ο βαθμός οιδήματος του κερατοειδούς είναι ενδεικτικός βλάβης του κερατοειδούς.

Οφθαλμικός ερεθισμός: πρόκληση αλλοιώσεων του οφθαλμού, οι οποίες εμφανίζονται μετά την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην εμπρόσθια επιφάνειά του και είναι πλήρως αναστρέψιμες εντός 21 ημερών από την εφαρμογή της ουσίας. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά προς τους όρους «αναστρέψιμες επιδράσεις στους οφθαλμούς» και «κατηγορία 2 του GHS των Ηνωμένων Εθνών» (4).

Ποσοστό ψευδοαρνητικής έκβασης: το ποσοστό του συνόλου των θετικών χημικών ουσιών που εσφαλμένα χαρακτηρίζονται ως αρνητικές με μια μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί έναν από τους δείκτες επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών.

Ποσοστό ψευδοθετικής έκβασης: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών χημικών ουσιών που εσφαλμένα χαρακτηρίζονται ως θετικές με μια μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί έναν από τους δείκτες επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών.

Κατακράτηση φλουορεσκεΐνης: υποκειμενική μέτρηση, στο πλαίσιο της δοκιμής ICE, του βαθμού κατακράτησης νατριούχου φλουορεσκεΐνης από τα κερατοειδικά επιθηλιακά κύτταρα κατόπιν έκθεσης στην υπό δοκιμή χημική ουσία. Ο βαθμός κατακράτησης φλουορεσκεΐνης είναι ενδεικτικός βλάβης του κερατοειδικού επιθηλίου.

Κίνδυνος: εγγενής ιδιότητα ενός παράγοντα ή μιας κατάστασης που μπορεί να έχει δυσμενείς επιδράσεις όταν οργανισμός, σύστημα ή (υπο)πληθυσμός εκτεθεί στον συγκεκριμένο παράγοντα.

Μη αναστρέψιμες επιδράσεις στους οφθαλμούς: βλ. «σοβαρή οφθαλμική βλάβη» και «κατηγορία 1 του GHS των Ηνωμένων Εθνών».

▼M7

Μείγμα: ένα μείγμα ή διάλυμα που αποτελείται από δύο ή περισσότερες ουσίες οι οποίες δεν αντιδρούν μέσα σε αυτό (4).

Αρνητικός μάρτυρας: δείγμα επανάληψης (replicate) που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και δεν υποβάλλεται σε μεταχείριση. Το δείγμα αυτό εξετάζεται μαζί με τα δείγματα που έχουν υποβληθεί σε μεταχείριση με την υπό δοκιμή χημική ουσία και με άλλα δείγματα-μάρτυρες, ούτως ώστε να διαπιστώνεται αν ο διαλύτης αλληλεπιδρά με το σύστημα δοκιμής.

Δεν ταξινομείται: χημικές ουσίες που δεν ταξινομούνται ως ερεθιστικά για τους οφθαλμούς (κατηγορία 2 του GHS των Ηνωμένων Εθνών) ούτε ως ουσίες που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη (κατηγορία 1 του GHS των Ηνωμένων Εθνών). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά προς τον όρο «καμία κατηγορία του GHS των Ηνωμένων Εθνών».

Θετικός μάρτυρας: δείγμα επανάληψης που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και υποβάλλεται σε μεταχείριση με χημική ουσία που είναι γνωστό ότι προκαλεί θετική απόκριση. Για να διασφαλισθεί η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας της απόκρισης του θετικού μάρτυρα σε συνάρτηση με τον χρόνο, το μέγεθος της σοβαρής απόκρισης δεν πρέπει να είναι υπερβολικό.

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια μέθοδος δοκιμών μπορεί να διεξάγεται με υψηλή αναπαραγωγιμότητα διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, καθώς και της ενδοεργαστηριακής επαναληψιμότητας.

Αναστρέψιμες επιδράσεις στους οφθαλμούς: βλ. «ερεθισμός του οφθαλμού» και «κατηγορία 2 του GHS των Ηνωμένων Εθνών».

Σοβαρή οφθαλμική βλάβη: πρόκληση βλάβης στους οφθαλμικούς ιστούς ή σοβαρής μείωσης της όρασης, κατόπιν εφαρμογής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην πρόσθια επιφάνεια του οφθαλμού, η οποία δεν είναι πλήρως αναστρέψιμη εντός 21 ημερών από την εφαρμογή. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά προς τους όρους «μη αναστρέψιμες επιδράσεις στους οφθαλμούς» και «κατηγορία 1 του GHS των Ηνωμένων Εθνών» (4).

Σχισμοειδής λυχνία: όργανο για την απευθείας εξέταση του οφθαλμού υπό μεγέθυνση με διοφθάλμιο μικροσκόπιο μέσω της δημιουργίας στερεοσκοπικής όρθιας εικόνας. Στη μέθοδο δοκιμής ICE, το συγκεκριμένο όργανο χρησιμοποιείται για την παρατήρηση των πρόσθιων μερών του οφθαλμού ορνιθίου καθώς και για την αντικειμενική μέτρηση του πάχους του κερατοειδούς με προσαρτημένο παχύμετρο.

Μάρτυρας με διαλύτη/φορέα: δείγμα που δεν υποβάλλεται σε μεταχείριση και περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής, συμπεριλαμβανομένου του διαλύτη ή του φορέα. Το δείγμα αυτό υποβάλλεται σε δοκιμή μαζί με τα δείγματα που έχουν υποβληθεί σε μεταχείριση με την υπό δοκιμή χημική ουσία και με άλλα δείγματα-μάρτυρες, με σκοπό τον καθορισμό της βασικής απόκρισης των δειγμάτων που υποβάλλονται σε μεταχείριση με την υπό δοκιμή χημική ουσία διαλυμένη στον ίδιο διαλύτη ή φορέα. Όταν το εν λόγω δείγμα υποβάλλεται σε δοκιμή με παράλληλο αρνητικό μάρτυρα, καταδεικνύει επίσης αν ο διαλύτης ή ο φορέας αλληλεπιδρά με το σύστημα δοκιμής.

Ουσία: τα χημικά στοιχεία και οι ενώσεις τους σε φυσική κατάσταση ή όπως λαμβάνονται με οποιαδήποτε παραγωγική διεργασία, στα οποία συμπεριλαμβάνονται όλα τα πρόσθετα που απαιτούνται για να διατηρείται η σταθερότητα του προϊόντος καθώς και τυχόν προσμείξεις που προκύπτουν από τη χρησιμοποιούμενη διεργασία, αλλά από τα οποία εξαιρούνται οι διαλύτες που είναι δυνατόν να διαχωριστούν χωρίς να επηρεαστεί η σταθερότητα της ουσίας ούτε να μεταβληθεί η σύνθεσή της (4).

Επιφανειοδραστική ουσία: ονομάζεται επίσης τασιενεργή ουσία και είναι ουσία, όπως τα απορρυπαντικά, που μπορεί να μειώσει την επιφανειακή τάση ενός υγρού και, ως εκ τούτου, του επιτρέπει να σχηματίζει αφρό ή να διεισδύει σε στερεά· είναι επίσης γνωστή ως διαβρεκτικό μέσο.

▼M7

Καθοδική (top-down) προσέγγιση: κλιμακωτή προσέγγιση που χρησιμοποιείται για χημική ουσία για την οποία υπάρχουν υπόνοιες ότι προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη. Η προσέγγιση αυτή αρχίζει με τον προσδιορισμό των χημικών ουσιών που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη (θετικό αποτέλεσμα) σε σχέση με άλλες χημικές ουσίες (αρνητικό αποτέλεσμα).

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Κλιμακωτή στρατηγική δοκιμών: στρατηγική δοκιμών κατά στάδια, στο πλαίσιο της οποίας όλες οι υφιστάμενες πληροφορίες για μια υπό δοκιμή χημική ουσία εξετάζονται με συγκεκριμένη σειρά, με χρήση διαδικασίας βάρους της απόδειξης σε κάθε στάδιο, προκειμένου να διαπιστώνεται, πριν από τη μετάβαση στο επόμενο στάδιο, αν διατίθενται επαρκείς πληροφορίες για να ληφθεί απόφαση περί ταξινόμησης κινδύνου. Εάν σε υπό δοκιμή χημική ουσία μπορεί να αποδοθεί δυναμικό ερεθιστικότητας βάσει των υφιστάμενων πληροφοριών, δεν απαιτούνται περαιτέρω δοκιμές. Εάν βάσει των υφιστάμενων πληροφοριών δεν είναι εφικτή η απόδοση δυναμικού ερεθιστικότητας σε υπό δοκιμή χημική ουσία, εφαρμόζεται κλιμακωτή διαδικασία διαδοχικών δοκιμών σε ζώα έως ότου καταστεί εφικτή η βέβαιη ταξινόμηση της ουσίας.

Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Προϊόντων των Ηνωμένων Εθνών (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) (GHS των Ηνωμένων Εθνών): σύστημα που προτείνει την ταξινόμηση των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) με βάση τυποποιημένα είδη και βαθμούς φυσικών κινδύνων και κινδύνων για την υγεία και το περιβάλλον και καλύπτει τα αντίστοιχα επικοινωνιακά στοιχεία, όπως εικονογράμματα, προειδοποιητικές λέξεις, δηλώσεις επικινδυνότητας, δηλώσεις προφύλαξης και δελτία δεδομένων ασφαλείας, για τη μετάδοση πληροφοριών σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις των εν λόγω προϊόντων με σκοπό την προστασία των ανθρώπων (εργοδοτών, εργαζομένων, μεταφορέων, καταναλωτών και διασωστών) και του περιβάλλοντος (4).

Κατηγορία 1 του GHS των Ηνωμένων Εθνών: Βλ. «Σοβαρή οφθαλμική βλάβη» και/ή «μη αναστρέψιμες οφθαλμικές επιδράσεις».

Κατηγορία 2 του GHS των Ηνωμένων Εθνών: Βλ. «Οφθαλμικός ερεθισμός» και/ή «Αναστρέψιμες επιδράσεις στον οφθαλμό».

«Καμία κατηγορία» του GHS των Ηνωμένων Εθνών: ουσίες που δεν πληρούν τις απαιτήσεις για να ταξινομηθούν ως κατηγορίας 1 ή 2 (2A ή 2B) του GHS των Ηνωμένων Εθνών. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά προς τον όρο «δεν ταξινομείται».

Επικυρωμένη μέθοδος δοκιμών: μέθοδος δοκιμών για την οποία έχουν ολοκληρωθεί μελέτες επικύρωσης προκειμένου να προσδιοριστούν η καταλληλότητα (συμπεριλαμβανομένης της ορθότητας) και η αξιοπιστία της για συγκεκριμένο σκοπό. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι επιδόσεις μιας επικυρωμένης μεθόδου δοκιμών όσον αφορά την ορθότητα και την αξιοπιστία ενδέχεται να μην επαρκούν για να κριθεί αποδεκτή για τον προτεινόμενο σκοπό.

Βάρος της απόδειξης: η διαδικασία εξέτασης της ισχύος και των αδυναμιών διαφόρων πληροφοριών για τη συναγωγή και την τεκμηρίωση συμπεράσματος σχετικά με το δυναμικό κινδύνου που ενέχει μια χημική ουσία.

▼M7

Προσάρτημα 2

ΟΥΣΙΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΔΟΚΙΜΩΝ ICE

Πριν εντάξουν την παρούσα μέθοδο δοκιμών στη συνήθη πρακτική τους, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα προσδιορίζοντας σωστά την ταξινόμηση του κινδύνου για τους οφθαλμούς από τις 13 χημικές ουσίες που συνιστώνται στον πίνακα 1. Οι ουσίες αυτές επιλέχθηκαν ως αντιπροσωπευτικές του φάσματος αποκρίσεων όσον αφορά τους κινδύνους για τους οφθαλμούς, με βάση τα αποτελέσματα της οφθαλμικής δοκιμής in vivo σε κουνέλια (TG 405) (17) και το σύστημα ταξινόμησης GHS των Ηνωμένων Εθνών (δηλ. κατηγορίες 1, 2A, 2B και «δεν ταξινομείται») (4) (6). Άλλα κριτήρια επιλογής αφορούσαν τη διαθεσιμότητα των χημικών ουσιών στο εμπόριο και την ύπαρξη υψηλής ποιότητας δεδομένων αναφοράς in vivo, καθώς και υψηλής ποιότητας δεδομένων in vitro από τη μέθοδο δοκιμών ICE. Δεδομένα αναφοράς είναι διαθέσιμα στο απλουστευμένο συνοπτικό έγγραφο (Streamlined Summary Document) (3) και στο έγγραφο επισκόπησης των διαθέσιμων δεδομένων (Background Review Document) της ICCVAM για τη μέθοδο δοκιμών ICE (9).

Πίνακας 1

Συνιστώμενες χημικές ουσίες για την απόδειξη της τεχνικής ικανότητας ως προς τη δοκιμή ICE

Χημική ουσία	Αριθμός CAS	Χημική κατηγορία [1]	Φυσική μορφή	Ταξινόμηση In Vivo [2]	Ταξινόμηση In Vitro [3]
Χλωριούχο βενζαλκόνιο (5 %)	8001-54-5	Ένωση κατιόντων υδριδίων	Υγρό	Κατηγορία 1	Κατηγορία 1
Χλωρεξιδίνη	55-56-1	Αμίνη, αμιδίνη	Στερεό	Κατηγορία 1	Κατηγορία 1
Διβενζοϋλο-L-τρυγικό οξύ	2743-38-6	Καρβοξυλικό οξύ, εστέρας	Στερεό	Κατηγορία 1	Κατηγορία 1
Ιμιδαζόλιο	288-32-4	Ετεροκυκλική ένωση	Στερεό	Κατηγορία 1	Κατηγορία 1
Τριχλωροξικό οξύ (30 %)	76-03-9	Καρβοξυλικό οξύ	Υγρό	Κατηγορία 1	Κατηγορία 1
2,6-Διχλωροβενζοϋλοχλωρίδιο	4659-45-4	Ακυλαλογονίδιο	Υγρό	Κατηγορία 2A	Δεν είναι δυνατόν να γίνει πρόβλεψη [4]
Νιτρικό αμμώνιο	6484-52-2	Ανόργανο άλας	Στερεό	Κατηγορία 2A [5]	Δεν είναι δυνατόν να γίνει πρόβλεψη [4]
2-Μεθυλακετοξικός αιθυλεστέρας	609-14-3	Κετόνη, εστέρας	Υγρό	Κατηγορία 2B	Δεν είναι δυνατόν να γίνει πρόβλεψη [4]
Διμεθυλοσουλφοξείδιο	67-68-5	Οργανική ένωση του θείου	Υγρό	Καμία κατηγορία	Καμία κατηγορία
Γλυκερόλη (γλυκερίνη)	56-81-5	Αλκοόλη	Υγρό	Καμία κατηγορία	Αριθ. κατηγορίας (οριακά)
Μεθυλοκυκλοπεντάνιο	96-37-7	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός)	Υγρό	Καμία κατηγορία	Καμία κατηγορία
n-Εξάνιο	110-54-3	Υδρογονάνθρακας (άκυκλος)	Υγρό	Καμία κατηγορία	Καμία κατηγορία

▼**M7**

Χημική ουσία	Αριθμός CAS	Χημική κατηγορία ([1])	Φυσική μορφή	Ταξινόμηση In Vivo ([2])	Ταξινόμηση In Vitro ([3])
Τριακετίνη	102-76-1	Λιπίδιο	Υγρό	Δεν ταξινομείται	Καμία κατηγορία

Συντμήσεις: Αριθ. CAS = αριθμός μητρώου της υπηρεσίας Chemical Abstracts Service

([1]) Κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία κατατάχθηκε σε χημική κατηγορία σύμφωνα με πρότυπο σύστημα ταξινόμησης, το οποίο βασίζεται στο σύστημα ταξινόμησης Medical Subject Headings (MeSH) της National Library of Medicine (θεματικές επικεφαλίδες ιατρικού περιεχομένου της Εθνικής Ιατρικής Βιβλιοθήκης, διατίθεται στη διαδικτυακή διεύθυνση https://www.nlm.nih.gov/mesh/).

([2]) Βάσει των αποτελεσμάτων της οφθαλμικής δοκιμής in vivo σε κουνέλια (OECD TG 405) και σύμφωνα με το GHS των Ηνωμένων Εθνών (4)(6).

([3]) Βάσει των αποτελεσμάτων στη μέθοδο ICE, όπως περιγράφεται στον πίνακα 6.

([4]) Συνδυασμός των βαθμολογιών στη μέθοδο ICE, εκτός από εκείνες που περιγράφονται στον πίνακα 6 για τον προσδιορισμό των ουσιών «Καμίας κατηγορίας» του GHS και κατηγορίας 1 του GHS (βλ. πίνακα 6)

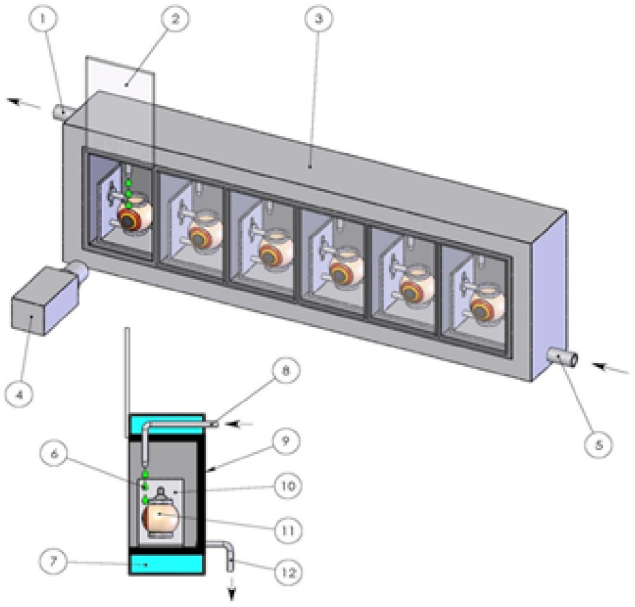
([5]) Η ταξινόμηση ως κατηγορίας 2A ή 2B εξαρτάται από την ερμηνεία του κριτηρίου του GHS των Ηνωμένων Εθνών για τη διάκριση μεταξύ αυτών των δύο κατηγοριών, δηλ. για την κατάταξη στην κατηγορία 2A είναι απαραίτητο να εμφανίζει επιδράσεις την 7η ημέρα 1 από τα 3 ζώα έναντι 2 από τα 3 ζώα. Η μελέτη in vivo περιελάμβανε 3 ζώα. Όλα τα τελικά σημεία, εκτός από το ερύθημα του επιπεφυκότος σε ένα ζώο, επανήλθαν σε μηδενική βαθμολογία την ημέρα 7 ή νωρίτερα. Το ένα ζώο που δεν είχε αναρρώσει πλήρως έως την ημέρα 7 παρουσίαζε ερύθημα επιπεφυκότος βαθμού 1 (την ημέρα 7) το οποίο εξαφανίστηκε την ημέρα 10.

▼**M7**

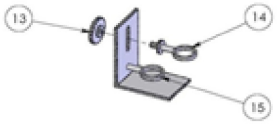
Προσάρτημα 3

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ΣΥΣΚΕΥΗΣ ΥΠΕΡΔΙΑΠΟΤΙΣΗΣ ΚΑΙ ΣΦΙΓΚΤΗΡΑ ΟΦΘΑΛΜΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΔΟΚΙΜΩΝ ICE

[Βλ. Burton et al. (18) για επιπλέον γενικές περιγραφές της συσκευής υπερδιαπότισης και του σφιγκτήρα οφθαλμών]



CROSS SECTION COMPARTMENT



EYE HOLDER

α/α	Περιγραφή	α/α	Περιγραφή
1	Στόμιο εξόδου θερμού νερού	9	Διαμέρισμα
2	Συρόμενη θύρα	10	Στήριγμα οφθαλμών
3	Συσκευή υπερδιαπότισης	11	Οφθαλμός ορνιθίου
4	Οπτικό όργανο μέτρησης	12	Στόμιο εξόδου αλατούχου διαλύματος
5	Στόμιο εισόδου θερμού νερού	13	Κοχλίας στερέωσης
6	Αλατούχο διάλυμα	14	Ρυθμιζόμενος άνω βραχίονας
7	Θερμό νερό	15	Σταθερός κάτω βραχίονας
8	Στόμιο εισόδου αλατούχου διαλύματος		

▼M7

Β.49. ΔΟΚΙΜΉ ΜΙΚΡΟΠΥΡΉΝΩΝ IN VITRO ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΏΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 487 του ΟΟΣΑ (2016). Αποτελεί μέρος μιας σειράς μεθόδων δοκιμών γενετικής τοξικολογίας. Έχει συνταχθεί ένα έγγραφο του ΟΟΣΑ με συνοπτικές πληροφορίες για τις δοκιμές γενετικής τοξικολογίας και μια επισκόπηση των πρόσφατων αλλαγών που έγιναν σε αυτές τις κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών (1).

Η δοκιμή μικροπυρήνων in vitro (MNvit) αποτελεί δοκιμή γονιδιοτοξικότητας για την ανίχνευση μικροπυρήνων στο κυτταρόπλασμα των μεσοφασικών κυττάρων. Οι μικροπυρήνες μπορεί να προέρχονται από άκεντρα χρωμοσωμικά θραύσματα (δηλαδή χωρίς κεντρομερίδιο) ή από ολόκληρα χρωμοσώματα που δεν είναι ικανά να μετακινηθούν προς τους πόλους κατά το στάδιο ανάφασης της κυτταρικής διαίρεσης. Ως εκ τούτου, η δοκιμή MNvit είναι μέθοδος in vitro που παρέχει ευρεία βάση για την in vitro διερεύνηση του δυναμικού πρόκλησης χρωμοσωμικών βλαβών, διότι τόσο τα ανευπλοειδογόνα όσο και τα κλαστογόνα μπορούν να ανιχνευθούν (2) (3) σε κύτταρα που υφίστανται κυτταρική διαίρεση κατά τη διάρκεια της έκθεσής τους στην υπό δοκιμή χημική ουσία ή μετά από αυτή (βλ. παράγραφο 13 για περισσότερες λεπτομέρειες). Οι μικροπυρήνες αποτελούν βλάβη που έχει μεταβιβαστεί στα θυγατρικά κύτταρα, ενώ οι χρωμοσωμικές εκτροπές που καταγράφονται σε μεταφασικά κύτταρα μπορεί να μη μεταβιβάζονται. Σε κάθε περίπτωση, οι μεταβολές μπορεί να μην είναι συμβατές με την επιβίωση των κυττάρων.

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών επιτρέπει τη χρήση πρωτοκόλλων με ή χωρίς τον αναστολέα πολυμερισμού της ακτίνης κυτταροχαλασίνη Β (cytoB). Η προσθήκη cytoB πριν από τη μίτωση απολήγει σε διπύρηνα κύτταρα και, ως εκ τούτου, επιτρέπει την αναγνώριση και την ανάλυση μικροπυρήνων μόνο σε κύτταρα που έχουν ολοκληρώσει μία μίτωση (4) (5). Η παρούσα μέθοδος παρέχει επίσης τη δυνατότητα χρήσης πρωτοκόλλων χωρίς αναστολή της κυτταροκίνησης, με την προϋπόθεση ότι υπάρχουν στοιχεία από τα οποία προκύπτει ότι ο αναλυόμενος κυτταρικός πληθυσμός έχει υποστεί μίτωση.

Εκτός από τη χρήση της δοκιμής MNvit για τον εντοπισμό χημικών ουσιών που επάγουν μικροπυρήνες, είναι επίσης δυνατόν να χρησιμοποιηθεί η ανοσοχημική σήμανση κινητοχώρων ή η υβριδοποίηση με κεντρομεριδιακούς/τελομερικούς ανιχνευτές (FISH, από τα αρχικά των λέξεων Fluorescence In Situ Hybridisation/ υβριδοποίηση in situ με φθορισμό) για τη συγκέντρωση συμπληρωματικών πληροφοριών σχετικά με τους μηχανισμούς πρόκλησης χρωμοσωμικών βλαβών και σχηματισμού μικροπυρήνων (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17). Οι εν λόγω διαδικασίες σήμανσης και υβριδισμού μπορούν να χρησιμοποιούνται όταν αυξάνεται ο σχηματισμός μικροπυρήνων και ο ερευνητής επιθυμεί να διαπιστώσει αν η αύξηση οφείλεται σε κλαστογόνα και/ή ανευπλοειδογόνα συμβάντα.

Χάρη στη δυνατότητα σχετικά αντικειμενικής αξιολόγησης των μικροπυρήνων σε μεσοφασικά κύτταρα, το προσωπικό του εργαστηρίου αρκεί απλώς να προσδιορίζει τον αριθμό διπύρηνων κυττάρων, όταν χρησιμοποιείται cytoB, και την επίπτωση (incidence) των κυττάρων με μικροπυρήνες σε όλες τις περιπτώσεις. Συνεπώς, είναι δυνατή η σχετικά ταχεία καταμέτρηση των παρασκευασμάτων και η αυτοματοποίηση της ανάλυσης. Αυτό καθιστά πρακτικά εφικτή την εξέταση χιλιάδων αντί εκατοντάδων κυττάρων ανά μεταχείριση, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ισχύς της δοκιμής. Τέλος, επειδή οι μικροπυρήνες μπορεί να προέρχονται από καθυστερημένα (lagging) χρωμοσώματα, υπάρχει δυνατότητα ανίχνευσης παραγόντων που επάγουν ανευπλοειδία και οι οποίοι είναι δύσκολο να μελετηθούν με τις κλασικές δοκιμές χρωμοσωμικής εκτροπής, π.χ. κεφάλαιο Β.10 του παρόντος παραρτήματος (18). Ωστόσο, με τη δοκιμή MNvit που περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο, δεν είναι δυνατόν να γίνει διάκριση μεταξύ των χημικών ουσιών που επάγουν μεταβολές του χρωμοσωμικού αριθμού και/ή πλοειδίες και των κλαστογόνων, χωρίς τη χρήση ειδικών τεχνικών, όπως η FISH που αναφέρεται στην παράγραφο 4.

Η δοκιμή MNvit είναι ανθεκτική και μπορεί να διεξαχθεί σε διάφορους τύπους κυττάρων, με ή χωρίς cytoB. Εκτενή δεδομένα υποστηρίζουν την εγκυρότητα της δοκιμής MNvit σε διάφορους τύπους κυττάρων (καλλιέργειες κυτταρικών σειρών ή πρωτογενείς κυτταροκαλλιέργειες) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36). Μεταξύ αυτών συγκαταλέγονται, ειδικότερα, οι διεθνείς μελέτες επικύρωσης που συντόνισε η γαλλική επιστημονική εταιρεία Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (19) (20) (21)

▼M7

(22) (23) και οι εκθέσεις του International Workshop on Genotoxicity Testing (5) (17). Τα διαθέσιμα δεδομένα επαναξιολογήθηκαν επίσης στο πλαίσιο μελέτης αναδρομικής επικύρωσης με ανάλυση βάρους της απόδειξης, η οποία διεξήχθη από το Ευρωπαϊκό Κέντρο Επικύρωσης Εναλλακτικών Μεθόδων (ECVAM) της Ευρωπαϊκής Επιτροπής, και η μέθοδος δοκιμών κρίθηκε επιστημονικά έγκυρη από την επιστημονική συμβουλευτική επιτροπή (ESAC) του ECVAM (37) (38) (39).

Στη δοκιμή κυττάρων θηλαστικών MNvit μπορούν να χρησιμοποιούνται καλλιέργειες κυτταρικών σειρών ή πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων ανθρώπου ή τρωκτικών. Δεδομένου ότι η συχνότητα υποβάθρου του σχηματισμού μικροπυρήνων επηρεάζει την ευαισθησία της δοκιμής, συνιστάται η χρήση τύπων κυττάρων με σταθερή και καθορισμένη συχνότητα υποβάθρου όσον αφορά τον σχηματισμό μικροπυρήνων. Τα χρησιμοποιούμενα κύτταρα επιλέγονται με βάση την ικανότητά τους να αναπτύσσονται ικανοποιητικά σε καλλιέργεια, τη σταθερότητα του καρυότυπού τους (συμπεριλαμβανομένου του χρωμοσωμικού αριθμού) και την αυθόρμητη συχνότητα σχηματισμού μικροπυρήνων (40). Τα μέχρι σήμερα διαθέσιμα δεδομένα δεν επιτρέπουν τη διατύπωση αυστηρών συστάσεων, αλλά υποδηλώνουν ότι είναι σημαντικό, κατά την αξιολόγηση των χημικών κινδύνων, να λαμβάνονται υπόψη η κατάσταση της p53, η γενετική σταθερότητα (καρυότυπος), η ικανότητα επιδιόρθωσης του DNA και η προέλευση (από τρωκτικά ή τον άνθρωπο) των κυττάρων που επιλέγονται για τη δοκιμή. Ως εκ τούτου, ενθαρρύνονται οι χρήστες της παρούσας μεθόδου δοκιμών να λαμβάνουν υπόψη την επίδραση αυτών και άλλων κυτταρικών χαρακτηριστικών στις επιδόσεις των κυτταρικών σειρών ως προς την ανίχνευση της επαγωγής μικροπυρήνων, καθώς εξελίσσεται η επιστημονική γνώση σε αυτόν τον τομέα.

Οι χρησιμοποιούμενοι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Οι δοκιμές που διεξάγονται in vitro απαιτούν κατά κανόνα τη χρήση εξωγενούς πηγής μεταβολικής ενεργοποίησης, εκτός εάν τα κύτταρα διαθέτουν ικανότητα μεταβολισμού των υπό δοκιμή χημικών ουσιών. Το εξωγενές σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης δεν μιμείται απόλυτα τις συνθήκες που επικρατούν in vivo. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγονται συνθήκες που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε τεχνητά θετικά αποτελέσματα που δεν αντανακλούν την κυτταροτοξικότητα των υπό δοκιμή χημικών ουσιών· Στις συνθήκες αυτές περιλαμβάνονται οι μεταβολές του pH (41) (42) (43) ή της ωσμωμοριακότητας, η αλληλεπίδραση με το θρεπτικό μέσο της κυτταροκαλλιέργειας (44) (45) και τα υπέρμετρα επίπεδα κυτταροτοξικότητας (βλ. παράγραφο 29).

Για την ανάλυση της επαγωγής μικροπυρήνων, έχει καθοριστική σημασία να συντελείται μίτωση τόσο στις καλλιέργειες που υποβάλλονται σε μεταχείριση όσο και σε εκείνες που δεν υποβάλλονται. Το πιο διαφωτιστικό στάδιο για την καταμέτρηση των μικροπυρήνων είναι η ολοκλήρωση μιας μίτωσης των κυττάρων κατά τη διάρκεια της μεταχείρισης με την υπό δοκιμή χημική ουσία ή μετά από αυτή. Για τα βιομηχανικά νανοϋλικά, ενδέχεται να χρειάζονται ειδικές προσαρμογές της παρούσας μεθόδου δοκιμών, αλλά αυτές δεν περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών.

Πριν από τη χρήση της μεθόδου δοκιμών σε μείγμα για την παραγωγή δεδομένων για συγκεκριμένο ρυθμιστικό σκοπό, θα πρέπει να εξετάζεται αν — και, εάν ναι, για ποιον λόγο — αυτή μπορεί να αποδώσει επαρκή αποτελέσματα για τον επιδιωκόμενο σκοπό. Οι εκτιμήσεις αυτές δεν είναι αναγκαίες όταν οι κανονιστικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τον έλεγχο του μείγματος.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων ή κυττάρων άλλων θηλαστικών εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία με και χωρίς εξωγενή πηγή μεταβολικής ενεργοποίησης, εκτός εάν χρησιμοποιούνται κύτταρα με επαρκή μεταβολική ικανότητα (βλ. παράγραφο 19).

Κατά τη διάρκεια της έκθεσης στην υπό δοκιμή χημική ουσία ή μετά από αυτήν, τα κύτταρα καλλιεργούνται για επαρκές χρονικό διάστημα, ώστε η χρωμοσωμική βλάβη ή άλλες επιδράσεις στον κυτταρικό κύκλο/την κυτταρική διαίρεση να οδηγήσουν στον σχηματισμό μικροπυρήνων σε μεσοφασικά κύτταρα. Για την επαγωγή ανευπλοειδίας, κανονικά χρειάζεται η παρουσία της υπό δοκιμή χημικής ουσίας κατά τη μίτωση. Τα μεσοφασικά κύτταρα συλλέγονται και, ύστερα από χρώση, αναλύονται για να διαπιστωθεί η παρουσία μικροπυρήνων. Στην ιδανική περίπτωση, θα πρέπει να καταμετρώνται μόνο μικροπυρήνες κυττάρων

▼M7

τα οποία ολοκλήρωσαν μια μίτωση κατά τη διάρκεια της έκθεσης στην υπό δοκιμή χημική ουσία ή της περιόδου μετά την έκθεση, εάν προβλέπεται. Στις καλλιέργειες που υποβάλλονται σε κατεργασία με αναστολέα κυτταροκίνησης, αυτό επιτυγχάνεται εύκολα με την καταμέτρηση μόνο των διπύρηνων κυττάρων. Εάν δεν χρησιμοποιείται αναστολέας κυτταροκίνησης, έχει σημασία να καταδεικνύεται, μέσω της αύξησης του κυτταρικού πληθυσμού, ότι τα αναλυόμενα κύτταρα κατά πάσα πιθανότητα διαιρέθηκαν κατά τη διάρκεια της έκθεσης στην υπό δοκιμή χημική ουσία ή μετά από αυτή. Για όλα τα πρωτόκολλα, έχει σημασία να καταδεικνύεται ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, τόσο στις καλλιέργειες-μάρτυρες όσο και σε εκείνες που υποβάλλονται σε μεταχείριση, και να εκτιμάται ο βαθμός κυτταροτοξικότητας ή κυτταρόστασης που επάγει η υπό δοκιμή χημική ουσία σε όλες τις καλλιέργειες στις οποίες καταμετρώνται οι μικροπυρήνες.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Κύτταρα

Μπορούν να χρησιμοποιούνται καλλιεργημένα πρωτογενή λεμφοκύτταρα περιφερειακού αίματος του ανθρώπου ή άλλων θηλαστικών (7) (20) (46) (47) και ορισμένες κυτταρικές σειρές τρωκτικών, όπως οι CHO, V79, CHL/IU και L5178Y ή κυτταρικές σειρές ανθρώπινης προέλευσης, όπως η TK6 (19) (20) (21) (22) (23) (26) (27) (28) (29) (31) (33) (34) (35) (36) (βλ. παράγραφο 6). Έχουν χρησιμοποιηθεί σε δοκιμές μικροπυρήνων και άλλες κυτταρικές σειρές, όπως κύτταρα HT29 (48), Caco-2 (49), HepaRG (50) (51), HepG2 (52) (53), A549 και πρωτογενή εμβρυϊκά κύτταρα συριακού κρικητού (54), αλλά επί του παρόντος δεν έχουν επικυρωθεί εκτενώς. Για τον λόγο αυτό, η χρήση αυτών των κυτταρικών σειρών και τύπων θα πρέπει να αιτιολογείται με βάση τις αποδεδειγμένες επιδόσεις τους στη δοκιμή, όπως περιγράφεται στο τμήμα «Κριτήρια αποδοχής». Έχει αναφερθεί ότι η Cyto B μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη των κυττάρων L5178Y και, ως εκ τούτου, δεν συνιστάται η χρήση της με τη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά (23). Για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων, όταν χρησιμοποιούνται πρωτογενή κύτταρα, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρησιμοποίησης, εφόσον είναι εφικτή, ανθρώπινων κυττάρων που έχουν ληφθεί σύμφωνα με τις σχετικές δεοντολογικές αρχές και κανονιστικές ρυθμίσεις.

Τα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος θα πρέπει να λαμβάνονται από νεαρά άτομα (ηλικίας περίπου 18-35 ετών), που δεν καπνίζουν, δεν πάσχουν από γνωστή νόσο και δεν έχουν εκτεθεί πρόσφατα σε γονιδιοτοξικούς παράγοντες (π.χ. χημικές ουσίες, ιοντίζουσες ακτινοβολίες) σε επίπεδα τα οποία θα μπορούσαν να αυξήσουν την επίπτωση υποβάθρου των κυττάρων με μικροπυρήνες. Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται χαμηλή και σταθερή επίπτωση υποβάθρου των κυττάρων με μικροπυρήνες. Η γραμμή βάσης της επίπτωσης των κυττάρων με μικροπυρήνες αυξάνεται με την ηλικία, τάση που είναι εντονότερη στις γυναίκες απ' ό,τι στους άνδρες (55). Εάν συνδυάζονται προς χρήση κύτταρα από περισσότερους του ενός δότες, θα πρέπει να προσδιορίζεται ο αριθμός των δοτών. Είναι αναγκαίο να αποδεικνύεται ότι τα κύτταρα έχουν διαιρεθεί κατά το διάστημα που μεσολαβεί από την έναρξη της μεταχείρισης με την υπό δοκιμή χημική ουσία μέχρι τη δειγματοληψία τους. Οι κυτταροκαλλιέργειες διατηρούνται σε εκθετική φάση ανάπτυξης (κυτταρικές σειρές) ή διεγείρονται για να διαιρεθούν (πρωτογενείς καλλιέργειες λεμφοκυττάρων), ώστε τα κύτταρα να εκτίθενται σε διάφορα στάδια του κυτταρικού κύκλου, δεδομένου ότι μπορεί να μην είναι γνωστή η ευαισθησία κάθε σταδίου στις υπό δοκιμή χημικές ουσίες. Κατά κανόνα, τα πρωτογενή κύτταρα που χρειάζονται διέγερση από μιτογόνους παράγοντες για τη διαίρεσή τους δεν είναι πια συγχρονισμένα κατά τη διάρκεια της έκθεσης στην υπό δοκιμή χημική ουσία (π.χ. ανθρώπινα λεμφοκύτταρα μετά από 48ωρη διέγερση με μιτογόνο). Η χρήση συγχρονισμένων κυττάρων κατά τη διάρκεια της μεταχείρισης με την υπό δοκιμή χημική ουσία δεν συνιστάται, αλλά μπορεί να γίνει δεκτή, εφόσον αιτιολογείται.

Θρεπτικά μέσα και συνθήκες καλλιέργειας

Για τη διατήρηση των καλλιεργειών θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλο θρεπτικό μέσο και κατάλληλες συνθήκες επώασης (δοχεία καλλιέργειας, ατμόσφαιρα με ύγρανση και 5 % CO_2, κατά περίπτωση, θερμοκρασία 37 °C). Θα πρέπει να ελέγχονται τακτικά στις κυτταρικές σειρές η σταθερότητα του χαρακτηριστικού αριθμού χρωμοσωμάτων και η απουσία μόλυνσης από μυκόπλασμα και να μη χρησιμοποιούνται τα κύτταρα, εάν έχουν μολυνθεί ή έχει μεταβληθεί ο χαρακτηριστικός αριθμός χρωμοσωμάτων. Η φυσιολογική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου των κυτταρικών σειρών ή πρωτογενών καλλιεργειών που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο δοκιμών θα πρέπει να καθορίζεται και να είναι συνεπής με τα δημοσιευμένα χαρακτηριστικά των κυττάρων.

▼M7

Παρασκευή των καλλιεργειών

Κυτταρικές σειρές: τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται από αποθεματικές καλλιέργειες, εμβολιαζόμενα σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας σε πυκνότητα τέτοια ώστε τα υπό μορφή εναιωρήματος ή μονοστιβάδας κύτταρα να εξακολουθούν να αναπτύσσονται εκθετικά μέχρι τη συλλογή τους (π.χ. θα πρέπει να αποφεύγεται η συρροή κυττάρων που αναπτύσσονται σε μονοστιβάδες).

Λεμφοκύτταρα: ολικό αίμα με αντιπηκτικό (π.χ. ηπαρίνη) ή διαχωρισμένα λεμφοκύτταρα καλλιεργούνται (π.χ. για 48 ώρες προκειμένου για ανθρώπινα λεμφοκύτταρα) παρουσία μιτογόνου παράγονται [π.χ. φυτοαιμοσυγκολλητίνη (PHA) προκειμένου για ανθρώπινα λεμφοκύτταρα], με σκοπό την επαγωγή κυτταρικής διαίρεσης πριν από την έκθεση στην υπό δοκιμή χημική ουσία και τη cytoB.

Μεταβολική ενεργοποίηση

Όταν χρησιμοποιούνται κύτταρα με ανεπαρκή ενδογενή μεταβολική ικανότητα, πρέπει να χρησιμοποιούνται εξωγενή συστήματα μεταβολικής ενεργοποίησης. Το συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο σύστημα, που συνιστάται ως προεπιλογή, εκτός εάν υπάρχει αιτιολόγηση υπέρ άλλου συστήματος, είναι ένα μεταμιτοχονδριακό κλάσμα εμπλουτισμένο με συμπαράγοντα (S9), το οποίο παρασκευάζεται από ήπαρ τρωκτικών (κατά κανόνα επιμύων), κατεργασμένο με παράγοντα ενζυμικής επαγωγής, όπως το Aroclor 1254 (56) (57) ή ο συνδυασμός φαινοβαρβιτάλης και b-ναφθοφλαβόνης (58) (59) (60). Ο συνδυασμός αυτός δεν αντιβαίνει στη Σύμβαση της Στοκχόλμης για τους έμμονους οργανικούς ρύπους (61) και έχει αποδειχθεί εξίσου αποτελεσματικός με το Aroclor 1254 στην επαγωγή οξειδασών μεικτής λειτουργίας (58) (59) (60). Το κλάσμα S9 χρησιμοποιείται συνήθως σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 1 έως 2 % (κ.ό.), αλλά οι οποίες επιτρέπεται να αυξηθούν σε 10 % (κ.ό.) στο τελικό δοκιμαστικό θρεπτικό μέσο. Η χρήση προϊόντων που μειώνουν τον μιτωτικό δείκτη, και ιδίως προϊόντων που συμπλοκοποιούν το ασβέστιο (62), θα πρέπει να αποφεύγεται κατά τη μεταχείριση. Η επιλογή του τύπου και της συγκέντρωσης του χρησιμοποιούμενου εξωγενούς συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης ή μεταβολικού επαγωγέα μπορεί να επηρεαστεί από την κατηγορία των υπό δοκιμή χημικών ουσιών.

Παρασκεύασμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας

Οι στερεές υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να διαλύονται σε κατάλληλους διαλύτες και να αραιώνονται, εφόσον χρειάζεται, πριν από τη μεταχείριση των κυττάρων. Οι υγρές υπό δοκιμή χημικές ουσίες επιτρέπεται να προστίθενται κατευθείαν στο σύστημα δοκιμής και/ή να αραιώνονται πριν από τη μεταχείριση του συστήματος δοκιμής. Οι αέριες ή πτητικές υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να υποβάλλονται στη δοκιμή με κατάλληλες τροποποιήσεις των τυποποιημένων πρωτοκόλλων, π.χ. μεταχείριση σε σφραγισμένα δοχεία (63) (64) (65). Τα παρασκευάσματα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να ετοιμάζονται ακριβώς πριν από τη μεταχείριση, εκτός αν τα στοιχεία σχετικά με τη σταθερότητα της ουσίας αποδεικνύουν ότι είναι αποδεκτή η φύλαξη.

Συνθήκες δοκιμής

Διαλύτες

Θα πρέπει να επιλέγεται διαλύτης που να βελτιστοποιεί τη διαλυτότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, χωρίς να επηρεάζει δυσμενώς τη διεξαγωγή της δοκιμής, π.χ. μεταβάλλοντας την ανάπτυξη των κυττάρων, πλήττοντας την ακεραιότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, αντιδρώντας με τα δοχεία καλλιέργειας ή αποδυναμώνοντας το σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης. Συνιστάται να εξετάζεται πρώτα, στο μέτρο του δυνατού, αν μπορεί να χρησιμοποιηθεί υδατικός διαλύτης (ή θρεπτικό μέσο καλλιέργειας). Καθιερωμένοι διαλύτες είναι το νερό και το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Κατά κανόνα, οι οργανικοί διαλύτες δεν πρέπει να υπερβαίνουν το 1 % (κ.ό.). Σε περίπτωση διάλυσης cytoB σε DMSO, η συνολική ποσότητα οργανικού διαλύτη που χρησιμοποιείται τόσο για την υπό δοκιμή χημική ουσία όσο και για τη cytoB δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 1 % (κ.ό.)· διαφορετικά, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μάρτυρες που δεν έχουν υποβληθεί σε μεταχείριση, ώστε να εξασφαλίζεται ότι το ποσοστό οργανικού διαλύτη δεν έχει δυσμενείς επιδράσεις. Οι υδατικοί διαλύτες (αλατούχο διάλυμα ή νερό) δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν το 10 % (κ.ό.) στο τελικό μέσο μεταχείριση. Εάν χρησιμοποιούνται άλλοι πλην των καθιερωμένων διαλυτών (π.χ. αιθανόλη ή ακετόνη), η χρήση τους θα πρέπει να τεκμηριώνεται με στοιχεία που αποδεικνύουν τη συμβατότητά τους με την υπό δοκιμή χημική ουσία και με το σύστημα δοκιμών, καθώς και την απουσία γενετικής τοξικότητας στη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση. Ελλείψει στοιχείων τεκμηρίωσης, είναι

▼M7

σημαντικό να συμπεριλαμβάνονται μάρτυρες που δεν έχουν υποβληθεί σε κατεργασία (βλ. προσάρτημα 1), καθώς και μάρτυρες με διαλύτη για να αποδεικνύεται ότι ο επιλεγμένος διαλύτης δεν επάγει επιβλαβείς ή χρωμοσωμικές επιδράσεις (π.χ. ανευπλοειδία ή κλαστογένεση).

Χρήση cytoB ως αναστολέα κυτταροκίνησης

Μια από τις σημαντικότερες παραμέτρους κατά την εκτέλεση της δοκιμής MNvit είναι να εξασφαλίζεται ότι τα καταμετρούμενα κύτταρα έχουν ολοκληρώσει μια μίτωση κατά τη διάρκεια της μεταχείρισης ή της περιόδου επώασης μετά τη μεταχείριση, εάν προβλέπεται. Ως εκ τούτου η καταμέτρηση των μικροπυρήνων θα πρέπει να περιορίζεται μόνο στα κύτταρα που έχουν υποστεί μίτωση κατά τη διάρκεια της μεταχείρισης ή μετά από αυτή. Η cytoB είναι ο ευρύτερα χρησιμοποιούμενος παράγοντας για την αναστολή της κυτταροκίνησης, καθώς αναστέλλει τη συγκρότηση της ακτίνης και, κατ' επέκταση, εμποδίζει τον αποχωρισμό των θυγατρικών κυττάρων μετά τη μίτωση, προκαλώντας τον σχηματισμό διπύρηνων κυττάρων (6) (66) (67). Η επίδραση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην κινητική του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μπορεί να μετρηθεί ταυτόχρονα, όταν χρησιμοποιείται η cytoB. Όταν χρησιμοποιούνται ανθρώπινα λεμφοκύτταρα, πρέπει να χρησιμοποιείται cytoB ως αναστολέας κυτταροκίνησης, επειδή η διάρκεια του κυτταρικού κύκλοι ποικίλλει μεταξύ των δοτών και επειδή δεν αντιδρούν όλα τα λεμφοκύτταρα στη διέγερση με PHA. Η χρήση της cytoB δεν είναι υποχρεωτική για άλλους τύπους κυττάρων, εάν μπορεί να αποδειχθεί ότι αυτά έχουν υποστεί διαίρεση, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 27. Επιπλέον, η cytoB δεν χρησιμοποιείται κατά κανόνα κατά την αξιολόγηση δειγμάτων για μικροπυρήνες με τη χρήση μεθόδων κυτταρομετρίας ροής.

Το εργαστήριο θα πρέπει να καθορίζει, για κάθε τύπο κυττάρων, την κατάλληλη συγκέντρωση cytoB, με γνώμονα την επίτευξη της βέλτιστης συχνότητας διπύρηνων κυττάρων στις καλλιέργειες-μάρτυρες με διαλύτη, και να αποδεικνύει ότι η συγκέντρωση αυτή έχει ικανοποιητική απόδοση σε διπύρηνα κύτταρα για καταμέτρηση. Η κατάλληλη συγκέντρωση cytoB κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 3 και 6 μg/ml (19).

Μέτρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταροτοξικότητας και επιλογή των συγκεντρώσεων μεταχείρισης

Κατά τον καθορισμό της υψηλότερης συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να αποφεύγονται οι συγκεντρώσεις που μπορούν να οδηγήσουν σε τεχνητά θετικές αποκρίσεις, όπως εκείνες που προκαλούν υπέρμετρη κυτταροτοξικότητα (βλ. παράγραφο 29), καθίζηση στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (βλ. παράγραφο 30) ή έντονες μεταβολές του pH ή της ωσμωμοριακότητας (βλ. παράγραφο 9). Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία προκαλεί έντονη μεταβολή του pH του θρεπτικού μέσου κατά την προσθήκη της, το pH μπορεί να ρυθμίζεται με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος στο τελικό θρεπτικό μέσο δοκιμής, με σκοπό να αποφεύγονται τα τεχνητά θετικά αποτελέσματα και να διατηρούνται κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας.

Μετράται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός για να εξασφαλίζεται ότι επαρκής αριθμός από τα υποβαλλόμενα σε μεταχείριση κύτταρα υφίστανται μίτωση κατά τη διάρκεια της δοκιμής και ότι η μεταχείριση διεξάγεται σε κατάλληλα επίπεδα κυτταροτοξικότητας (βλ. παράγραφο 29). Η κυτταροτοξικότητα θα πρέπει να προσδιορίζεται στο κύριο πείραμα με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση, με χρήση κατάλληλης ένδειξης του θανάτου και της ανάπτυξης των κυττάρων (βλ. παραγράφους 26 και 27). Μολονότι η αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας σε αρχική προκαταρκτική δοκιμή μπορεί να είναι χρήσιμη για τον ακριβέστερο καθορισμό των συγκεντρώσεων που θα χρησιμοποιηθούν στο κύριο πείραμα, δεν είναι υποχρεωτική η διεξαγωγή αρχικής δοκιμής. Η διεξαγωγή αρχικής δοκιμής δεν θα πρέπει να αντικαθιστά τη μέτρηση της κυτταροτοξικότητας στο κύριο πείραμα.

Η κατεργασία των καλλιεργειών με cytoB και η μέτρηση της σχετικής συχνότητας των μονοπύρηνων, διπύρηνων και πολυπύρηνων κυττάρων στην καλλιέργεια παρέχουν μια ορθή μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού της επίδρασης της μεταχείρισης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και της κυτταροτοξικής ή κυτταροστατικής δράσης της (6) και εξασφαλίζουν την καταμέτρηση μόνο των κυττάρων εκείνων που διαιρέθηκαν κατά τη διάρκεια της μεταχείρισης ή μετά από

▼M7

αυτή. Συνιστάται ο δείκτης πολλαπλασιασμού με αναστολή κυτταροκίνησης (CBPI) ή ο δείκτης αναδιπλασιασμού (RI) (6) (27) (68) από 500 τουλάχιστον κύτταρα ανά καλλιέργεια (βλ. μαθηματικούς τύπους στο προσάρτημα 2) για την εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας και κυτταροστατικής δραστηριότητας της μεταχείρισης με τη σύγκριση των τιμών που αντιστοιχούν στις καλλιέργειες μεταχείρισης και στις καλλιέργειες-μάρτυρες. Η αξιολόγηση άλλων δεικτών κυτταροτοξικότητας (π.χ. ακεραιότητα κυττάρων, απόπτωση, νέκρωση, καταμέτρηση μετάφασης, κυτταρικός κύκλος) μπορεί να παράσχει χρήσιμες πληροφορίες, αλλά δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται αντί των δεικτών CBPI ή RI.

Στις μελέτες χωρίς cytoB, είναι αναγκαίο αποδεικνύεται η διαίρεση των κυττάρων σε καλλιέργεια, έτσι ώστε ένα σημαντικό μέρος των καταμετρηθέντων κυττάρων να έχει διαιρεθεί κατά τη διάρκεια ή μετά τη μεταχείριση με την υπό δοκιμή χημική ουσία· σε διαφορετική περίπτωση, υπάρχει το ενδεχόμενο ψευδαρνητικών αποκρίσεων. Συνιστάται η μέτρηση του σχετικού διπλασιασμού του πληθυσμού (RPD) ή της σχετικής αύξησης του καταμετρούμενου αριθμού κυττάρων (RICC) για την εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας και της κυτταροστατικής δραστηριότητας μιας μεταχείρισης (17) (68) (69) (70) (71) (βλ. μαθηματικούς τύπους στο προσάρτημα 2). Σε παρατεταμένους χρόνους δειγματοληψίας (π.χ. μεταχείριση για χρόνο ίσο με την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου επί 1,5-2) και συλλογή μετά από επιπλέον χρόνο ίσο με 1,5-2 φορές την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, με αποτέλεσμα οι χρόνοι δειγματοληψίας να είναι 3-4 φορές η κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, όπως περιγράφεται στις παραγράφους 38 και 39), η RPD ενδέχεται να υποεκτιμά την κυτταροτοξικότητα (71). Υπό αυτές τις συνθήκες, η RICC θα αποτελούσε ενδεχομένως καλύτερο μέσο μέτρησης, ενώ η αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας μετά από χρόνο ίσο με την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου επί 1,5 θα παρείχε χρήσιμη εκτίμηση. Η αξιολόγηση άλλων δεικτών κυτταροτοξικότητας ή κυτταρόστασης (π.χ. ακεραιότητα των κυττάρων, απόπτωση, νέκρωση, καταμέτρηση μετάφασης, δείκτης πολλαπλασιασμού (PI), κυτταρικός κύκλος, πυρηνοπλασματικές γέφυρες ή πυρηνικές εκβλαστήσεις) θα παρείχαν ενδεχομένως χρήσιμες επιπλέον πληροφορίες, αλλά δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται αντί της RPD ούτε της RICC.

Θα πρέπει να αξιολογούνται τουλάχιστον τρεις συγκεντρώσεις δοκιμής (χωρίς τον διαλύτη και τους θετικούς μάρτυρες) που πληρούν τα κριτήρια αποδοχής (ενδεδειγμένη κυτταροτοξικότητα, αριθμός κυττάρων, κ.λπ.). Ανεξάρτητα από τα είδη κυττάρων (κυτταρικές σειρές ή πρωτογενείς καλλιέργειες λεμφοκυττάρων), μπορούν να χρησιμοποιούνται σε κάθε συγκέντρωση δοκιμής είτε πολλαπλές πανομοιότυπες καλλιέργειες (επαναλήψεις) είτε μοναδικές καλλιέργειες. Αν και συνιστάται η χρήση διπλών καλλιεργειών, οι μονές καλλιέργειες είναι επίσης αποδεκτές, υπό τον όρο ότι καταμετράται ο ίδιος συνολικός αριθμός κυττάρων, ανεξαρτήτως του αν πρόκειται για μονές ή για διπλές καλλιέργειες. Η χρήση μονών καλλιεργειών ενδείκνυται κατ' εξοχήν όταν αξιολογούνται περισσότερες από 3 συγκεντρώσεις (βλ. παραγράφους 44-45). Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις ανεξάρτητες επαναλήψεις σε δεδομένη συγκέντρωση μπορούν να συνενώνονται για την ανάλυση δεδομένων. Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες με ελάχιστη ή μηδενική κυτταροτοξικότητα, κατάλληλες είναι συνήθως οι συγκεντρώσεις που απέχουν μεταξύ τους κατά παράγοντα ίσο με 2 ή 3 περίπου. Σε περίπτωση κυτταροτοξικότητας, οι επιλεγόμενες συγκεντρώσεις δοκιμής θα πρέπει να καλύπτουν ένα εύρος τιμών κυμαινόμενο από τη συγκέντρωση που προκαλεί την κυτταροτοξικότητα η οποία περιγράφεται στην παράγραφο 29 μέχρι τις συγκεντρώσεις στις οποίες παρατηρείται μέτρια και ελάχιστη ή μηδενική κυτταροτοξικότητα. Πολλές υπό δοκιμή χημικές ουσίες παρουσιάζουν καμπύλες συγκέντρωσης-απόκρισης με μεγάλη κλίση και, για να ληφθούν δεδομένα σε χαμηλή ή μέτρια κυτταροτοξικότητα ή για να μελετηθεί λεπτομερώς η σχέση δόσης-απόκρισης, είναι αναγκαία η χρήση συγκεντρώσεων με μικρότερα διαστήματα μεταξύ τους και/ή περισσότερων από τρεις συγκεντρώσεις (μονές καλλιέργειες ή επαναλήψεις), ιδίως σε περιπτώσεις όπου απαιτείται επανάληψη του πειράματος (βλ. παράγραφο 60).

Εάν η μέγιστη συγκέντρωση βασίζεται στην κυτταροτοξικότητα, η υψηλότερη συγκέντρωση θα πρέπει να αποσκοπεί στην επίτευξη κυτταροτοξικότητας 55 ± 5 %, με τη χρήση των συνιστώμενων παραμέτρων κυτταροτοξικότητας (δηλ. μείωση της RICC ή του RPD στην περίπτωση των κυτταρικών σειρών, όταν δεν χρησιμοποιείται cytoB, και μείωση του CBPI ή του RI όταν χρησιμοποιείται cytoB σε 45 ± 5 % του παράλληλου αρνητικού μάρτυρα) (72). Τα θετικά αποτελέσματα που προκύπτουν μόνο στο ανώτερο άκρο του εν λόγω εύρους κυτταροτοξικότητας 55 ± 5 % θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή (71).

▼M7

Για δυσδιάλυτες υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν είναι κυτταροτοξικές σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από τη συγκέντρωση μέγιστης διαλυτότητας, η αναλυόμενη μέγιστη συγκέντρωση θα πρέπει να επιφέρει θολερότητα ή ίζημα ορατό με γυμνό οφθαλμό ή με τη βοήθεια ανεστραμμένου μικροσκοπίου στο τέλος της μεταχείρισης με την υπό δοκιμή χημική ουσία. Ακόμη και αν εμφανίζεται κυτταροτοξικότητα σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από τη συγκέντρωση μέγιστης διαλυτότητας, συνιστάται να διεξάγεται η δοκιμή σε μία μόνο συγκέντρωση που επάγει θολερότητα ή ορατό ίζημα, διότι μπορεί να προκύψουν τεχνητές επιδράσεις από το ίζημα. Στη συγκέντρωση που επιφέρει ίζημα, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να διασφαλίζεται ότι το τελευταίο δεν παρεμποδίζει τη διεξαγωγή της δοκιμής (π.χ. τη χρώση ή την καταμέτρηση). Ο προσδιορισμός της διαλυτότητας στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας πριν από το πείραμα μπορεί να είναι χρήσιμος.

Εάν δεν παρατηρηθεί ίζημα ούτε περιοριστική κυτταροτοξικότητα, η ανώτατη συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να αντιστοιχεί στη μικρότερη από τις τιμές 10 mM, 2 mg/ml ή 2 μl/ml (73) (74) (75). Όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν έχει καθορισμένη σύνθεση, π.χ. ουσίες άγνωστης ή μεταβλητής σύνθεσης, πολύπλοκα προϊόντα αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά (UVCB) (76), εκχυλίσματα από το περιβάλλον κλπ., η ανώτατη συγκέντρωση θα πρέπει ενδεχομένως να είναι υψηλότερη (π.χ. 5 mg/ml), ελλείψει επαρκούς κυτταροτοξικότητας, προκειμένου να αυξηθεί η συγκέντρωση του κάθε συστατικού. Επισημαίνεται, ωστόσο, ότι οι απαιτήσεις αυτές μπορεί να διαφέρουν για τα φαρμακευτικά προϊόντα για τον άνθρωπο (93).

Μάρτυρες

Σε κάθε χρόνο συλλογής, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες (βλ. παράγραφο 21), αποτελούμενοι μόνο από τον διαλύτη στο θρεπτικό μέσο της μεταχείρισης και υποβαλλόμενοι στην ίδια μεταχείριση όπως και οι καλλιέργειες.

Απαιτούνται παράλληλοι θετικοί μάρτυρες για να αποδεικνύεται αφενός η ικανότητα του εργαστηρίου να προσδιορίζει τις κλαστογόνες και ανευπλοειδογόνες ουσίες υπό τις συνθήκες του χρησιμοποιούμενου πρωτοκόλλου δοκιμής και, αφετέρου, η αποτελεσματικότητα του εξωγενούς συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης, κατά περίπτωση. Παραδείγματα θετικών μαρτύρων παρέχονται κατωτέρω στον πίνακα 1. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικοί θετικοί χημικοί μάρτυρες, εφόσον η χρήση τους αιτιολογείται.

Μέχρι στιγμής, δεν υπάρχουν ανευπλοειδογόνες ουσίες για τις οποίες να είναι γνωστό ότι απαιτείται μεταβολική ενεργοποίηση προκειμένου να έχουν γονιδιοτοξική δράση (17). Επειδή οι in vitro δοκιμές γενετικής τοξικότητας σε κύτταρα θηλαστικών είναι επαρκώς τυποποιημένες για βραχυχρόνιες μεταχειρίσεις που πραγματοποιούνται ταυτόχρονα με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση με την ίδια διάρκεια μεταχείρισης, η χρήση θετικών μαρτύρων μπορεί να περιορίζεται σε μια κλαστογόνο ουσία που απαιτεί μεταβολική ενεργοποίηση. Στην περίπτωση αυτή, μία μοναδική απόκριση κλαστογόνου στον θετικό μάρτυρα θα καταδείξει τόσο τη δραστηριότητα του συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης και την αποκρισιμότητα του συστήματος δοκιμών. Ωστόσο, σε περίπτωση μακροχρόνιας μεταχείρισης (χωρίς S9), θα πρέπει να προβλέπεται χωριστός θετικός μάρτυρας, διότι η διάρκεια της μεταχείρισης διαφέρει από αυτήν της δοκιμής με μεταβολική ενεργοποίηση. Εάν επιλεγεί μια κλαστογόνος ουσία ως μοναδικός θετικός μάρτυρας για βραχυχρόνια μεταχείριση με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση, μια ανευπλοειδογόνος ουσία θα πρέπει να επιλέγεται για τη μακροπρόθεσμη μεταχείριση χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση. Οι θετικοί μάρτυρες, τόσο για την κλαστογένεση όσο και για την ανευπλοειδογένεση, πρέπει να χρησιμοποιούνται σε κύτταρα που διαθέτουν ικανότητα μεταβολισμού και δεν απαιτούν S9.

Κάθε θετικός μάρτυρας θα πρέπει να χρησιμοποιείται σε μία ή περισσότερες συγκεντρώσεις που αναμένεται να έχουν ως αποτέλεσμα αναπαραγώγιμη και ανιχνεύσιμη αύξηση σε σχέση με την τιμή υποβάθρου, για να καταδεικνύεται η ευαισθησία του συστήματος δοκιμής (δηλ. σαφείς επιδράσεις, οι οποίες όμως δεν αποκαλύπτουν αμέσως την ταυτότητα των κωδικοποιημένων αντικειμενοφόρων πλακών στον παρατηρητή), και η απόκριση δεν θα πρέπει να υπονομεύεται από κυτταροτοξικότητα που υπερβαίνει τα όρια που προβλέπονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών.

▼M7

Πίνακας 1

Συνιστώμενες χημικές ουσίες αναφοράς για την αξιολόγηση της τεχνικής ικανότητας του εργαστηρίου και την επιλογή θετικών μαρτύρων

Κατηγορία:	Χημική ουσία	Αριθμός CAS
1. **Κλαστογόνα που δρουν χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση**		
	Μεθανοσουλφονικός μεθυλεστέρας	66-27-3
	Μιτομυκίνη C	50-07-7
	4-Νιτροκινολιν-N-οξείδιο	56-57-5
	Κυτοσίνη αραβινοσίδη	147-94-4
2. **Κλαστογόνα που απαιτούν μεταβολική ενεργοποίηση**		
	Βενζο(a)πυρένιο	50-32-8
	Κυκλοφωσφαμίδιο	50-18-0
3. **Ανευπλοειδογόνες ουσίες**		
	Κολχικίνη	64-86-8
	Βινβλαστίνη	143-67-9

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Πρόγραμμα μεταχείρισης

Για τη μεγιστοποίηση της πιθανότητας ανίχνευσης μιας ανευπλοειδογόνου ή κλαστογόνου ουσίας που δρα σε συγκεκριμένο στάδιο του κυτταρικού κύκλου, έχει μεγάλη σημασία η μεταχείριση επαρκών αριθμών κυττάρων με την υπό δοκιμή χημική ουσία σε όλα τα στάδια του κύκλου τους. Κάθε μεταχείριση πρέπει να αρχίζει και να τελειώνει ενόσω τα κύτταρα αναπτύσσονται εκθετικά και τα κύτταρα θα πρέπει να συνεχίζουν να αναπτύσσονται μέχρι τη στιγμή της δειγματοληψίας. Το πρόγραμμα μεταχείρισης των κυτταρικών σειρών και των καλλιεργειών πρωτογενών κυττάρων μπορεί, επομένως, να διαφέρει ως ένα βαθμό από εκείνο των λεμφοκυττάρων, τα οποία χρειάζονται μιτογόνο διέγερση για να αρχίσουν τον κυτταρικό κύκλο τους (17). Η αποτελεσματικότερη προσέγγιση για τα λεμφοκύτταρα συνίσταται στην έναρξη της μεταχείρισης με την υπό δοκιμή χημική ουσία σε 44-48 ώρες μετά τη διέγερση με PHA, οπότε και τα κύτταρα διαιρούνται ασύγχρονα (6).

Σύμφωνα με τα δημοσιευμένα δεδομένα (19), οι περισσότερες ανευπλοειδογόνες και κλαστογόνες ουσίες ανιχνεύονται με βραχύχρονη μεταχείριση 3 έως 6 ωρών, με και χωρίς S9, πριν από την απομάκρυνση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και δειγματοληψία σε χρόνο που ισοδυναμεί περίπου με την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου επί 1,5-2,0 μετά την έναρξη της μεταχείρισης (7).

Εντούτοις, για ενδελεχή αξιολόγηση, η οποία θα ήταν αναγκαία για τη διαπίστωση αρνητικού αποτελέσματος, θα πρέπει να πληρούνται και οι τρεις ακόλουθες πειραματικές συνθήκες με τη χρήση βραχυχρόνιας μεταχείρισης με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση και μακροχρόνιας μεταχείρισης χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση (βλ. παραγράφους 56, 57 και 58):

— Τα κύτταρα θα πρέπει να εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση για 3-6 ώρες και να λαμβάνεται δείγμα μετά την παρέλευση χρονικού διαστήματος που ισοδυναμεί περίπου με το γινόμενο της φυσιολογικής διάρκειας του κυτταρικού κύκλου επί 1,5 - 2,0 από την έναρξη της μεταχείρισης (19),

— Τα κύτταρα θα πρέπει να εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία με μεταβολική ενεργοποίηση για 3-6 ώρες και να λαμβάνεται δείγμα μετά την παρέλευση χρονικού διαστήματος που ισοδυναμεί περίπου με το γινόμενο της φυσιολογικής διάρκειας του κυτταρικού κύκλου επί 1,5 - 2,0 μετά την έναρξη της μεταχείρισης (19),

▼M7

— Τα κύτταρα θα πρέπει να εκτίθενται συνεχώς χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση μέχρι τη δειγματοληψία σε χρόνο που ισοδυναμεί περίπου με το γινόμενο της φυσιολογικής διάρκειας του κυτταρικού κύκλου επί 1,5 - 2,0.

Σε περίπτωση που οποιαδήποτε από τις ανωτέρω πειραματικές συνθήκες οδηγεί σε θετική απόκριση, μπορεί να μη χρειάζεται να διερευνηθεί άλλο σχήμα μεταχείρισης.

Εάν είναι γνωστό ή υπάρχουν υπόνοιες ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία επηρεάζει τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (π.χ. στις δοκιμές ουσιών ανάλογων των νουκλεοσιδίων), ιδίως για τα κύτταρα με λειτουργική p53 (35) (36) (77), οι χρόνοι δειγματοληψίας ή αποκατάστασης είναι δυνατόν να παραταθούν επιπλέον κατά την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου επί 1,5 - 2,0 (δηλ. συνολικά για χρονικό διάστημα που ισοδυναμεί με την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου επί 3,0 έως 4,0 φορές μετά την έναρξη της βραχυχρόνιας και της μακροχρόνιας κατεργασίας). Με αυτή τη δυνατότητα επιλογής αντιμετωπίζονται οι περιπτώσεις προβληματισμού σχετικά με τις πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και της cytoB. Όταν γίνεται χρήση εκτεταμένων περιόδων δειγματοληψίας (δηλ. συνολικός χρόνος καλλιέργειας ισοδύναμος με την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου επί 3,0 έως 4,0), θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να εξασφαλίζεται η συνέχιση της ενεργού διαίρεσης των κυττάρων. Για παράδειγμα, η εκθετική ανάπτυξη των λεμφοκυττάρων ενδέχεται να μειώνεται μετά την πάροδο 96 ωρών από τη διέγερση και κυτταροκαλλιέργειες σε στιβάδες ενδέχεται να παρουσιάζουν συρροή.

Τα συνιστώμενα προγράμματα μεταχείρισης κυττάρων παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα 2. Τα γενικά αυτά προγράμματα μεταχείρισης μπορούν να τροποποιούνται (και να αιτιολογούνται) ανάλογα με τη σταθερότητα και τη δραστικότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ή με τα ιδιαίτερα αυξητικά χαρακτηριστικά των χρησιμοποιούμενων κυττάρων.

Πίνακας 2

Χρόνοι μεταχείρισης και συλλογής κυττάρων για τη δοκιμή MNvit

Λεμφοκύτταρα, πρωτογενή κύτταρα και κυτταρικές σειρές που υποβάλλονται σε μεταχείριση με cytoB	+ S9 Σύντομη μεταχείριση	μεταχείριση επί 3-6 ώρες παρουσία S9· απομάκρυνση του S9 και του θρεπτικού υλικού μεταχείρισης· προσθήκη νέου θρεπτικού υλικού και cytoB· συλλογή σε χρόνο που ισοδυναμεί με την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου επί 1,5 - 2,0 μετά την έναρξη της μεταχείρισης.
	– S9 Σύντομη μεταχείριση	μεταχείριση επί 3-6 ώρες· απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου μεταχείρισης· προσθήκη νέου θρεπτικού υλικού και cytoB· συλλογή σε χρόνο που ισοδυναμεί με την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου επί 1,5 - 2,0 μετά την έναρξη της μεταχείρισης.
	– S9 Παρατεταμένη μεταχείριση	μεταχείριση επί 1,5 - 2,0 φορές την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου παρουσία cytoB· συλλογή στο τέλος της περιόδου μεταχείρισης.
Κυτταρικές σειρές που υποβάλλονται σε μεταχείριση χωρίς cytoB (Πανομοιότυπα με προγράμματα μεταχείρισης που παρατίθενται ανωτέρω, με τη διαφορά ότι δεν προστίθεται cytoB.)		

Για τις καλλιέργειες σε μονοστιβάδες, το τέλος της μεταχείρισης διάρκειας 3-6 ωρών, είναι πιθανή η παρουσία μιτωτικών κυττάρων (αναγνωρίζονται από το στρογγυλό σχήμα τους και από την απόσπασή τους από την επιφάνεια). Επειδή τα εν λόγω μιτωτικά κύτταρα αποσπώνται εύκολα, είναι πιθανή η απώλειά τους κατά την απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου που περιέχει την υπό δοκιμή χημική ουσία. Εάν υπάρχουν αποδεικτικά στοιχεία για σημαντική αύξηση του αριθμού των μιτωτικών κυττάρων σε σχέση με τους μάρτυρες, με πιθανή διακοπή της μίτωσης, τα κύτταρα θα πρέπει να συλλέγονται με φυγοκέντρηση και να εισάγονται εκ νέου στην καλλιέργεια, ώστε να αποφεύγεται η απώλεια κυττάρων που υφίστανται μίτωση και ενδέχεται να εμφανίζουν μικροπυρήνες ή χρωμοσωμική εκτροπή κατά τον χρόνο της συλλογής.

▼M7

Συλλογή των κυττάρων και ετοιμασία των αντικειμενοφόρων πλακών

Η συλλογή και η επεξεργασία των κυττάρων θα πρέπει να πραγματοποιούνται σε κάθε καλλιέργεια χωριστά. Η ετοιμασία των κυτταρικών παρασκευασμάτων μπορεί να περιλαμβάνει κατεργασία με υπότονο διάλυμα. Ωστόσο, το στάδιο αυτό δεν είναι απαραίτητο, εάν επιτυγχάνεται κατάλληλη επίστρωση των κυττάρων με άλλον τρόπο. Μπορούν να χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές ετοιμασίας αντικειμενοφόρων πλακών, με την προϋπόθεση ότι προκύπτουν υψηλής ποιότητας κυτταρικά παρασκευάσματα για καταμέτρηση. Κύτταρα με άθικτη κυτταρική μεμβράνη και άθικτο κυτταρόπλασμα θα πρέπει να διατηρούνται για να είναι δυνατός ο εντοπισμός μικροπυρήνων και (στη μέθοδο αναστολής της κυτταροκίνησης) ο αξιόπιστος εντοπισμός διπύρηνων κυττάρων.

Για τη χρώση των αντικειμενοφόρων πλακών μπορούν να χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι, όπως η χρωστική Giemsa ή ειδικά για το DNA φθοριοχρώματα. Με τη χρήση χρώσεων φλουορεσκεΐνης [π.χ. πορτοκαλί της ακριδίνης (78) ή Hoechst 33258 συν πυρονίνη-Y (79)] είναι δυνατόν να εξαλειφθούν ορισμένα από τα τεχνητά αποτελέσματα που οφείλονται στη χρήση μη ειδικών για το DNA χρώσεων. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιούνται αντισώματα κατά του κινητοχώρου, FISH με παγκεντρομεριδιακούς ανιχνευτές DNA ή η σήμανση in situ με ειδικούς για τα παγκεντρομερίδια εκκινητές, σε συνδυασμό με κατάλληλη αντίχρωση του DNA, για την εξακρίβωση του περιεχομένου (θα χρωματίζονται τα ολόκληρα χρωμοσώματα, αλλά δεν θα χρωματίζονται τα χωρίς κεντρομερίδιο τμήματα χρωμοσώματος) των μικροπυρήνων, εάν ζητούνται πληροφορίες σχετικά με τον μηχανισμό με τον οποίον αυτοί σχηματίζονται (16) (17). Επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται και άλλες μέθοδοι διάκρισης μεταξύ κλαστογόνων και ανευπλοειδογόνων ουσιών, εάν έχει αποδειχθεί και επικυρωθεί η αποτελεσματικότητά τους. Για παράδειγμα, για ορισμένες κυτταρικές σειρές, η καταμέτρηση των πυρήνων με λιγότερα από 2N χρωμοσώματα ως συμβάντα υποδιπλοειδίας, με τη χρήση τεχνικών όπως η ανάλυση εικόνων, η κυτταρομετρία με σάρωση λέιζερ ή η κυτταρομετρία ροής, θα μπορούσε επίσης να παρέχει χρήσιμες πληροφορίες (80) (81) (82). Οι μορφολογικές παρατηρήσεις των πυρήνων θα μπορούσαν επίσης να παρέχουν στοιχεία για πιθανή ανευπλοειδία. Επιπλέον, μια δοκιμή χρωμοσωμικών εκτροπών μετάφασης, κατά προτίμηση στον ίδιο τύπο κυττάρων και με χρήση πρωτοκόλλου με συγκρίσιμη ευαισθησία, θα μπορούσε επίσης να είναι ένας χρήσιμος τρόπος για να διαπιστωθεί αν οι μικροπυρήνες οφείλονται σε θραύση χρωμοσωμάτων (δεδομένου ότι η απώλεια χρωμοσώματος δεν θα ανιχνευόταν στη δοκιμή χρωμοσωμικών εκτροπών).

Ανάλυση

Όλες οι αντικειμενοφόρες πλάκες, τόσο εκείνες με τους μάρτυρες με διαλύτη όσο και εκείνες που φέρουν μάρτυρες χωρίς μεταχείριση (εάν χρησιμοποιήθηκαν) και θετικούς μάρτυρες, θα πρέπει να λαμβάνουν ανεξάρτητο κωδικό πριν από τη μικροσκοπική ανάλυση συχνοτήτων μικροπυρήνων. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες τεχνικές για τον έλεγχο κάθε μεροληψίας ή ολίσθησης κατά τη χρήση αυτόματου συστήματος καταμέτρησης, όπως η κυτταρομετρία ροής, η κυτταρομετρία με σάρωση λέιζερ ή η ανάλυση εικόνων. Ανεξάρτητα από την αυτοματοποιημένη πλατφόρμα που χρησιμοποιείται για την καταγραφή του σχηματισμού μικροπυρήνων, θα πρέπει να αξιολογούνται παράλληλα οι δείκτες CBPI, RI, RPD ή RICC.

Στις κατεργασμένες με cytoB καλλιέργειες, οι συχνότητες μικροπυρήνων θα πρέπει να εξετάζονται τουλάχιστον σε 2 000 διπύρηνα κύτταρα ανά συγκέντρωση και μάρτυρα (83), ισομερώς κατανεμημένα μεταξύ των επαναλήψεων, εάν χρησιμοποιούνται επαναλήψεις. Στην περίπτωση των μονών καλλιεργειών ανά δόση (βλ. παράγραφο 28) θα πρέπει να καταμετρώνται τουλάχιστον 2 000 διπύρηνα κύτταρα ανά καλλιέργεια (83) στη μονή καλλιέργεια. Εάν είναι διαθέσιμα για καταμέτρηση σημαντικά λιγότερα από 1 000 διπύρηνα κύτταρα ανά καλλιέργεια (για διπλές καλλιέργειες) ή λιγότερα από 2 000 κύτταρα (για μονές καλλιέργειες) και εάν δεν διαπιστωθεί σημαντική αύξηση των μικροπυρήνων, η δοκιμή πρέπει να επαναληφθεί με περισσότερα κύτταρα ή σε λιγότερο κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις, αναλόγως του ποιο από τα δύο ενδείκνυται. Πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μην καταμετρώνται διπύρηνα κύτταρα με ανώμαλο σχήμα ή με μεγάλη διαφορά μεγέθους των δύο πυρήνων. Επιπλέον, δεν πρέπει να συγχέονται τα διπύρηνα κύτταρα με τα ελλιπώς επιστρωμένα πολυπύρηνα κύτταρα. Τα κύτταρα με περισσότερους από δύο κύριους πυρήνες δεν θα πρέπει να εξετάζονται για την παρουσία μικροπυρήνων, εφόσον η βασική συχνότητα μικροπυρήνων μπορεί να είναι υψηλότερη σε αυτά (84). Η καταμέτρηση μονοπύρηνων κυττάρων είναι αποδεκτή, εάν έχει αποδειχθεί ότι η δράση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας παρεμποδίζει τη δράση της cytoB. Επανάληψη της δοκιμής χωρίς cytoB θα ήταν ενδεχομένως χρήσιμη σε τέτοιες περιπτώσεις.

▼M7

Η καταμέτρηση μονοπύρηνων κυττάρων επιπλέον των διπύρηνων κυττάρων θα μπορούσε να παράσχει χρήσιμες πληροφορίες (85) (86), αλλά δεν είναι υποχρεωτική.

Στις υπό δοκιμή κυτταρικές σειρές χωρίς κατεργασία με cytoB, θα πρέπει να καταμετρώνται οι μικροπυρήνες τουλάχιστον σε 2 000 κύτταρα ανά συγκέντρωση δοκιμής και μάρτυρα (83), ισομερώς κατανεμημένα μεταξύ των επαναλήψεων, εάν χρησιμοποιούνται επαναλήψεις. Όταν χρησιμοποιούνται μονές καλλιέργειες ανά συγκέντρωση (βλ. παράγραφο 28), θα πρέπει να καταμετρώνται τουλάχιστον 2 000 κύτταρα ανά καλλιέργεια σε αυτή τη μονή καλλιέργεια. Εάν είναι διαθέσιμα για καταμέτρηση σημαντικά λιγότερα από 1 000 κύτταρα ανά καλλιέργεια (για διπλές καλλιέργειες) ή λιγότερα από 2 000 κύτταρα (για μονές καλλιέργειες) και εάν δεν διαπιστωθεί σημαντική αύξηση των μικροπυρήνων, η δοκιμή πρέπει να επαναληφθεί με περισσότερα κύτταρα ή σε λιγότερο κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις, αναλόγως του ποιο από τα δύο ενδείκνυται.

Όταν χρησιμοποιείται cytoB, πρέπει να προσδιορίζεται ο δείκτης CBPI ή RI, τουλάχιστον από 500 κύτταρα ανά καλλιέργεια, για την εκτίμηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (βλ. προσάρτημα 2). Στις περιπτώσεις μεταχείρισης χωρίς cytoB, είναι απολύτως αναγκαίο να παρέχονται στοιχεία που να αποδεικνύουν τη διαίρεση κυττάρων σε καλλιέργεια, όπως εξηγείται στις παραγράφους 24-28.

Τεχνική ικανότητα του εργαστηρίου

Για να εξασφαλίσει επαρκή εμπειρία στη διεξαγωγή της δοκιμής πριν την εντάξει στην τρέχουσα πρακτική του, το εργαστήριο θα πρέπει να έχει πραγματοποιήσει σειρά πειραμάτων με θετικές χημικές ουσίες αναφοράς που ενεργούν μέσω διαφόρων μηχανισμών (τουλάχιστον μία με και μία χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση, και μία που ενεργεί μέσω ενός ανευπλοειδογόνου μηχανισμού, επιλεγμένες μεταξύ των χημικών ουσιών που απαριθμούνται στον πίνακα 1) και διάφορους αρνητικούς μάρτυρες (περιλαμβανομένων και των καλλιεργειών που δεν υποβάλλονται σε μεταχείριση και διαφόρων διαλυτών/φορέα). Οι αποκρίσεις των εν λόγω θετικών και αρνητικών μαρτύρων θα πρέπει να συμφωνούν με τη βιβλιογραφία. Αυτό δεν ισχύει για τα εργαστήρια που έχουν πείρα, δηλ. διαθέτουν βάση ιστορικών δεδομένων, όπως ορίζεται στις παραγράφους 49 έως 52.

Θα πρέπει να διερευνάται ένα σύνολο επιλεγμένων χημικών ουσιών που αποτελούν θετικούς μάρτυρες (βλ. πίνακα 1), με βραχυχρόνια και μακροχρόνια μεταχείριση χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση, καθώς και με βραχυχρόνια μεταχείριση με μεταβολική ενεργοποίηση, με σκοπό να καταδειχθεί η τεχνική ικανότητα εντοπισμού κλαστογόνων και ανευπλοειδογόνων χημικών ουσιών, να διαπιστώνεται η αποτελεσματικότητα του συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης και να καταδεικνύεται η καταλληλότητα των διαδικασιών καταμέτρησης (μικροσκοπική οπτική ανάλυση, κυτταρομετρία ροής, κυτταρομετρία με σάρωση λέιζερ, ή ανάλυση εικόνων). Θα πρέπει να επιλέγεται ένα εύρος συγκεντρώσεων των επιλεγμένων χημικών ουσιών που να επιφέρουν αναπαραγώγιμες και σχετιζόμενες με τη συγκέντρωση αυξήσεις σε σχέση με τις τιμές υποβάθρου, για να αποδεικνύονται η ευαισθησία και το δυναμικό εύρος του συστήματος δοκιμής.

Ιστορικά δεδομένα για μάρτυρες

Το εργαστήριο θα πρέπει να καθορίζει:

— εύρος και κατανομή ιστορικών δεδομένων για θετικούς μάρτυρες,

— εύρος και κατανομή ιστορικών δεδομένων για αρνητικούς μάρτυρες (χωρίς μεταχείριση, με διαλύτη).

Κατά την αρχική συγκέντρωση δεδομένων για ιστορική κατανομή όσον αφορά τους αρνητικούς μάρτυρες, οι παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες θα πρέπει να συμφωνούν με τα δημοσιευμένα δεδομένα για αρνητικούς μάρτυρες, εφόσον υπάρχουν. Καθώς θα προστίθενται περισσότερα πειραματικά δεδομένα στην κατανομή των μαρτύρων, οι παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες θα πρέπει, στην ιδανική περίπτωση, να βρίσκονται εντός των ορίων ελέγχου σε επίπεδο 95 % της εν λόγω κατανομής (87) (88). Η βάση ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για αρνητικούς μάρτυρες θα πρέπει αρχικά να δημιουργείται με δεδομένα από τουλάχιστον 10 πειράματα, αν και είναι προτιμότερο να αποτελείται από τουλάχιστον 20 πειράματα που έχουν εκτελεστεί σε συγκρίσιμες πειραματικές συνθήκες. Τα εργαστήρια θα πρέπει να χρησιμοποιούν μεθόδους ποιοτικού ελέγχου, όπως διαγράμματα ελέγχου [π.χ. διαγράμματα C ή X-bar (88)], για να προσδιορίζουν

▼M7

τη μεταβλητότητα των δεδομένων τους που αφορούν τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες και να αποδεικνύουν ότι έχουν «υπό έλεγχο» τη μεθοδολογία (83). Περαιτέρω συστάσεις για τον τρόπο δημιουργίας και χρήσης των ιστορικών δεδομένων (δηλ. κριτήρια προσθήκης στοιχείων στα ιστορικά δεδομένα και αποκλεισμού στοιχείων από αυτά, καθώς και κριτήρια αποδοχής συγκεκριμένου πειράματος) έχουν διατυπωθεί στη βιβλιογραφία (87).

Κάθε αλλαγή του πειραματικού πρωτοκόλλου θα πρέπει να εξετάζεται υπό το πρίσμα της συμφωνίας των δεδομένων με τις υφιστάμενες βάσεις ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για μάρτυρες. Τυχόν σημαντικές ανακολουθίες θα πρέπει να έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία νέας βάσης ιστορικών δεδομένων για μάρτυρες.

Τα δεδομένα για αρνητικούς μάρτυρες θα πρέπει να είναι η συχνότητα εμφάνισης μικροκυττάρων από μια μονή καλλιέργεια ή από το άθροισμα των καλλιεργειών επανάληψης, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 28. Οι παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες θα πρέπει, στην ιδανική περίπτωση, να βρίσκονται εντός των ορίων ελέγχου σε επίπεδο 95 % της κατανομής της βάσης ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για αρνητικούς μάρτυρες (87) (88). Όταν τα δεδομένα για παράλληλους αρνητικούς μάρτυρες δεν βρίσκονται εντός των ορίων ελέγχου σε επίπεδο 95 %, μπορεί να είναι αποδεκτή η προσθήκη τους στην ιστορική κατανομή μαρτύρων, εφόσον τα εν λόγω δεδομένα δεν είναι ακραίες έκτοπες τιμές και υπάρχουν στοιχεία που αποδεικνύουν ότι το σύστημα δοκιμής είναι «υπό έλεγχο» (βλ. παράγραφο 50) και ότι δεν πρόκειται για τεχνικό ή ανθρώπινο σφάλμα.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Παρουσίαση των αποτελεσμάτων

Εάν εφαρμόζεται η τεχνική της αναστολής της κυτταροκίνησης, μόνο οι συχνότητες διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνες (ανεξαρτήτως του αριθμού μικροπυρήνων ανά κύτταρο) χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της επαγωγής μικροπυρήνων. Η καταγραφή του αριθμού κυττάρων με έναν, δύο ή περισσότερους μικροπυρήνες μπορεί να αναφέρεται χωριστά και ενδεχομένως παρέχει χρήσιμες πληροφορίες, αλλά δεν είναι υποχρεωτική.

Πρέπει να προσδιορίζονται παράλληλες μετρήσεις κυτταροτοξικότητας και/ή κυτταρόστασης για όλες τις καλλιέργειες που υποβάλλονται σε μεταχείριση και τις καλλιέργειες που είναι αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες (16). Όταν εφαρμόζεται η μέθοδος αναστολής της κυτταροκίνησης, πρέπει να υπολογίζεται ο δείκτης CBPI ή ο RI ως μέτρο της καθυστέρησης του κυτταρικού κύκλου, για όλες τις καλλιέργειες που υποβάλλονται σε μεταχείριση και τις καλλιέργειες-μάρτυρες. Εάν δεν χρησιμοποιείται cytoB, πρέπει να υπολογίζεται ο δείκτης RPD ή RICC (βλ. προσάρτημα 2).

Θα πρέπει να παρέχονται δεδομένα για κάθε καλλιέργεια. Επιπλέον, όλα τα δεδομένα θα πρέπει να συγκεφαλαιώνονται σε μορφή πίνακα.

Κριτήρια αποδοχής

Η αποδοχή μιας δοκιμής βασίζεται στα ακόλουθα κριτήρια:

— Ο παράλληλος αρνητικός μάρτυρας θεωρείται αποδεκτός για προσθήκη στη βάση ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για αρνητικούς μάρτυρες, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 50.

— Οι παράλληλοι θετικοί μάρτυρες (βλ. παράγραφο 50) θα πρέπει να επάγουν αποκρίσεις συμβατές με εκείνες που έχουν καταχωριστεί στη βάση ιστορικών δεδομένων για θετικούς μάρτυρες του εργαστηρίου και να επιφέρουν στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα.

— Θα πρέπει να πληρούνται τα κριτήρια κυτταρικού πολλαπλασιασμού στον μάρτυρα με διαλύτη (παράγραφοι 25 -27).

— Διεξάγονταν δοκιμές σε όλες τις πειραματικές συνθήκες, εκτός εάν σε μία από αυτές τα αποτελέσματα ήταν θετικά (βλ. παραγράφους 36-40).

— Επαρκής αριθμός κυττάρων και συγκεντρώσεων είναι αναλύσιμος (παράγραφοι 28 και 44-46).

▼M7

— Τα κριτήρια επιλογής της ανώτατης συγκέντρωσης είναι σύμφωνα με αυτά που περιγράφονται στις παραγράφους 24-31.

Αξιολόγηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται σαφώς θετική εάν, σε οποιαδήποτε από τις πειραματικές συνθήκες που εξετάστηκαν (βλ. παραγράφους 36-39):

— τουλάχιστον μία από τις συγκεντρώσεις δοκιμής παρουσιάζει στατιστικά σημαντική αύξηση της απόκρισης σε σχέση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα (89)

— η αύξηση σχετίζεται με τη δόση τουλάχιστον σε μία από τις πειραματικές συνθήκες, όταν αξιολογείται με κατάλληλο έλεγχο τάσης (βλ. παράγραφο 28)

— κάποιο από τα αποτελέσματα βρίσκεται εκτός της κατανομής των ιστορικών δεδομένων για αρνητικούς μάρτυρες (π.χ. όρια ελέγχου σε επίπεδο 95 % με βάση την κατανομή Poisson· βλ. παράγραφο 52).

Όταν πληρούνται όλα αυτά τα κριτήρια, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται ικανή να επάγει θραύσεις και/ή προσθήκη ή απώλεια χρωμοσώματος σε αυτό το σύστημα δοκιμών. Συστάσεις για τις πλέον κατάλληλες στατιστικές μεθόδους έχουν διατυπωθεί επίσης στη βιβλιογραφία (90) (91) (92).

Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται σαφώς αρνητική εάν, σε όλες τις πειραματικές συνθήκες που εξετάστηκαν (βλ. παραγράφους 36-39):

— σε καμία από τις συγκεντρώσεις δοκιμής δεν εμφανίζεται στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα,

— δεν παρατηρείται αύξηση σχετιζόμενη με τη συγκέντρωση, όταν αξιολογείται με κατάλληλο έλεγχο τάσης,

— όλα τα αποτελέσματα βρίσκονται εντός της κατανομής των ιστορικών δεδομένων για αρνητικούς μάρτυρες (π.χ. όρια ελέγχου σε επίπεδο 95 % με βάση την κατανομή Poisson· βλ. παράγραφο 52).

Θεωρείται τότε ότι η υπό δοκιμή ουσία δεν είναι ικανή να επάγει θραύσεις και/ή προσθήκη ή απώλεια χρωμοσώματος σε αυτό το σύστημα δοκιμών. Συστάσεις για τις πλέον κατάλληλες στατιστικές μεθόδους έχουν διατυπωθεί επίσης στη βιβλιογραφία (90) (91) (92).

Δεν απαιτείται επαλήθευση των σαφώς θετικών ή αρνητικών αποκρίσεων.

Όταν η απόκριση δεν είναι ούτε σαφώς αρνητική ούτε θετική, όπως περιγράφεται ανωτέρω, ή για να διαπιστωθεί η βιολογική σημασία ενός αποτελέσματος, τα δεδομένα θα πρέπει να αξιολογούνται με βάση την κρίση των ειδικών και/ή περαιτέρω διερεύνηση. Η καταμέτρηση επιπλέον κυττάρων (κατά περίπτωση) ή η επανάληψη του πειράματος, ενδεχομένως με τη χρήση διαφορετικών πειραματικών συνθηκών [π.χ. διαστήματα μεταξύ των συγκεντρώσεων, άλλες συνθήκες μεταβολικής ενεργοποίησης (δηλ. συγκέντρωση ή προέλευση του S9)] θα μπορούσε να είναι χρήσιμη.

Σε σπάνιες περιπτώσεις, ακόμη και μετά από περαιτέρω έρευνες, το σύνολο δεδομένων δεν επιτρέπει την εξαγωγή συμπεράσματος για θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα και, κατά συνέπεια, κρίνεται διφορούμενο.

Η επαγωγή μικροπυρήνων από χημικές ουσίες στη δοκιμή MNvit ενδέχεται να οφείλεται σε θραύση ή απώλεια χρωμοσώματος ή σε συνδυασμό αυτών. Για να προσδιοριστεί αν ο μηχανισμός επαγωγής μικροπυρήνων συνδέεται με κλαστογόνο ή ανευπλοειδογόνο δράση, είναι δυνατόν να διεξαχθεί περαιτέρω ανάλυση με αντισώματα κινητοχώρου, κεντρομερικούς ανιχνευτές in situ ή με άλλες μεθόδους.

▼M7

Έκθεση δοκιμής

Στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

— πηγή, αριθμός παρτίδας, καταληκτική ημερομηνία χρήσης, εφόσον υπάρχει·

— σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εάν είναι γνωστή·

— ικανότητα αντίδρασης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας με τον διαλύτη/φορέα ή τα θρεπτικά υλικά κυτταροκαλλιέργειας·

— διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον διαλύτη, εάν είναι γνωστές·

— μέτρηση του pH, της ωσμωμοριακότητας και του ιζήματος του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας στο οποίο προστέθηκε η υπό δοκιμή χημική ουσία, κατά περίπτωση.

Μονοσυστατική ουσία:

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες·

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγματα:

— περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Διαλύτης:

— αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη·

— εκατοστιαία αναλογία του διαλύτη στο τελικό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας.

Κύτταρα:

— τύπος και προέλευση των χρησιμοποιούμενων κυττάρων·

— καταλληλότητα του χρησιμοποιούμενου τύπου κυττάρων·

— απουσία μυκοπλάσματος, σε περίπτωση κυτταρικών σειρών·

— για τις κυτταρικές σειρές, πληροφορίες για τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου ή τον δείκτη πολλαπλασιασμού·

— όταν χρησιμοποιούνται λεμφοκύτταρα, φύλο των δοτών αίματος, ηλικία και κάθε σημαντική πληροφορία για τον δότη, πλήρες αίμα ή διαχωρισμένα λεμφοκύτταρα, χρησιμοποιηθέν μιτογόνο·

— κανονική διάρκεια (αρνητικός μάρτυρας) του κυτταρικού κύκλου·

— αριθμός ανακαλλιεργειών των κυτταρικών σειρών, εάν είναι διαθέσιμος·

— μέθοδοι για τη διατήρηση των κυτταροκαλλιεργειών, προκειμένου για κυτταρικές σειρές·

— χαρακτηριστικός αριθμός χρωμοσωμάτων, προκειμένου για κυτταρικές σειρές.

▼**M7**

Συνθήκες δοκιμής:

— ταυτότητα του αναστολέα κυτταροκίνησης (π.χ. cytoB), εάν χρησιμοποιείται, συγκέντρωση της ουσίας αυτής και διάρκεια έκθεσης των κυττάρων·

— συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εκφραζόμενη ως τελική συγκέντρωση στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (π.χ. μg ή mg/mL ή mM θρεπτικού μέσου καλλιέργειας)·

— αιτιολόγηση της επιλογής των συγκεντρώσεων και του αριθμού καλλιεργειών, συμπεριλαμβανομένων δεδομένων για την κυτταροτοξικότητα και των περιορισμών από πλευράς διαλυτότητας·

— σύνθεση των θρεπτικών μέσων, συγκέντρωση CO_2, κατά περίπτωση, επίπεδο υγρασίας·

— συγκέντρωση (και/ή όγκος) του διαλύτη και της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που προστέθηκαν στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας·

— θερμοκρασία και χρόνος επώασης,

— διάρκεια της μεταχείρισης·

— χρόνος συλλογής μετά τη μεταχείριση·

— πυκνότητα των κυττάρων κατά τον εμβολιασμό, κατά περίπτωση·

— τύπος και σύσταση του συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης (πηγή του S9, μέθοδος παρασκευής του μείγματος S9, συγκέντρωση ή όγκος του μείγματος S9 και του S9 στο τελικό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, ποιοτικοί έλεγχοι του S9, π.χ. ενζυματική δράση, στειρότητα, μεταβολική ικανότητα)·

— θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες, τελικές συγκεντρώσεις, συνθήκες και διάρκειες των περιόδων μεταχείρισης και ανάκαμψης·

— χρησιμοποιούμενες μέθοδοι ετοιμασίας των αντικειμενοφόρων πλακών και τεχνική χρώσης·

— κριτήρια για την καταγραφή των κυττάρων με μικροπυρήνες (επιλογή αναλύσιμων κυττάρων και αναγνώριση κυττάρων με μικροπυρήνες)·

— αριθμοί εξετασθέντων κυττάρων·

— μέθοδοι μέτρησης της κυτταροτοξικότητας·

— τυχόν συμπληρωματικές πληροφορίες που αφορούν την κυτταροτοξικότητα και τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε·

— κριτήρια χαρακτηρισμού των μελετών ως θετικών, αρνητικών ή αμφίβολων·

— χρησιμοποιούμενες μέθοδοι στατιστικής ανάλυσης·

— χρησιμοποιούμενες μέθοδοι, π.χ. χρήση αντισωμάτων κατά του κινητοχώρου ή ειδικών για τα κεντρομερίδια ανιχνευτών DNA, για να διαπιστωθεί αν οι μικροπυρήνες περιείχαν πλήρη χρωμοσώματα ή χρωμοσωμικά θραύσματα, κατά περίπτωση·

— μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό του pH, της ωσμωμοριακότητας και της καθίζησης.

Αποτελέσματα:

— ορισμός των αποδεκτών για εξέταση κυττάρων·

— ελλείψει cyto B, ο αριθμός των κατεργασμένων κυττάρων και ο αριθμός των κυττάρων που συλλέγονται για κάθε καλλιέργεια σε περίπτωση κυτταρικών σειρών·

▼M7

— χρησιμοποιούμενο μέτρο κυτταροτοξικότητας, π.χ. δείκτης CBPI ή RI, στην περίπτωση της μεθόδου αναστολής κυτταροκίνησης· δείκτης RICC ή RPD όταν δεν χρησιμοποιούνται μέθοδοι αναστολής κυτταροκίνησης· άλλες παρατηρήσεις, κατά περίπτωση (π.χ. συρροή κυττάρων, απόπτωση, νέκρωση, καταμέτρηση μετάφασης, συχνότητα διπύρηνων κυττάρων)·

— σημεία καθίζησης και χρόνος προσδιορισμού·

— δεδομένα για το pH και την ωσμωτικότητα του θρεπτικού υλικού μεταχείρισης, εφόσον προσδιορίστηκαν·

— κατανομή των μονοπύρηνων, διπύρηνων και πολυπύρηνων κυττάρων, εάν χρησιμοποιείται μέθοδος αναστολής κυτταροκίνησης·

— αριθμός κυττάρων με μικροπυρήνες ανά καλλιέργεια που υποβλήθηκε σε μεταχείριση και ανά καλλιέργεια-μάρτυρα, με τη διευκρίνιση αν πρόκειται για διπύρηνα ή μονοπύρηνα κύτταρα, εφόσον ενδείκνυται·

— σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης, όπου είναι δυνατόν·

— δεδομένα για παράλληλους αρνητικούς μάρτυρες (με διαλύτη) και θετικούς μάρτυρες (συγκεντρώσεις και διαλύτες)·

— ιστορικά δεδομένα για τους αρνητικούς (με διαλύτη) και θετικούς μάρτυρες, με πεδία τιμών, μέσες τιμές και τυπική απόκλιση και όρια ελέγχου σε επίπεδο 95 % για την κατανομή, καθώς και πλήθος των δεδομένων·

— στατιστική ανάλυση· τιμές p, εάν υπάρχουν.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(2) Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, pp. 1-4.

(3) Parry, J.M., A. Sors (1993). The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project. *Mutation Research*, Vol. 287/1, pp. 3-15.

(4) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios,* Vol. 43/172-173, pp. 233-246.

(5) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2000). Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 167-172.

(6) Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols,* Vol. 2/5, pp. 1084-1104.

(7) Fenech, M., A.A. Morley (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research,* Vol. 161/2, pp. 193-198.

(8) Eastmond, D.A., J.D. Tucker (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 13/1, pp. 34-43.

▼M7

(9) Eastmond, D.A., D. Pinkel (1990). Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probe. *Mutation Research,* Vol. 234/5, pp. 9-20.

(10) Miller, B.M. et al. (1991). Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutagenesis,* Vol. 6/4, pp. 297-302.

(11) Farooqi, Z., F. Darroudi, A. T. Natarajan (1993). The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis,* Vol. 8/4, pp. 329-334.

(12) Migliore, L. et al. (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research,* Vol. 319/3, pp. 205-213.

(13) Norppa, H., L. Renzi, C. Lindholm (1993). Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization. *Mutagenesis,* Vol. 8/6, pp. 519-525.

(14) Eastmond, D.A, D.S. Rupa, L.S. Hasegawa (1994). Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes. *Mutation Research,* Vol. 322/1, pp. 9-20.

(15) Marshall, R.R. et al. (1996). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutation Research,* Vol. 372/2, pp. 233-245.

(16) Zijno, P. *et al.* (1996). Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 372/2, 211-219.

(17) Kirsch-Volders *et al.* (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research,* Vol. 540/2, pp. 153-163.

(18) Κεφάλαιο B.10 του παρόντος παραρτήματος: *In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test*,.

(19) Lorge, E. et al. (2006). SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 13-36.

(20) Clare, G. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 37-60.

(21) Aardema, M.J. et al. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 61-87.

(22) Wakata, A. et al. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 88-124.

(23) Oliver, J. et al. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 125-152.

(24) Albertini, S. et al. (1997). Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, pp. 187-208.

(25) Miller, B. et al. (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, pp. 45-59.

▼**M7**

(26) Miller, B. et al. (1998). Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Research,* Vol. 410, pp. 81-116.

(27) Kalweit, S. et al. (1999). Chemically induced micronucleus formation in V79 cells — comparison of three different test approaches. *Mutation Research,* Vol. 439/2, pp. 183-190.

(28) Kersten, B. et al. (1999). The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutation Research,* Vol. 445/1, pp. 55-71.

(29) von der Hude, W. et al. (2000). *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells — results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances. *Mutation Res*earch, Vol. 468/2, pp. 137-163.

(30) Garriott, M.L., J.B. Phelps, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research,* Vol. 517/1-2, pp. 123-134.

(31) Matsushima, T. et al. (1999). Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis,* Vol. 14/6, pp. 569-580.

(32) Elhajouji, A., E. Lorge (2006). Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 1-152.

(33) Kirkland, D. (2010). Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the *in vitro* micronucleus test (MNVit): Introduction to the collaborative trial. *Mutation Res*earch, Vol. 702/2, pp. 139-147.

(34) Hashimoto K. (1999). (2011). Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the *in vitro* micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells. *Regulatory Toxicology and Pharmacol*ogy, Vol. 59/1, pp. 28-36.

(35) Honma, M., M. Hayashi (2011). Comparison of *in vitro* micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, pp. 373-384.

(36) Zhang, L.S. et al. (1995). A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research Letters,* Vol. 347/3-4, pp. 105-115.

(37) ECVAM (2006). Δήλωση της επιστημονικής συμβουλευτικής επιτροπής (ESAC) του Ευρωπαϊκού Κέντρου για την επικύρωση εναλλακτικών μεθόδων (ECVAM) σχετικά με την επιστημονική εγκυρότητα της in vitro δοκιμής μικροπύρηνων κυττάρων εναλλακτικά προς την in vitro δοκιμή χρωμοσωμικών εκτροπών για τις δοκιμές γονιδιοτοξικότητας. 25η συνεδρίαση της ESAC, 16-17 Νοεμβρίου 2006, Διατίθεται στον ιστότοπο: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

(38) ESAC (2006). ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. Διατίθεται στη διαδικτυακή διεύθυνση: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

(39) Corvi, R. et al. (2008). ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT). *Mutagenesis,* Vol 23/4, pp. 271-283.

(40) ILSI paper (draft). Lorge, E., M.M. Moore, J. Clements, M. O'Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, A. Sutter, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Young-Tannir. Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. *Mutation Research.*

▼**M7**

(41) Scott, D. et al. (1991). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, Mutation Res., 257, pp. *Mutation Research,* Vol. 257/2, pp. 147-205.

(42) Morita, T. et al. (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Research,* Vol. 268/2, pp. 297-305.

(43) Brusick, D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 789-886.

(44) Long, L.H. et al. (2007). Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium. *Mutation Research,* Vol. 634/1-2, pp. 177-183.

(45) Nesslany, F. et al. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environmental and Molecular Mutation.*, Vol. 49, pp. 439-452.

(46) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 147/1-2, pp. 29-36.

(47) Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method. *Mutation Research,* Vol. 392, pp. 11-18.

(48) Payne, C.M. et al. (2010). Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: relevance to genomic instability in colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, Vol. 62/6, pp. 825-840.

(49) Bazin, E. et al. (2010). Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin, Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 51/3, pp. 251-259.

(50) Le Hegarat, L. et al. (2010). Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cells by the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. *Mutagenesis*, Vol. 25/6, pp. 555-560.

(51) Josse, R. et al. (2012). An adaptation of the human HepaRG cells to the *in vitro* micronucleus assay. *Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 295-304.

(52) Ehrlich, V.et al. (2002). Fumonisin B_1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis,* Vol. 17/3, pp. 257-260.

(53) Knasmüller, S. et al. (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology,* Vol. 198/1-3, pp. 315-328.

(54) Gibson, D.P. et al. (1997). Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, pp. 61-70.

(55) Bonassi, S. et al. (2001). Human MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. **37/1**, pp. 31-45.

(56) Maron, D.M., B.N. Ames (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research,* Vol. 113/3-4, pp. 173-215.

(57) Ong, T.-m. et al. (1980). Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology,* Vol. 4/1, pp. 55-65.

▼M7

(58) Elliott, B.M. et al. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis,* Vol. 7, pp. 175-177.

(59) Matsushima, T. et al. (1976). «A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems», in *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres, F.J. et al. (eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(60) Johnson, T.E., D. R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996). Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 28, pp. 51-59.

(61) UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Διατίθεται στη διαδικτυακή διεύθυνση: http://www.pops.int/

(62) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987). Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes. *Mutation Research*, Vol.190/3, pp. 225-8.

(63) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982). «CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids», in Genotoxic Effects of Airborne Agents. Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, pp. 91-103.

(64) Zamora, P.O. et al. (1983). Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 5/6, pp. 795-801.

(65) Asakura, M. et al. (2008). An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay. *Mutation Research*, Vol. 652/2, pp. 122-130.

(66) Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research,* Vol. 285/1, pp. 35-44.

(67) Phelps, J.B., M.L. Garriott, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research,* Vol. 521/1-2, pp. 103-112.

(68) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2004). Corrigendum to «Report from the *in vitro* micronucleus assay working group». *Mutation Research,* 564, 97-100.

(69) Lorge, E. et al. (2008). Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects. *Mutation Research,* Vol. 655/1-2, pp. 1-3.

(70) Surralles, J. et al. (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research,* Vol. 341/3, pp. 169-184.

(71) Honma, M. (2011). Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 724, pp. 86-87.

(72) Pfuhler, S. et al. (2011). *In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop. *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 101-107.

(73) OECD (2014). Έγγραφο που τεκμηριώνει την απόφαση WNT για την εφαρμογή αναθεωρημένων κριτηρίων για την επιλογή της μέγιστης συγκέντρωσης στις in vitro δοκιμές γονιδιοτοξικότητας σε κύτταρα θηλαστικών (Κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών 473, 476 και 487). ENV/JM/TG(2014)17. Διατίθεται κατόπιν αιτήσεως.

▼M7

(74) Morita T., M. Honma, K. Morikawa (2012). Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity. *Mutation Research*, Vol. 741, pp. 32-56.

(75) Brookmire L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *in vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 54/1, pp. 36-43.

(76) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances. http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt.

(77) Sobol, Z. et al. (2012). Development and validation of an *in vitro* micronucleus assay platform in TK6 cells. *Mutation Research, Vol.*746/1, pp. 29-34.

(78) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Research,* Vol. 120/4, pp. 241-247.

(79) MacGregor, J. T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Research,* Vol. 120/4, pp. 269-275.

(80) Bryce, S.M. et al. (2011). Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/4, pp. 280-286.

(81) Nicolette, J. *et al.* (2011). *in vitro* micronucleus screening of pharmaceutical candidates by flow cytometry in Chinese hamster V79 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, pp. 355-362.

(82) Shi, J., R. Bezabhie, A. Szkudlinska (2010). Further evaluation of a flow cytometric *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies. *Mutagenesis*, Vol. 25/1, pp. 33-40.

(83) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on testing and assessment, No.198, OECD Publishing, Paris.

(84) Fenech, et al. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research,* Vol. 534/1-2, pp. 65-75.

(85) Elhajouji, A., M. Cunha, M. Kirsch-Volders (1998). Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis*, Vol. 13/2, pp. 193-8.

(86) Kirsch-Volders, M. et al. (2011). The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives of Toxicology,* Vol. 85/8, pp. 873-99.

(87) Hayashi, M. et al. (2010). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol.723/2, pp. 87-90.

(88) Ryan, T. P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*. 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

(89) Hoffman, W.P., M.L. Garriott, C. Lee (2003). «*In vitro* micronucleus test», in *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, 2nd ed. Chow, S. (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 463-467.

(90) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, 3rd ed. John Wiley & Sons, New York.

(91) Galloway, S.M. et al. (1987). Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.

▼**M7**

(92) Richardson, C. et al. (1989). Analysis of Data from *in vitro* Cytogenetic Assays. in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(93) International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use.

▼M7

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ανευπλοειδογόνος ουσία: κάθε χημική ουσία ή διεργασία που προκαλεί ανευπλοειδία σε κύτταρα ή οργανισμούς, μέσω της αντίδρασής της με τα συστατικά του μηχανισμού του κυτταρικού κύκλου μιτωτικής και μειωτικής διαίρεσης.

Ανευπλοειδία: κάθε απόκλιση από τον φυσιολογικό διπλοειδή (ή απλοειδή) αριθμό χρωμοσωμάτων κατά σε ένα ή περισσότερα χρωμοσώματα, όχι όμως κατά πλήρεις σειρές χρωμοσωμάτων (πολυπλοειδία).

Απόπτωση: προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, ο οποίος χαρακτηρίζεται από μια σειρά σταδίων που οδηγούν στη διάσπαση των κυττάρων προς περικλειόμενα από κυτταρική μεμβράνη σωματίδια τα οποία, στη συνέχεια, απομακρύνονται με φαγοκυττάρωση ή αποβολή.

Κυτταρικός πολλαπλασιασμός: η αύξηση του αριθμού των κυττάρων η οποία είναι αποτέλεσμα της μιτωτικής τους διαίρεσης.

Κεντρομερίδιο: η περιοχή DNA του χρωμοσώματος στην οποία συγκρατούνται ενωμένες μεταξύ τους οι δύο χρωματίδες και όπου προσδένονται εκατέρωθεν οι δύο κινητοχώροι.

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Συγκεντρώσεις: αναφέρεται στις τελικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας.

Κλαστογόνο: κάθε χημική ουσία ή συμβάν που προκαλεί δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές σε πληθυσμούς κυττάρων ή ευκαρυωτικούς οργανισμούς.

Κυτταροκίνηση: η διαδικασία κυτταρικής διαίρεσης αμέσως μετά τη μίτωση για τον σχηματισμό δύο θυγατρικών κυττάρων, το καθένα από τα οποία περιέχει έναν μόνο πυρήνα.

Δείκτης πολλαπλασιασμού με αναστολή κυτταροκίνησης (CBPI): το ποσοστό κυττάρων από δεύτερη διαίρεση στον υποβαλλόμενο σε μεταχείριση πληθυσμό σε σχέση με τον μάρτυρα που δεν υποβάλλεται σε μεταχείριση (βλ. μαθηματικό τύπο στο προσάρτημα 2).

Κυτταρόσταση: αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων (βλ. μαθηματικό τύπο στο προσάρτημα 2).

Κυτταροτοξικότητα: στους προσδιορισμούς που καλύπτονται από την παρούσα μέθοδο δοκιμών και διενεργούνται με την παρουσία κυτταροχαλασίνης Β, η κυτταροτοξικότητα διαπιστώνεται ως μείωση του δείκτη πολλαπλασιασμού με αναστολή κυτταροκίνησης (CBPI) ή του δείκτη αναδιπλασιασμού (RI) των κυττάρων υπό μεταχείριση σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (βλ. παράγραφο 26 και προσάρτημα 2).

Στους προσδιορισμούς που καλύπτονται από την παρούσα μέθοδο δοκιμών απουσία κυτταροχαλασίνης Β, η κυτταροτοξικότητα διαπιστώνεται ως μείωση του σχετικού διπλασιασμού του πληθυσμού (RPD) ή της σχετικής αύξησης του αριθμού κυττάρων (RICC) των κατεργασμένων κυττάρων σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (βλ. παράγραφο 27 και προσάρτημα 2).

Γονιδιοτοξικός: γενικός όρος που καλύπτει τους παράγοντες που προκαλούν κάθε είδους βλάβη του DNA ή του χρωμοσώματος, μεταξύ των οποίων τις ρήξεις, τις απαλείψεις, τις χημικές προσθήκες, τις τροποποιήσεις και συνδέσεις νουκλεοτιδίων, τις αναδιατάξεις, τις γονιδιακές μεταλλάξεις, τις χρωμοσωμικές εκτροπές και την ανευπλοειδία. Δεν προκαλούν όλα τα είδη γονιδιοτοξικών επιδράσεων μεταλλάξεις ή μόνιμη χρωμοσωμική βλάβη.

Μεσοφασικά κύτταρα: κύτταρα που δεν βρίσκονται στο μιτωτικό στάδιο.

Κινητοχώρος: πρωτεϊνική δομή που συναρμολογείται στο κεντρομερίδιο του χρωμοσώματος και με την οποία ενώνονται οι μικροσωληνίσκοι της ατράκτου κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης, ώστε να κινηθούν οργανωμένα τα θυγατρικά χρωμοσώματα προς τους πόλους των θυγατρικών κυττάρων.

▼M7

Μικροπυρήνες: μικροί πυρήνες, που συνυπάρχουν και διακρίνονται από τους κύριους πυρήνες των κυττάρων και οι οποίοι παράγονται κατά τη διάρκεια της τελόφασης της μίτωσης (μείωσης) από καθυστερούντα χρωμοσωμικά θραύσματα ή ολόκληρα χρωμοσώματα.

Μίτωση: διαίρεση του κυτταρικού πυρήνα, η οποία συνήθως χωρίζεται σε πρόφαση, προμετάφαση, μετάφαση, ανάφαση και τελόφαση.

Μιτωτικός δείκτης: ο λόγος του αριθμού κυττάρων που βρίσκονται σε μετάφαση προς τον συνολικό αριθμό κυττάρων που παρατηρούνται σε έναν κυτταρικό πληθυσμό· αποτελεί ένδειξη του βαθμού κυτταρικού πολλαπλασιασμού του συγκεκριμένου πληθυσμού.

Μεταλλαξιογόνο: παράγοντας που προκαλεί κληρονομήσιμη μεταβολή μίας ή περισσότερων ακολουθιών ζευγών βάσεων του DNA στα γονίδια ή της δομής των χρωμοσωμάτων (χρωμοσωμικές εκτροπές).

Μη αποχωρισμός: αδυναμία των ζευγών χρωματίδων να αποχωριστούν και να διαχωριστούν σωστά στα αναπτυσσόμενα θυγατρικά κύτταρα, με αποτέλεσμα τα θυγατρικά κύτταρα να μην έχουν κανονικό αριθμό χρωμοσωμάτων.

Κατάσταση της p53: η πρωτεΐνη p53 συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, την απόπτωση και την επιδιόρθωση του DNA. Τα κύτταρα που παρουσιάζουν έλλειψη λειτουργικής πρωτεΐνης p53, αδυνατώντας να διακόψουν τον κυτταρικό κύκλο ή να εξαλείψουν τα κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη μέσω της απόπτωσης ή άλλων μηχανισμών (π.χ. επαγωγή της επιδιόρθωσης του DNA) που σχετίζονται με τις λειτουργίες απόκρισης της p53 σε βλάβες του DNA, θα πρέπει θεωρητικά να είναι πιο επιρρεπή σε γονιδιακές μεταλλάξεις ή χρωμοσωμικές εκτροπές.

Πολυπλοειδία: αριθμητικές χρωμοσωμικές εκτροπές κυττάρων ή οργανισμών, οι οποίες αφορούν πλήρεις σειρές χρωμοσωμάτων, σε αντίθεση με εκείνες που αφορούν ένα ή περισσότερα μεμονωμένα χρωμοσώματα (ανευπλοειδία).

Δείκτης πολλαπλασιασμού (PI): μέθοδος μέτρησης της κυτταροτοξικότητας, όταν δεν χρησιμοποιείται κυτταροχαλασίνη Β (βλ. μαθηματικό τύπο στο προσάρτημα 2).

Σχετική αύξηση του αριθμού κυττάρων (RICC): μέθοδος μέτρησης της κυτταροτοξικότητας, όταν δεν χρησιμοποιείται κυτταροχαλασίνη Β (βλ. μαθηματικό τύπο στο προσάρτημα 2).

Σχετικός διπλασιασμός του πληθυσμού (RPD): μέθοδος μέτρησης της κυτταροτοξικότητας, όταν δεν χρησιμοποιείται κυτταροχαλασίνη Β (βλ. μαθηματικό τύπο στο προσάρτημα 2).

Δείκτης αναδιπλασιασμού (RI): το ποσοστό κυτταρικών κύκλων διαίρεσης που ολοκληρώνονται σε υποβαλλόμενη σε μεταχείριση καλλιέργεια, σε σχέση με τον μάρτυρα που δεν υποβάλλεται σε μεταχείριση, κατά τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης και ανάκαμψης (βλ. μαθηματικό τύπο στο προσάρτημα 2).

Ηπατικό κλάσμα S9: υπερκείμενο υγρό ομογενοποιήματος ήπατος μετά από φυγοκέντρηση σε 9 000 g, δηλ. ανεπεξέργαστο εκχύλισμα ήπατος.

Μείγμα S9: μείγμα του ηπατικού κλάσματος S9 με συμπαράγοντες που είναι αναγκαίοι για τη δράση των μεταβολικών ενζύμων.

Μάρτυρας με διαλύτη: γενικός όρος για τον προσδιορισμό των καλλιεργειών-μαρτύρων που λαμβάνουν μόνο τον διαλύτη ο οποίος χρησιμοποιείται για τη διάλυση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Μάρτυρες που δεν υποβάλλονται σε μεταχείριση: καλλιέργειες που δεν υφίστανται καμία μεταχείριση (δηλ. ούτε με την υπό δοκιμή χημική ουσία ούτε με διαλύτη), αλλά ετοιμάζονται ταυτόχρονα με τις καλλιέργειες που λαμβάνουν την υπό δοκιμή χημική ουσία και με τον ίδιο τρόπο.

▼M7

Προσάρτημα 2

ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΟΙ ΤΥΠΟΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

Όταν χρησιμοποιείται cytoB, η κυτταροτοξικότητα πρέπει να εκτιμάται με βάση τον **δείκτη πολλαπλασιασμού με αναστολή κυτταροκίνησης (CBPI)** ή τον **δείκτη αναδιπλασιασμού (RI)** (17) (69). CBPI δείχνει τον μέσο αριθμό κυτταρικών κύκλων ανά κύτταρο κατά τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης στην cytoB και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Ο RI δείχνει τον σχετικό αριθμό πυρήνων στις υποβαλλόμενες σε μεταχείριση καλλιέργειες σε σχέση με τις καλλιέργειες-μάρτυρες και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό του επί τοις εκατό ποσοστού κυτταρόστασης.

$$\% \text{ Κυτταρόσταση} = 100 - 100\{(\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPIC} - 1)\}$$

Και:

T = ουσία

C = καλλιέργεια-μάρτυρας

όπου:

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{αριθ.μονοπύρηνων}) + (2 \times \text{αριθ.διπύρηνων}) + (3 \times \text{αριθ.πολυπύρηνων}))}{(\text{συνολικός αριθμός κυττάρων})}$$

Συνεπώς, μια τιμή CBPI ίση με 1 (όλα τα κύτταρα είναι μονοπύρηνα) ισοδυναμεί με κυτταρόσταση 100 %.

Κυτταρόσταση = 100-RI

$$\text{RI} = \frac{((\text{αριθ.διπύρηνων}) + (2 \times \text{αριθ.πολυπύρηνων}))/(\text{σύνολο κυττάρων})_T}{((\text{αριθ.διπύρηνων}) + (2 \times \text{αριθ.πολυπύρηνων}))/(\text{σύνολο κυττάρων})_C} \times 100$$

T = υποβαλλόμενες σε μεταχείριση καλλιέργειες

C = καλλιέργειες-μάρτυρες

Συνεπώς, μια τιμή RI ίση με 53 % σημαίνει ότι στην υποβληθείσα σε μεταχείριση καλλιέργεια διαιρέθηκε μόνο το 53 % των κυττάρων σε σχέση με την καλλιέργεια — μάρτυρα προς σχηματισμό διπύρηνων και πολυπύρηνων κυττάρων, δηλαδή κυτταρόσταση 47 %.

Όταν δεν χρησιμοποιείται cytoB, συνιστάται η εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας με βάση τη **σχετική αύξηση του αριθμού κυττάρων (RICC)** ή τον **σχετικό διπλασιασμό του πληθυσμού (RPD)** (69), δεδομένου ότι και στις δύο αυτές παραμέτρους λαμβάνεται υπόψη το ποσοστό του κυτταρικού πληθυσμού που έχει διαιρεθεί.

$$\textbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{αύξηση αριθμού κυττάρων στις καλλιέργειες μεταχείρισης}(\text{τελική} - \text{αρχική}))}{(\text{αύξηση αριθμού κυττάρων στις καλλιέργειες} - \text{μάρτυρες}(\text{τελική} - \text{ρχική}))} \times 100$$

$$\textbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{διπλασιασμοί πληθυσμού στις καλλιέργειες μεταχείρισης})}{(\text{διπλασιασμοί πληθυσμού στις καλλιέργειες} - \text{μάρτυρες})} \times 100$$

όπου:

Διπλασιασμός πληθυσμού = [log (αριθ. κυττάρων μετά την μεταχείριση ÷ αρχικός αριθ. κυττάρων)] ÷ log 2

Συνεπώς μια τιμή RICC ή RPD ίση με 53 % δείχνει κυτταροτοξικότητα/κυτταρόσταση 47 %.

▼**M7**

Η κυτταροτοξικότητα είναι δυνατόν να εκτιμηθεί μέσω της καταμέτρησης των κλώνων που αποτελούνται από 1 (cl1), 2 (cl2), 3 έως 4 (cl4) και 5 έως 8 (cl8) κύτταρα, με τη βοήθεια **δείκτη πολλαπλασιασμού (PI)**.

$$PI = \frac{((1 \times cl1) + (2 \times cl2) + (3 \times cl4) + (4 \times cl8))}{(cl1 + cl2 + cl4 + cl8)}$$

Ο PI έχει χρησιμοποιηθεί ως χρήσιμη και αξιόπιστη παράμετρος κυτταροτοξικότητας και στην περίπτωση των κυτταρικών σειρών που καλλιεργούνται in situ χωρίς cytoB (35) (36) (37) (38) και μπορεί να θεωρηθεί χρήσιμη επιπλέον παράμετρος.

Σε κάθε περίπτωση, ο αριθμός κυττάρων πριν από τη μεταχείριση θα πρέπει να είναι ο ίδιος για τις υποβαλλόμενες σε μεταχείριση καλλιέργειες και τις καλλιέργειες που αποτελούν τον αρνητικό μάρτυρα.

Ο RCC (δηλ. ο λόγος «αριθμός κυττάρων στις καλλιέργειες μεταχείρισης/αριθμός κυττάρων στις καλλιέργειες-μάρτυρες») είχε χρησιμοποιηθεί ως παράμετρος κυτταροτοξικότητας στο παρελθόν, αλλά δεν συνιστάται πλέον, διότι μπορεί να οδηγήσει σε υποεκτίμηση της κυτταροτοξικότητας.

Όταν χρησιμοποιούνται συστήματα αυτόματης καταμέτρησης, π.χ. κυτταρομετρία ροής, κυτταρομετρία με σάρωση λέιζερ ή ανάλυση εικόνων, ο αριθμός των κυττάρων στον τύπο μπορεί να αντικατασταθεί από τον αριθμό των πυρήνων.

Στις καλλιέργειες αρνητικού μάρτυρα, ο δείκτης διπλασιασμού του πληθυσμού ή αναδιπλασιασμού θα πρέπει να είναι συμβατός με την απαίτηση για τη δειγματοληψία κυττάρων μετά την μεταχείριση σε χρόνο που ισοδυναμεί περίπου με την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου επί 1,5-2,0.

▼M3

B.50. **ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΡΜΑΤΟΣ: ΤΟΠΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΛΕΜΦΑΔΕΝΩΝ: DA**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Οι κατευθυντήριες γραμμές του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή δοκιμών με χημικές ουσίες και οι μέθοδοι δοκιμών της ΕΕ επανεξετάζονται κατά περιόδους με βάση την επιστημονική πρόοδο, τις μεταβαλλόμενες ανάγκες κανονιστικής ρύθμισης και τον προβληματισμό όσον αφορά την καλή μεταχείριση των ζώων. Η πρώτη μέθοδος δοκιμών (B.42) για τον προσδιορισμό της ευαισθητοποίησης του δέρματος σε ποντικούς, δηλαδή η τοπική δοκιμασία λεμφαδένων (LLNA – κατευθυντήρια γραμμή OECD Test Guideline 429) αναθεωρήθηκε (1). Έχουν δημοσιευθεί λεπτομερείς περιγραφές της επικύρωσης της LLNA, καθώς και επισκόπηση των σχετικών εργασιών (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Στην LLNA χρησιμοποιείται ραδιενεργός θυμιδίνη ή ραδιενεργό ιώδιο για τη μέτρηση του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων, με αποτέλεσμα να περιορίζεται η χρήση της δοκιμασίας όταν υπάρχουν προβλήματα προμήθειας, χρήσης ή τελικής διάθεσης ραδιοϊσοτόπων. Η μέθοδος δοκιμών LLNA: DA (αναπτύχθηκε από την εταιρεία Daicel Chemical Industries, Ltd.) αποτελεί τροποποίηση της LLNA που δεν απαιτεί ραδιενέργεια και στην οποία προσδιορίζεται, μέσω της βιοφωταύγειας, η περιεκτικότητα σε τριφωσφορική αδενοσίνη (αδενοσινοτριφωσφορικό οξύ, ATP) ως δείκτης πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων. Η LLNA: DA επικυρώθηκε, επανεξετάστηκε και συνιστάται από διεθνή επιτροπή αξιολόγησης από ομότιμους κριτές, καθώς θεωρείται χρήσιμη για την αναγνώριση των ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών για το δέρμα χημικών ουσιών, με ορισμένους περιορισμούς (10) (11) (12) (13). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών σχεδιάστηκε για την εκτίμηση του δερματικού ευαισθητοποιητικού δυναμικού των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) στα ζώα. Το κεφάλαιο B.6 του παρόντος παραρτήματος και η κατευθυντήρια γραμμή OECD Test Guideline 406 συνίστανται σε δοκιμές σε ινδικά χοιρίδια, συγκεκριμένα στη δοκιμή μεγιστοποίησης σε ινδικά χοιρίδια και τη δοκιμή Buehler (14). Τόσο η LLNA (κεφάλαιο B.42 του παρόντος παραρτήματος, OECD Test Guideline 429), όσο και οι δύο τροποποιήσεις της που δεν απαιτούν ραδιενέργεια – LLNA: DA (κεφάλαιο B.50 του παρόντος παραρτήματος, OECD Test Guideline 442 A) και LLNA: BrdU-ELISA (κεφάλαιο B.51 του παρόντος παραρτήματος, OECD Test Guideline 442 B) – προσφέρουν πλεονέκτημα έναντι των δοκιμών σε ινδικά χοιρίδια που περιγράφονται στο κεφάλαιο B.6 και στην κατευθυντήρια γραμμή OECD Test Guideline 406 (14), όσον αφορά τον περιορισμό και τη βελτίωση της χρήσης ζώων.

2. Η LLNA: DA, όπως και η LLNA, μελετά την επαγωγική φάση της δερματικής ευαισθητοποίησης και παρέχει κατάλληλα ποσοτικά δεδομένα για την εκτίμηση της σχέσης δόσης-απόκρισης. Επιπλέον, η ικανότητα ανίχνευσης των ευαισθητοποιητικών για το δέρμα ουσιών χωρίς να χρειάζεται ραδιοσήμανση για το DNA αποκλείει το ενδεχόμενο επαγγελματικής έκθεσης σε ραδιενέργεια και αίρει τα προβλήματα διάθεσης των αποβλήτων. Αυτό παρέχει τη δυνατότητα αύξησης της χρήσης ποντικών για την ανίχνευση των ευαισθητοποιητικών για το δέρμα ουσιών, χάρη στην οποία θα μπορούσε να περιοριστεί περαιτέρω η χρήση ινδικών χοιριδίων σε δοκιμές για τη διαπίστωση του δυναμικού δερματικής ευαισθητοποίησης (κεφάλαιο B.6, OECD Test Guideline 406) (14).

ΟΡΙΣΜΟΙ

3. Οι χρησιμοποιούμενοι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

4. Η δοκιμασία LLNA: DA αποτελεί τροποποιημένη μέθοδο LLNA για την αναγνώριση χημικών ουσιών που πιθανώς προκαλούν δερματική ευαισθητοποίηση, με συγκεκριμένους περιορισμούς. Αυτό δεν σημαίνει κατ' ανάγκη ότι η LLNA: DA πρέπει να χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση αντί της LLNA ή των δοκιμών σε ινδικά χοιρίδια (κεφάλαιο B.6, OECD Test Guideline 406) (14), αλλά μάλλον ότι είναι εφάμιλλη των τελευταίων και μπορεί να χρησιμοποιείται ως εναλλακτική λύση, η οποία κατά κανόνα δεν απαιτεί περαιτέρω επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, θετικών και

▼M3

αρνητικών (10) (11). Πριν από τη διεξαγωγή της μελέτης, το εργαστήριο δοκιμών πρέπει να λαμβάνει υπόψη όλα τα διαθέσιμα στοιχεία σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία, μεταξύ των οποίων την ταυτότητα και τη χημική δομή της, τις φυσικές και χημικές ιδιότητές της, τα αποτελέσματα τυχόν άλλων δοκιμών τοξικότητας της ουσίας, in vitro ή in vivo, και τα τοξικολογικά δεδομένα του αφορούν χημικά προϊόντα ανάλογης δομής. Τα στοιχεία αυτά θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη προκειμένου να κριθεί αν η LLNA: DA είναι κατάλληλη για την ελεγχόμενη ουσία (με δεδομένη την ασυμβατότητα περιορισμένου αριθμού ειδών χημικών προϊόντων με την LLNA: DA —βλέπε παράγραφο 5) και ως βοήθημα κατά την επιλογή δόσεων.

5. Η LLNA: DA είναι μέθοδος in vivo και, επομένως, δεν καταργεί τη χρήση ζώων στην εκτίμηση της δραστικότητας αλλεργικής ευαισθητοποίησης εξ επαφής. Είναι ωστόσο ικανή να περιορίσει τη χρήση ζώων για τον σκοπό αυτό, σε σύγκριση με τις δοκιμές σε ινδικά χοιρίδια (κεφάλαιο B.6, OECD Test Guideline 406) (14). Επιπλέον, η LLNA: DA βελτιώνει ουσιαστικά (ελάττωση του πόνου και της δυσφορίας) τον τρόπο με τον οποίο χρησιμοποιούνται τα ζώα στις δοκιμές αλλεργικής ευαισθητοποίησης εξ επαφής, δεδομένου ότι, σε αντίθεση με τη μέθοδο δοκιμών B.6 και την κατευθυντήρια γραμμή OECD Test Guideline 406, δεν απαιτεί την εκδήλωση των επαγόμενων από το ερέθισμα αντιδράσεων δερματικής υπερευαισθησίας. Παρά τα πλεονεκτήματα της LLNA: BrdU-DA έναντι των μεθόδων B.6 και OECD Test Guideline 406 (14), υπάρχουν ορισμένοι περιοριστικοί παράγοντες που ενδέχεται να επιβάλλουν τη χρήση των B.6 και OECD Test Guideline 406 (π.χ. δοκιμές με ορισμένα μέταλλα, ψευδοθετικά ευρήματα με ορισμένες ερεθιστικές για το δέρμα ουσίες [όπως ορισμένα επιφανειοδραστικά χημικά προϊόντα] (6) (1 και κεφάλαιο B.42 του παρόντος παραρτήματος), η διαλυτότητα της ελεγχόμενης ουσίας). Επιπροσθέτως, η χρήση των δοκιμών σε ινδικά χοιρίδια [μέθοδοι B.6, OECD Test Guideline 406 (14)] ενδέχεται να καταστεί αναγκαία στην περίπτωση χημικών ουσιών ή τάξεων χημικών ουσιών που περιέχουν δραστικές ομάδες οι οποίες έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να αποτελέσουν συγχυτικούς παράγοντες (16).Οι περιορισμοί που έχουν προσδιοριστεί για την LLNA (1 και κεφάλαιο B.42 του παρόντος παραρτήματος) συνιστάται να ισχύουν και για την LLNA: BrdU-DA (10). Επιπλέον, η χρήση της LLNA: DA πιθανώς να μην ενδείκνυται για τις δοκιμές με ουσίες που επηρεάζουν τα επίπεδα ATP (π.χ. ουσίες που δρουν ως αναστολείς της ATP) ή την ακριβή μέτρηση της ενδοκυττάριας ATP (π.χ. παρουσία ενζύμων που διασπούν την ATP, παρουσία εξωκυττάριας ATP στον λεμφαδένα). Εκτός αυτών των εντοπισθέντων περιορισμών, θεωρείται ότι η LLNA: DA μπορεί να εφαρμοστεί στις δοκιμές οποιασδήποτε ουσίας, εκτός εάν αυτή έχει ιδιότητες που ενδέχεται να επηρεάσουν την ορθότητα της μεθόδου. Επιπροσθέτως, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η πιθανότητα οριακών θετικών αποτελεσμάτων όταν οι τιμές του δείκτη διέγερσης (SI) κυμαίνονται από 1,8 έως 2,5 (βλέπε παραγράφους 31-32). Αυτό στηρίζεται στη βάση δεδομένων επικύρωσης για 44 ουσίες με τη χρήση SI ≥ 1,8 (βλέπε παράγραφο 6), από τις οποίες αναγνωρίστηκαν σωστά με την LLNA: DA και οι 32 ευαισθητοποιητικές βάσει της LLNA, αλλά δεν αναγνωρίστηκαν σωστά 3 από τις 12 μη ευαισθητοποιητικές βάσει της LLNA ουσίες με τιμές SI μεταξύ 1,8 και 2,5 (δηλαδή οριακό θετικό αποτέλεσμα) (10). Επειδή, ωστόσο, χρησιμοποιήθηκε η ίδια σειρά δεδομένων για τον καθορισμό των τιμών του SI και για τον υπολογισμό των προγνωστικών ιδιοτήτων της δοκιμής, τα αναφερόμενα αποτελέσματα μπορεί να συνιστούν υπερεκτίμηση των πραγματικών προγνωστικών ιδιοτήτων.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

6. Η βασική αρχή στην οποία στηρίζεται η LLNA: DA είναι ότι οι ευαισθητοποιητικές ουσίες επάγουν πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων των λεμφαδένων που αποχετεύουν το σημείο εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας. Ο πολλαπλασιασμός αυτός είναι ανάλογος με τη δόση και με την ισχύ του εφαρμοζόμενου αλλεργιογόνου και αποτελεί ένα απλό μέσο αντικειμενικής, ποσοτικής μέτρησης της ευαισθητοποίησης. Μετράται με σύγκριση του αριθμητικού μέσου του πολλαπλασιασμού σε κάθε ομάδα δοκιμής προς τον αριθμητικό μέσο του πολλαπλασιασμού στην ομάδα-μάρτυρα που έχει υποβληθεί σε αγωγή με τον φορέα (VC). Προσδιορίζεται ο λόγος του αριθμητικού μέσου του πολλαπλασιασμού σε κάθε ομάδα που υποβάλλεται σε

▼M3

αγωγή προς την αντίστοιχη τιμή για την παράλληλη ομάδα VC, ο οποίος καλείται δείκτης διέγερσης (SI) και πρέπει να είναι ≥ 1,8 ώστε να δικαιολογείται η περαιτέρω αξιολόγηση μιας ελεγχόμενης ουσίας ως δυνητικά ευαισθητοποιητικής για το δέρμα. Οι διαδικασίες που περιγράφονται στο παρόν κεφάλαιο βασίζονται στη μέτρηση της περιεκτικότητας σε ATP μέσω της βιοφωταύγειας (που είναι γνωστό ότι συσχετίζεται με τον αριθμό ζωντανών κυττάρων) (17) ως ένδειξης αυξημένου αριθμού πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων στους αποχετευτικούς ωτικούς λεμφαδένες (18) (19). Στη μέθοδο βιοφωταύγειας χρησιμοποιείται το ένζυμο λουσιφεράση για να καταλύσει την εκπομπή φωτός κατά την ακόλουθη αντίδραση ATP με λουσιφερίνη:

$$ATP + Luciferin + O_2 \xrightarrow{Luciferase} Oxyluciferin + AMP + PP_i + CO_2 + Light$$

Η ένταση του εκπεμπόμενου φωτός συνδέεται με γραμμική σχέση με τη συγκέντρωση ATP και μετράται με ειδικό φωτόμετρο φωταυγειομετρίας (λουμινόμετρο). Η δοκιμασία λουσιφερίνης-λουσιφεράσης αποτελεί ευαίσθητη μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού της ATP με ευρύ φάσμα εφαρμογών (20).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Επιλογή ζωικού είδους

7. Το είδος που έχει επιλεγεί για τη συγκεκριμένη δοκιμή είναι ο ποντικός. Οι μελέτες επικύρωσης της LLNA: DA διεξήχθησαν αποκλειστικά σε ποντικούς της φυλής CBA/J, η οποία κατά συνέπεια θεωρείται προτιμώμενη (12) (13). Χρησιμοποιούνται νεαροί ενήλικες θηλυκοί ποντικοί που δεν έχουν ποτέ γεννήσει ούτε εγκυμονούν. Κατά την έναρξη της μελέτης, η ηλικία των ζώων πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 8 και 12 εβδομάδων και οι διαφορές βάρους μεταξύ τους πρέπει να είναι ελάχιστες και να μην υπερβαίνουν το 20 % της μέσης τιμής. Εναλλακτικά, είναι δυνατή η χρήση άλλων φυλών, καθώς και αρσενικών ζώων, εφόσον έχουν συγκεντρωθεί επαρκή δεδομένα από τα οποία προκύπτει ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές απόκρισης κατά την LLNA: DA, οφειλόμενες ειδικά στη φυλή και/ή το φύλο.

Συνθήκες στέγασης και διατροφής

8. Οι ποντικοί πρέπει να στεγάζονται σε ομάδες (21), εκτός εάν η ατομική στέγασή τους δικαιολογείται με επαρκή επιστημονική αιτιολόγηση. Η θερμοκρασία του θαλάμου πειραματόζωων πρέπει να είναι 22 ± 3 °C. Αν και η σχετική υγρασία πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου, εντούτοις ο στόχος θα πρέπει να είναι μια τιμή 50-60 %. Ο φωτισμός πρέπει να είναι τεχνητός, με φωτοπερίοδο 12ώρου. Για τη διατροφή επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται συνήθη εργαστηριακά σιτηρέσια με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού.

Προετοιμασία των ζώων

9. Τα ζώα επιλέγονται τυχαία, σημαίνονται με τρόπο που επιτρέπει την αναγνώριση του καθενός (αλλά όχι με αναγνωριστικό ενώτιο οποιασδήποτε μορφής) και παραμένουν στους κλωβούς τους τουλάχιστον για πέντε ημέρες πριν από την έναρξη της χορήγησης των δόσεων, ώστε να εγκλιματιστούν στις εργαστηριακές συνθήκες. Πριν από την έναρξη της αγωγής, εξετάζονται όλα τα ζώα για να είναι βέβαιο ότι δεν παρουσιάζουν εμφανείς βλάβες του δέρματος.

Παρασκευή των διαλυμάτων δοσολογίας

10. Πριν από την εφαρμογή στο αυτί ποντικού, τα στερεά χημικά προϊόντα πρέπει να διαλύονται, ή να σχηματίζεται εναιώρημά τους, σε κατάλληλους διαλύτες/φορείς και να αραιώνονται, εφόσον ενδείκνυται. Τα υγρά χημικά προϊόντα μπορούν να εφαρμόζονται ως έχουν ή να αραιώνονται πριν από τη χορήγηση. Τα αδιάλυτα χημικά προϊόντα, όπως αυτά που συναντώνται συνήθως στα ιατροτεχνολογικά είδη, πρέπει να υποβάλλονται σε εξαντλητική εκχύλιση με κατάλληλο διαλύτη, ώστε να παραλαμβάνονται όλα τα εκχυλίσιμα συστατικά για δοκιμή, πριν από την εφαρμογή στο αυτί ποντικού. Τα παρασκευάσματα της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να ανανεώνονται καθημερινά, εκτός εάν η φύλαξή τους είναι αποδεκτή βάσει των σχετικών με τη σταθερότητα στοιχείων.

▼M3

Έλεγχος αξιοπιστίας

11. Χρησιμοποιούνται χημικά προϊόντα ως θετικοί μάρτυρες για να καταδειχθεί η ορθή εκτέλεση της δοκιμασίας με την απόκριση, με επαρκή και αναπαραγώγιμη ευαισθησία, σε ευαισθητοποιητική ελεγχόμενη ουσία για την οποία έχει χαρακτηριστεί επακριβώς το μέγεθος της απόκρισης. Συνιστάται η συμπερίληψη παράλληλου θετικού μάρτυρα επειδή καταδεικνύει την ικανότητα του εργαστηρίου να εκτελεί με επιτυχία κάθε δοκιμασία και καθιστά δυνατή την εκτίμηση της ενδοεργαστηριακής και διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας και συγκρισιμότητας. Επίσης, καθώς ορισμένες ρυθμιστικές Αρχές απαιτούν τη χρήση θετικού μάρτυρα σε κάθε μελέτη, συνιστάται στους χρήστες να ζητούν τη γνώμη των αρμόδιων αρχών πριν από τη διεξαγωγή της LLNA: DA. Συνιστάται, επομένως, η χρήση παράλληλου θετικού μάρτυρα ως συνήθης πρακτική, ώστε να μην χρειάζονται πρόσθετες δοκιμές σε ζώα για την κάλυψη των αναγκών που μπορεί να δημιουργήσει η περιοδική χρήση θετικών μαρτύρων (βλέπε παράγραφο 12). Ένας θετικός μάρτυρας θα πρέπει να δίδει θετική απόκριση κατά την LLNA: DA σε επίπεδα έκθεσης τα οποία αναμένεται να προκαλέσουν αύξηση του SI σε τιμή ≥ 1,8 σε σύγκριση με την ομάδα αρνητικού μάρτυρα. Η δόση για τον θετικό μάρτυρα πρέπει να επιλέγεται κατά τρόπο ώστε να μην προκαλεί υπέρμετρο ερεθισμό του δέρματος ή συστημική τοξικότητα και η επαγωγή να είναι αναπαραγώγιμη αλλά όχι υπερβολική (δηλαδή οι τιμές SI > 10 θεωρούνται υπέρμετρες). Οι προτιμώμενοι θετικοί μάρτυρες είναι το διάλυμα εξυλοκινναμωμικής αλδεΰδης (αριθ. Chemical Abstracts Service [CAS] 101-86-0) 25 % και το διάλυμα ευγενόλης (αριθ. CAS 97-53-0) 25 % σε μείγμα ακετόνης-ελαιολάδου (4:1, v/v). Σε ορισμένες, δεόντως αιτιολογημένες, περιπτώσεις μπορούν να χρησιμοποιούνται άλλοι θετικοί μάρτυρες που πληρούν τα προαναφερόμενα κριτήρια.

12. Παρά τη σύσταση για συμπερίληψη παράλληλης ομάδας θετικού μάρτυρα, σε ορισμένες περιπτώσεις ενδέχεται να αρκεί η περιοδική δοκιμή του θετικού μάρτυρα (δηλαδή ανά διαστήματα που δεν υπερβαίνουν το εξάμηνο) για εργαστήρια που εκτελούν τακτικά LLNA: DA (δηλαδή με συχνότητα τουλάχιστον μηνιαία) και διαθέτουν εδραιωμένη ιστορική βάση δεδομένων για τον θετικό μάρτυρα, η οποία καταδεικνύει την ικανότητα του εργαστηρίου να επιτυγχάνει αναπαραγώγιμα και ορθά αποτελέσματα με τους θετικούς μάρτυρες. Η επαρκής τεχνική ικανότητα ως προς την LLNA: DA μπορεί να αποδειχθεί με την επίτευξη σταθερών θετικών αποτελεσμάτων με τον θετικό μάρτυρα σε 10 τουλάχιστον ανεξάρτητες δοκιμές που έχουν διεξαχθεί εντός εύλογου χρονικού διαστήματος, δηλαδή μικρότερου από ένα έτος.

13. Πρέπει να συμπεριλαμβάνεται πάντοτε παράλληλη ομάδα θετικού μάρτυρα όταν επέρχονται διαδικαστικές αλλαγές στην LLNA: DA (π.χ. αλλαγή ειδικευμένου προσωπικού, αλλαγή υλικών και/ή αντιδραστηρίων της μεθόδου δοκιμών ή του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται σε αυτή, αλλαγή της προέλευσης των πειραματόζωων), οι οποίες πρέπει να τεκμηριώνονται στις εκθέσεις του εργαστηρίου. Πρέπει να εξετάζονται οι επιπτώσεις των αλλαγών αυτών στην επάρκεια της ήδη συγκροτημένης ιστορικής βάσης δεδομένων, προκειμένου να κριθεί αν είναι απαραίτητη η δημιουργία νέας ιστορικής βάσης δεδομένων για την τεκμηρίωση της σταθερότητας των αποτελεσμάτων που προκύπτουν με τους θετικούς μάρτυρες.

14. Οι ερευνητές θα πρέπει να γνωρίζουν ότι η απόφαση για διεξαγωγή περιοδικής και όχι ταυτόχρονης μελέτης με θετικό μάρτυρα επηρεάζει έμμεσα την επάρκεια και τη δυνατότητα αποδοχής των αρνητικών αποτελεσμάτων που προκύπτουν χωρίς παράλληλο θετικό μάρτυρα κατά το μεσοδιάστημα μεταξύ των περιοδικών μελετών με θετικό μάρτυρα. Για παράδειγμα, σε περίπτωση ψευδαρνητικού αποτελέσματος της περιοδικής μελέτης με θετικό μάρτυρα, μπορεί να αμφισβητηθούν τα αρνητικά αποτελέσματα που προέκυψαν για την ελεγχόμενη ουσία κατά το μεσοδιάστημα μεταξύ της τελευταίας αποδεκτής περιοδικής μελέτης με θετικό μάρτυρα και της μη αποδεκτής. Οι συνέπειες αυτές πρέπει να λαμβάνονται επιμελώς υπόψη όταν κρίνεται αν θα συμπεριλαμβάνονται παράλληλοι θετικοί μάρτυρες ή θα διεξάγονται απλώς περιοδικές μελέτες με θετικούς μάρτυρες. Πρέπει επίσης να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης μικρότερου αριθμού ζώων στην παράλληλη ομάδα θετικού μάρτυρα, εφόσον δικαιολογείται από επιστημονική άποψη και το εργαστήριο καταδεικνύει τη δυνατότητα χρήσης μικρότερου αριθμού ποντικών με βάση ειδικά για το ίδιο ιστορικά δεδομένα (22).

▼M3

15. Παρόλο που ο θετικός μάρτυρας πρέπει να ελέγχεται στον φορέα που είναι γνωστό ότι αποσπά σταθερή απόκριση (π.χ. μείγμα ακετόνης-ελαιολάδου σε αναλογία 4:1, v/v), ενδέχεται να υπάρχουν περιπτώσεις όπου οι νομοθετικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τη διεξαγωγή δοκιμών και σε μη τυποποιημένο φορέα (κλινικώς/χημικώς συναφές σκεύασμα) (23). Σε περίπτωση δοκιμής του παράλληλου θετικού μάρτυρα και της ελεγχόμενης ουσίας σε διαφορετικούς φορείς, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται χωριστός μάρτυρας VC για τον παράλληλο θετικό μάρτυρα.

16. Όταν αξιολογούνται ουσίες που ανήκουν σε συγκεκριμένη τάξη χημικών ουσιών ή προκαλούν συγκεκριμένο φάσμα αποκρίσεων, είναι ενδεχομένως χρήσιμες και οι ουσίες συγκριτικής αξιολόγησης για να καταδειχθεί η ορθή λειτουργία της μεθόδου δοκιμών ως προς την ανίχνευση του δερματικού ευαισθητοποιητικού δυναμικού των συγκεκριμένων ειδών ουσιών. Οι κατάλληλες ουσίες συγκριτικής αξιολόγησης πρέπει να διαθέτουν τις ακόλουθες ιδιότητες:

— δομική και λειτουργική αναλογία προς την τάξη της ελεγχόμενης ουσίας,

— γνωστά φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά,

— δεδομένα τεκμηρίωσης που προέρχονται από την LLNA: DA,

— δεδομένα τεκμηρίωσης που αφορούν άλλα ζωικά μοντέλα και/ή τον άνθρωπο.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

Αριθμός ζώων και επίπεδα δόσεων

17. Χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τέσσερα ζώα ανά δοσολογική ομάδα, με τρεις τουλάχιστον συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας, συν μια παράλληλη ομάδα αρνητικού μάρτυρα, που υποβάλλεται σε αγωγή μόνο με τον φορέα της ελεγχόμενης ουσίας, και έναν θετικό μάρτυρα (παράλληλο ή πρόσφατο, ανάλογα με την πολιτική που εφαρμόζει το εργαστήριο λαμβάνοντας υπόψη τις παραγράφους 11-15). Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο δοκιμής με πολλαπλές δόσεις της ουσίας που χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας, κυρίως στις περιπτώσεις διαλειπουσών δοκιμών με θετικό μάρτυρα. Η μεταχείριση και η αγωγή των ζώων των ομάδων-μαρτύρων, εκτός του ότι αυτά δεν υποβάλλονται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία, πρέπει κατά τα άλλα να είναι πανομοιότυπες με των ζώων των ομάδων αγωγής.

18. Η επιλογή των δόσεων και του φορέα πρέπει να βασίζεται στις συστάσεις των βιβλιογραφικών πηγών (2) και (24). Επιλέγονται κατά κανόνα διαδοχικές δόσεις από κατάλληλη σειρά συγκεντρώσεων, όπως 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % κ.λπ. Η επιλογή της χρησιμοποιούμενης σειράς συγκεντρώσεων πρέπει να συνοδεύεται από επαρκή επιστημονική αιτιολόγηση. Κατά την επιλογή των τριών διαδοχικών συγκεντρώσεων, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όλα τα υπάρχοντα τοξικολογικά στοιχεία (π.χ. οξεία τοξικότητα και δερματικός ερεθισμός) και στοιχεία για τη δομή και τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης ουσίας (και/ή ουσιών ανάλογης δομής) που ενδιαφέρουν, έτσι ώστε η υψηλότερη συγκέντρωση να μεγιστοποιεί την έκθεση, χωρίς να προκαλεί συστημική τοξικότητα και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος (24) (25). Εάν δεν υπάρχουν τέτοια στοιχεία, μπορεί να χρειάζεται δοκιμή προδιαλογής (βλέπε παραγράφους 21-24).

19. Ο φορέας πρέπει να μην προκαλεί συστηματικά και άλλα σφάλματα στα αποτελέσματα των δοκιμών και να επιλέγεται με γνώμονα τη μεγιστοποίηση της διαλυτότητας, ώστε να προκύπτει η μέγιστη εφικτή συγκέντρωση και, ταυτόχρονα, να σχηματίζεται κατάλληλο διάλυμα/εναιώρημα για την εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας. Συνιστώνται οι ακόλουθοι φορείς: μείγμα ακετόνης-ελαιολάδου (4:1, v/v), N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο, μεθυλαιθυλκετόνη, προπυλενογλυκόλη και διμεθυλοσουλφοξείδιο (6), χωρίς να αποκλείεται η χρήση άλλων, εφόσον παρέχεται επαρκής επιστημονική αιτιολόγηση. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ενδέχεται να απαιτείται η χρήση, ως πρόσθετου μάρτυρα, ενός κλινικώς συναφούς διαλύτη ή του σκευάσματος του εμπορίου με τη μορφή του οποίου διατίθεται στην αγορά η ελεγχόμενη ουσία. Θα πρέπει να λαμβάνεται ιδιαίτερη μέριμνα για την ενσωμάτωση των υδρόφιλων ουσιών σε ένα σύστημα φορέα το οποίο διαβρέχει το δέρμα και δεν απορρέει αμέσως, με την προσθήκη κατάλληλων διαλυτοποιητών (π.χ. 1 % Pluronic® L92). Κατά συνέπεια, θα πρέπει να αποφεύγονται οι εξ ολοκλήρου υδατικοί φορείς.

▼M3

20. Η επεξεργασία λεμφαδένων μεμονωμένων ποντικών επιτρέπει την εκτίμηση της μεταβλητότητας μεταξύ των ζώων και τη στατιστική ανάλυση της διαφοράς μεταξύ των μετρήσεων της ελεγχόμενης ουσίας και των μετρήσεων της ομάδας VC (βλέπε παράγραφο 33) Επιπλέον, η αξιολόγηση της δυνατότητας μείωσης του αριθμού ποντικών της ομάδας θετικού μάρτυρα είναι εφικτή μόνο εφόσον συλλέγονται δεδομένα για μεμονωμένα ζώα (22). Επίσης, ορισμένες ρυθμιστικές Αρχές απαιτούν τη συλλογή δεδομένων για μεμονωμένα ζώα. Η τακτική συλλογή δεδομένων για μεμονωμένα ζώα προσφέρει ένα πλεονέκτημα από πλευράς καλής μεταχείρισης των ζώων, καθώς αποτρέπει την επανάληψη δοκιμών που θα ήταν αναγκαία σε περίπτωση μεταγενέστερης εξέτασης των αποτελεσμάτων τα οποία έχουν προκύψει για την ελεγχόμενη ουσία με έναν τρόπο (π.χ. από συγχωνευμένα δεδομένα για τα ζώα) από ρυθμιστικές αρχές που έχουν άλλες απαιτήσεις (π.χ. δεδομένα για μεμονωμένα ζώα).

Δοκιμή προδιαλογής

21. Όταν δεν υπάρχουν στοιχεία για τον προσδιορισμό της μέγιστης δόσης προς δοκιμή (βλέπε παράγραφο 18), θα πρέπει να εκτελείται δοκιμή προδιαλογής, προκειμένου να καθοριστεί το κατάλληλο επίπεδο δόσης για τη δοκιμή με LLNA: DA. Η δοκιμή προδιαλογής αποσκοπεί στην καθοδήγηση κατά την επιλογή του ανώτατου επιπέδου δόσης το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για την κυρίως μελέτη LLNA: BrdU-DA, στις περιπτώσεις που δεν υπάρχουν στοιχεία σχετικά με τη συγκέντρωση η οποία επάγει συστημική τοξικότητα (βλέπε παράγραφο 24) και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος (βλέπε παράγραφο 23). Το ανώτατο επίπεδο δόσης που χρησιμοποιείται στη δοκιμή πρέπει να είναι το 100 % της ελεγχόμενης ουσίας, εάν αυτή είναι υγρή, ή η μέγιστη δυνατή συγκέντρωση, προκειμένου για στερεά ή εναιωρήματα.

22. Η δοκιμή προδιαλογής διεξάγεται στις ίδιες συνθήκες όπως η κυρίως μελέτη LLNA: DA, εκτός από την εκτίμηση του πολλαπλασιασμού στους λεμφαδένες, η οποία παραλείπεται, και τη δυνατότητα μείωσης του αριθμού των ζώων που χρησιμοποιούνται σε κάθε δοσολογική ομάδα. Προτείνεται η χρήση ενός ή δύο ζώων ανά δοσολογική ομάδα. Όλοι οι ποντικοί εξετάζονται καθημερινά για την ανίχνευση κλινικών σημείων συστημικής τοξικότητας ή τοπικού ερεθισμού στο σημείο εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας. Καταγράφεται το βάρος σώματος πριν από την έναρξη και πριν από τον τερματισμό της δοκιμής (8η ημέρα). Εξετάζονται και τα δύο αυτιά κάθε ποντικού για την ανίχνευση ερυθήματος, το οποίο βαθμολογείται με τη βοήθεια του πίνακα 1 (25). Μετράται το πάχος των αυτιών με παχύμετρο (π.χ. ψηφιακό μικρόμετρο ή παχύμετρο Peacock Dial) την 1η ημέρα (πριν από τη χορήγηση της δόσης), την 3η ημέρα (περίπου 48 ώρες μετά την πρώτη δόση), την 7η ημέρα (24 ώρες πριν από τον τερματισμό) και την 8η ημέρα. Επιπλέον, το πάχος των αυτιών είναι δυνατόν να προσδιοριστεί την 8η ημέρα με προσδιορισμούς βάρους δείγματος αυτιού λαμβανόμενου με λαβίδα βιοψίας, οι οποίοι πρέπει να εκτελούνται μετά τη θανάτωση των ζώων με ευθανασία. Μια βαθμολογία ερυθήματος ≥ 3 και/ή η αύξηση του πάχους των αυτιών κατά ≥ 25 %, σε οποιαδήποτε ημέρα μέτρησης, αποτελούν ενδείξεις υπέρμετρου τοπικού ερεθισμού (26) (27). Ως μέγιστη δόση για την κυρίως μελέτη LLNA: DA επιλέγεται η αμέσως χαμηλότερη δόση στη σειρά συγκεντρώσεων της προδιαλογής (βλέπε παράγραφο 18) η οποία δεν επάγει συστημική τοξικότητα και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος.

Πίνακας 1

Βαθμολογία ερυθήματος

Παρατήρηση	Βαθμολογία
Απουσία ερυθήματος	0
Πολύ ελαφρό ερύθημα (μόλις αντιληπτό)	1
Περιγεγραμμένο ερύθημα	2

▼**M3**

Παρατήρηση	Βαθμολογία
Μέτριο έως σοβαρό ερύθημα	3
Σοβαρό ερύθημα (ερυθρότητα τεύτλων) έως σχηματισμός εσχάρας που εμποδίζει τη διαβάθμιση του ερυθήματος	4

23. Εκτός από την αύξηση του πάχους των αυτιών κατά 25 % (26) (27), έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση των ερεθιστικών ουσιών κατά την LLNA η στατιστικά σημαντική αύξηση του πάχους των αυτιών των ποντικών που υποβάλλονται σε αγωγή σε σύγκριση με τους ποντικούς-μάρτυρες (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Ωστόσο, η αύξηση του πάχους των αυτιών κατά λιγότερο από 25 %, έστω και αν είναι στατιστικά σημαντική, δεν έχει συσχετιστεί ειδικά με υπέρμετρο ερεθισμό (30) (31) (32) (33) (34).

24. Οι ακόλουθες κλινικές παρατηρήσεις, εντασσόμενες σε ολοκληρωμένη εκτίμηση, είναι δυνατόν να αποτελούν ένδειξη συστημικής τοξικότητας (35) και, κατ' επέκταση, να υποδεικνύουν το ανώτατο επίπεδο δόσης προς χρήση στην κυρίως μελέτη LLNA: DA: αλλαγές στη λειτουργία του νευρικού συστήματος (π.χ. ανόρθωση τριχών, αταξία, τρόμοι, σπασμοί), στη συμπεριφορά (π.χ. επιθετικότητα, αλλαγή όσον αφορά την περιποίηση του σώματος, έντονη μεταβολή της κινητικότητας), στον αναπνευστικό ρυθμό (δηλαδή μεταβολές της συχνότητας και της έντασης των αναπνοών, όπως δύσπνοια, ασθμαίνουσα αναπνοή και ρόγχος), καθώς και στην κατανάλωση τροφής και νερού. Επιπλέον, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη στην αξιολόγηση τα σημεία λήθαργου και/ή απουσίας αντίδρασης σε ερεθίσματα και κάθε κλινικό σημείο που υπερβαίνει τον ελαφρό ή στιγμιαίο πόνο και δυσφορία, η μείωση του βάρους σώματος κατά > 5 % μεταξύ 1ης και 8ης ημέρας και η θνησιμότητα. Τα ετοιμοθάνατα ζώα, καθώς και όσα παρουσιάζουν σημεία έντονου πόνου και δυσφορίας, πρέπει να θανατώνονται με ευθανασία (36).

Πρόγραμμα πειραμάτων της κυρίως μελέτης

25. Το πρόγραμμα πειραμάτων της δοκιμασίας έχει ως εξής:

— *1η ημέρα:* Κάθε ζώο ζυγίζεται χωριστά και καταγράφονται το βάρος του και οι ενδεχόμενες κλινικές παρατηρήσεις. Η ραχιαία επιφάνεια κάθε αυτιού επιχρίεται με υδατικό διάλυμα λαυρυλοθειικού νατρίου (SLS) 1 % με τη βοήθεια ψήκτρας εμβαπτιζόμενης στο διάλυμα αυτό, έτσι ώστε να καλύπτεται ολόκληρη η ραχιαία επιφάνεια κάθε αυτιού με 4-5 κινήσεις. Μία ώρα μετά την αγωγή με SLS, τοποθετούνται στη ραχιαία επιφάνεια κάθε αυτιού 25 μL κατάλληλης αραίωσης της ελεγχόμενης ουσίας, του φορέα μόνου ή του θετικού μάρτυρα (παράλληλου ή πρόσφατου, ανάλογα με την πολιτική που εφαρμόζει το εργαστήριο λαμβάνοντας υπόψη τις παραγράφους 11-15).

— *2η, 3η και 7η ημέρα:* Επαναλαμβάνεται η διαδικασία προκατεργασίας με υδατικό διάλυμα SLS 1 % και εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας όπως την 1η ημέρα.

— *4η, 5η και 6η ημέρα:* Καμία αγωγή.

— *8η ημέρα:* Καταγράφονται το βάρος κάθε ζώου και οι ενδεχόμενες κλινικές παρατηρήσεις. Περίπου 24 έως 30 ώρες μετά την έναρξη της εφαρμογής κατά την 7η ημέρα, τα ζώα θανατώνονται με ευθανασία. Εκτέμνονται οι αποχετευτικοί ωτικοί λεμφαδένες από κάθε αυτί ποντικού και υποβάλλονται χωριστά σε επεξεργασία με φυσιολογικό ορό στον οποίο έχει προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (PBS) ανά ζώο. Λεπτομέρειες και διαγράμματα για την αναγνώριση και την εκτομή των λεμφαδένων παρέχονται στη βιβλιογραφική πηγή (22). Για την περαιτέρω παρακολούθηση της τοπικής απόκρισης του δέρματος κατά την κυρίως μελέτη, το πρωτόκολλό της μπορεί να περιλαμβάνει πρόσθετες παραμέτρους, όπως βαθμολογία του ωτικού ερυθήματος ή μετρήσεις του πάχους των αυτιών (με τη βοήθεια παχυμέτρου ή με προσδιορισμούς βάρους δείγματος αυτιού λαμβανόμενου με λαβίδα βιοψίας κατά τη νεκροψία).

▼M3

Παρασκευή κυτταρικών εναιωρημάτων

26. Παρασκευάζεται εναιώρημα μεμονωμένων λεμφοκυττάρων από τους λεμφαδένες που έχουν ληφθεί με αμφοτερόπλευρη εκτομή από κάθε ποντικό, με την τοποθέτηση των λεμφαδένων μεταξύ δύο γυάλινων πλακιδίων και την άσκηση ελαφράς πίεσης ώστε να συνθλιβούν οι αδένες. Αφού επιβεβαιωθεί ο σχηματισμός λεπτού ομοιόμορφου στρώματος του ιστού, διαχωρίζονται τα δύο πλακίδια. Σχηματίζεται εναιώρημα του ιστού και των δύο πλακιδίων σε PBS ως εξής: κάθε πλακίδιο κρατείται υπό κλίση πάνω από το τρυβλίο Petri και εκπλύνεται με PBS, ενώ ταυτόχρονα αφαιρείται ο ιστός από το πλακίδιο με ξέστρο κυττάρων. Εξάλλου, επειδή οι λεμφαδένες των ζώων της ομάδας αρνητικού μάρτυρα είναι μικροί, είναι σημαντικό να εκτελείται η εργασία αυτή με προσοχή ώστε να αποφεύγονται οι τεχνητές επιδράσεις στις τιμές του SI. Για την έκπλυση των δύο πλακιδίων πρέπει να χρησιμοποιείται συνολικός όγκος 1 mL PBS. Το εναιώρημα λεμφοκυττάρων στο τρυβλίο Petri πρέπει να ομοιογενοποιείται ελαφρά με το ξέστρο κυττάρων. Στη συνέχεια, λαμβάνεται με μικροσιφώνιο ποσότητα 20 μL του εναιωρήματος λεμφοκυττάρων —με προσοχή ώστε να μην αναρροφηθεί η ορατή μεμβράνη— και αναμειγνύεται με 1,98 mL PBS για να προκύψει δείγμα όγκου 2 mL. Παρασκευάζεται έπειτα ένα δεύτερο δείγμα 2 mL με την ίδια διαδικασία, ώστε να αντιστοιχούν δύο δείγματα σε κάθε ζώο.

Προσδιορισμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (μέτρηση της περιεκτικότητας των λεμφοκυττάρων σε ATP)

27. Η αύξηση της περιεκτικότητας των λεμφοκυττάρων σε ATP μετράται με τη μέθοδο της λουσιφερίνης/λουσιφεράσης με τη βοήθεια συνόλου αντιδραστηρίων (kit) για τη μέτρηση ATP, το οποίο προσδιορίζει τη βιοφωταύγεια σε σχετικές μονάδες φωταύγειας (RLU). Η διάρκεια της δοκιμασίας, από τον χρόνο θανάτωσης των ζώων μέχρι τη μέτρηση της περιεκτικότητας σε ATP για το καθένα, πρέπει να διατηρείται σταθερή και να μην υπερβαίνει τα 30 λεπτά περίπου, καθώς θεωρείται ότι η περιεκτικότητα σε ATP μειώνεται σταδιακά με την πάροδο του χρόνου μετά τη θανάτωση των ζώων (12). Συνεπώς, η σειρά διαδικασιών που αρχίζει με την εκτομή των ωτικών λεμφαδένων και τελειώνει με τη μέτρηση της ATP πρέπει να ολοκληρώνεται εντός 20 λεπτών σύμφωνα με το προκαθορισμένο χρονοδιάγραμμα, που είναι το ίδιο για όλα τα ζώα. Μετράται η φωταύγεια ATP καθενός από τα δείγματα των 2 mL ώστε να λαμβάνονται συνολικά δύο μετρούμενες τιμές ATP για κάθε ζώο. Στη συνέχεια προσδιορίζεται η μέση τιμή φωταύγειας λόγω ATP, η οποία χρησιμοποιείται στους μετέπειτα υπολογισμούς (βλέπε παράγραφο 30).

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Κλινικές παρατηρήσεις

28. Κάθε ποντικός πρέπει να εξετάζεται με προσοχή, τουλάχιστον μία φορά ημερησίως, για την ανίχνευση κλινικών σημείων είτε τοπικού ερεθισμού στο σημείο εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας είτε συστημικής τοξικότητας. Όλες οι παρατηρήσεις καταγράφονται συστηματικά σε χωριστό αρχείο για κάθε ποντικό. Τα σχέδια παρακολούθησης πρέπει να περιλαμβάνουν κριτήρια για τον ταχύ εντοπισμό, με σκοπό την ευθανασία, των ποντικών που εμφανίζουν συστημική τοξικότητα ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό ή διάβρωση του δέρματος (36).

Βάρος σώματος

29. Όπως αναφέρεται στην παράγραφο 25, το βάρος κάθε ζώου πρέπει να μετράται κατά την έναρξη της δοκιμής και κατά τον προγραμματισμένο χρόνο ευθανασίας.

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

30. Τα αποτελέσματα για κάθε ομάδα αγωγής εκφράζονται σε μέση τιμή SI. Ο SI προκύπτει με διαίρεση της μέσης τιμής RLU/ποντικό κάθε ομάδας αγωγής με την ελεγχόμενη ουσία, όπως επίσης και της ομάδας θετικού μάρτυρα, διά της μέσης τιμής RLU/ποντικό της ομάδας που υποβλήθηκε σε αγωγή με τον διαλύτη/ομάδας VC. Στην περίπτωση αυτή, ο μέσος SI για τις ομάδες VC ισούται με τη μονάδα.

▼M3

31. Στη διαδικασία λήψης απόφασης, ένα αποτέλεσμα θεωρείται θετικό όταν SI ≥ 1,8 (10). Ωστόσο, όταν κρίνεται αν ένα οριακό αποτέλεσμα (δηλαδή τιμή SI από 1,8 έως 2,5) θα χαρακτηριστεί ή όχι θετικό, μπορούν επίσης να χρησιμοποιούνται η ισχύς της σχέσης δόσης-απόκρισης, η στατιστική σημαντικότητα και η σταθερότητα των αποκρίσεων των μαρτύρων που υποβάλλονται σε αγωγή με τον διαλύτη/φορέα και των θετικών μαρτύρων (2) (3) (37).

32. Προκειμένου να επιβεβαιώσουν οι χρήστες ότι μια οριακή θετική απόκριση με SI από 1,8 έως 2,5 αποτελεί θετικό αποτέλεσμα, μπορεί να επιθυμούν να λάβουν υπόψη τις τιμές του SI σε συνδυασμό με συμπληρωματικές πληροφορίες, όπως η σχέση δόσης-απόκρισης, τα στοιχεία συστημικής τοξικότητας ή υπέρμετρου ερεθισμού και, εφόσον ενδείκνυται, η στατιστική σημαντικότητα (10). Θα πρέπει επίσης να συνεκτιμώνται διάφορες ιδιότητες της ελεγχόμενης ουσίας, μεταξύ των οποίων το κατά πόσον έχει δομική σχέση με γνωστές ευαισθητοποιητικές για το δέρμα ουσίες, το κατά πόσον προκαλεί υπέρμετρο ερεθισμό του δέρματος του ποντικού και το είδος της σχέσης δόσης-απόκρισης που παρατηρήθηκε. Αυτά και άλλα κριτήρια αναλύονται στη βιβλιογραφική πηγή (4).

33. Η συλλογή δεδομένων σε επίπεδο μεμονωμένου ποντικού καθιστά δυνατή τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων για τη διαπίστωση της ύπαρξης σχέσης δόσης-απόκρισης και του βαθμού της σχέσης αυτής. Η ενδεχόμενη στατιστική εκτίμηση θα μπορούσε να περιλαμβάνει αξιολόγηση της σχέσης δόσης-απόκρισης, καθώς και κατάλληλα προσαρμοσμένες συγκρίσεις των ομάδων δοκιμής (π.χ. συγκρίσεις κατά ζεύγη μεταξύ της ομάδας που λαμβάνει τη δόση και της παράλληλης ομάδας-μάρτυρα που λαμβάνει τον διαλύτη/φορέα). Οι στατιστικές αναλύσεις είναι δυνατόν να περιλαμβάνουν, λόγου χάριν, γραμμική παλινδρόμηση ή δοκιμή William για την εκτίμηση των τάσεων της απόκρισης σε σχέση με τη δόση και δοκιμή Dunnett για τις συγκρίσεις κατά ζεύγη. Κατά την επιλογή της ενδεδειγμένης μεθόδου στατιστικής ανάλυσης, ο ερευνητής θα πρέπει να έχει επίγνωση των πιθανώς άνισων διακυμάνσεων (διασπορών) και άλλων συναφών προβλημάτων τα οποία ενδέχεται να επιβάλλουν μετασχηματισμό των δεδομένων ή μη παραμετρική στατιστική ανάλυση. Σε κάθε περίπτωση, ενδέχεται να χρειαστεί να εκτελέσει ο ερευνητής υπολογισμούς του SI και στατιστικές αναλύσεις με και χωρίς ορισμένα σημεία δεδομένων (καλούμενα μερικές φορές «έκτροπες τιμές»).

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ

Δεδομένα

34. Τα δεδομένα πρέπει να συγκεφαλαιώνονται με τη μορφή πίνακα, στον οποίο εμφαίνονται η τιμή RLU για κάθε ζώο, η ομαδική μέση τιμή RLU/ζώο, η σχετική στατιστική έκφραση του σφάλματος (π.χ. SD, SEM) και η μέση τιμή του SI για κάθε δοσολογική ομάδα σε σύγκριση με την παράλληλη ομάδα-μάρτυρα που υποβλήθηκε σε αγωγή με τον διαλύτη/φορέα.

Έκθεση δοκιμής

35. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιέχει τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη χημική ουσία και μάρτυρες:

— στοιχεία ταυτότητας (π.χ. αριθ. CAS και EC, εφόσον υπάρχουν, πηγή, καθαρότητα, γνωστές προσμίξεις, αριθμός παρτίδας),

— σύσταση και φυσικές και χημικές ιδιότητες (π.χ. πτητικότητα, σταθερότητα, διαλυτότητα),

— προκειμένου για μείγματα, σύνθεση και εκατοστιαία αναλογία των συστατικών.

Διαλύτης/φορέας:

— στοιχεία ταυτότητας (καθαρότητα, συγκέντρωση, κατά περίπτωση, όγκος που χρησιμοποιήθηκε),

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα.

▼M3

Ζώα της δοκιμής:

— προέλευση των ποντικών της φυλής CBA,

— μικροβιολογική κατάσταση των ζώων, εφόσον είναι γνωστή,

— αριθμός και ηλικία των ζώων,

— προέλευση των ζώων, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσιο κ.λπ.

Συνθήκες δοκιμής:

— προέλευση, αριθμός παρτίδας και δεδομένα του κατασκευαστή για τον ποιοτικό έλεγχο/διασφάλιση ποιότητας του συνόλου αντιδραστηρίων (kit) για ATP,

— λεπτομέρειες για την παρασκευή και εφαρμογή του δείγματος της ελεγχόμενης ουσίας,

— αιτιολόγηση της επιλογής των δόσεων (συμπεριλαμβανομένων των αποτελεσμάτων της δοκιμής προδιαλογής, εφόσον έχει διεξαχθεί),

— συγκεντρώσεις φορέα και ελεγχόμενης ουσίας που χρησιμοποιήθηκαν και συνολική ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας που χορηγήθηκε,

— λεπτομέρειες για την ποιότητα της τροφής και του νερού (μεταξύ άλλων, τύπος/προέλευση του σιτηρεσίου, προέλευση του νερού),

— λεπτομέρειες για τα προγράμματα αγωγής και δειγματοληψίας,

— μέθοδοι μέτρησης της τοξικότητας,

— κριτήρια χαρακτηρισμού της μελέτης ως θετικής ή αρνητικής,

— λεπτομέρειες για τυχόν παρεκκλίσεις από το πρωτόκολλο και επεξήγηση του τρόπου με τον οποίο αυτές επηρεάζουν τον σχεδιασμό και τα αποτελέσματα της μελέτης.

Έλεγχος αξιοπιστίας:

— περίληψη των αποτελεσμάτων του πιο πρόσφατου ελέγχου αξιοπιστίας, συμπεριλαμβανομένων πληροφοριών σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία, τη συγκέντρωση και τον φορέα που χρησιμοποιήθηκε,

— δεδομένα του εργαστηρίου δοκιμών που αφορούν τον παράλληλο και/ή ιστορικό θετικό μάρτυρα και τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα (αγωγή με τον διαλύτη/φορέα),

— εάν δεν συμπεριελήφθη στη δοκιμή παράλληλος θετικός μάρτυρας, ημερομηνία διεξαγωγής της πιο πρόσφατης περιοδικής δοκιμής με θετικό μάρτυρα και σχετική έκθεση του εργαστηρίου, καθώς και έκθεση με λεπτομερή ιστορικά δεδομένα του εργαστηρίου για τον θετικό μάρτυρα που δικαιολογούν την απόφαση να μη συμπεριληφθεί παράλληλος θετικός μάρτυρας.

Αποτελέσματα:

— βάρος κάθε ποντικού κατά την έναρξη της χορήγησης των δόσεων και κατά τον προγραμματισμένο χρόνο θανάτωσης, καθώς και μέση τιμή και σχετική στατιστική έκφραση του σφάλματος (π.χ. SD, SEM) για κάθε ομάδα αγωγής,

— για κάθε ζώο, χρόνος εκδήλωσης και εξέλιξη των σημείων τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένου τυχόν ερεθισμού του δέρματος στο σημείο χορήγησης,

— για κάθε ζώο, χρόνος θανάτωσης και χρόνος μέτρησης της ATP,

— πίνακας με τις τιμές RLU ανά ποντικό και τις τιμές SI για κάθε δοσολογική ομάδα αγωγής,

— για κάθε ομάδα αγωγής, μέση τιμή RLU/ποντικό και σχετική στατιστική έκφραση του σφάλματος (π.χ. SD, SEM), καθώς και τα αποτελέσματα της ανάλυσης έκτροπων τιμών,

▼M3

— υπολογισμένος SI και κατάλληλο μέτρο μεταβλητότητας στο οποίο συνεκτιμάται η μεταβλητότητα μεταξύ των ζώων, τόσο της ομάδας που υποβάλλεται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία, όσο και των ομάδων-μαρτύρων,

— σχέση δόσης-απόκρισης,

— στατιστικές αναλύσεις, κατά περίπτωση.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων:

— σύντομος σχολιασμός των αποτελεσμάτων, της ανάλυσης της σχέσης δόσης-απόκρισης και, κατά περίπτωση, των στατιστικών αναλύσεων, με γνωμάτευση για τον χαρακτηρισμό ή μη της ελεγχόμενης ουσίας ως ευαισθητοποιητικής για το δέρμα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol*., 34, 999-1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem, Toxicol*., 34, 985-997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-333.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol*., 146, 49-59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 258-273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol. 34*, 274-286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process.*Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 249-257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd, based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No 10-7551A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm]

▼**M3**

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNA-PRPRept2009.pdf].

(12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint.*J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1-10.

(13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11-26.

(14) OECD (1992), *Skin Sensitisation*, Test Guideline No 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(15) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol*., 46, 1896-1904.

(16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol*., 55, 90-96.

(17) Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. and Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth*., 160, 81-88.

(18) Ishizaka, A., Tono-oka, T. and Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth*., 72, 127-132.

(19) Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. and Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, 27-34.

(20) Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol*., 305, 346-370.

(21) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(22) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(23) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol*., 238, 71-89.

(24) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol*., 93, 13-31.

(25) OECD (2002), *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test Guideline No 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol*., 21, 195-206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol*., 22, 491-506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60-68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721-728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect*., 115, 1023-1028.

(35) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

(36) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53 563-79.

(38) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 34, ENV/JM/MONO (2005)14, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ορθότητα: η εγγύτητα της συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί μέτρο των επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς την «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας μεθόδου δοκιμών (38).

Ουσία συγκριτικής αξιολόγησης: ουσία, ευαισθητοποιητική ή μη, που χρησιμοποιείται ως πρότυπο για σύγκριση με ελεγχόμενη ουσία. Μια ουσία συγκριτικής αξιολόγησης πρέπει να διαθέτει τις ακόλουθες ιδιότητες: i) σταθερή(-ές) και αξιόπιστη(-ες) προέλευση(-εις), ii) δομική και λειτουργική αναλογία προς την τάξη των ελεγχόμενων ουσιών, iii) γνωστά φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά, iv) δεδομένα τεκμηρίωσης γνωστών επιδράσεων και (v) γνωστή ισχύ στο εύρος της επιθυμητής απόκρισης.

Ψευδαρνητικό αποτέλεσμα: ο εσφαλμένος χαρακτηρισμός ουσίας ως αρνητικής ή μη δραστικής με μέθοδο δοκιμών, ενώ στην πραγματικότητα είναι θετική ή δραστική.

Ψευδοθετικό αποτέλεσμα: ο εσφαλμένος χαρακτηρισμός ουσίας ως θετικής ή δραστικής με δοκιμή, ενώ στην πραγματικότητα είναι αρνητική ή μη δραστική.

Κίνδυνος: το δυναμικό δυσμενούς επίδρασης στην υγεία ή στο περιβάλλον. Η δυσμενής επίδραση εκδηλώνεται μόνο εάν τα επίπεδα έκθεσης είναι επαρκή.

Διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα: μέτρο του βαθμού στον οποίο διαφορετικά ειδικευμένα εργαστήρια μπορούν να επιτυγχάνουν ποιοτικά και ποσοτικά παραπλήσια αποτελέσματα, χρησιμοποιώντας το ίδιο πρωτόκολλο και υποβάλλοντας σε δοκιμή τις ίδιες ελεγχόμενες ουσίες. Η διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα προσδιορίζεται κατά τις διαδικασίες προεπικύρωσης και επικύρωσης και αποτελεί ένδειξη του κατά πόσον υπάρχει δυνατότητα επιτυχούς μεταφοράς μιας δοκιμής μεταξύ εργαστηρίων· καλείται επίσης «αναπαραγωγιμότητα μεταξύ εργαστηρίων» (38).

Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα: προσδιορισμός του βαθμού στον οποίο ειδικευμένα άτομα μπορούν να επαναλάβουν με επιτυχία τα ίδια αποτελέσματα εντός του ίδιου εργαστηρίου, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένο πρωτόκολλο σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Καλείται επίσης «αναπαραγωγιμότητα εντός του εργαστηρίου» (38).

Έκτροπη τιμή: έκτροπη τιμή (outlier) είναι μια παρατήρηση σε τυχαίο δείγμα πληθυσμού η οποία διαφέρει σημαντικά από άλλες τιμές αυτού του δείγματος.

Διασφάλιση ποιότητας: διαχειριστική διαδικασία με την οποία αξιολογούνται, από άτομα ανεξάρτητα από εκείνα που εκτελούν τις δοκιμές, η τήρηση των προτύπων, των απαιτήσεων και των διαδικασιών τήρησης αρχείων που αφορούν τις εργαστηριακές δοκιμές, καθώς και η ορθότητα της μεταφοράς δεδομένων.

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια μέθοδος δοκιμών μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (38).

Δερματική ευαισθητοποίηση: ανοσολογική διαδικασία που είναι αποτέλεσμα της τοπικής έκθεσης ευπαθούς ατόμου σε επαγωγικό χημικό αλλεργιογόνο, το οποίο προκαλεί δερματική ανοσοαπόκριση που μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ευαισθητοποίησης εξ επαφής.

Δείκτης διέγερσης (SI): αριθμητική τιμή η οποία υπολογίζεται προκειμένου να εκτιμηθεί το δερματικό ευαισθητοποιητικό δυναμικό μιας ελεγχόμενης ουσίας και ισούται με την αναλογία του πολλαπλασιασμού στις ομάδες που υποβάλλονται σε αγωγή με την ουσία προς τον πολλαπλασιασμό στην ομάδα-μάρτυρα που υποβάλλεται ταυτόχρονα σε αγωγή με τον φορέα.

Ελεγχόμενη ουσία (καλούμενη επίσης «ελεγχόμενη χημική ουσία»): κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

▼M3

B.51. **ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΡΜΑΤΟΣ: ΤΟΠΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΛΕΜΦΑΔΕΝΩΝ: BRDU-ELISA**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Οι κατευθυντήριες γραμμές του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή δοκιμών με χημικές ουσίες και οι μέθοδοι δοκιμών της ΕΕ επανεξετάζονται κατά περιόδους με βάση την επιστημονική πρόοδο, τις μεταβαλλόμενες ανάγκες κανονιστικής ρύθμισης και τον προβληματισμό όσον αφορά την καλή μεταχείριση των ζώων. Η πρώτη μέθοδος δοκιμών (B.42) για τον προσδιορισμό της ευαισθητοποίησης του δέρματος σε ποντικούς, δηλαδή η τοπική δοκιμασία λεμφαδένων (LLNA – κατευθυντήρια γραμμή OECD Test Guideline 429) αναθεωρήθηκε (1 και κεφάλαιο B.42 του παρόντος παραρτήματος). Έχουν δημοσιευθεί λεπτομερείς περιγραφές της επικύρωσης της LLNA, καθώς και επισκόπηση των σχετικών εργασιών (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Στην LLNA χρησιμοποιείται ραδιενεργός θυμιδίνη ή ραδιενεργό ιώδιο για τη μέτρηση του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων, με αποτέλεσμα να περιορίζεται η χρήση της δοκιμασίας όταν υπάρχουν προβλήματα προμήθειας, χρήσης ή τελικής διάθεσης ραδιοϊσοτόπων. Η μέθοδος LLNA: BrdU-ELISA [Enzyme-Linked Immunosorbent Assay/δοκιμασία ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού] αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου δοκιμών LLNA που δεν απαιτεί ραδιενέργεια και στην οποία χρησιμοποιείται για τη μέτρηση του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων μη ραδιοσημασμένη 5-βρωμο-2-δεσοξυουριδίνη (BrdU) (αριθ. Chemical Abstracts Service [CAS] 59-14-3) σε ένα σύστημα δοκιμής βασισμένο στην τεχνική ELISA. Η LLNA: BrdU-ELISA επικυρώθηκε, επανεξετάστηκε και συνιστάται από διεθνή ανεξάρτητη επιστημονική επιτροπή αξιολόγησης από ομότιμους κριτές, καθώς θεωρείται χρήσιμη για την αναγνώριση των ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών για το δέρμα χημικών ουσιών, με ορισμένους περιορισμούς (10) (11) (12). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών σχεδιάστηκε για την εκτίμηση του δερματικού ευαισθητοποιητικού δυναμικού των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) στα ζώα. Το κεφάλαιο B.6 του παρόντος παραρτήματος και η κατευθυντήρια γραμμή OECD Test Guideline 406 συνίστανται σε δοκιμές σε ινδικά χοιρίδια, συγκεκριμένα στη δοκιμή μεγιστοποίησης σε ινδικά χοιρίδια και τη δοκιμή Buehler (13). Τόσο η LLNA (κεφάλαιο B.42 του παρόντος παραρτήματος, OECD Test Guideline 429), όσο και οι δύο τροποποιήσεις της που δεν απαιτούν ραδιενέργεια – LLNA: BrdU-ELISA (κεφάλαιο B.51 του παρόντος παραρτήματος, OECD Test Guideline 442 B) και LLNA: DA (κεφάλαιο B.50 του παρόντος παραρτήματος, OECD Test Guideline 442 A) – προσφέρουν πλεονέκτημα έναντι των δοκιμών σε ινδικά χοιρίδια που περιγράφονται στο κεφάλαιο B.6 και στην κατευθυντήρια γραμμή OECD Test Guideline 406 (13) όσον αφορά τον περιορισμό και τη βελτίωση της χρήσης ζώων.

2. Η LLNA: BrdU-ELISA, όπως και η LLNA, μελετά την επαγωγική φάση της δερματικής ευαισθητοποίησης και παρέχει κατάλληλα ποσοτικά δεδομένα για την εκτίμηση της σχέσης δόσης-απόκρισης. Επιπλέον, η ικανότητα ανίχνευσης των ευαισθητοποιητικών για το δέρμα ουσιών χωρίς να χρειάζεται ραδιοσήμανση για το DNA αποκλείει το ενδεχόμενο επαγγελματικής έκθεσης σε ραδιενέργεια και αίρει τα προβλήματα διάθεσης των αποβλήτων. Αυτό παρέχει τη δυνατότητα αύξησης της χρήσης ποντικών για την ανίχνευση των ευαισθητοποιητικών για το δέρμα ουσιών, χάρη στην οποία θα μπορούσε να περιοριστεί περαιτέρω η χρήση ινδικών χοιριδίων σε δοκιμές για τη διαπίστωση του δυναμικού δερματικής ευαισθητοποίησης (κεφάλαιο B.6, OECD Test Guideline 406) (13).

ΟΡΙΣΜΟΙ

3. Οι χρησιμοποιούμενοι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

4. Η LLNA: BrdU-ELISA αποτελεί τροποποιημένη μέθοδο LLNA για την αναγνώριση χημικών ουσιών που πιθανώς προκαλούν δερματική ευαισθητοποίηση, με συγκεκριμένους περιορισμούς. Αυτό δεν σημαίνει κατ' ανάγκη ότι η LLNA: BrdU-ELISA πρέπει να χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση αντί της LLNA ή των δοκιμών σε ινδικά χοιρίδια (κεφάλαιο B.6, OECD Test Guideline 406) (13) αλλά μάλλον ότι είναι εφάμιλλη των τελευταίων και μπορεί να χρησιμοποιείται ως εναλλακτική λύση, η οποία κατά κανόνα δεν απαιτεί περαιτέρω επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων,

▼M3

θετικών και αρνητικών (10) (11). Πριν από τη διεξαγωγή της μελέτης, το εργαστήριο δοκιμών πρέπει να λαμβάνει υπόψη όλα τα διαθέσιμα στοιχεία σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία, μεταξύ των οποίων την ταυτότητα και τη χημική δομή της, τις φυσικές και χημικές ιδιότητές της, τα αποτελέσματα τυχόν άλλων δοκιμών τοξικότητας της ουσίας, in vitro ή in vivo, και τα τοξικολογικά δεδομένα του αφορούν χημικά προϊόντα ανάλογης δομής. Τα στοιχεία αυτά θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη προκειμένου να κριθεί αν η LLNA: BrdU-ELISA είναι κατάλληλη για την ελεγχόμενη ουσία (με δεδομένη την ασυμβατότητα περιορισμένου αριθμού ειδών χημικών προϊόντων με την LLNA: BrdU-ELISA —βλέπε παράγραφο 5) και ως βοήθημα κατά την επιλογή δόσεων.

5. Η LLNA: BrdU-ELISA είναι μέθοδος in vivo και, επομένως, δεν καταργεί τη χρήση ζώων στην εκτίμηση της δραστικότητας αλλεργικής ευαισθητοποίησης εξ επαφής. Είναι ωστόσο ικανή να περιορίσει τη χρήση ζώων για τον σκοπό αυτό, σε σύγκριση με τις δοκιμές σε ινδικά χοιρίδια (κεφάλαιο B.6, OECD Test Guideline 406) (13). Επιπλέον, η LLNA: BrdU-ELISA βελτιώνει ουσιαστικά τον τρόπο με τον οποίο χρησιμοποιούνται τα ζώα στις δοκιμές αλλεργικής ευαισθητοποίησης εξ επαφής, δεδομένου ότι, σε αντίθεση με τη μέθοδο δοκιμών B.6 και την κατευθυντήρια γραμμή OECD Test Guideline 406, δεν απαιτεί την εκδήλωση των επαγόμενων από το ερέθισμα αντιδράσεων δερματικής υπερευαισθησίας. Επίσης, η LLNA: BrdU-ELISA δεν απαιτεί τη χρήση ανοσοενισχυτικών, όπως η δοκιμή μεγιστοποίησης σε ινδικά χοιρίδια (κεφάλαιο B.6 του παρόντος παραρτήματος, 13). Κατ' αυτόν τον τρόπο, η LLNA: BrdU-ELISA περιορίζει τη δυσφορία των ζώων. Παρά τα πλεονεκτήματα της LLNA: BrdU-ELISA έναντι των μεθόδων B.6 και OECD Test Guideline 406 (13), υπάρχουν ορισμένοι περιοριστικοί παράγοντες που ενδέχεται να επιβάλλουν τη χρήση των B.6 και OECD Test Guideline 406 (π.χ. δοκιμές με ορισμένα μέταλλα, ψευδοθετικά ευρήματα με ορισμένες ερεθιστικές για το δέρμα ουσίες [όπως ορισμένα επιφανειοδραστικά χημικά προϊόντα] (6) (1 και κεφάλαιο B.42 του παρόντος παραρτήματος), η διαλυτότητα της ελεγχόμενης ουσίας). Επιπροσθέτως, η χρήση των δοκιμών σε ινδικά χοιρίδια (μέθοδοι B.6, OECD Test Guideline 406) (13) ενδέχεται να καταστεί αναγκαία στην περίπτωση χημικών ουσιών ή τάξεων χημικών ουσιών που περιέχουν δραστικές ομάδες οι οποίες έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να αποτελέσουν συγχυτικούς παράγοντες (15). Οι περιορισμοί που έχουν προσδιοριστεί για την LLNA (1 και κεφάλαιο B.42 του παρόντος παραρτήματος) συνιστάται να ισχύουν και για την LLNA: BrdU-ELISA (10). Εκτός αυτών των εντοπισθέντων περιορισμών, θεωρείται ότι η LLNA: BrdU-ELISA μπορεί να εφαρμοστεί στις δοκιμές οποιασδήποτε χημικής ουσίας, εκτός εάν αυτή έχει ιδιότητες που ενδέχεται να επηρεάσουν την ορθότητα της μεθόδου. Επιπροσθέτως, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η πιθανότητα οριακών θετικών αποτελεσμάτων όταν οι τιμές του δείκτη διέγερσης (SI) κυμαίνονται από 1,6 έως 1,9 (βλέπε παραγράφους 31-32). Αυτό στηρίζεται στη βάση δεδομένων επικύρωσης για 43 ουσίες με τη χρήση SI ≥ 1,6 (βλέπε παράγραφο 6), από τις οποίες αναγνωρίστηκαν σωστά με την LLNA: BrdU-ELISA και οι 32 ευαισθητοποιητικές βάσει της LLNA, αλλά δεν αναγνωρίστηκαν σωστά 2 από τις 11 μη ευαισθητοποιητικές βάσει της LLNA ουσίες με τιμές SI μεταξύ 1,6 και 1,9 (δηλαδή οριακό θετικό αποτέλεσμα) (10). Επειδή, ωστόσο, χρησιμοποιήθηκε η ίδια σειρά δεδομένων για τον καθορισμό των τιμών του SI και για τον υπολογισμό των προγνωστικών ιδιοτήτων της δοκιμής, τα αναφερόμενα αποτελέσματα μπορεί να συνιστούν υπερεκτίμηση των πραγματικών προγνωστικών ιδιοτήτων.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

6. Η βασική αρχή στην οποία στηρίζεται η LLNA: BrdU-ELISA είναι ότι οι ευαισθητοποιητικές ουσίες επάγουν πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων των λεμφαδένων που αποχετεύουν το σημείο εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας. Ο πολλαπλασιασμός αυτός είναι ανάλογος με τη δόση και με την ισχύ του εφαρμοζόμενου αλλεργιογόνου και αποτελεί ένα απλό μέσο αντικειμενικής, ποσοτικής μέτρησης της ευαισθητοποίησης. Μετράται με σύγκριση του αριθμητικού μέσου του πολλαπλασιασμού σε κάθε ομάδα δοκιμής προς τον αριθμητικό μέσο του πολλαπλασιασμού στην ομάδα-μάρτυρα που έχει υποβληθεί σε αγωγή με τον φορέα (VC). Προσδιορίζεται ο λόγος του αριθμητικού μέσου του πολλαπλασιασμού σε κάθε ομάδα που υποβάλλεται σε αγωγή προς την αντίστοιχη τιμή για την παράλληλη ομάδα VC, ο οποίος καλείται δείκτης διέγερσης (SI) και πρέπει να είναι ≥ 1,6 ώστε να δικαιολογείται η περαιτέρω αξιολόγηση μιας ελεγχόμενης ουσίας

▼M3

ως δυνητικά ευαισθητοποιητικής για το δέρμα. Οι διαδικασίες που περιγράφονται στο παρόν κεφάλαιο βασίζονται στη χρήση της μετρούμενης περιεκτικότητας σε BrdU ως ένδειξης αυξημένου αριθμού πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων στους αποχετευτικούς ωτικούς λεμφαδένες. Η BrdU είναι ένωση ομοειδής με τη θυμιδίνη και ενσωματώνεται με παρόμοιο τρόπο στο DNA των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων. Η ενσωμάτωση της BrdU μετράται με την τεχνική ELISA, στην οποία χρησιμοποιείται ένα εξειδικευμένο αντίσωμα για τη BrdU, σημασμένο με υπεροξειδάση. Με την προσθήκη του υποστρώματος, η υπεροξειδάση αντιδρά με αυτό προς σχηματισμό έγχρωμου προϊόντος το οποίο προσδιορίζεται ποσοτικά μέσω της ειδικής απορρόφησης, με τη χρήση συσκευής ανάγνωσης πλακών μικροτιτλοδότησης.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Επιλογή ζωικού είδους

7. Το είδος που έχει επιλεγεί για τη συγκεκριμένη δοκιμή είναι ο ποντικός. Οι μελέτες επικύρωσης της LLNA: BrdU-ELISA διεξήχθησαν αποκλειστικά σε ποντικούς της φυλής CBA/J, η οποία κατά συνέπεια θεωρείται προτιμώμενη (10) (12). Χρησιμοποιούνται νεαροί ενήλικες θηλυκοί ποντικοί που δεν έχουν ποτέ γεννήσει ούτε εγκυμονούν. Κατά την έναρξη της μελέτης, η ηλικία των ζώων πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 8 και 12 εβδομάδων και οι διαφορές βάρους μεταξύ τους πρέπει να είναι ελάχιστες και να μην υπερβαίνουν το 20 % της μέσης τιμής. Εναλλακτικά, είναι δυνατή η χρήση άλλων φυλών, καθώς και αρσενικών ζώων, εφόσον έχουν συγκεντρωθεί επαρκή δεδομένα από τα οποία προκύπτει ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές απόκρισης κατά την LLNA: BrdU-ELISA, οφειλόμενες ειδικά στη φυλή και/ή το φύλο.

Συνθήκες στέγασης και διατροφής

8. Οι ποντικοί πρέπει να στεγάζονται σε ομάδες (16), εκτός εάν η ατομική στέγασή τους δικαιολογείται με επαρκή επιστημονική αιτιολόγηση. Η θερμοκρασία του θαλάμου πειραματόζωων πρέπει να είναι 22 ± 3 °C. Αν και η σχετική υγρασία πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου, εντούτοις ο στόχος θα πρέπει να είναι μια τιμή 50-60 %. Ο φωτισμός πρέπει να είναι τεχνητός, με φωτοπερίοδο 12ώρου. Για τη διατροφή επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται συνήθη εργαστηριακά σιτηρέσια με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού.

Προετοιμασία των ζώων

9. Τα ζώα επιλέγονται τυχαία, σημαίνονται με τρόπο που επιτρέπει την αναγνώριση του καθενός (αλλά όχι με αναγνωριστικό ενώτιο οποιασδήποτε μορφής) και παραμένουν στους κλωβούς τους τουλάχιστον για πέντε ημέρες πριν από την έναρξη της χορήγησης των δόσεων, ώστε να εγκλιματιστούν στις εργαστηριακές συνθήκες. Πριν από την έναρξη της αγωγής, εξετάζονται όλα τα ζώα για να είναι βέβαιο ότι δεν παρουσιάζουν εμφανείς βλάβες του δέρματος.

Παρασκευή των διαλυμάτων δοσολογίας

10. Πριν από την εφαρμογή στο αυτί ποντικού, τα στερεά χημικά προϊόντα πρέπει να διαλύονται, ή να σχηματίζεται εναιώρημά τους, σε κατάλληλους διαλύτες/φορείς και να αραιώνονται, εφόσον ενδείκνυται. Τα υγρά χημικά προϊόντα μπορούν να εφαρμόζονται ως έχουν ή να αραιώνονται πριν από τη χορήγηση. Τα αδιάλυτα χημικά προϊόντα, όπως αυτά που συναντώνται συνήθως στα ιατροτεχνολογικά είδη, πρέπει να υποβάλλονται σε εξαντλητική εκχύλιση με κατάλληλο διαλύτη, ώστε να παραλαμβάνονται όλα τα εκχυλίσιμα συστατικά για δοκιμή, πριν από την εφαρμογή στο αυτί ποντικού. Τα παρασκευάσματα της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να ανανεώνονται καθημερινά, εκτός εάν η φύλαξή τους είναι αποδεκτή βάσει των σχετικών με τη σταθερότητα στοιχείων.

Έλεγχος αξιοπιστίας

11. Χρησιμοποιούνται χημικά προϊόντα ως θετικοί μάρτυρες για να καταδειχθεί η ορθή εκτέλεση της δοκιμασίας με την απόκριση, με επαρκή και αναπαραγώγιμη ευαισθησία, σε ευαισθητοποιητική ελεγχόμενη ουσία για την οποία έχει χαρακτηριστεί επακριβώς το μέγεθος της απόκρισης. Συνιστάται η συμπερίληψη παράλληλου θετικού μάρτυρα επειδή καταδεικνύει την

▼M3

ικανότητα του εργαστηρίου να εκτελεί με επιτυχία κάθε δοκιμασία και καθιστά δυνατή την εκτίμηση της ενδοεργαστηριακής και διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας και συγκρισιμότητας. Επίσης, καθώς ορισμένες ρυθμιστικές Αρχές απαιτούν τη χρήση θετικού μάρτυρα σε κάθε μελέτη, συνιστάται στους χρήστες να ζητούν τη γνώμη των αρμόδιων αρχών πριν από τη διεξαγωγή της LLNA: BrdU-ELISA. Συνιστάται, επομένως, η χρήση παράλληλου θετικού μάρτυρα ως συνήθης πρακτική, ώστε να μην χρειάζονται πρόσθετες δοκιμές σε ζώα για την κάλυψη των αναγκών που μπορεί να δημιουργήσει η περιοδική χρήση θετικών μαρτύρων (βλέπε παράγραφο 12). Ένας θετικός μάρτυρας θα πρέπει να δίδει θετική απόκριση κατά την LLNA: BrdU-ELISA σε επίπεδα έκθεσης τα οποία αναμένεται να προκαλέσουν αύξηση του SI σε τιμή ≥ 1,6 σε σύγκριση με την ομάδα αρνητικού μάρτυρα. Η δόση για τον θετικό μάρτυρα πρέπει να επιλέγεται κατά τρόπο ώστε να μην προκαλεί υπέρμετρο ερεθισμό του δέρματος ή συστημική τοξικότητα και η επαγωγή να είναι αναπαραγώγιμη αλλά όχι υπερβολική (δηλαδή οι τιμές SI > 14 θεωρούνται υπέρμετρες). Οι προτιμώμενοι θετικοί μάρτυρες είναι το διάλυμα εξυλοκινναμωμικής αλδεΰδης (αριθ. CAS 101-86-0) 25 % και το διάλυμα ευγενόλης (αριθ. CAS 97-53-0) 25 % σε μείγμα ακετόνης-ελαιολάδου (4:1, v/v). Σε ορισμένες, δεόντως αιτιολογημένες περιπτώσεις, μπορούν να χρησιμοποιούνται άλλοι θετικοί μάρτυρες που πληρούν τα προαναφερόμενα κριτήρια.

12. Παρά τη σύσταση για συμπερίληψη παράλληλης ομάδας θετικού μάρτυρα, σε ορισμένες περιπτώσεις ενδέχεται να αρκεί η περιοδική δοκιμή του θετικού μάρτυρα (δηλαδή ανά διαστήματα που δεν υπερβαίνουν το εξάμηνο) για εργαστήρια που εκτελούν τακτικά LLNA: BrdU-ELISA (δηλαδή με συχνότητα τουλάχιστον μηνιαία) και διαθέτουν εδραιωμένη ιστορική βάση δεδομένων για τον θετικό μάρτυρα, η οποία καταδεικνύει την ικανότητα του εργαστηρίου να επιτυγχάνει αναπαραγώγιμα και ορθά αποτελέσματα με τους θετικούς μάρτυρες. Η επαρκής τεχνική ικανότητα ως προς την LLNA: BrdU-ELISA μπορεί να αποδειχθεί με την επίτευξη σταθερών θετικών αποτελεσμάτων με τον θετικό μάρτυρα σε 10 τουλάχιστον ανεξάρτητες δοκιμές που έχουν διεξαχθεί εντός εύλογου χρονικού διαστήματος, δηλαδή μικρότερου από ένα έτος.

13. Πρέπει να συμπεριλαμβάνεται πάντοτε παράλληλη ομάδα θετικού μάρτυρα όταν επέρχονται διαδικαστικές αλλαγές στην LLNA: BrdU-ELISA (π.χ. αλλαγή ειδικευμένου προσωπικού, αλλαγή υλικών και/ή αντιδραστηρίων της μεθόδου δοκιμών ή του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται σε αυτή, αλλαγή της προέλευσης των πειραματόζωων), οι οποίες πρέπει να τεκμηριώνονται στις εκθέσεις του εργαστηρίου. Πρέπει να εξετάζονται οι επιπτώσεις των αλλαγών αυτών στην επάρκεια της ήδη συγκροτημένης ιστορικής βάσης δεδομένων, προκειμένου να κριθεί αν είναι απαραίτητη η δημιουργία νέας ιστορικής βάσης δεδομένων για την τεκμηρίωση της σταθερότητας των αποτελεσμάτων που προκύπτουν με τους θετικούς μάρτυρες.

14. Οι ερευνητές θα πρέπει να γνωρίζουν ότι η απόφαση για διεξαγωγή περιοδικής και όχι ταυτόχρονης μελέτης με θετικό μάρτυρα επηρεάζει έμμεσα την επάρκεια και τη δυνατότητα αποδοχής των αρνητικών αποτελεσμάτων που προκύπτουν χωρίς παράλληλο θετικό μάρτυρα κατά το μεσοδιάστημα μεταξύ των περιοδικών μελετών με θετικό μάρτυρα. Για παράδειγμα, σε περίπτωση ψευδαρνητικού αποτελέσματος της περιοδικής μελέτης με θετικό μάρτυρα, μπορεί να αμφισβητηθούν τα αρνητικά αποτελέσματα που προέκυψαν για την ελεγχόμενη ουσία κατά το μεσοδιάστημα μεταξύ της τελευταίας αποδεκτής περιοδικής μελέτης με θετικό μάρτυρα και της μη αποδεκτής. Οι συνέπειες αυτές πρέπει να λαμβάνονται επιμελώς υπόψη όταν κρίνεται αν θα συμπεριλαμβάνονται παράλληλοι θετικοί μάρτυρες ή θα διεξάγονται απλώς περιοδικές μελέτες με θετικούς μάρτυρες. Πρέπει επίσης να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης μικρότερου αριθμού ζώων στην παράλληλη ομάδα θετικού μάρτυρα, εφόσον δικαιολογείται από επιστημονική άποψη και το εργαστήριο καταδεικνύει τη δυνατότητα χρήσης μικρότερου αριθμού ποντικών με βάση ειδικά για το ίδιο ιστορικά δεδομένα (17).

15. Παρόλο που ο θετικός μάρτυρας πρέπει να ελέγχεται στον φορέα που είναι γνωστό ότι αποσπά σταθερή απόκριση (π.χ. μείγμα ακετόνης-ελαιολάδου σε αναλογία 4:1, v/v), ενδέχεται να υπάρχουν περιπτώσεις όπου οι νομοθετικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τη διεξαγωγή δοκιμών και σε μη τυποποιημένο φορέα (κλινικώς/χημικώς συναφές σκεύασμα) (18). Σε περίπτωση δοκιμής του παράλληλου θετικού μάρτυρα και της ελεγχόμενης ουσίας σε διαφορετικούς φορείς, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται χωριστός μάρτυρας VC για τον παράλληλο θετικό μάρτυρα.

▼M3

16. Όταν αξιολογούνται ελεγχόμενες ουσίες που ανήκουν σε συγκεκριμένη τάξη χημικών ουσιών ή προκαλούν συγκεκριμένο φάσμα αποκρίσεων, είναι ενδεχομένως χρήσιμες και οι ουσίες συγκριτικής αξιολόγησης για να καταδειχθεί η ορθή λειτουργία της μεθόδου ως προς την ανίχνευση του δερματικού ευαισθητοποιητικού δυναμικού των συγκεκριμένων ειδών ελεγχόμενων ουσιών. Οι κατάλληλες ουσίες συγκριτικής αξιολόγησης πρέπει να διαθέτουν τις ακόλουθες ιδιότητες:

— δομική και λειτουργική αναλογία προς την τάξη της ελεγχόμενης ουσίας,

— γνωστά φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά,

— δεδομένα τεκμηρίωσης που προέρχονται από την LLNA: BrdU-ELISA,

— δεδομένα τεκμηρίωσης που αφορούν άλλα ζωικά μοντέλα και/ή τον άνθρωπο.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

Αριθμός ζώων και επίπεδα δόσεων

17. Χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τέσσερα ζώα ανά δοσολογική ομάδα, με τρεις τουλάχιστον συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας, συν μια παράλληλη ομάδα αρνητικού μάρτυρα, που υποβάλλεται σε αγωγή μόνο με τον φορέα της ελεγχόμενης ουσίας, και μια ομάδα θετικού μάρτυρα (παράλληλου ή πρόσφατου, ανάλογα με την πολιτική που εφαρμόζει το εργαστήριο λαμβάνοντας υπόψη τις παραγράφους 11-15). Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο δοκιμής με πολλαπλές δόσεις της ουσίας που χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας, κυρίως στις περιπτώσεις διαλειπουσών δοκιμών με θετικό μάρτυρα. Η μεταχείριση και η αγωγή των ζώων των ομάδων-μαρτύρων, εκτός του ότι αυτά δεν υποβάλλονται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία, πρέπει κατά τα άλλα να είναι πανομοιότυπες με των ζώων των ομάδων αγωγής.

18. Η επιλογή των δόσεων και του φορέα πρέπει να βασίζεται στις συστάσεις των βιβλιογραφικών πηγών (2) και (19). Επιλέγονται κατά κανόνα διαδοχικές δόσεις από κατάλληλη σειρά συγκεντρώσεων, όπως 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % κ.λπ. Η επιλογή της χρησιμοποιούμενης σειράς συγκεντρώσεων πρέπει να συνοδεύεται από επαρκή επιστημονική αιτιολόγηση. Κατά την επιλογή των τριών διαδοχικών συγκεντρώσεων, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όλα τα υπάρχοντα τοξικολογικά στοιχεία (π.χ. οξεία τοξικότητα και δερματικός ερεθισμός) και στοιχεία για τη δομή και τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης ουσίας (και/ή ουσιών ανάλογης δομής) που ενδιαφέρουν, έτσι ώστε η υψηλότερη συγκέντρωση να μεγιστοποιεί την έκθεση, χωρίς να προκαλεί συστημική τοξικότητα και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος (19) (20) και κεφάλαιο Β.4 του παρόντος παραρτήματος). Εάν δεν υπάρχουν τέτοια στοιχεία, μπορεί να χρειάζεται δοκιμή προδιαλογής (βλέπε παραγράφους 21-24).

19. Ο φορέας πρέπει να μην προκαλεί συστηματικά και άλλα σφάλματα στα αποτελέσματα των δοκιμών και να επιλέγεται με γνώμονα τη μεγιστοποίηση της διαλυτότητας, ώστε να προκύπτει η μέγιστη εφικτή συγκέντρωση και, ταυτόχρονα, να σχηματίζεται κατάλληλο διάλυμα/εναιώρημα για την εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας. Συνιστώνται οι ακόλουθοι φορείς: μείγμα ακετόνης-ελαιολάδου (4:1, v/v), N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο, μεθυλαιθυλκετόνη, προπυλενογλυκόλη και διμεθυλοσουλφοξείδιο (6), χωρίς να αποκλείεται η χρήση άλλων, εφόσον παρέχεται επαρκής επιστημονική αιτιολόγηση. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ενδέχεται να απαιτείται η χρήση, ως πρόσθετου μάρτυρα, ενός κλινικώς συναφούς διαλύτη ή του σκευάσματος του εμπορίου με τη μορφή του οποίου διατίθεται στην αγορά η ελεγχόμενη ουσία. Θα πρέπει να λαμβάνεται ιδιαίτερη μέριμνα για την ενσωμάτωση των υδρόφιλων ελεγχόμενων ουσιών σε ένα σύστημα φορέα το οποίο διαβρέχει το δέρμα και δεν απορρέει αμέσως, με την προσθήκη κατάλληλων διαλυτοποιητών (π.χ. 1 % Pluronic® L92). Κατά συνέπεια, θα πρέπει να αποφεύγονται οι εξ ολοκλήρου υδατικοί φορείς.

▼M3

20. Η επεξεργασία λεμφαδένων μεμονωμένων ποντικών επιτρέπει την εκτίμηση της μεταβλητότητας μεταξύ των ζώων και τη στατιστική ανάλυση της διαφοράς μεταξύ των μετρήσεων της ελεγχόμενης ουσίας και των μετρήσεων της ομάδας VC (βλέπε παράγραφο 33) Επιπλέον, η αξιολόγηση της δυνατότητας μείωσης του αριθμού ποντικών της ομάδας θετικού μάρτυρα είναι εφικτή μόνο εφόσον συλλέγονται δεδομένα για μεμονωμένα ζώα (17). Επίσης, ορισμένες ρυθμιστικές Αρχές απαιτούν τη συλλογή δεδομένων για μεμονωμένα ζώα. Η τακτική συλλογή δεδομένων για μεμονωμένα ζώα προσφέρει ένα πλεονέκτημα από πλευράς καλής μεταχείρισης των ζώων, καθώς αποτρέπει την επανάληψη δοκιμών που θα ήταν αναγκαία σε περίπτωση μεταγενέστερης εξέτασης των αποτελεσμάτων τα οποία έχουν προκύψει για την ελεγχόμενη ουσία με έναν τρόπο (π.χ. από συγχωνευμένα δεδομένα για τα ζώα) από ρυθμιστικές αρχές που έχουν άλλες απαιτήσεις (π.χ. δεδομένα για μεμονωμένα ζώα).

Δοκιμή προδιαλογής

21. Όταν δεν υπάρχουν στοιχεία για τον προσδιορισμό της μέγιστης δόσης προς δοκιμή (βλέπε παράγραφο 18), θα πρέπει να εκτελείται δοκιμή προδιαλογής, προκειμένου να καθοριστεί το κατάλληλο επίπεδο δόσης για τη δοκιμή με LLNA: BrdU-ELISA. Η δοκιμή προδιαλογής αποσκοπεί στην καθοδήγηση κατά την επιλογή του ανώτατου επιπέδου δόσης το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για την κυρίως μελέτη LLNA: BrdU-ELISA, στις περιπτώσεις που δεν υπάρχουν στοιχεία σχετικά με τη συγκέντρωση η οποία επάγει συστημική τοξικότητα (βλέπε παράγραφο 24) και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος (βλέπε παράγραφο 23). Το ανώτατο επίπεδο δόσης που χρησιμοποιείται στη δοκιμή πρέπει να είναι η συγκέντρωση 100 % της ελεγχόμενης ουσίας, εάν αυτή είναι υγρή, ή η μέγιστη δυνατή συγκέντρωση, προκειμένου για στερεά ή εναιωρήματα.

22. Η δοκιμή προδιαλογής διεξάγεται στις ίδιες συνθήκες όπως η κυρίως μελέτη LLNA: BrdU-ELISA, εκτός από την εκτίμηση του πολλαπλασιασμού στους λεμφαδένες, η οποία παραλείπεται, και τη δυνατότητα μείωσης του αριθμού των ζώων που χρησιμοποιούνται σε κάθε δοσολογική ομάδα. Προτείνεται η χρήση ενός ή δύο ζώων ανά δοσολογική ομάδα. Όλοι οι ποντικοί εξετάζονται καθημερινά για την ανίχνευση κλινικών σημείων συστημικής τοξικότητας ή τοπικού ερεθισμού στο σημείο εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας. Καταγράφεται το βάρος σώματος πριν από την έναρξη και πριν από τον τερματισμό της δοκιμής (6η ημέρα). Εξετάζονται και τα δύο αυτιά κάθε ποντικού για την ανίχνευση ερυθήματος, το οποίο βαθμολογείται με τη βοήθεια του πίνακα 1 (20 και κεφάλαιο B.4 του παρόντος παραρτήματος). Μετράται το πάχος των αυτιών με παχύμετρο (π.χ. ψηφιακό μικρόμετρο ή παχύμετρο Peacock Dial) την 1η ημέρα (πριν από τη χορήγηση της δόσης), την 3η ημέρα (περίπου 48 ώρες μετά την πρώτη δόση) και την 6η ημέρα. Επιπλέον, το πάχος των αυτιών είναι δυνατόν να προσδιοριστεί την 6η ημέρα με προσδιορισμούς βάρους δείγματος αυτιού λαμβανόμενου με λαβίδα βιοψίας, οι οποίοι πρέπει να εκτελούνται μετά τη θανάτωση των ζώων με ευθανασία. Μια βαθμολογία ερυθήματος ≥ 3 και/ή η αύξηση του πάχους των αυτιών κατά ≥ 25 %, σε οποιαδήποτε ημέρα μέτρησης, αποτελούν ενδείξεις υπέρμετρου τοπικού ερεθισμού (21) (22). Ως μέγιστη δόση για την κυρίως μελέτη LLNA: BrdU-ELISA επιλέγεται η αμέσως χαμηλότερη δόση στη σειρά συγκεντρώσεων της προδιαλογής (βλέπε παράγραφο 18) η οποία δεν επάγει συστημική τοξικότητα και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος.

Πίνακας 1

Βαθμολογία ερυθήματος

Παρατήρηση	Βαθμολογία
Απουσία ερυθήματος	0
Πολύ ελαφρό ερύθημα (μόλις αντιληπτό)	1
Περιγεγραμμένο ερύθημα	2

▼M3

Παρατήρηση	Βαθμολογία
Μέτριο έως σοβαρό ερύθημα	3
Σοβαρό ερύθημα (ερυθρότητα τεύτλων) έως σχηματισμός εσχάρας που εμποδίζει τη διαβάθμιση του ερυθήματος	4

23. Εκτός από την αύξηση του πάχους των αυτιών κατά 25 % (21) (22), έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση των ερεθιστικών ουσιών κατά την LLNA η στατιστικά σημαντική αύξηση του πάχους των αυτιών των ποντικών που υποβάλλονται σε αγωγή σε σύγκριση με τους ποντικούς-μάρτυρες (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Ωστόσο, η αύξηση του πάχους των αυτιών κατά λιγότερο από 25 %, έστω και αν είναι στατιστικά σημαντική, δεν έχει συσχετιστεί ειδικά με υπέρμετρο ερεθισμό (25) (26) (27) (28) (29).

24. Οι ακόλουθες κλινικές παρατηρήσεις, εντασσόμενες σε ολοκληρωμένη εκτίμηση, είναι δυνατόν να αποτελούν ένδειξη συστημικής τοξικότητας (30) και, κατ' επέκταση, να υποδεικνύουν το ανώτατο επίπεδο δόσης προς χρήση στην κυρίως μελέτη LLNA: BrdU-ELISA αλλαγές στη λειτουργία του νευρικού συστήματος (π.χ. ανόρθωση τριχών, αταξία, τρόμοι, σπασμοί), στη συμπεριφορά (π.χ. επιθετικότητα, αλλαγή όσον αφορά την περιποίηση του σώματος, έντονη μεταβολή της κινητικότητας), στον αναπνευστικό ρυθμό (δηλαδή μεταβολές της συχνότητας και της έντασης των αναπνοών, όπως δύσπνοια, ασθμαίνουσα αναπνοή και ρόγχος), καθώς και στην κατανάλωση τροφής και νερού. Επιπλέον, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη στην αξιολόγηση τα σημεία λήθαργου και/ή απουσίας αντίδρασης σε ερεθίσματα και κάθε κλινικό σημείο που υπερβαίνει τον ελαφρό ή στιγμιαίο πόνο και δυσφορία, η μείωση του βάρους σώματος κατά > 5 % μεταξύ 1ης και 6ης ημέρας και η θνησιμότητα. Τα ετοιμοθάνατα ζώα, καθώς και όσα παρουσιάζουν σημεία έντονου πόνου και δυσφορίας, πρέπει να θανατώνονται με ευθανασία (31).

Πρόγραμμα πειραμάτων της κυρίως μελέτης

25. Το πρόγραμμα πειραμάτων της δοκιμασίας έχει ως εξής:

— *1η ημέρα:* Κάθε ζώο ζυγίζεται χωριστά και καταγράφονται το βάρος του και οι ενδεχόμενες κλινικές παρατηρήσεις. Στη ραχιαία επιφάνεια κάθε αυτιού τοποθετούνται 25 μL κατάλληλης αραίωσης της ελεγχόμενης ουσίας, του φορέα μόνου ή του θετικού μάρτυρα (παράλληλου ή πρόσφατου, ανάλογα με την πολιτική που εφαρμόζει το εργαστήριο λαμβάνοντας υπόψη τις παραγράφους 11-15).

— *2η και 3η ημέρα:* Επαναλαμβάνεται η διαδικασία εφαρμογής της ουσίας όπως την πρώτη ημέρα.

— *4η ημέρα:* Καμία αγωγή.

— *5η ημέρα:* Χορηγούνται ενδοπεριτοναϊκώς 0,5 mL (5 mg/ποντικό) διαλύματος BrdU (10 mg/mL).

— *6η ημέρα:* Καταγράφονται το βάρος κάθε ζώου και οι ενδεχόμενες κλινικές παρατηρήσεις. Περίπου 24 ώρες μετά τη χορήγηση της BrdU, τα ζώα θανατώνονται με ευθανασία. Εκτέμνονται οι αποχετευτικοί ωτικοί λεμφαδένες από κάθε αυτί ποντικού και υποβάλλονται χωριστά σε επεξεργασία με φυσιολογικό ορό στον οποίο έχει προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (PBS) ανά ζώο. Λεπτομέρειες και διαγράμματα για την αναγνώριση και την εκτομή των λεμφαδένων παρέχονται στη βιβλιογραφική πηγή (17). Για την περαιτέρω παρακολούθηση της τοπικής απόκρισης του δέρματος κατά την κυρίως μελέτη, το πρωτόκολλό της μπορεί να περιλαμβάνει πρόσθετες παραμέτρους, όπως βαθμολογία του ωτικού ερυθήματος ή μετρήσεις του πάχους των αυτιών (με τη βοήθεια παχυμέτρου ή με προσδιορισμούς βάρους δείγματος αυτιού λαμβανόμενου με λαβίδα βιοψίας κατά τη νεκροψία).

▼M3

Παρασκευή κυτταρικών εναιωρημάτων

26. Παρασκευάζεται εναιώρημα μεμονωμένων λεμφοκυττάρων από τους λεμφαδένες που έχουν ληφθεί με αμφοτερόπλευρη εκτομή από κάθε ποντικό, με ήπια μηχανική διάσπαση μέσω πλέγματος από ανοξείδωτο χάλυβα με οπές των 200 μm ή με άλλη αποδεκτή τεχνική σχηματισμού εναιωρήματος μεμονωμένων κυττάρων (π.χ. σύνθλιψη των λεμφαδένων με τη βοήθεια πλαστικού υπέρου ιγδίου (γουδοχέρι) μιας χρήσης, ακολουθούμενη από διήθηση μέσω δικτυωτού πλέγματος από νάιλον των 70 μm). Δεδομένου ότι η διαδικασία παρασκευής του εναιωρήματος λεμφοκυττάρων είναι κρίσιμης σημασίας για την παρούσα δοκιμασία, κάθε χειριστής θα πρέπει να έχει αποκτήσει εκ των προτέρων τη σχετική δεξιότητα. Εξάλλου, επειδή οι λεμφαδένες των ζώων της ομάδας αρνητικού μάρτυρα είναι μικροί, είναι σημαντικό να εκτελείται η εργασία αυτή με προσοχή ώστε να αποφεύγονται οι τεχνητές επιδράσεις στις τιμές του SI. Σε κάθε περίπτωση, ο στοχευόμενος όγκος του εναιωρήματος λεμφοκυττάρων πρέπει να ρυθμίζεται σε βελτιστοποιημένο όγκο (περίπου 15 mL), ο οποίος προσδιορίζεται με γνώμονα την επίτευξη μέσης τιμής απορρόφησης 0,1-0,2 στην ομάδα αρνητικού μάρτυρα.

Προσδιορισμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (μέτρηση της περιεκτικότητας του DNA των λεμφοκυττάρων σε BrdU)

27. Η περιεκτικότητα σε BrdU μετράται με την τεχνική ELISA, με τη χρήση ενός συνόλου αντιδραστηρίων του εμπορίου (π.χ. Roche Applied Science, Mannheim, Γερμανία, αριθ. καταλόγου 11 647 229 001). Περιληπτικά, φέρονται 100 μL εναιωρήματος λεμφοκυττάρων, εις τριπλούν, στις κοιλότητες (μικροκυψελίδες) πλάκας μικροτιτλοδότησης με επίπεδο πυθμένα. Μετά από μονιμοποίηση και αποδιάταξη των λεμφοκυττάρων, προστίθεται σε κάθε κοιλότητα αντίσωμα anti-BrdU και αφήνεται να αντιδράσει. Στη συνέχεια απομακρύνεται το αντίσωμα anti-BrdU με έκπλυση και προστίθεται το διάλυμα υποστρώματος για να παραχθεί το χρωμογόνο. Μετράται έπειτα η απορρόφηση στα 370 nm, με μήκος κύματος αναφοράς τα 492 nm. Σε όλες τις περιπτώσεις πρέπει να βελτιστοποιούνται οι συνθήκες δοκιμής (βλέπε παράγραφο 26).

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Κλινικές παρατηρήσεις

28. Κάθε ποντικός πρέπει να εξετάζεται με προσοχή, τουλάχιστον μία φορά ημερησίως, για την ανίχνευση κλινικών σημείων είτε τοπικού ερεθισμού στο σημείο εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας είτε συστημικής τοξικότητας. Όλες οι παρατηρήσεις καταγράφονται συστηματικά σε χωριστό αρχείο για κάθε ποντικό. Τα σχέδια παρακολούθησης πρέπει να περιλαμβάνουν κριτήρια για τον ταχύ εντοπισμό, με σκοπό την ευθανασία, των ποντικών που εμφανίζουν συστημική τοξικότητα ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό ή διάβρωση του δέρματος (31).

Βάρος σώματος

29. Όπως αναφέρεται στην παράγραφο 25, το βάρος κάθε ζώου πρέπει να μετράται κατά την έναρξη της δοκιμής και κατά τον προγραμματισμένο χρόνο ευθανασίας.

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

30. Τα αποτελέσματα για κάθε ομάδα αγωγής εκφράζονται σε μέση τιμή SI. Ο SI προκύπτει με διαίρεση της μέσης τιμής του δείκτη σήμανσης BrdU/ποντικό κάθε ομάδας αγωγής με την ελεγχόμενη ουσία, όπως επίσης και της ομάδας θετικού μάρτυρα, διά της μέσης τιμής του δείκτη σήμανσης BrdU/ποντικό της ομάδας που υποβλήθηκε σε αγωγή με τον διαλύτη/ομάδας VC. Στην περίπτωση αυτή, ο μέσος SI για τις ομάδες VC ισούται με τη μονάδα.

Ο δείκτης σήμανσης BrdU ορίζεται ως εξής:

$$\text{Δείκτης σήμανσης BrdU} = (\text{ABS}_{em} - \text{ABS τυφλού}_{em}) - (\text{ABS}_{ref} - \text{ABS τυφλού}_{ref})$$

όπου: em = μήκος κύματος εκπομπής και ref = μήκος κύματος αναφοράς.

▼M3

31. Στη διαδικασία λήψης απόφασης, ένα αποτέλεσμα θεωρείται θετικό όταν SI ≥ 1,6 (10). Ωστόσο, όταν κρίνεται αν ένα οριακό αποτέλεσμα (δηλαδή τιμή SI από 1,6 έως 1,9) θα χαρακτηριστεί ή όχι θετικό, μπορούν επίσης να χρησιμοποιούνται η ισχύς της σχέσης δόσης-απόκρισης, η στατιστική σημαντικότητα και η σταθερότητα των αποκρίσεων των μαρτύρων που υποβάλλονται σε αγωγή με τον διαλύτη/φορέα και των θετικών μαρτύρων (3) (6) (32).

32. Προκειμένου να επιβεβαιώσουν οι χρήστες ότι μια οριακή θετική απόκριση με SI από 1,6 έως 1,9 αποτελεί θετικό αποτέλεσμα, μπορεί να επιθυμούν να λάβουν υπόψη τις τιμές του SI σε συνδυασμό με συμπληρωματικές πληροφορίες, όπως η σχέση δόσης-απόκρισης, τα στοιχεία συστημικής τοξικότητας ή υπέρμετρου ερεθισμού και, εφόσον ενδείκνυται, η στατιστική σημαντικότητα (10). Θα πρέπει επίσης να συνεκτιμώνται διάφορες ιδιότητες της ελεγχόμενης ουσίας, μεταξύ των οποίων το κατά πόσον έχει δομική σχέση με γνωστές ευαισθητοποιητικές για το δέρμα ουσίες, το κατά πόσον προκαλεί υπέρμετρο ερεθισμό του δέρματος του ποντικού και το είδος της σχέσης δόσης-απόκρισης που παρατηρήθηκε. Αυτά και άλλα κριτήρια αναλύονται στη βιβλιογραφική πηγή (4).

33. Η συλλογή δεδομένων σε επίπεδο μεμονωμένου ποντικού καθιστά δυνατή τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων για τη διαπίστωση της ύπαρξης σχέσης δόσης-απόκρισης και του βαθμού της σχέσης αυτής. Η ενδεχόμενη στατιστική εκτίμηση θα μπορούσε να περιλαμβάνει αξιολόγηση της σχέσης δόσης-απόκρισης, καθώς και κατάλληλα προσαρμοσμένες συγκρίσεις των ομάδων δοκιμής (π.χ. συγκρίσεις κατά ζεύγη μεταξύ της ομάδας που λαμβάνει τη δόση και της παράλληλης ομάδας-μάρτυρα που λαμβάνει τον διαλύτη/φορέα). Οι στατιστικές αναλύσεις είναι δυνατόν να περιλαμβάνουν, λόγου χάριν, γραμμική παλινδρόμηση ή δοκιμή William για την εκτίμηση των τάσεων της απόκρισης σε σχέση με τη δόση και δοκιμή Dunnett για τις συγκρίσεις κατά ζεύγη. Κατά την επιλογή της ενδεδειγμένης μεθόδου στατιστικής ανάλυσης, ο ερευνητής θα πρέπει να έχει επίγνωση των πιθανώς άνισων διακυμάνσεων (διασπορών) και άλλων συναφών προβλημάτων τα οποία ενδέχεται να επιβάλλουν μετασχηματισμό των δεδομένων ή μη παραμετρική στατιστική ανάλυση. Σε κάθε περίπτωση, ενδέχεται να χρειαστεί να εκτελέσει ο ερευνητής υπολογισμούς του SI και στατιστικές αναλύσεις με και χωρίς ορισμένα σημεία δεδομένων (καλούμενα μερικές φορές «έκτροπες τιμές»).

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ

Δεδομένα

34. Τα δεδομένα πρέπει να συγκεφαλαιώνονται με τη μορφή πίνακα, στον οποίο εμφαίνονται η τιμή του δείκτη σήμανσης BrdU για κάθε ζώο, ο ομαδικός μέσος δείκτης σήμανσης BrdU/ζώο, η σχετική στατιστική έκφραση του σφάλματος (π.χ. SD, SEM) και η μέση τιμή του SI για κάθε δοσολογική ομάδα σε σύγκριση με την παράλληλη ομάδα-μάρτυρα που υποβλήθηκε σε αγωγή με τον διαλύτη/φορέα.

Έκθεση δοκιμής

35. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιέχει τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη χημική ουσία και μάρτυρες:

— στοιχεία ταυτότητας (π.χ. αριθ. CAS και EC, εφόσον υπάρχουν, πηγή, καθαρότητα, γνωστές προσμίξεις, αριθμός παρτίδας),

— σύσταση και φυσικές και χημικές ιδιότητες (π.χ. πτητικότητα, σταθερότητα, διαλυτότητα),

— προκειμένου για μείγματα, σύνθεση και εκατοστιαία αναλογία των συστατικών.

Διαλύτης/φορέας:

— στοιχεία ταυτότητας (καθαρότητα, συγκέντρωση, κατά περίπτωση, όγκος που χρησιμοποιήθηκε),

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα.

▼M3

Ζώα της δοκιμής:

— προέλευση των ποντικών της φυλής CBA,

— μικροβιολογική κατάσταση των ζώων, εφόσον είναι γνωστή,

— αριθμός και ηλικία των ζώων,

— προέλευση των ζώων, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσιο κ.λπ.

Συνθήκες δοκιμής:

— προέλευση, αριθμός παρτίδας και δεδομένα του κατασκευαστή για τον ποιοτικό έλεγχο/διασφάλιση ποιότητας (ευαισθησία και εξειδίκευση του αντισώματος και όριο ανίχνευσης) του συνόλου αντιδραστηρίων (kit) για ELISA,

— λεπτομέρειες για την παρασκευή και εφαρμογή του δείγματος της ελεγχόμενης ουσίας,

— αιτιολόγηση της επιλογής των δόσεων (συμπεριλαμβανομένων των αποτελεσμάτων της δοκιμής προδιαλογής, εφόσον έχει διεξαχθεί),

— συγκεντρώσεις φορέα και ελεγχόμενης ουσίας που χρησιμοποιήθηκαν και συνολική ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας που χορηγήθηκε,

— λεπτομέρειες για την ποιότητα της τροφής και του νερού (μεταξύ άλλων, τύπος/προέλευση του σιτηρεσίου, προέλευση του νερού),

— λεπτομέρειες για τα προγράμματα αγωγής και δειγματοληψίας,

— μέθοδοι μέτρησης της τοξικότητας,

— κριτήρια χαρακτηρισμού της μελέτης ως θετικής ή αρνητικής,

— λεπτομέρειες για τυχόν παρεκκλίσεις από το πρωτόκολλο και επεξήγηση του τρόπου με τον οποίο αυτές επηρεάζουν τον σχεδιασμό και τα αποτελέσματα της μελέτης.

Έλεγχος αξιοπιστίας:

— περίληψη των αποτελεσμάτων του πιο πρόσφατου ελέγχου αξιοπιστίας, συμπεριλαμβανομένων πληροφοριών σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία, τη συγκέντρωση και τον φορέα που χρησιμοποιήθηκε,

— δεδομένα του εργαστηρίου δοκιμών που αφορούν τον παράλληλο και/ή ιστορικό θετικό μάρτυρα και τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα (αγωγή με τον διαλύτη/φορέα),

— εάν δεν συμπεριελήφθη στη δοκιμή παράλληλος θετικός μάρτυρας, ημερομηνία διεξαγωγής της πιο πρόσφατης περιοδικής δοκιμής με θετικό μάρτυρα και σχετική έκθεση του εργαστηρίου, καθώς και έκθεση με λεπτομερή ιστορικά δεδομένα του εργαστηρίου για τον θετικό μάρτυρα που δικαιολογούν την απόφαση να μη συμπεριληφθεί παράλληλος θετικός μάρτυρας.

Αποτελέσματα:

— βάρος κάθε ποντικού κατά την έναρξη της χορήγησης των δόσεων και κατά τον προγραμματισμένο χρόνο ευθανασίας· καθώς και μέση τιμή και σχετική στατιστική έκφραση του σφάλματος (π.χ. SD, SEM) για κάθε ομάδα αγωγής,

— για κάθε ζώο, χρόνος εκδήλωσης και εξέλιξη των σημείων τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένου τυχόν ερεθισμού του δέρματος στο σημείο χορήγησης,

— πίνακας με τις τιμές του δείκτη σήμανσης BrdU ανά ποντικό και τις τιμές SI για κάθε δοσολογική ομάδα αγωγής,

— για κάθε ομάδα αγωγής, μέση τιμή του δείκτη σήμανσης BrdU/ποντικό και σχετική στατιστική έκφραση του σφάλματος (π.χ. SD, SEM), καθώς και τα αποτελέσματα της ανάλυσης έκτροπων τιμών,

▼M3

— υπολογισμένος SI και κατάλληλο μέτρο μεταβλητότητας στο οποίο συνεκτιμάται η μεταβλητότητα μεταξύ των ζώων, τόσο της ομάδας που υποβάλλεται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία όσο και των ομάδων-μαρτύρων,

— σχέση δόσης-απόκρισης,

— στατιστικές αναλύσεις, κατά περίπτωση.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων:

— σύντομος σχολιασμός των αποτελεσμάτων, της ανάλυσης της σχέσης δόσης-απόκρισης και, κατά περίπτωση, των στατιστικών αναλύσεων, με γνωμάτευση για τον χαρακτηρισμό ή μη της ελεγχόμενης ουσίας ως ευαισθητοποιητικής για το δέρμα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. Food Chem. Toxicol., 34, 999-1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 34, 985-997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 36, 327-33.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicol., 146, 49-59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 258-273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 274-286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 249-257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication No. 10-7552A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm]

▼**M3**

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNA-PRPRept2009.pdf]

(12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. and Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. J. Appl. Toxicol., 25, 129-134.

(13) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). Food Chem. Toxicol., 46, 1896-1904.

(15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90-96.

(16) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(17) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(18) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. Toxicol., 238, 71-89.

(19) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. Toxicol., 93, 13-31.

(20) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. Toxicologist, 96, 235.

(22) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. Drug Chem. Toxicol., 21, 195-206.

(24) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. Toxicol. Appl. Pharmacol., 153, 83-94.

(25) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. Toxicol. Meth., 8, 245-256.

▼**M3**

(26) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. Drug. Chem. Toxicol., 22, 491-506.

(27) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter- laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. Toxicol., 212, 60-68.

(28) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? Arch. Toxicol., 79, 721-728.

(29) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. Environ. Health Perspect., 115, 1023-1028.

(30) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].

(31) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(32) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. J. Toxicol. Environ.l Health, 53, 563-79.

(33) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ορθότητα: η εγγύτητα της συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί μέτρο των επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς την «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας μεθόδου δοκιμών (33).

Ουσία συγκριτικής αξιολόγησης: ουσία, ευαισθητοποιητική ή μη, που χρησιμοποιείται ως πρότυπο για σύγκριση με ελεγχόμενη ουσία. Μια ουσία συγκριτικής αξιολόγησης πρέπει να διαθέτει τις ακόλουθες ιδιότητες: i) σταθερή(-ές) και αξιόπιστη(-ες) προέλευση(-εις), ii) δομική και λειτουργική αναλογία προς την τάξη των ελεγχόμενων ουσιών, iii) γνωστά φυσικά/χημικά χαρακτηριστικά, iv) δεδομένα τεκμηρίωσης γνωστών επιδράσεων και v) γνωστή ισχύ στο εύρος της επιθυμητής απόκρισης.

Ψευδαρνητικό αποτέλεσμα: ο εσφαλμένος χαρακτηρισμός ελεγχόμενης ουσίας ως αρνητικής ή μη δραστικής με μέθοδο δοκιμών, ενώ στην πραγματικότητα είναι θετική ή δραστική (33).

Ψευδοθετικό αποτέλεσμα: ο εσφαλμένος χαρακτηρισμός ελεγχόμενης ουσίας ως θετικής ή δραστικής με δοκιμή, ενώ στην πραγματικότητα είναι αρνητική ή μη δραστική (33).

Κίνδυνος: το δυναμικό δυσμενούς επίδρασης στην υγεία ή στο περιβάλλον. Η δυσμενής επίδραση εκδηλώνεται μόνο εάν τα επίπεδα έκθεσης είναι επαρκή.

Διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα: μέτρο του βαθμού στον οποίο διαφορετικά ειδικευμένα εργαστήρια μπορούν να επιτυγχάνουν ποιοτικά και ποσοτικά παραπλήσια αποτελέσματα, χρησιμοποιώντας το ίδιο πρωτόκολλο και υποβάλλοντας σε δοκιμή την ίδια ελεγχόμενη ουσία. Η διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα προσδιορίζεται κατά τις διαδικασίες προεπικύρωσης και επικύρωσης και αποτελεί ένδειξη του κατά πόσον υπάρχει δυνατότητα επιτυχούς μεταφοράς μιας δοκιμής μεταξύ εργαστηρίων· καλείται επίσης «αναπαραγωγιμότητα μεταξύ εργαστηρίων» (33).

Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα: προσδιορισμός του βαθμού στον οποίο ειδικευμένα άτομα μπορούν να επαναλάβουν με επιτυχία τα ίδια αποτελέσματα εντός του ίδιου εργαστηρίου, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένο πρωτόκολλο σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Καλείται επίσης «αναπαραγωγιμότητα εντός του εργαστηρίου» (33).

Έκτροπη τιμή: έκτροπη τιμή (outlier) είναι μια παρατήρηση σε τυχαίο δείγμα πληθυσμού η οποία διαφέρει σημαντικά από άλλες τιμές αυτού του δείγματος.

Διασφάλιση ποιότητας: διαχειριστική διαδικασία με την οποία αξιολογούνται, από άτομα ανεξάρτητα από εκείνα που εκτελούν τις δοκιμές, η τήρηση των προτύπων, των απαιτήσεων και των διαδικασιών τήρησης αρχείων που αφορούν τις εργαστηριακές δοκιμές, καθώς και η ορθότητα της μεταφοράς δεδομένων.

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια μέθοδος δοκιμών μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (33).

Δερματική ευαισθητοποίηση: ανοσολογική διαδικασία που είναι αποτέλεσμα της τοπικής έκθεσης ευπαθούς ατόμου σε επαγωγικό χημικό αλλεργιογόνο, το οποίο προκαλεί δερματική ανοσοαπόκριση που μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ευαισθητοποίησης εξ επαφής.

Δείκτης διέγερσης (SI): αριθμητική τιμή η οποία υπολογίζεται προκειμένου να εκτιμηθεί το δερματικό ευαισθητοποιητικό δυναμικό μιας ελεγχόμενης ουσίας και ισούται με την αναλογία του πολλαπλασιασμού στις ομάδες που υποβάλλονται σε αγωγή με την ουσία προς τον πολλαπλασιασμό στην ομάδα που υποβάλλεται ταυτόχρονα σε αγωγή με τον φορέα.

Ελεγχόμενη ουσία (καλούμενη επίσης «ελεγχόμενη χημική ουσία»): κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

▼M4

B.52. ΟΞΕΙΑ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ — ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΩΝ ΚΛΑΣΕΩΝ ΟΞΕΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 436 του ΟΟΣΑ (2009). Η πρώτη TG 403 για την οξεία αναπνευστική τοξικότητα εκδόθηκε το 1981 και έκτοτε έχει αναθεωρηθεί [βλέπε κεφάλαιο Β.2 του παρόντος παραρτήματος (1)]. Η ανάπτυξη μιας μεθόδου για τις κλάσεις οξείας τοξικότητας (ATC) μέσω αναπνευστικής έκθεσης (2) (3) (4) θεωρήθηκε κατάλληλη μετά την έκδοση της αναθεωρημένης μεθόδου ATC μέσω έκθεσης από το στόμα (κεφάλαιο Β.1γ του παρόντος παραρτήματος) (5). Η αναδρομική αξιολόγηση των επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών ATC για την οξεία αναπνευστική τοξικότητα κατέδειξε ότι η μέθοδος είναι κατάλληλη για χρήση στην ταξινόμηση και επισήμανση (6). Η μέθοδος δοκιμών ATC αναπνευστικής τοξικότητας επιτρέπει την εφαρμογή σειριακών σταδίων με καθορισμένες συγκεντρώσεις στόχο για την ταξινόμηση της τοξικότητας μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Η θνησιμότητα χρησιμοποιείται ως βασικό καταληκτικό σημείο. Ωστόσο, τα ζώα που πονούν πολύ, που εμφανίζουν έντονη δυσφορία, που υποφέρουν ή που είναι ετοιμοθάνατα πρέπει να θανατώνονται με μη βάναυσο τρόπο ώστε να ελαχιστοποιείται η ταλαιπωρία τους. Κατευθύνσεις για τα μη βάναυσα καταληκτικά σημεία παρέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 19 του ΟΟΣΑ (7).

2. Κατευθύνσεις για την εφαρμογή και την ερμηνεία της παρούσας μεθόδου δοκιμών περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης GD 39 για τη διεξαγωγή δοκιμών οξείας αναπνευστικής τοξικότητας (8).

3. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών παρέχονται στο προσάρτημα 1 και στο έγγραφο GD 39 (8).

4. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών παρέχει πληροφορίες για τις επικίνδυνες ιδιότητες και επιτρέπει την ταξινόμηση και κατάταξη των ελεγχόμενων χημικών ουσιών σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 για την ταξινόμηση των χημικών που προκαλούν οξεία τοξικότητα (9). Εάν απαιτούνται σημειακές εκτιμήσεις των τιμών LC_{50} ή αναλύσεις συγκέντρωσης-απόκρισης, το κεφάλαιο Β.2 του παρόντος παραρτήματος (1) αποτελεί κατάλληλη μέθοδο δοκιμών που θα πρέπει να εφαρμόζεται. Περαιτέρω κατευθύνσεις για την επιλογή μεθόδου δοκιμών περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 39 (8). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν προορίζεται συγκεκριμένα για τον έλεγχο εξειδικευμένων υλικών, όπως ασθενώς διαλυτών ισομετρικών ή ινωδών υλικών ή τεχνητών νανοϋλικών.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

5. Πριν από τη διεξαγωγή δοκιμών σύμφωνα με την παρούσα μέθοδο δοκιμών το εργαστήριο ελέγχου θα πρέπει να εξετάζει όλες τις διαθέσιμες πληροφορίες για την ελεγχόμενη χημική ουσία, συμπεριλαμβανομένων υφιστάμενων μελετών τα στοιχεία των οποίων θα υποστήριζαν τη μη διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών, ώστε να ελαχιστοποιείται η χρήση ζώων. Πληροφορίες που μπορούν να βοηθήσουν στην επιλογή των καταλληλότερων ειδών, στελεχών, φύλων, τρόπων έκθεσης και των κατάλληλων συγκεντρώσεων ελέγχου περιλαμβάνουν την ταυτότητα, τη χημική δομή και τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας· αποτελέσματα δοκιμών τοξικότητας *in vitro* ή *in vivo*· προβλεπόμενες χρήσεις και δυνητική έκθεση του ανθρώπου· διαθέσιμα δεδομένα (Q)SAR και τοξικολογικά δεδομένα για δομικά συγγενείς χημικές ουσίες. Συγκεντρώσεις που αναμένεται να προκαλούν έντονο πόρο και δυσφορία, λόγω της διαβρωτικής [1] ή ιδιαιτέρως ερεθιστικής τους δράσης, δεν πρέπει να ελέγχονται με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών [βλέπε έγγραφο GD 39 (8)].

[1] Η αξιολόγηση της διαβρωτικής ικανότητας θα πρέπει να βασίζεται σε εμπειρογνωμοσύνη με τη χρήση στοιχείων όπως η πείρα σε ανθρώπους και ζώα, υπάρχοντα δεδομένα (in vitro), π.χ. βάσει των κεφαλαίων Β.40 (10) και Β.40β (11) του παρόντος παραρτήματος ή της κατευθυντήριας γραμμής δοκιμών 435 του ΟΟΣΑ (12), τιμές pH, πληροφορίες για παρόμοιες χημικές ουσίες ή οποιαδήποτε άλλα συναφή δεδομένα.

▼M4

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

6. Η δοκιμή βασίζεται σε μια βαθμιδωτή διαδικασίας μέσω της οποίας λαμβάνονται επαρκείς πληροφορίες για την οξεία αναπνευστική τοξικότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας κατά τη διάρκεια μιας περιόδου έκθεσης 4 ωρών, ώστε να καθίσταται δυνατή η ταξινόμησή της. Ενδέχεται να εφαρμόζονται άλλοι χρόνοι έκθεσης για την εξυπηρέτηση ειδικών κανονιστικών σκοπών. Σε καθένα από τα καθορισμένα στάδια συγκέντρωσης, ελέγχονται 3 ζώα από κάθε φύλο. Ανάλογα με τον αριθμό των ζώων που πεθαίνουν και/ή βρίσκονται σε ετοιμοθάνατη κατάσταση, ενδέχεται να επαρκούν 2 στάδια για την εκτίμηση της οξείας τοξικότητας της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Εάν υπάρχουν αποδεικτικά στοιχεία ότι ένα φύλο είναι πιο ευπαθές από το άλλο, τότε η δοκιμή ενδέχεται να συνεχιστεί μόνο με το πλέον ευπαθές φύλο. Το αποτέλεσμα του προηγούμενου σταδίου καθορίζει το επόμενο στάδιο, έτσι ώστε:

α) να μην απαιτείται περαιτέρω δοκιμή·

β) να πραγματοποιούνται δοκιμές σε τρία ζώα ανά φύλο· ή

γ) να πραγματοποιούνται δοκιμές σε 6 ζώα του πλέον ευπαθούς φύλου μόνο· ήτοι οι εκτιμήσεις κατώτερου ορίου της κλάσης τοξικότητας πρέπει να βασίζονται σε 6 ζώα ανά ομάδα συγκέντρωσης, ανεξαρτήτως φύλου.

7. Τα ετοιμοθάνατα ζώα, καθώς και εκείνα που παρουσιάζουν σαφή σημεία πόνου ή έντονης και διαρκούς δυσφορίας, θανατώνονται με ευθανασία και λαμβάνονται υπόψη στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων με τον ίδιο τρόπο όπως τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη δοκιμή. Τα κριτήρια για τη λήψη της απόφασης να θανατωθούν ετοιμοθάνατα ή βαρέως πάσχοντα ζώα, καθώς και οι κατευθύνσεις για την αναγνώριση των ενδείξεων προβλέψιμου ή επικείμενου θανάτου, αποτελούν το αντικείμενο του εγγράφου καθοδήγησης αριθ. 19 για τα λιγότερο βάναυσα καταληκτικά σημεία (7).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Επιλογή των ειδών ζώων

8. Πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή, νεαρά ενήλικα ζώα των συνήθων εργαστηριακών φυλών. Το προτιμώμενο είδος είναι ο επίμυς και εάν χρησιμοποιούνται άλλα είδη πρέπει να παρέχεται σχετική αιτιολόγηση.

Προετοιμασία των ζώων

9. Τα θηλυκά πρέπει να είναι άτοκα και να μη βρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης. Κατά την ημέρα της έκθεσης, τα ζώα θα πρέπει να είναι νεαρά ενήλικα, ηλικίας 8 έως 12 εβδομάδων, ενώ το εύρος της διακύμανσης βαρών των ζώων δεν πρέπει να υπερβαίνει το ± 20 % του μέσου βάρους για κάθε φύλο οποιωνδήποτε προηγουμένως εκτεθειμένων ζώων της ίδιας ηλικίας. Τα ζώα επιλέγονται τυχαία και σημαίνονται με τρόπο που επιτρέπει την αναγνώριση του καθενός. Τα ζώα διατηρούνται στους κλωβούς τους επί 5 τουλάχιστον ημέρες πριν από την έναρξη της δοκιμής προκειμένου να εγκλιματιστούν στις συνθήκες του εργαστηρίου. Τα ζώα πρέπει επίσης να εγκλιματίζονται στην πειραματική συσκευή για σύντομο χρονικό διάστημα πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμής, καθώς αυτό θα μειώσει το άγχος που προκαλείται από την εισαγωγή στο νέο περιβάλλον.

Ζωοτεχνία

10. Η θερμοκρασία στην αίθουσα πειραματόζωων θα πρέπει να είναι 22 ± 3 °C. Η σχετική υγρασία θα πρέπει να διατηρείται, σε ιδανικές συνθήκες, εντός ενός εύρους 30 έως 70 %, αν και αυτό ενδέχεται να μην είναι δυνατόν όταν χρησιμοποιείται το νερό ως φορέας. Πριν και μετά την έκθεση, τα ζώα πρέπει γενικά να στεγάζονται σε κλωβούς σε ομάδες ανά φύλο και συγκέντρωση, αλλά ο αριθμός των ζώων ανά κλωβό δεν πρέπει να εμποδίζει την παρατήρηση κάθε ζώου, ενώ θα πρέπει να ελαχιστοποιεί τυχόν απώλειες λόγω κανιβαλισμού ή μαχών. Όταν τα ζώα πρόκειται να εκτεθούν μόνο ρινικά, ενδέχεται να είναι απαραίτητο να εγκλιματίζονται στους σωλήνες συγκράτησης. Οι σωλήνες συγκράτησης δεν θα πρέπει να προκαλούν περιττή φυσική, θερμική δυσφορία ή δυσφορία λόγω ακινητοποίησης στα

▼M4

ζώα. Η συγκράτηση ενδέχεται να επηρεάζει τα φυσικά καταληκτικά σημεία, όπως τη θερμοκρασία του σώματος (υπερθερμία) και/ή τον όγκο του αναπνεόμενου αέρα ανά λεπτό. Εάν υπάρχουν διαθέσιμα γενικά δεδομένα που δείχνουν ότι δεν προκαλούνται τέτοιες αλλαγές σε σημαντικό βαθμό, τότε δεν είναι απαραίτητη η προκαταρκτική προσαρμογή στους σωλήνες συγκράτησης. Τα ζώα που εκτίθενται ολόσωμα σε αερόλυμα θα πρέπει να στεγάζονται ατομικά κατά τη διάρκεια της έκθεσης, ώστε να αποφεύγεται η διήθηση του ελεγχόμενου αερολύματος μέσω του τριχώματος των ζώων που στεγάζονται στον ίδιο κλωβό. Μπορούν να χρησιμοποιούνται συμβατικά και πιστοποιημένα εργαστηριακά σιτηρέσια, εκτός από την περίοδο έκθεσης, συνοδευόμενα από απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού από το δίκτυο ύδρευσης. Ο φωτισμός θα πρέπει να είναι τεχνητός, με φωτοπερίοδο 12 ωρών.

Θάλαμοι εισπνοής

11. Κατά την επιλογή θαλάμου εισπνοής θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη η φύση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και ο στόχος της δοκιμής. Προτιμώμενος τρόπος έκθεσης είναι η ρινική έκθεση (ο εν λόγω όρος περιλαμβάνει κεφαλική, ρινική ή ρυγχική έκθεση). Η ρινική έκθεση προτιμάται γενικά για μελέτες με υγρά ή στερεά αερολύματα και για ατμούς που ενδέχεται να συμπυκνώνονται σε αερολύματα. Ειδικοί στόχοι της μελέτης μπορεί να επιτυγχάνονται καλύτερα με μέθοδο ολόσωμης έκθεσης, αλλά αυτό θα πρέπει να αιτιολογείται στην έκθεση της μελέτης. Για να εξασφαλίζεται η σταθερότητα της ατμόσφαιρας κατά τη χρήση θαλάμου ολόσωμης έκθεσης, ο συνολικός όγκος των ελεγχόμενων ζώων δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 5 % του όγκου του θαλάμου. Οι αρχές των τεχνικών ρινικής και ολόσωμης έκθεσης, καθώς και τα ιδιαίτερα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά τους, περιγράφονται στο έγγραφο GD 39 (8).

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΚΘΕΣΗΣ

Χορήγηση των συγκεντρώσεων

12. Συνιστάται να εφαρμόζεται καθορισμένη διάρκεια έκθεσης τεσσάρων ωρών, εκτός του χρόνου εξισορρόπησης. Ενδέχεται να απαιτείται επιλογή διαφορετικής διάρκειας για την εκπλήρωση συγκεκριμένων απαιτήσεως. Ωστόσο, σχετική αιτιολόγηση πρέπει να παρέχεται στην έκθεση της μελέτης [βλ GD 39 (8)]. Τα ζώα που εκτίθενται σε θαλάμους ολόσωμης έκθεσης θα πρέπει να στεγάζονται απομονωμένα ώστε να αποφευχθεί η κατάποση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας κατά την περιποίηση από τα άλλα ζώα που στεγάζονται στον κλωβό. Κατά την περίοδο έκθεσης τα ζώα θα πρέπει να στερούνται τροφής. Νερό μπορεί να παρέχεται καθ' όλη τη διάρκεια της ολόσωμης έκθεσης.

13. Τα ζώα εκτίθενται στην ελεγχόμενη ουσία σε μορφή αερίου, ατμού, αερολύματος ή μείγματος αυτών. Η φυσική κατάσταση που ελέγχεται εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, την επιλεχθείσα συγκέντρωση και/ή τη φυσική μορφή που είναι πιθανότερο να υπάρχει κατά τον χειρισμό και τη χρήση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Υγροσκοπικές και χημικά δραστικές ελεγχόμενες χημικές ουσίες θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή υπό συνθήκες ξηρού αέρα. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μην παράγονται εκρηκτικές συγκεντρώσεις.

Κατανομή μεγέθους σωματιδίων

14. Πρέπει να προσδιορίζεται η κατανομή μεγέθους σωματιδίων για όλα τα αερολύματα και για τους ατμούς που ενδέχεται να συμπυκνυκνωθούν σε αερολύματα. Για να είναι δυνατή η έκθεση όλων των σχετικών περιοχών της αναπνευστικής οδού, συνιστώνται αερολύματα με διάμεσο αεροδυναμικής διαμέτρου κατά μάζα (MMAD) 1 έως 4 μm, με γεωμετρική τυπική απόκλιση (σ_g) από 1,5 έως 3,0 (8) (13) (14). Παρόλο που θα πρέπει να καταβάλλονται εύλογες προσπάθειες για τη συμμόρφωση με το πρότυπο αυτό, εάν αυτό δεν είναι δυνατό θα πρέπει να πραγματοποιείται εμπειρογνωμοσύνη. Παραδείγματος χάριν, καπνοί μετάλλων ενδέχεται να υπολείπονται του προτύπου αυτού, ενώ φορτισμένα σωματίδια, ίνες και υγροσκοπικά υλικά (των οποίων το μέγεθος αυξάνεται στο υγρό περιβάλλον της αναπνευστικής οδού) ενδέχεται να το υπερβαίνουν.

▼M4

Παρασκεύασμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε φορέα

15. Μπορεί να χρησιμοποιείται φορέας για την παραγωγή κατάλληλης συγκέντρωσης και μεγέθους σωματιδίων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην ατμόσφαιρα. Κατά κανόνα, θα πρέπει να προτιμάται το νερό. Τα σωματιδιακά υλικά μπορούν να υποβάλλονται σε μηχανικές διεργασίες ώστε να επιτυγχάνεται η απαιτούμενη κατανομή μεγέθους σωματιδίων, αλλά θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μην αποσυντίθεται και να μην αλλοιώνεται η ελεγχόμενη χημική ουσία. Στις περιπτώσεις που θεωρείται ότι μηχανικές διεργασίες έχουν αλλοιώσει τη χημική σύσταση της ουσίας (π.χ. ακραίες θερμοκρασίες από υπερβολική άλεση λόγω τριβής), η σύσταση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας θα πρέπει να εξακριβώνεται αναλυτικά. Θα πρέπει να λαμβάνεται κατάλληλη μέριμνα, ώστε να μη μολύνεται η ελεγχόμενη χημική ουσία. Δεν είναι απαραίτητο να υποβάλλονται σε δοκιμή μη εύθρυπτα κοκκώδη υλικά που έχουν σκοπίμως συντεθεί έτσι ώστε να είναι μη εισπνεύσιμα. Θα πρέπει να διεξάγεται δοκιμή αντοχής στη φθορά λόγω τριβής ώστε να αποδεικνύεται ότι δεν παράγονται εισπνεύσιμα σωματίδια κατά τον χειρισμό κοκκώδους υλικού. Εάν παράγονται εισπνεύσιμα σωματίδια κατά τη δοκιμή αντοχής στη φθορά λόγω τριβής, θα πρέπει να εκτελείται δοκιμή αναπνευστικής τοξικότητας.

Ζώα-μάρτυρες

16. Δεν είναι απαραίτητη μια παράλληλη ομάδα αρνητικών (αέρας) μαρτύρων. Όταν χρησιμοποιείται άλλος φορέας εκτός από το νερό για τη δημιουργία της πειραματικής ατμόσφαιρας, θα πρέπει να χρησιμοποιείται ομάδα-μάρτυρας για τον φορέα μόνο όταν δεν υπάρχουν διαθέσιμα ιστορικά δεδομένα αναπνευστικής τοξικότητας. Εάν η μελέτη τοξικότητας μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας που έχει μορφοποιηθεί σε φορέα δεν αποκαλύψει τοξικότητα, θεωρείται ότι ο φορέας δεν είναι τοξικός στην ελεγχόμενη συγκέντρωση. Συνεπώς δεν απαιτείται μάρτυρας για τον φορέα.

ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΕΚΘΕΣΗΣ

Ροή αέρα στον θάλαμο

17. Η ροή του αέρα μέσω του θαλάμου πρέπει να ελέγχεται προσεκτικά, να παρακολουθείται συνεχώς και να καταγράφεται τουλάχιστον σε ωριαία βάση κατά τη διάρκεια κάθε έκθεσης. Η παρακολούθηση της ελεγχόμενης συγκέντρωσης στην ατμόσφαιρα (ή σταθερότητα) περιλαμβάνει ολοκληρωτική μέτρηση όλων των δυναμικών παραμέτρων και αποτελεί έμμεσο τρόπο ελέγχου όλων των σχετικών δυναμικών παραμέτρων παραγωγής της ατμόσφαιρας. Θα πρέπει να δίδεται προσοχή ώστε να αποφεύγεται η εκ νέου αναπνοή σε θαλάμους ρινικής έκθεσης στις περιπτώσεις που η ροή του αέρα μέσω του συστήματος έκθεσης είναι ανεπαρκής για την παροχή δυναμικής ροής ατμόσφαιρας της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Υπάρχουν προβλεπόμενες μεθοδολογίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αποδειχθεί ότι δεν πραγματοποιείται εκ νέου αναπνοή υπό τις επιλεγμένες συνθήκες λειτουργίας (8) (15). Η συγκέντρωση οξυγόνου πρέπει να είναι τουλάχιστον 19 % και η συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1 %. Εάν υπάρχει λόγος να θεωρείται ότι δεν μπορεί να υπάρξει συμμόρφωση με τα πρότυπα αυτά, πρέπει να μετρώνται οι συγκεντρώσεις οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα.

Θερμοκρασία και σχετική υγρασία του θαλάμου

18. Η θερμοκρασία του θαλάμου πρέπει να διατηρείται στους 22 ± 3 °C. Η σχετική υγρασία στη ζώνη αναπνοής των ζώων, τόσο για ρινική όσο και για ολόσωμη έκθεση, θα πρέπει να παρακολουθείται και να καταγράφεται τουλάχιστον τρεις φορές στην περίπτωση έκθεσης έως 4 ωρών, και ανά ώρα στην περίπτωση έκθεσης μικρότερης διάρκειας. Η σχετική υγρασία θα πρέπει σε ιδανικές συνθήκες να διατηρείται σε επίπεδα από 30 έως 70 %, αλλά αυτό μπορεί να είναι είτε ανέφικτο (π.χ. κατά τη δοκιμή μειγμάτων που έχουν ως βάση το νερό) ή μη μετρήσιμο λόγω του αλληλεπίδρασης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας με τη μέθοδο δοκιμών.

▼M4

Ελεγχόμενη χημική ουσία: ονομαστική συγκέντρωση

19. Εάν είναι εφικτό, θα πρέπει να υπολογίζεται και να καταγράφεται η ονομαστική συγκέντρωση στον θάλαμο έκθεσης. Η ονομαστική συγκέντρωση ορίζεται ως η μάζα της παραγόμενης ελεγχόμενης χημικής ουσίας διά του συνολικού όγκου αέρα που διαβιβάζεται μέσω του συστήματος έκθεσης. Η ονομαστική συγκέντρωση δεν χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό της έκθεσης των ζώων, αλλά μια σύγκριση της ονομαστικής συγκέντρωσης και της πραγματικής συγκέντρωσης αποτελεί ένδειξη της αποτελεσματικότητας παραγωγής του συστήματος δοκιμών και, συνεπώς, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανακάλυψη προβλημάτων παραγωγής.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: πραγματική συγκέντρωση

20. Η πραγματική συγκέντρωση ορίζεται ως η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας στη ζώνη αναπνοής των ζώων σε θάλαμο εισπνοής. Οι πραγματικές συγκεντρώσεις μπορούν να ληφθούν είτε με ειδικές μεθόδους (π.χ. άμεση δειγματοληψία, μέθοδοι προσρόφησης ή χημικής αντίδρασης και επακόλουθος αναλυτικός χαρακτηρισμός) είτε με μη ειδικές μεθόδους, όπως η σταθμική ανάλυση με ηθμό. Η χρήση σταθμικής ανάλυσης είναι αποδεκτή μόνο για αερολύματα σκόνης με ένα μέρος ή για αερολύματα υγρών χαμηλής πτητικότητας και θα πρέπει να υποστηρίζεται από κατάλληλους χαρακτηρισμούς της ελεγχόμενης ουσίας πριν από τη μελέτη. Η συγκέντρωση αερολυμάτων σκόνης με πολλά μέρη μπορεί επίσης να προσδιοριστεί με σταθμική ανάλυση. Ωστόσο, απαιτούνται για αυτό αναλυτικά δεδομένα που αποδεικνύουν ότι η σύνθεση του αερομεταφερόμενου υλικού είναι παρόμοια με το αρχικό υλικό. Εάν οι πληροφορίες αυτές δεν είναι διαθέσιμες, ενδέχεται να απαιτείται εκ νέου ανάλυση της ελεγχόμενης ουσίας (ιδανικά, στην αερομεταφερόμενη κατάσταση) ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της μελέτης. Σε ουσίες σε μορφή αερολύματος που ενδέχεται να εξατμίζονται ή να εξαχνίζονται, θα πρέπει να αποδεικνύεται ότι όλες οι φάσεις έχουν συλλεχθεί με την επιλεχθείσα μέθοδο. Οι επιδιωκόμενες συγκεντρώσεις, οι ονομαστικές και οι πραγματικές συγκεντρώσεις θα πρέπει να αναφέρονται στην έκθεση μελέτης, αλλά μόνο οι πραγματικές συγκεντρώσεις χρησιμοποιούνται σε στατιστικές αναλύσεις για τον υπολογισμό τιμών θανατηφόρας συγκέντρωσης.

21. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται μία παρτίδα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, εάν είναι δυνατό, και το ελεγχόμενο δείγμα θα πρέπει να αποθηκεύεται υπό συνθήκες που διατηρούν την καθαρότητά του, την ομοιογένειά του και τη σταθερότητά του. Πριν από την έναρξη της μελέτης, η ελεγχόμενη ουσία θα πρέπει να χαρακτηρίζεται, ως προς την καθαρότητά της και, εάν είναι τεχνικά εφικτό, ως προς την ταυτότητα και τις ποσότητες τυχόν εντοπισθέντων ρύπων και προσμείξεων. Αυτό μπορεί να αποδειχθεί, μεταξύ άλλων, από τα ακόλουθα δεδομένα: χρόνος κατακράτησης και σχετική ζώνη κορυφής, μοριακό βάρος μέσω αναλύσεων φασματομετρίας μάζας ή αεριοχρωματογραφίας ή άλλες εκτιμήσεις. Παρόλο που η ταυτότητα του ελεγχόμενου δείγματος δεν αποτελεί ευθύνη του εργαστηρίου ελέγχου, θα ήταν σκόπιμο να επιβεβαιώνει το εργαστήριο τον χαρακτηρισμό από τον χορηγό, έστω και σε περιορισμένη έκταση (π.χ. χρώμα, φυσική κατάσταση κ.λπ.).

22. Η ατμόσφαιρα έκθεσης διατηρείται σταθερή στο μέτρο του εφικτού και παρακολουθείται συνεχώς και/ή κατά διαστήματα ανάλογα με τη μέθοδο ανάλυσης. Όταν εφαρμόζεται δειγματοληψία κατά διαστήματα, θα πρέπει να λαμβάνονται δείγματα της ατμόσφαιρας του θαλάμου τουλάχιστον δύο φορές κατά τη διάρκεια μελέτης τεσσάρων ωρών. Εάν δεν είναι εφικτό λόγω περιορισμένου ρυθμού ροής αέρα ή χαμηλών συγκεντρώσεων, μπορεί να λαμβάνεται ένα δείγμα καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης. Εάν εμφανίζονται έντονες διακυμάνσεις μεταξύ των δειγμάτων, στις επόμενες συγκεντρώσεις που θα υποβληθούν σε δοκιμή θα πρέπει να λαμβάνονται τέσσερα δείγματα ανά έκθεση. Τα επιμέρους δείγματα συγκέντρωσης από τον θάλαμο δεν θα πρέπει να αποκλίνουν από τη μέση συγκέντρωση στον θάλαμο περισσότερο από ± 10 % για αέρια και ατμούς ή ± 20 % για υγρά ή στερεά αερολύματα. Ο χρόνος για την εξισορρόπηση του θαλάμου (t_{95}) πρέπει να υπολογίζεται και να καταγράφεται. Η διάρκεια της έκθεσης καλύπτει τον χρόνο παραγωγής της ελεγχόμενης ουσίας, στον οποίο λαμβάνονται υπόψη οι χρόνοι που απαιτούνται για την επίτευξη του t_{95}. Καθοδήγηση για την εκτίμηση του t_{95} παρέχει το έγγραφο GD 39 (8).

▼M4

23. Για πολύ περίπλοκα μείγματα που αποτελούνται από ατμούς/αέρια και αερολύματα (π.χ. ατμόσφαιρες καύσης και ελεγχόμενα χημικά εκπεμπόμενα από στοχοστρεφή προϊόντα/συσκευές τελικής χρήσης), κάθε φάση ενδέχεται να συμπεριφέρεται διαφορετικά σε θάλαμο εισπνοής. Έτσι, θα πρέπει να επιλέγεται τουλάχιστον μία ουσία δείκτης (αναλύτης), συνήθως η κύρια δραστική ουσία του μείγματος, σε κάθε φάση (ατμός/αέριο και αερόλυμα). Όταν η ελεγχόμενη ουσία είναι μείγμα, η αναλυτική συγκέντρωση θα πρέπει να αναφέρεται για ολόκληρο το μείγμα και όχι μόνο για τη δραστική ουσία ή το συστατικό (αναλύτης). Πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με τις πραγματικές συγκεντρώσεις παρέχονται στο έγγραφο GD 39 (8).

Ελεγχόμενη χημική ουσία: κατανομή μεγέθους σωματιδίων

24. Η κατανομή μεγέθους σωματιδίων των αερολυμάτων θα πρέπει να προσδιορίζεται τουλάχιστον δύο φορές κατά τη διάρκεια κάθε τετράωρης έκθεσης με τη χρήση κρουστικού διαχωριστήρα ή εναλλακτικού οργάνου, όπως ο αεροδυναμικός κατανεμητής σωματιδίων. Εάν μπορεί να αποδειχθεί ισοδυναμία των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται μέσω κρουστικού διαχωριστήρα ή εναλλακτικού οργάνου, το εναλλακτικό όργανο μπορεί να χρησιμοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης. Παράλληλα με το κύριο όργανο θα πρέπει να χρησιμοποιείται μια δεύτερη συσκευή, όπως ένα σταθμικό φίλτρο ή πλυντρίδα αερίου/φυσαλιδοδείκτης, για να επιβεβαιώνει την απόδοση συλλογής του κύριου οργάνου. Η συγκέντρωση μάζας που λαμβάνεται μέσω ανάλυσης μεγέθους σωματιδίων θα πρέπει να είναι εντός των εύλογων ορίων συγκέντρωσης μάζας που λαμβάνονται μέσω ανάλυσης με φίλτρο [βλέπε GD 39 (8)]. Εάν είναι δυνατόν να αποδειχθεί ισοδυναμία σε αρχικό στάδιο της μελέτης, οι περαιτέρω επιβεβαιωτικές μετρήσεις μπορούν να παραλείπονται. Για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων, θα πρέπει να λαμβάνονται μέτρα ώστε να ελαχιστοποιούνται τα αβέβαια δεδομένα που ενδέχεται να οδηγούν σε ανάγκη επανάληψης μιας έκθεσης. Θα πρέπει να προσδιορίζεται η κατανομή μεγέθους σωματιδίων στην περίπτωση των ατμών, εάν υπάρχει πιθανότητα η συμπύκνωση των ατμών να οδηγήσει στον σχηματισμό αερολύματος ή εάν εντοπίζονται σε ατμόσφαιρα ατμών σωματίδια με δυναμικό πρόκλησης μεικτών φάσεων (βλέπε παράγραφο 14).

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Κυρίως δοκιμή

25. Σε κάθε στάδιο χρησιμοποιούνται τρία ζώα ανά φύλο ή έξι ζώα του πλέον ευπαθούς φύλου. Σε περίπτωση ρινικής έκθεσης άλλων ειδών τρωκτικών εκτός των επιμύων, οι μέγιστες περίοδοι έκθεσης μπορούν να προσαρμόζονται ώστε να ελαχιστοποιείται η δυσφορία που νιώθει το κάθε είδος. Το επίπεδο συγκέντρωσης που χρησιμοποιείται ως αρχική δόση επιλέγεται μεταξύ των τεσσάρων καθορισμένων επιπέδων και το αρχικό επίπεδο συγκέντρωσης θα πρέπει να είναι αυτό που είναι πιθανότερο να προκαλέσει τοξικότητα σε ορισμένα από τα εκτεθειμένα ζώα. Τα συστήματα δοκιμής αερίων, ατμών και αερολυμάτων (που περιλαμβάνονται στα προσαρτήματα 2-4) αντιπροσωπεύουν τη δοκιμή με τις κρίσιμες τιμές των κατηγοριών 1-4 του κανονισμού CLP (9) για τα αέρια (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4h) (προσάρτημα 2), για τους ατμούς (0,5, 2, 10, 20 mg/l/4h) (προσάρτημα 3) και για τα αερολύματα (0,05, 0,5, 1, 5 mg/l/4h) (προσάρτημα 4). Η κατηγορία 5, η οποία δεν εφαρμόζεται στον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 (9), αφορά συγκεντρώσεις ανώτερες των αντίστοιχων οριακών συγκεντρώσεων. Για κάθε αρχική συγκέντρωση, εφαρμόζεται το αντίστοιχο σύστημα δοκιμής. Ανάλογα με τον αριθμό των θανατωθέντων με ανώδυνο τρόπο ή νεκρών ζώων η διαδικασία δοκιμής ακολουθεί την πορεία που δείχνουν τα αντίστοιχα βέλη, έως ότου είναι δυνατό να γίνει κατηγοριοποίηση.

26. Το χρονικό διάστημα μεταξύ των εκθέσεων στις οποίες υποβάλλονται οι ομάδες καθορίζεται από τον χρόνο εμφανίσεως, τη διάρκεια και τη σοβαρότητα των τοξικών εκδηλώσεων. Η έκθεση ζώων στο επόμενο επίπεδο συγκέντρωσης θα πρέπει να καθυστερεί έως ότου υπάρχει εύλογη πεποίθηση ότι τα ζώα που υποβλήθηκαν στην προηγούμενη δοκιμή θα επιβιώσουν. Συνιστάται να μεσολαβεί διάστημα τριών ή τεσσάρων ημερών μεταξύ των εκθέσεων σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης ώστε να είναι δυνατή η παρατήρηση καθυστερημένων εκδηλώσεων τοξικότητας. Το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί ενδέχεται να προσαρμόζεται κατά περίπτωση, π.χ. στην περίπτωση αβέβαιων αποκρίσεων.

▼M4

Οριακή δοκιμή

27. Οριακή δοκιμή χρησιμοποιείται όταν η ελεγχόμενη ουσία είναι γνωστή ή αναμένεται να είναι ουσιαστικά μη τοξική, ήτοι, να προκαλεί τοξικές επιδράσεις μόνο μόνον εάν ληφθεί σε δόσεις μεγαλύτερες από τις οριακές τιμές που προβλέπονται στις νομοθετικές ρυθμίσεις. Στοιχεία σχετικά με την τοξικότητα της ελεγχόμενης ουσίας είναι δυνατόν να συναχθούν από τα αποτελέσματα δοκιμών που έχουν διεξαχθεί με ανάλογες ουσίες ή μείγματα, λαμβάνοντας υπόψη την ταυτότητα και την εκατοστιαία αναλογία των σημαντικών από τοξικολογική άποψη συστατικών. Στις περιπτώσεις που δεν υπάρχουν καθόλου ή υπάρχουν ελάχιστα στοιχεία για την τοξικότητα της ελεγχόμενης ουσίας ή εάν η τελευταία αναμένεται να είναι τοξική, πρέπει να διεξάγεται η κυρίως δοκιμή [περαιτέρω καθοδήγηση παρέχει το έγγραφο GD 39 (8)].

28. Κατά τη συνήθη διαδικασία, τρία ζώα ανά φύλο ή έξι ζώα του πλέον ευπαθούς φύλου εκτίθενται σε συγκεντρώσεις 20 000 ppm στην περίπτωση αερίων, 20 mg/l στην περίπτωση ατμών και 5 mg/l στην περίπτωση σκονών/σταγονιδίων, αντιστοίχως (εάν είναι εφικτό), διαδικασία η οποία λειτουργεί ως οριακή δοκιμή στην παρούσα μέθοδο δοκιμών. Κατά τη διεξαγωγή δοκιμών με αερολύματα, κύριος στόχος θα πρέπει να είναι η επίτευξη εισπνεύσιμου μεγέθους σωματιδίων (ήτοι, MMAD 1-4 μm). Αυτό είναι δυνατό με τις περισσότερες ελεγχόμενες χημικές ουσίες σε συγκέντρωση 2 mg/l. Ο έλεγχος αερολυμάτων σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 2 mg/l θα πρέπει να επιχειρείται μόνο εάν είναι δυνατόν να επιτευχθεί εισπνεύσιμο μέγεθος σωματιδίων [βλέπε GD 39 (8)]. Σύμφωνα με το Παγκόσμιο Εναρμονισμένο Σύστημα (GHS) (16), η διεξαγωγή δοκιμών πάνω από μια οριακή συγκέντρωση δεν συνιστάται για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων. Το ενδεχόμενο διεξαγωγής δοκιμών με δόσεις της κλίμακας που ορίζει την κατηγορία 5 του GHS (16), η οποία δεν εφαρμόζεται στον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 (9), θα πρέπει να εξετάζεται μόνο στην περίπτωση που είναι πολύ πιθανόν τα αποτελέσματα μιας τέτοιας δοκιμής να έχουν άμεση σχέση με την προστασία της υγείας των ανθρώπων και εφόσον παρέχεται αιτιολόγηση στην έκθεση μελέτης. Στην περίπτωση δυνητικώς εκρήξιμων ελεγχόμενων ουσιών, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγονται οι συνθήκες που ευνοούν εκρήξεις. Για να αποφεύγεται η περιττή χρήση των ζώων, θα πρέπει να διεξάγεται δοκιμαστική διαδικασία χωρίς ζώα πριν από την οριακή δοκιμή ώστε να εξασφαλίζεται η δυνατότητα επίτευξης των απαραιτήτων συνθηκών θαλάμου για μια οριακή δοκιμή.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

29. Τα ζώα θα πρέπει να υποβάλλονται σε κλινική εξέταση συχνά κατά τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης. Έπειτα από την έκθεση, τα ζώα υποβάλλονται σε κλινική παρατήρηση τουλάχιστον δύο φορές την ημέρα της έκθεσης ή συχνότερα εάν είναι αναγκαίο ανάλογα με την απόκριση του ζώου στην αγωγή, και, στη συνέχεια, τουλάχιστον μια φορά ημερησίως για 14 ημέρες συνολικά. Η διάρκεια της περιόδου παρατήρησης δεν είναι προκαθορισμένη αλλά θα πρέπει να προσδιορίζεται βάσει της φύσης και του χρόνου εμφάνισης κλινικών εκδηλώσεων, καθώς και της διάρκειας της περιόδου ανάκαμψης. Ο χρόνος εμφανίσεως και εξαφανίσεως των τοξικών εκδηλώσεων είναι σημαντικός, ιδίως εάν παρατηρείται τάση καθυστερημένης εμφάνισης τοξικών συμπτωμάτων. Όλες οι παρατηρήσεις καταγράφονται συστηματικά και χωριστά για κάθε ζώο. Ζώα ετοιμοθάνατα ή που παρουσιάζουν έντονο πόνο και επίμονη σοβαρή δυσφορία πρέπει να θανατώνονται με ανώδυνο τρόπο για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων. Πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα κατά τη διεξαγωγή εξετάσεων για κλινικές εκδηλώσεις τοξικότητας, ώστε οι μειωμένες αρχικές εκδηλώσεις και οι παροδικές μεταβολές στην αναπνοή που προκαλούνται από τη διαδικασία της έκθεσης, να μην θεωρηθούν εσφαλμένα ως σχετικές με την αγωγή επιδράσεις. Οι αρχές και τα κριτήρια που συνοψίζονται στο έγγραφο καθοδήγησης για τα λιγότερο βάναυσα καταληκτικά σημεία θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη (7). Ο χρόνος θανάτου των ζώων που έχουν θανατωθεί προκειμένου να μην ταλαιπωρηθούν ή που έχουν βρεθεί νεκρά καταγράφεται με τη μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια.

▼M4

30. Οι παρατηρήσεις στον κλωβό θα πρέπει να περιλαμβάνουν τις μεταβολές στο δέρμα και το τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους καθώς και στο αναπνευστικό, κυκλοφοριακό, αυτόνομο και κεντρικό νευρικό σύστημα, στη σωματοκινητική δραστηριότητα και στον τρόπο συμπεριφοράς. Όταν είναι δυνατό, θα πρέπει να σημειώνεται οποιαδήποτε διαφοροποίηση μεταξύ τοπικών και συστημικών επιδράσεων. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίδεται στην παρατήρηση τρόμου, σπασμών, σιελόρροιας, διάρροιας, λήθαργου, ύπνου και κώματος. Η μέτρηση της θερμοκρασίας του ορθού μπορεί να παρέχει υποστηρικτικά αποδεικτικά στοιχεία αντανακλαστικής βραδύπνοιας ή υποθερμίας/υπερθερμίας που σχετίζεται με την αγωγή ή τη στέρηση της ελευθερίας.

Βάρος σώματος

31. Το βάρος του κάθε ζώου θα πρέπει να καταγράφεται μία φορά κατά τη διάρκεια της περιόδου εγκλιματισμού, κατά την ημέρα της έκθεσης πριν από την έκθεση (ημέρα 0) και τουλάχιστον την 1η, την 3η και την 7η ημέρα μετά την έκθεση (και, στη συνέχεια, εβδομαδιαίως) και κατά τον χρόνο θανάτου ή ευθανασίας, εάν λαμβάνει χώρα μετά την 1η ημέρα. Το σωματικό βάρος θεωρείται κρίσιμος δείκτης τοξικότητας, συνεπώς τα ζώα που εμφανίζουν συνεχόμενη μείωσή του > 20 % σε σύγκριση με τις τιμές πριν από τη μελέτη θα πρέπει να παρακολουθούνται στενά. Τα επιζώντα ζώα ζυγίζονται και θανατώνονται με ευθανασία στο τέλος της περιόδου μετά την έκθεση.

Παθολογοανατομία

32. Όλα τα πειραματόζωα, συμπεριλαμβανομένων των θανόντων κατά τη διάρκεια της δοκιμής, εκείνων που υποβάλλονται σε ευθανασία και εκείνων που αποσύρθηκαν από τη μελέτη για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων, υποβάλλονται σε ολική νεκροψία. Εάν δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί νεκροψία αμέσως μετά την ανακάλυψη κάποιου νεκρού ζώου, το ζώο θα πρέπει να ψύχεται (όχι να καταψύχεται) σε θερμοκρασίες αρκετά χαμηλές ώστε να ελαχιστοποιείται η αυτόλυση. Η νεκροψία θα πρέπει να εκτελείται όσο το δυνατόν συντομότερα, κατά κανόνα εντός μιας ή δύο ημερών. Όλες οι μακροσκοπικές παθολογικές αλλοιώσεις θα πρέπει να καταγράφονται για κάθε ζώο, δίδοντας ιδιαίτερη προσοχή σε τυχόν αλλοιώσεις της αναπνευστικής οδού.

33. Μπορούν να λαμβάνονται υπόψη επιπλέον εξετάσεις, που περιλαμβάνονται εκ των προτέρων στον σχεδιασμό, ώστε να διευρύνεται η ερμηνευτική αξία της μελέτης, όπως μέτρηση του βάρους των πνευμόνων των επιζώντων επιμύων και/ή παροχή αποδεικτικών στοιχείων ερεθισμού μέσω μικροσκοπικής εξέτασης της αναπνευστικής οδού. Στα ζώα που επιζούν 24 ή περισσότερες ώρες μπορεί να πραγματοποιείται εξέταση των οργάνων που εμφανίζουν μακροσκοπικώς παθολογικές αλλοιώσεις, καθώς των οργάνων που είναι γνωστό ή αναμένεται ότι θα επηρεαστούν. Ενδέχεται να προκύπτουν χρήσιμα στοιχεία από τη μικροσκοπική εξέταση ολόκληρης της αναπνευστικής οδού για τις ελεγχόμενες χημικές ουσίες που αντιδρούν με το νερό, όπως οξέα και υγροσκοπικές χημικές ουσίες.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Στοιχεία

34. Θα πρέπει να παρέχονται ατομικά στοιχεία για το βάρος των ζώων και τα ευρήματα της νεκροψίας. Τα δεδομένα κλινικής παρατήρησης πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα ο οποίος περιλαμβάνει για κάθε ομάδα τον αριθμό των χρησιμοποιηθέντων ζώων, τον αριθμό των ζώων που εμφανίζουν συγκεκριμένες τοξικές εκδηλώσεις, τον αριθμό των ζώων που βρέθηκαν νεκρά κατά τη διάρκεια της δοκιμής ή που θανατώθηκαν για να μην ταλαιπωρηθούν, τον χρόνο θανάτου κάθε ζώου, περιγραφή και χρονική πορεία των τοξικών εκδηλώσεων, αναστρεψιμότητα και ευρήματα νεκροψίας.

▼M4

Έκθεση δοκιμής

35. Η έκθεση της δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία, κατά περίπτωση:

Πειραματόζωα και διαχείρισή τους·

— περιγραφή των συνθηκών εγκλωβισμού, συμπεριλαμβανομένων των εξής: αριθμός (ή μεταβολή στον αριθμό) ζώων ανά κλωβό, στρωμνή, θερμοκρασία και σχετική υγρασία του περιβάλλοντος, φωτοπερίοδος και προσδιορισμός του σιτηρεσίου,

— είδος/φυλή που χρησιμοποιήθηκε και αιτιολόγηση της χρήσης άλλου είδους εκτός του επίμυ,

— αριθμός, ηλικία και φύλο των ζώων,

— μέθοδο τυχαιοποίησης,

— λεπτομερή στοιχεία για την ποιότητα της τροφής και του νερού (συμπεριλαμβανομένων του είδους και της πηγής του σιτηρεσίου και της πηγής του νερού),

— περιγραφή τυχόν προετοιμασίας πριν από τον έλεγχο, συμπεριλαμβανομένων του σιτηρεσίου, της περιόδου απομόνωσης και της αγωγής για ασθένειες.

Ελεγχόμενη χημική ουσία

— φυσική κατάσταση, καθαρότητα και, κατά περίπτωση, φυσικές και χημικές ιδιότητες (συμπεριλαμβανομένης της ισομερείωσης),

— στοιχεία αναγνώρισης και αριθμός μητρώου Παροχής Υπηρεσιών για Χημικές Ουσίες («CAS»), εάν είναι γνωστός.

Φορέας

— αιτιολόγηση χρήσης του φορέα και αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα (εάν δεν είναι νερό),

— προϋπάρχοντα ή παράλληλα δεδομένα που καταδεικνύουν ότι ο φορέας δεν επηρεάζει το αποτέλεσμα της μελέτης.

Θάλαμος εισπνοής

— περιγραφή του θαλάμου εισπνοής συμπεριλαμβανομένων των διαστάσεων και του όγκου,

— πηγή και περιγραφή του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται για την έκθεση ζώων, καθώς και για την παραγωγή της ατμόσφαιρας,

— εξοπλισμός για τη μέτρηση της θερμοκρασίας, της υγρασίας, του μεγέθους των σωματιδίων και της πραγματικής συγκέντρωσης,

— πηγή αέρα, επεξεργασία του παρεχόμενου/εξαγόμενου αέρα και σύστημα κλιματισμού που χρησιμοποιείται,

— μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη βαθμονόμηση του εξοπλισμού ώστε να εξασφαλίζεται ομοιογενής πειραματική ατμόσφαιρα,

— διαφορά πίεσης (θετική ή αρνητική),

— θύρες έκθεσης ανά θάλαμο (ρινική έκθεση)· θέση των ζώων στο σύστημα (ολόσωμη έκθεση),

— χρονική ομοιογένεια/σταθερότητα της πειραματικής ατμόσφαιρας,

— θέση των αισθητήρων θερμοκρασίας και υγρασίας και δειγματοληψία της πειραματικής ατμόσφαιρας στον θάλαμο,

— ταχύτητες ροής αέρα, ταχύτητα ροής αέρα/θύρα έκθεσης (ρινική έκθεση) ή φορτίο ζώων/θάλαμο (ολόσωμη έκθεση),

— πληροφορίες για τον εξοπλισμό που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση του οξυγόνου και του διοξειδίου του άνθρακα, κατά περίπτωση,

▼M4

— χρόνος που απαιτήθηκε για την επίτευξη ισορροπίας στον θάλαμο εισπνοής (t_{95}),

— αριθμός μεταβολών όγκου ανά ώρα,

— συσκευές μέτρησης (κατά περίπτωση).

Δεδομένα έκθεσης

— αιτιολόγηση της επιλογής της συγκέντρωσης-στόχου για την κυρίως μελέτη,

— ονομαστικές συγκεντρώσεις (συνολική μάζα της παραγόμενης ελεγχόμενης χημικής ουσίας μέσα στον θάλαμο εισπνοής διά του συνολικού όγκου αέρα που διαβιβάζεται μέσω του θαλάμου),

— πραγματικές συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που λαμβάνονται από τη ζώνη αναπνοής των ζώων· για ελεγχόμενα μείγματα που παράγουν ετερογενείς φυσικές μορφές (αέρια, ατμούς, αερολύματα), κάθε μορφή μπορεί να αναλύεται χωριστά,

— όλες οι ατμοσφαιρικές συγκεντρώσεις θα πρέπει να αναφέρονται σε μονάδες μάζας (π.χ. mg/l, mg/m^3 κ.λπ.)· μπορούν επίσης να αναφέρονται παρενθετικά μονάδες όγκου (π.χ. ppm, ppb),

— κατανομή μεγέθους σωματιδίων, διάμεσος αεροδυναμικής διαμέτρου κατά μάζα (MMAD) και γεωμετρική τυπική απόκλιση (σ_g), συμπεριλαμβανομένων των μεθόδων υπολογισμού τους. Θα πρέπει να αναφέρονται επιμέρους αναλύσεις μεγέθους σωματιδίων.

Συνθήκες δοκιμής

— λεπτομερή στοιχεία της παρασκευής της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, συμπεριλαμβανομένων λεπτομερών στοιχείων διαδικασιών που έχουν ενδεχομένως χρησιμοποιηθεί για τη μείωση του μεγέθους στερεών ουσιών ή για την παρασκευή διαλυμάτων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Σε περιπτώσεις που μηχανικές διαδικασίες ενδέχεται να έχουν αλλοιώσει τη σύνθεση μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας, πρέπει να περιλαμβάνονται τα αποτελέσματα των αναλύσεων ώστε να επαληθεύεται η σύνθεση της ελεγχόμενης ουσίας,

— περιγραφή (κατά προτίμηση μαζί με διάγραμμα) του εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή της ατμόσφαιρας ελέγχου και την έκθεση των ζώων στην ατμόσφαιρα ελέγχου,

— λεπτομερή στοιχεία της χημικής αναλυτικής μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε και επικύρωση της μεθόδου (συμπεριλαμβανομένης της ικανότητας ανάκτησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας από το μέσο δειγματοληψίας),

— αιτιολόγηση των επιλεγμένων συγκεντρώσεων ελέγχου.

Αποτελέσματα

— πίνακας με τη θερμοκρασία, την υγρασία και τη ροή αέρα στον θάλαμο,

— πίνακας με τα στοιχεία ονομαστικών και πραγματικών συγκεντρώσεων στον θάλαμο,

— πίνακας με τα στοιχεία μεγέθους σωματιδίων, συμπεριλαμβανομένων δεδομένων συλλογής του δείγματος ανάλυσης, της κατανομής μεγέθους σωματιδίων και υπολογισμών της MMAD και της σ_g,

— πίνακας με τα δεδομένα απόκρισης και το επίπεδο συγκέντρωσης για κάθε ζώο (δηλαδή ζώα που παρουσίασαν συμπτώματα τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένης της θνησιμότητας, της φύσης, της σοβαρότητας, και της διάρκειας των επιδράσεων),

— για κάθε ζώο, το βάρος που μετρήθηκε κατά τις ημέρες της μελέτης· ημερομηνία και χρόνος θανάτου, εάν έλαβε χώρα πριν από την προγραμματισμένη ευθανασία, χρονική πορεία εμφάνισης εκδηλώσεων τοξικότητας και εάν αυτές ήταν αναστρέψιμες για κάθε ζώο,

▼M4

— ευρήματα νεκροψίας και ιστοπαθολογικά ευρήματα για καθένα από τα ζώα, εφόσον διατίθενται,

— κατηγορία ταξινόμησης βάσει του κανονισμού CLP και κρίσιμη τιμή LC_{50}.

Συζήτηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

— Ιδιαίτερη έμφαση θα πρέπει να δίδεται στην περιγραφή των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπλήρωση των κριτηρίων της μεθόδου δοκιμών, π.χ. της οριακής συγκέντρωσης ή του μεγέθους σωματιδίων.

— Θα πρέπει να καλύπτεται το ζήτημα της εισπνευσιμότητας των σωματιδίων βάσει των συνολικών ευρημάτων, ιδίως εάν τα σχετικά με το μέγεθος των σωματιδίων κριτήρια δεν ήταν δυνατό να εκπληρωθούν.

— Η συνολική αξιολόγηση της μελέτης πρέπει να περιλαμβάνει τη συνοχή των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των ονομαστικών και πραγματικών συγκεντρώσεων και τη σχέση της πραγματικής προς την ονομαστική συγκέντρωση.

— Θα πρέπει να αναφέρεται η πιθανή αιτία θανάτου και ο επικρατέστερος τρόπος δράσης (συστημική δράση έναντι τοπικής).

— Θα πρέπει να παρέχεται εξήγηση εάν έπρεπε να θανατωθούν με ευθανασία ζώα που πονούσαν ή που εμφάνιζαν εκδηλώσεις έντονης και διαρκούς δυσφορίας, βάσει των κριτηρίων του εγγράφου καθοδήγησης του ΟΟΣΑ για τα λιγότερο βάναυσα καταληκτικά σημεία (7).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) Κεφάλαιο B.2 του παρόντος παραρτήματος: Οξεία τοξικότητα (αναπνευστική).

(2) Holzhütter H.-G., Genschow E., Diener W., και Schlede E. (2003), Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System, *Arch. Toxicol.* 77: 243-254.

(3) Diener W., Kayser D. και Schlede E. (1997), The Inhalation Acute-Toxic-Class Method, Test Procedures and Biometric Evaluations, *Arch. Toxicol.* 71: 537-549.

(4) Diener W. και Schlede E. (1999), Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC_{50} Tests. *ALTEX* 1: 129-134.

(5) Κεφάλαιο B.1β του παρόντος παραρτήματος: Οξεία τοξικότητα από το στόμα — Μέθοδος των κλάσεων οξείας τοξικότητας.

(6) OECD (2009), Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 105, OECD, Paris, Διαθέσιμο στη διεύθυνση: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(7) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(8) OECD (2009), Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(9) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων, την τροποποίηση και την κατάργηση των οδηγιών 67/548/ΕΟΚ και 1999/45/ΕΚ και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 (ΕΕ L 353 της 31.12.2008, σ. 1).

▼**M4**

(10) Κεφάλαιο Β.40 του παρόντος παραρτήματος: Διάβρωση του δέρματος in vitro: δοκιμή διαδερμικής ηλεκτρικής αντίστασης (TER).

(11) Κεφάλαιο Β.40α του παρόντος παραρτήματος: Διάβρωση του δέρματος in vitro: δοκιμή σε μοντέλο ανθρώπινου δέρματος.

(12) OECD (2005), In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Paris. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(13) Phalen RF (2009), Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

(14) SOT (1992), Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests, *Fund. Appl. Toxicol.* 18: 321-327.

(15) Pauluhn J. και Thiel A. (2007), A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers, *J. Appl. Toxicol.* 27: 160-167.

(16) UN (2007), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York and Geneva. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html].

▼**M4**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΣ

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

▼**M4**

Προσάρτημα 2

Διαδικασία εφαρμοζόμενη για καθεμία από τις αρχικές συγκεντρώσεις στην περίπτωση αερίων (ppm/4 ώρες)

Γενικές παρατηρήσεις ([1])

Η διαδικασία που ακολουθείται για καθεμία από τις αρχικές συγκεντρώσεις περιγράφεται σχηματικά στα αντίστοιχα διαγράμματα δοκιμής του παρόντος προσαρτήματος.

Προσάρτημα 2α: Η αρχική συγκέντρωση είναι 100 ppm

Προσάρτημα 2β: Η αρχική συγκέντρωση είναι 500 ppm

Προσάρτημα 2γ: Η αρχική συγκέντρωση είναι 2 500 ppm

Προσάρτημα 2δ: Η αρχική συγκέντρωση είναι 20 000 ppm

Ανάλογα με τον αριθμό των θανατωθέντων με ανώδυνο τρόπο ή νεκρών ζώων η διαδικασία δοκιμής ακολουθεί την πορεία που δείχνουν τα αντίστοιχα βέλη.

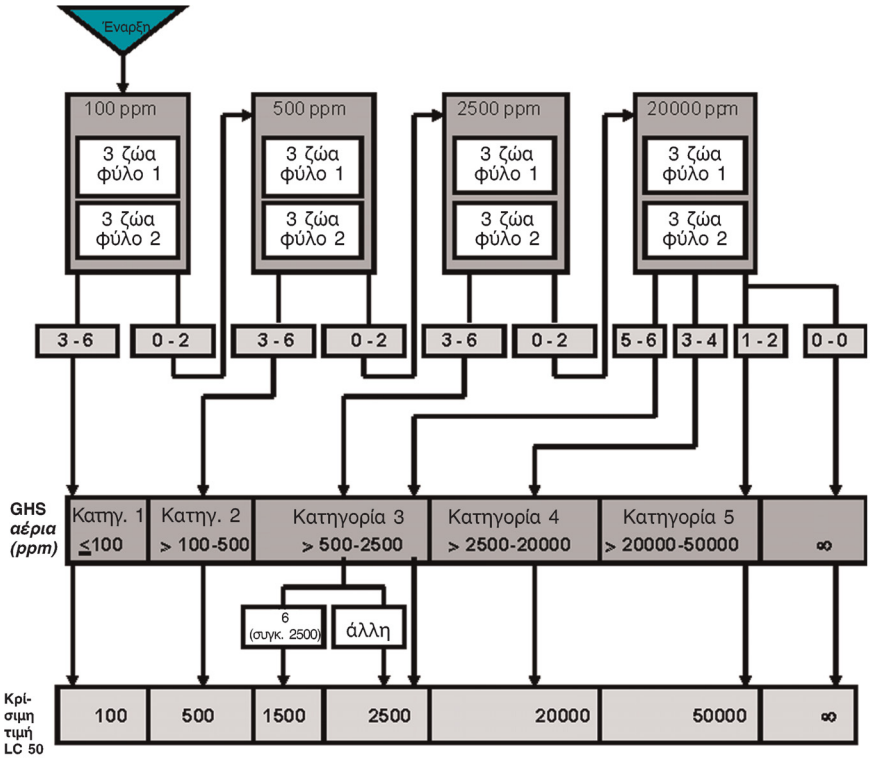
([1]) Στους ακόλουθους πίνακες γίνεται αναφορά στο Παγκόσμιο Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης Χημικών Ουσιών (GHS). Το ισοδύναμο νομοθέτημα της ΕΕ είναι ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008. Στην περίπτωση οξείας αναπνευστικής τοξικότητας, ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 (9) δεν εφαρμόζεται για την κατηγορία 5.

▼**M4**

Προσάρτημα 2α

Οξεία αναπνευστική τοξικότητα

Διαδικασία δοκιμής με αρχική συγκέντρωση 100 ppm/4 ώρες στην περίπτωση αερίων



— 3 αρσενικά + 3 θηλυκά, ή 6 ζώα από το πλέον ευπαθές φύλο χρησιμοποιούνται ανά στάδιο

— 0-6: Αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων/ελεγχόμενη συγκέντρωση

— GHS: Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης

— ∞: μη ταξινομημένη κατηγορία

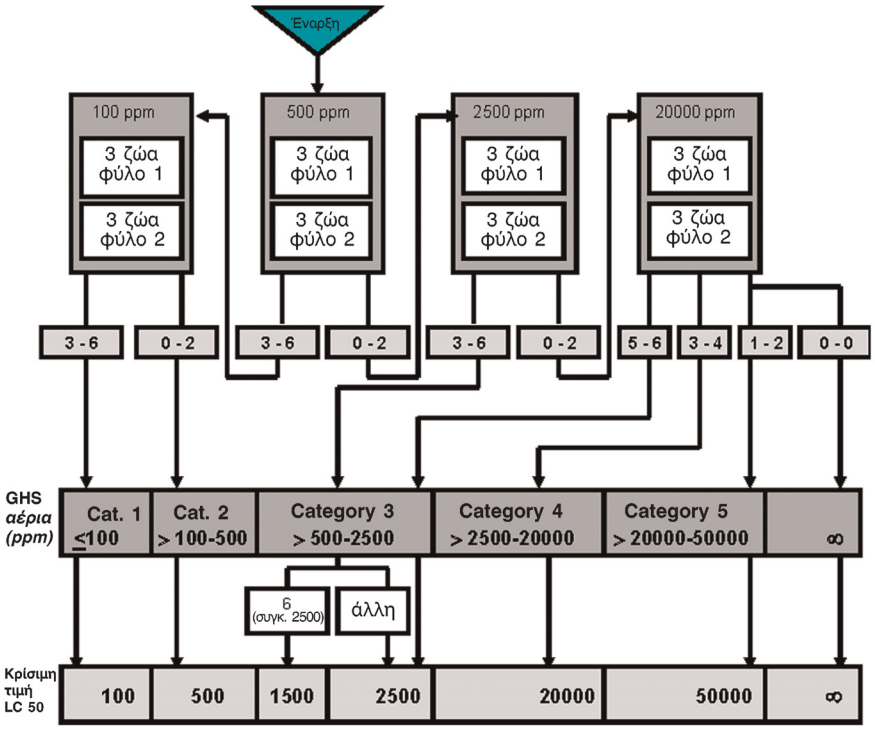
— Δοκιμή με συγκέντρωση ≥ 20.000 ppm/4 ώρες: ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης 39 παράγραφος 8

▼**M4**

Προσάρτημα 2β

Οξεία αναπνευστική τοξικότητα

Διαδικασία δοκιμής με αρχική συγκέντρωση 500 ppm/4 ώρες στην περίπτωση αερίων



— 3 αρσενικά + 3 θηλυκά, ή 6 ζώα από το πλέον ευπαθές φύλο χρησιμοποιούνται ανά στάδιο

— 0-6: Αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων/ελεγχόμενη συγκέντρωση

— GHS: Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης

— ∞: μη ταξινομημένη κατηγορία

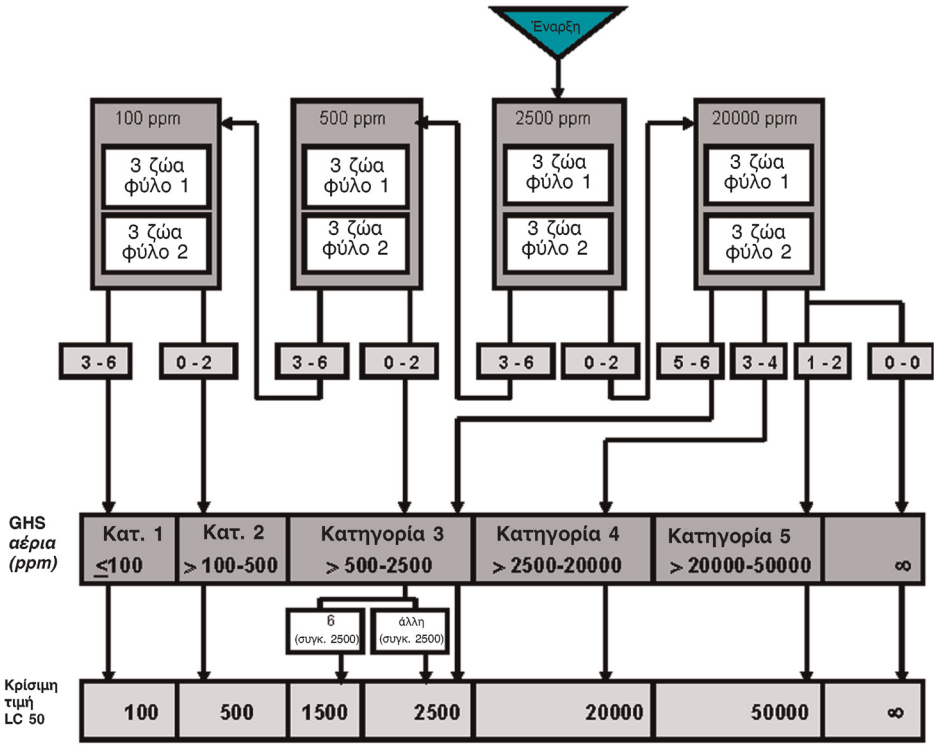
— Δοκιμή με συγκέντρωση ≥ 20.000 ppm/4 ώρες: ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης 39 παράγραφος 8

▼M4

Προσάρτημα 2γ

Οξεία αναπνευστική τοξικότητα

Διαδικασία δοκιμής με αρχική συγκέντρωση 2 500 ppm/4 ώρες στην περίπτωση αερίων



— 3 αρσενικά + 3 θηλυκά, ή 6 ζώα από το πλέον ευπαθές φύλο χρησιμοποιούνται ανά στάδιο

— 0–6: Αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων/ελεγχόμενη συγκέντρωση

— GHS: Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης

— ∞: μη ταξινομημένη κατηγορία

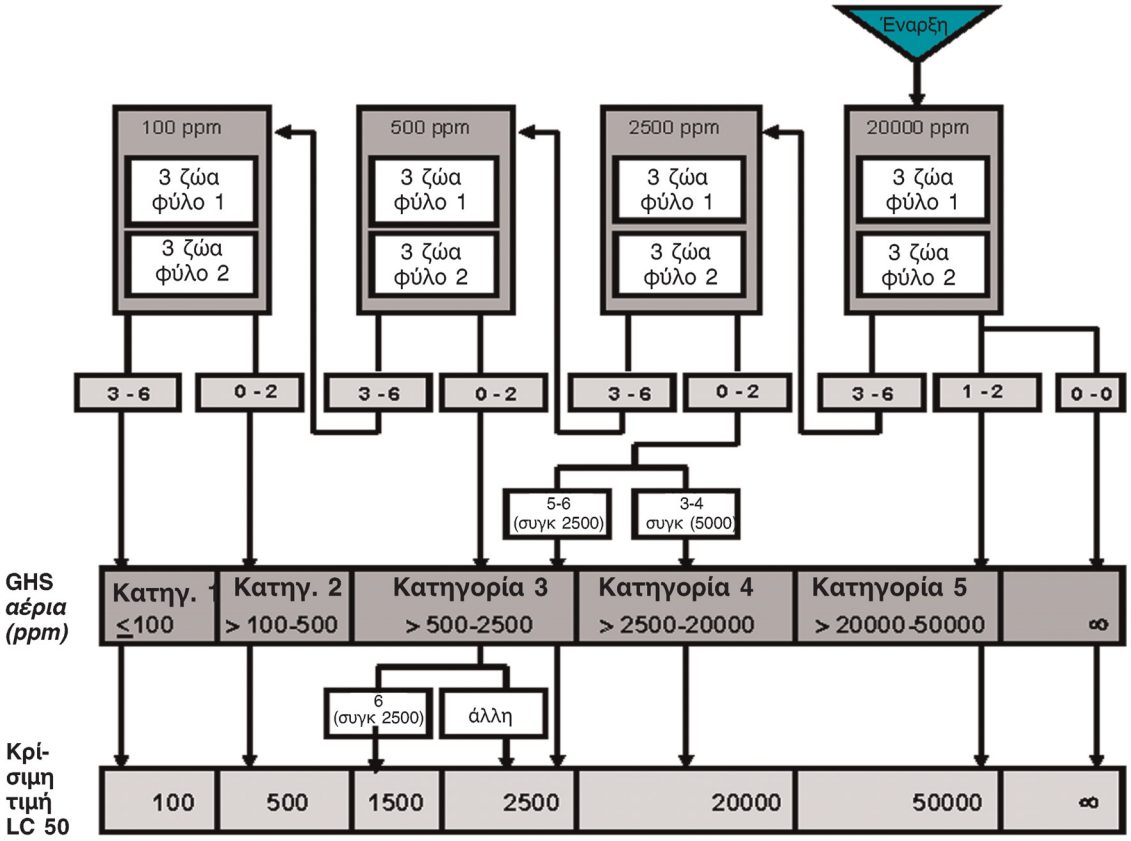
— Δοκιμή με συγκέντρωση ≥ 20.000 ppm/4 ώρες: ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης 39 παράγραφος 8

▼M4

Προσάρτημα 2δ

Οξεία αναπνευστική τοξικότητα

Διαδικασία δοκιμής με αρχική συγκέντρωση 20 000 ppm/4 ώρες στην περίπτωση αερίων



— 3 αρσενικά + 3 θηλυκά, ή 6 ζώα από το πλέον ευπαθές φύλο χρησιμοποιούνται ανά στάδιο

— 0-6: Αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων/ελεγχόμενη συγκέντρωση

— GHS: Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης

— ∞: μη ταξινομημένη κατηγορία

— Δοκιμή με συγκέντρωση ≥ 20.000 ppm/4 ώρες: ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης 39 παράγραφος 8

▼**M4**

Προσάρτημα 3

Διαδικασία εφαρμοζόμενη για καθεμία από τις αρχικές συγκεντρώσεις στην περίπτωση ατμών (mg/l/4 ώρες)

Γενικές παρατηρήσεις ([1])

Η διαδικασία που ακολουθείται για καθεμία από τις αρχικές συγκεντρώσεις περιγράφεται σχηματικά στα αντίστοιχα διαγράμματα δοκιμής του παρόντος προσαρτήματος.

Προσάρτημα 3α: Η αρχική συγκέντρωση είναι 0,5 mg/l

Προσάρτημα 3β: Η αρχική συγκέντρωση είναι 2,0 mg/l

Προσάρτημα 3γ: Η αρχική συγκέντρωση είναι 10 mg/l

Προσάρτημα 3δ: Η αρχική συγκέντρωση είναι 20 mg/l

Ανάλογα με τον αριθμό των θανατωθέντων με ανώδυνο τρόπο ή νεκρών ζώων η διαδικασία δοκιμής ακολουθεί την πορεία που δείχνουν τα αντίστοιχα βέλη.

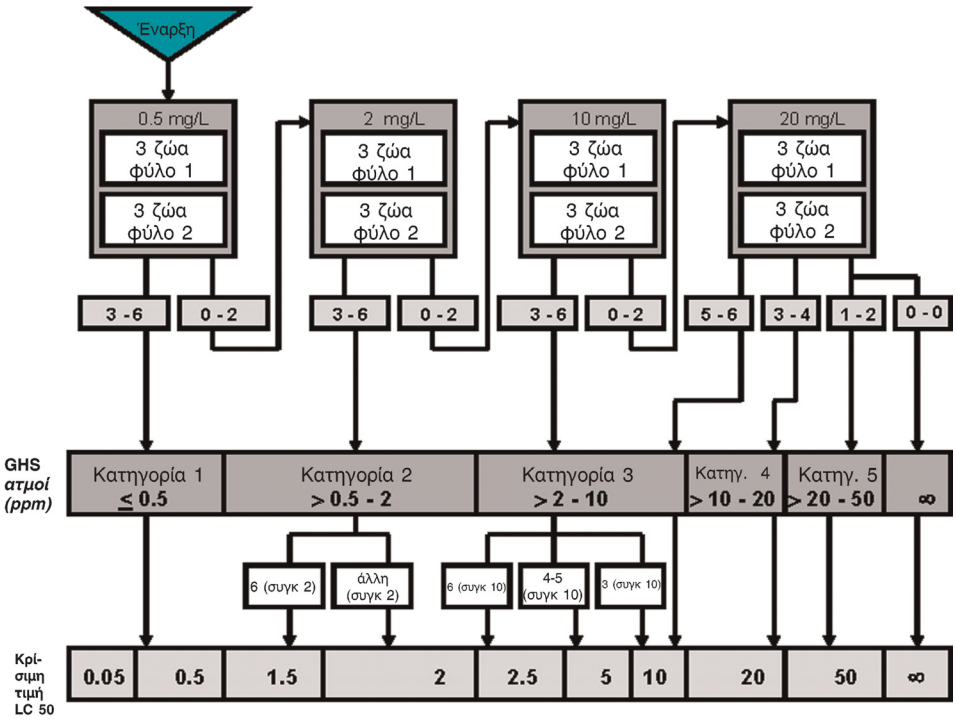
([1]) Στους ακόλουθους πίνακες γίνεται αναφορά στο Παγκόσμιο Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης Χημικών Ουσιών (GHS). Το ισοδύναμο νομοθέτημα της ΕΕ είναι ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008. Στην περίπτωση οξείας αναπνευστικής τοξικότητας, ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 (9) δεν εφαρμόζεται για την κατηγορία 5.

▼M4

Προσάρτημα 3α

Οξεία αναπνευστική τοξικότητα

Διαδικασία δοκιμής με αρχική συγκέντρωση 0,5 mg/L/4 ώρες στην περίπτωση ατμών



— 3 αρσενικά + 3 θηλυκά, ή 6 ζώα από το πλέον ευπαθές φύλο χρησιμοποιούνται ανά στάδιο

— 0-6: Αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων/ελεγχόμενη συγκέντρωση

— GHS: Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης

— ∞: μη ταξινομημένη κατηγορία

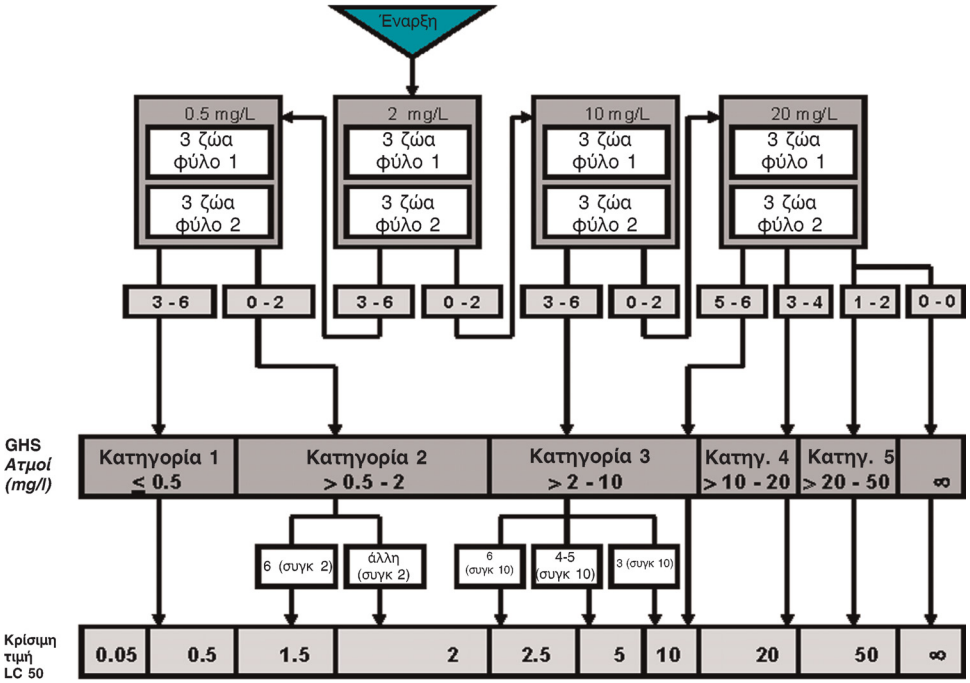
— Δοκιμή με συγκέντρωση 50 mg/L/4 ώρες: ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης 39 παράγραφος 8

▼**M4**

Προσάρτημα 3β

Οξεία αναπνευστική τοξικότητα

Διαδικασία δοκιμής με αρχική συγκέντρωση 2 mg/L/4 ώρες στην περίπτωση ατμών



— 3 αρσενικά + 3 θηλυκά, ή 6 ζώα από το πλέον ευπαθές φύλο χρησιμοποιούνται ανά στάδιο

— 0–6: Αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων/ελεγχόμενη συγκέντρωση

— GHS: Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης

— ∞: μη ταξινομημένη κατηγορία

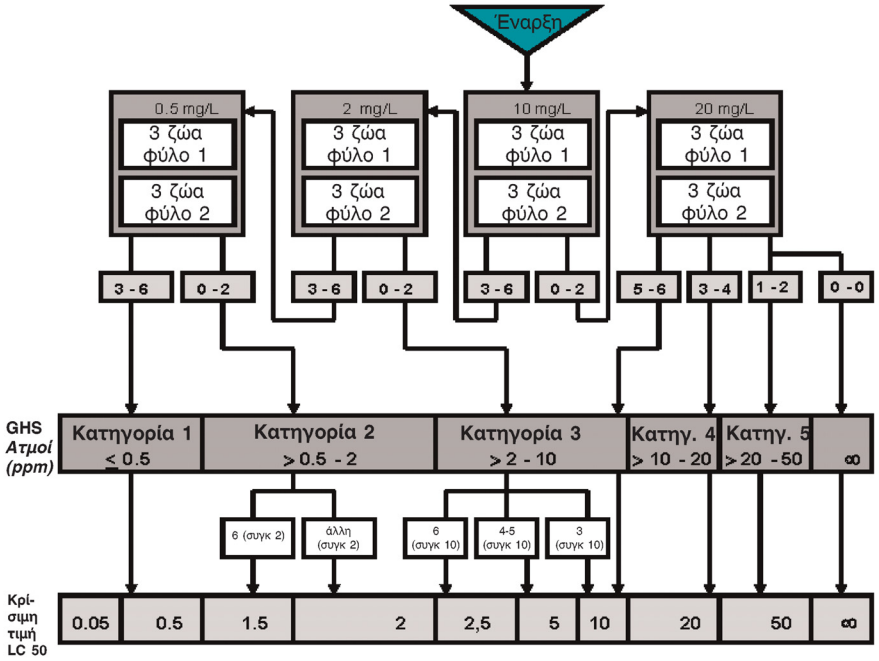
— Δοκιμή με συγκέντρωση 50 mg/L/4 ώρες: ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης 39 παράγραφος 8

▼M4

Προσάρτημα 3γ

Οξεία αναπνευστική τοξικότητα

Διαδικασία δοκιμής με αρχική συγκέντρωση 10 mg/L/4 ώρες στην περίπτωση ατμών



— 3 αρσενικά + 3 θηλυκά, ή 6 ζώα από το πλέον ευπαθές φύλο χρησιμοποιούνται ανά στάδιο

— 0-6: Αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων/ελεγχόμενη συγκέντρωση

— GHS: Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης

— ∞: μη ταξινομημένη κατηγορία

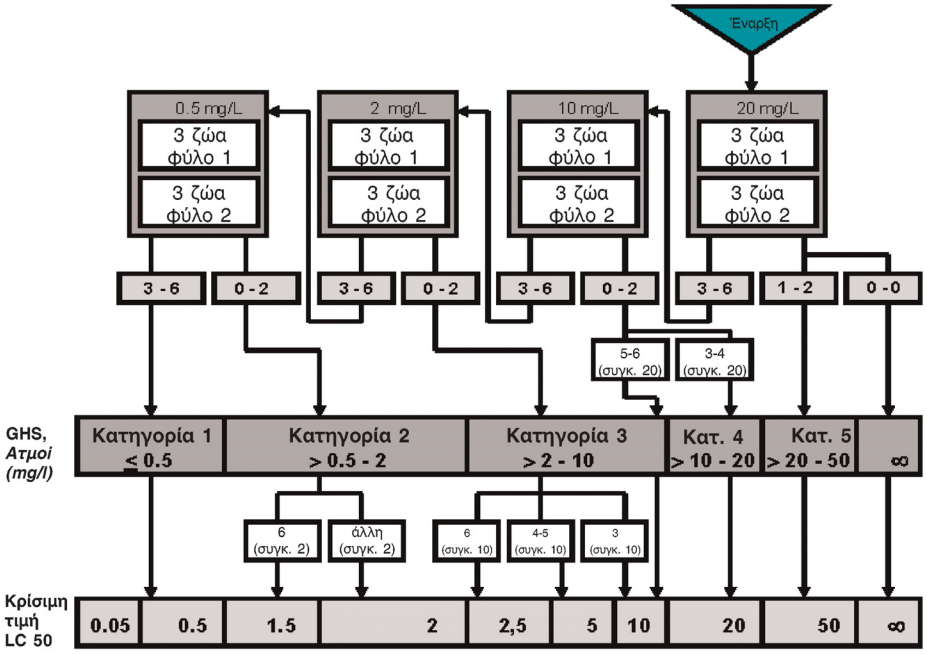
— Δοκιμή με συγκέντρωση 50 mg/L/4 ώρες: ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης 39 παράγραφος 8

▼M4

Προσάρτημα 3δ

Οξεία αναπνευστική τοξικότητα

Διαδικασία δοκιμής με αρχική συγκέντρωση 20 mg/L/4 ώρες στην περίπτωση ατμών



— 3 αρσενικά + 3 θηλυκά, ή 6 ζώα από το πλέον ευπαθές φύλο χρησιμοποιούνται ανά στάδιο

— 0-6: Αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων/ελεγχόμενη συγκέντρωση

— GHS: Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης

— ∞: μη ταξινομημένη κατηγορία

— Δοκιμή με συγκέντρωση 50 mg/L/4 ώρες: ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης 39 παράγραφος 8

▼**M4**

Προσάρτημα 4

Διαδικασία εφαρμοζόμενη για καθεμία από τις αρχικές συγκεντρώσεις στην περίπτωση αερολυμάτων (mg/l/4 ώρες)

Γενικές παρατηρήσεις ([1])

Η διαδικασία που ακολουθείται για καθεμία από τις αρχικές συγκεντρώσεις περιγράφεται σχηματικά στα αντίστοιχα διαγράμματα δοκιμής του παρόντος προσαρτήματος.

Προσάρτημα 4α: Η αρχική συγκέντρωση είναι 0,05 mg/l

Προσάρτημα 4β: Η αρχική συγκέντρωση είναι 0,5 mg/l

Προσάρτημα 4γ: Η αρχική συγκέντρωση είναι 1 mg/l

Προσάρτημα 4δ: Η αρχική συγκέντρωση είναι 5 mg/l

Ανάλογα με τον αριθμό των θανατωθέντων με ανώδυνο τρόπο ή νεκρών ζώων η διαδικασία δοκιμής ακολουθεί την πορεία που δείχνουν τα αντίστοιχα βέλη.

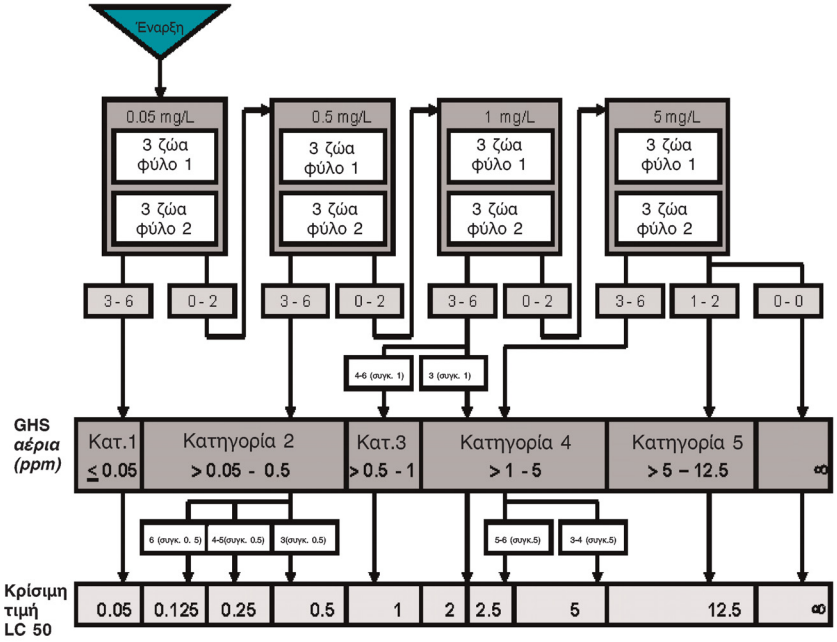
([1]) Στους ακόλουθους πίνακες γίνεται αναφορά στο Παγκόσμιο Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης Χημικών Ουσιών (GHS). Το ισοδύναμο νομοθέτημα της ΕΕ είναι ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008. Στην περίπτωση οξείας αναπνευστικής τοξικότητας, ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 (9) δεν εφαρμόζεται για την κατηγορία 5.

▼M4

Προσάρτημα 4α

Οξεία Αναπνευστική Τοξικότητα

Διαδικασία δοκιμής με αρχική συγκέντρωση 0,05 mg/L/4 ώρες στην περίπτωση ατμών



— 3 αρσενικά + 3 θηλυκά, ή 6 ζώα από το πλέον ευπαθές φύλο χρησιμοποιούνται ανά στάδιο

— 0-6: Αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων/ελεγχόμενη συγκέντρωση

— GHS: Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης

— ∞: μη ταξινομημένη κατηγορία

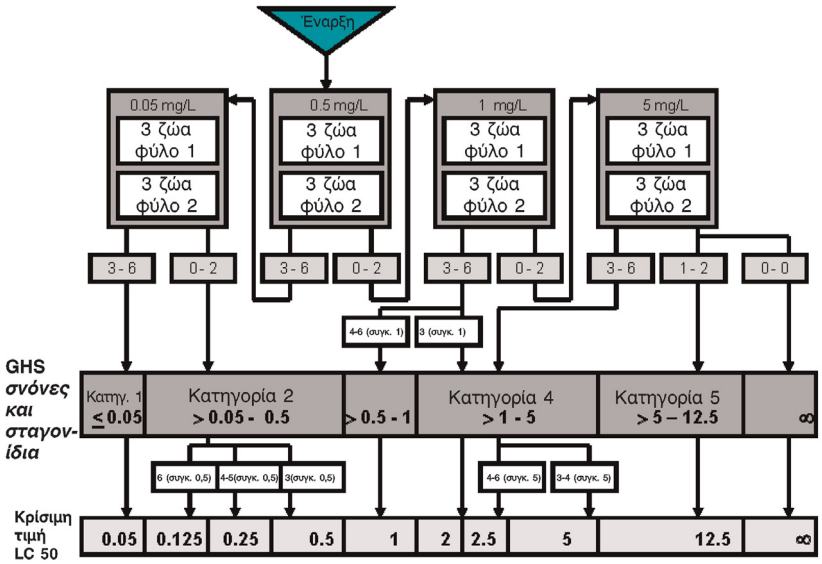
— Δοκιμή με συγκέντρωση ≥ 20.000 ppm/4 ώρες: ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης 39 παράγραφος 8

▼M4

Προσάρτημα 4β

Οξεία αναπνευστική τοξικότητα

Διαδικασία δοκιμής με αρχική συγκέντρωση 0,05 mg/L/4 ώρες στην περίπτωση αερολυμάτων



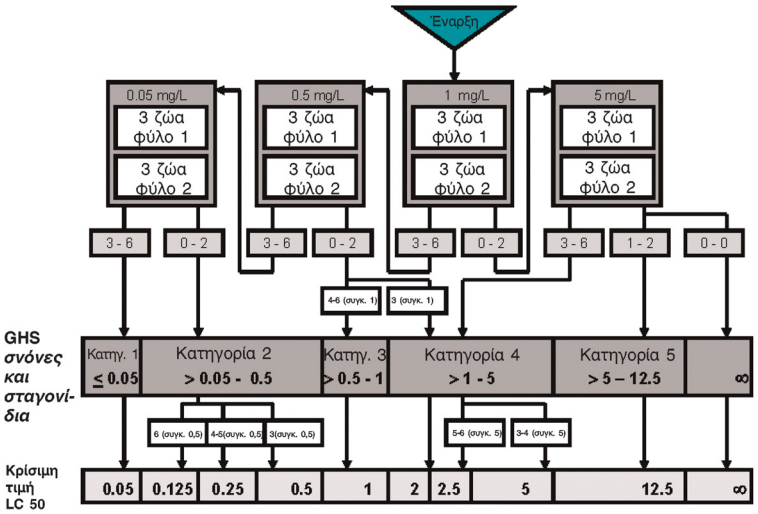
— 3 αρσενικά + 3 θηλυκά, ή 6 ζώα από το πλέον ευπαθές φύλο χρησιμοποιούνται ανά στάδιο
— 0-6: Αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων/ελεγχόμενη συγκέντρωση
— GHS: Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης
— ∞: μη ταξινομημένη κατηγορία
— Δοκιμή με συγκέντρωση 12,5 mg/L/4 ώρες: ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης 39 παράγραφος 8

▼**M4**

Προσάρτημα 4γ

Οξεία αναπνευστική τοξικότητα

Διαδικασία δοκιμής με αρχική συγκέντρωση 0,05 mg/L/4 ώρες στην περίπτωση αερολυμάτων



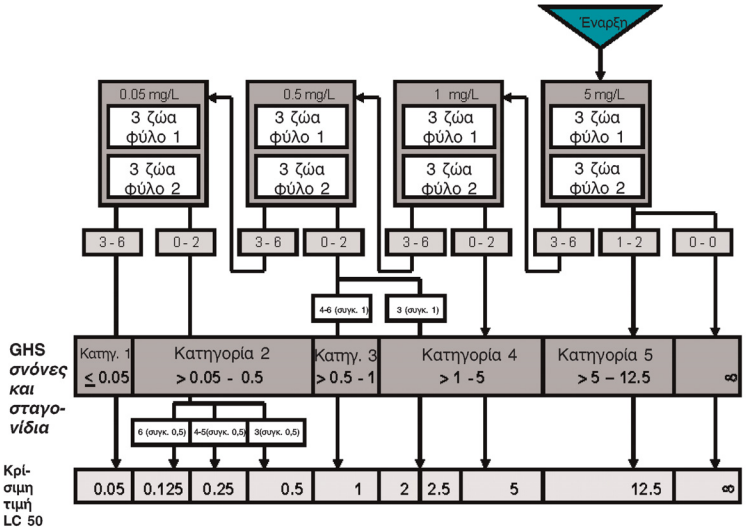
— 3 αρσενικά + 3 θηλυκά, ή 6 ζώα από το πλέον ευπαθές φύλο χρησιμοποιούνται ανά στάδιο
— 0-6: Αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων/ελεγχόμενη συγκέντρωση
— GHS: Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης
— ∞: μη ταξινομημένη κατηγορία
— Δοκιμή με συγκέντρωση 12,5 mg/L/4 ώρες: ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης 39 παράγραφος 8

▼**M4**

Προσάρτημα 4δ

Οξεία αναπνευστική τοξικότητα

Διαδικασία δοκιμής με αρχική συγκέντρωση 0,5 mg/L/4 ώρες στην περίπτωση αερολυμάτων



— 3 αρσενικά + 3 θηλυκά, ή 6 ζώα από το πλέον ευπαθές φύλο χρησιμοποιούνται ανά στάδιο
— 0-6: Αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων/ελεγχόμενη συγκέντρωση
— GHS: Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης
— ∞: μη ταξινομημένη κατηγορία
— Δοκιμή με συγκέντρωση 12,5 mg/L/4 ώρες: ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης 39 παράγραφος 8»

▼M5

Β.53. ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΗΣ ΝΕΥΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή δοκιμών (TG) 426 (2007). Τον Ιούνιο του 1995 στην Κοπεγχάγη, η ομάδα εργασίας του ΟΟΣΑ για την τοξικότητα στην αναπαραγωγή και την αναπτυξιακή τοξικότητα συζήτησε την αναγκαιότητα επικαιροποίησης των υφιστάμενων κατευθυντήριων γραμμών του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή δοκιμών για την τοξικότητα στην αναπαραγωγή και την αναπτυξιακή τοξικότητα, καθώς και την κατάρτιση νέων κατευθυντήριων γραμμών για τελικά σημεία που δεν είχαν ακόμα καλυφθεί (1). Η ομάδα εργασίας εισηγήθηκε τη σύνταξη κατευθυντήριας γραμμής για τη διεξαγωγή δοκιμών για την αναπτυξιακή νευροτοξικότητα βάσει κατευθυντήριας γραμμής του Οργανισμού για την Προστασία του Περιβάλλοντος των ΗΠΑ (EPA), η οποία έχει αναθεωρηθεί έκτοτε (2). Τον Ιούνιο του 1996 πραγματοποιήθηκε δεύτερη συνεδρίαση διαβούλευσης στην Κοπεγχάγη, για να δοθούν οδηγίες στη Γραμματεία σχετικά με τον σκελετό μιας νέας κατευθυντήριας γραμμής για τη διεξαγωγή δοκιμών για την αναπτυξιακή νευροτοξικότητα, συμπεριλαμβανομένων των κύριων στοιχείων της, όπως για παράδειγμα λεπτομέρειες σχετικά με την επιλογή των ζωικών ειδών, την περίοδο χορήγησης των δόσεων, την περίοδο δοκιμής, τα προς εκτίμηση τελικά σημεία και τα κριτήρια αξιολόγησης των αποτελεσμάτων. Το 1998 δημοσιεύθηκε κατευθυντήρια γραμμή των ΗΠΑ για την εκτίμηση των κινδύνων νευροτοξικότητας (3). Τον Οκτώβριο του 2000 πραγματοποιήθηκαν διαδοχικά συνάντηση διαβούλευσης των εμπειρογνωμόνων του ΟΟΣΑ και ημερίδα στο Ινστιτούτο Επιστημών του Κινδύνου του ILSI, ενώ το 2005 πραγματοποιήθηκε στο Τόκιο συνάντηση διαβούλευσης εμπειρογνωμόνων. Σκοπός των συναντήσεων αυτών ήταν να συζητηθούν τα επιστημονικά και τεχνικά ζητήματα που αφορούν την υφιστάμενη κατευθυντήρια γραμμή για τη διεξαγωγή δοκιμών, ενώ οι συστάσεις που διατυπώθηκαν κατά τις συναντήσεις (4)(5)(6)(7) ελήφθησαν υπόψη στην ανάπτυξη της παρούσας μεθόδου δοκιμών. Πρόσθετες πληροφορίες για τη διεξαγωγή, την ερμηνεία και την ορολογία που χρησιμοποιείται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών παρέχονται στα καθοδηγητικά έγγραφα αριθ. 43 «Μέθοδοι δοκιμών και εκτίμηση της τοξικότητας στην αναπαραγωγή» (8) και αριθ. 20 «Μέθοδοι δοκιμών νευροτοξικότητας» (9) του ΟΟΣΑ.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

2. Είναι γνωστό ότι ορισμένες χημικές ουσίες έχουν νευροτοξικές επιδράσεις στην ανάπτυξη του ανθρώπου και άλλων ειδών (10)(11)(12)(13). Ο προσδιορισμός της δυνατότητας μιας χημικής ουσίας να προκαλέσει αναπτυξιακή νευροτοξικότητα ενδέχεται να είναι αναγκαίος για την εκτίμηση και την αξιολόγηση των τοξικών χαρακτηριστικών αυτής. Οι μελέτες αναπτυξιακής νευροτοξικότητας έχουν σχεδιαστεί κατά τρόπο ώστε να παρέχουν δεδομένα, συμπεριλαμβανομένου του χαρακτηρισμού της σχέσης δόσης-απόκρισης, σχετικά με τις δυνητικές λειτουργικές και μορφολογικές επιδράσεις της ενδομήτριας έκθεσης και της έκθεσης κατά τα πρώτα στάδια της ζωής στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα των απογόνων.

3. Η μελέτη αναπτυξιακής νευροτοξικότητας μπορεί να διεξαχθεί ως χωριστή μελέτη, να ενσωματωθεί σε μελέτη τοξικότητας στην αναπαραγωγή και/ή νευροτοξικότητας σε ενήλικες [π.χ. μέθοδοι δοκιμών Β.34 (14), Β.35 (15), Β.43 (16)] ή να προστεθεί σε μελέτη προγεννητικής αναπτυξιακής τοξικότητας [π.χ.μέθοδος δοκιμών Β.31 (17)]. Όταν η μελέτη αναπτυξιακής νευροτοξικότητας ενσωματώνεται σε άλλη μελέτη ή συνδέεται με αυτήν, είναι επιτακτική ανάγκη να διατηρείται η αρτιότητα και των δύο τύπων μελέτης. Κάθε δοκιμή πρέπει να είναι σύμφωνη με τις ισχύουσες νομοθετικές διατάξεις ή κατευθυντήριες γραμμές κυβερνητικών ή θεσμικών οργάνων για τη χρήση πειραματόζωων στην έρευνα (π.χ. 18).

4. Πριν από τη διεξαγωγή της μελέτης, το εργαστήριο δοκιμών θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη όλες τις διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με την ελεγχόμενη χημική ουσία, μεταξύ των οποίων η ταυτότητα και η χημική δομή της, οι φυσικές και χημικές ιδιότητές της, τα αποτελέσματα άλλων in vitro ή in vivo δοκιμών τοξικότητας της εν λόγω χημικής ουσίας, τα τοξικολογικά δεδομένα που αφορούν ουσίες ανάλογης χημικής δομής, καθώς και τις προβλεπόμενες χρήσεις της ουσίας. Οι πληροφορίες αυτές είναι απαραίτητες για να διασφαλίζεται ότι η δοκιμή έχει ουσιαστική σημασία για την προστασία της υγείας του ανθρώπου και διευκολύνουν την επιλογή της κατάλληλης αρχικής δόσης χορήγησης.

▼M5

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

5. Η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται σε ζώα κατά τη διάρκεια της κύησης και της γαλουχίας. Υποβάλλονται σε δοκιμή οι μητέρες για την εκτίμηση των επιδράσεων σε κυοφορούντα και θηλάζοντα θηλυκά ζώα, ενώ είναι επίσης δυνατόν να προκύψουν και συγκριτικά στοιχεία (μητέρες έναντι απογόνων). Για την αξιολόγηση της νευροτοξικότητας, επιλέγονται τυχαία απόγονοι από την ίδια γέννα. Η αξιολόγηση συνίσταται σε παρατηρήσεις για τον εντοπισμό έντονων μακροσκοπικών νευρολογικών και συμπεριφορικών ανωμαλιών, συμπεριλαμβανομένων της αξιολόγησης της σωματικής ανάπτυξης, της οντογένεσης συμπεριφοράς, της κινητικής δραστηριότητας, της κινητικής και αισθητηριακής λειτουργίας, της μάθησης και της μνήμης, καθώς και αξιολόγηση του βάρους του εγκεφάλου και των νευροπαθολογικών ευρημάτων κατά τη μεταγεννητική ανάπτυξη και την ενήλικη ζωή.

6. Όταν η μέθοδος δοκιμών εφαρμόζεται ως χωριστή μελέτη, μπορούν να χρησιμοποιηθούν επιπλέον διαθέσιμα ζώα σε κάθε ομάδα για συγκεκριμένες νευροσυμπεριφορικές, νευροπαθολογικές, νευροχημικές και ηλεκτροφυσιολογικές διαδικασίες, οι οποίες μπορούν να συμπληρώσουν τα δεδομένα που προκύπτουν από τις συνιστώμενες στην παρούσα μέθοδο δοκιμών εξετάσεις (16)(19)(20)(21). Οι συμπληρωματικές διαδικασίες είναι ιδιαίτερα χρήσιμες στις περιπτώσεις όπου οι εμπειρικές παρατηρήσεις, οι αναμενόμενες επιδράσεις ή ο μηχανισμός/τρόπος δράσης υποδηλώνουν συγκεκριμένο τύπο νευροτοξικότητας. Οι συμπληρωματικές αυτές διαδικασίες μπορούν να εφαρμοστούν τόσο στις μητέρες όσο και στα νεογνά. Επιπλέον, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν επίσης διαδικασίες ex vivo ή in vitro, εφόσον δεν θίγουν την αρτιότητα των διαδικασιών in vivo.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Επιλογή ζωικού είδους

7. Το προτιμώμενο είδος για τη δοκιμή είναι ο επίμυς (αρουραίος), αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη, όταν είναι σκόπιμο. Σημειώνεται, ωστόσο, ότι οι ημέρες κυοφορίας και μεταγεννητικής περιόδου που προσδιορίζονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών αφορούν τα συνήθως χρησιμοποιούμενα στελέχη επιμύων και ότι, εάν χρησιμοποιηθεί διαφορετικό ζωικό είδος ή μη σύνηθες στέλεχος, θα πρέπει να επιλεγούν συγκρίσιμες χρονικές περίοδοι. Η χρήση άλλου είδους θα πρέπει να αιτιολογείται βάσει τοξικολογικών, φαρμακοκινητικών και/ή άλλων δεδομένων. Η αιτιολόγηση θα πρέπει να περιλαμβάνει τη διαθεσιμότητα μεταγεννητικών νευροσυμπεριφορικών και νευροπαθολογικών εκτιμήσεων για το συγκεκριμένο είδος. Εάν έχει προηγηθεί δοκιμή που προκάλεσε ανησυχίες, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το είδος/στέλεχος που ήγειρε τις ανησυχίες. Λόγω των διαφορετικών χαρακτηριστικών των διαφόρων στελεχών επιμύων όσον αφορά τις επιδόσεις, θα πρέπει να υπάρχουν στοιχεία που αποδεικνύουν επαρκή γονιμότητα και ανταπόκριση του στελέχους που επιλέγεται να χρησιμοποιηθεί. Πρέπει να τεκμηριώνονται η αξιοπιστία και η ευαισθησία άλλων ειδών στον εντοπισμό της αναπτυξιακής νευροτοξικότητας.

Συνθήκες στέγασης και διατροφής

8. Η θερμοκρασία του θαλάμου πειραματόζωων θα πρέπει να είναι 22 ± 3 °C. Αν και η σχετική υγρασία θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου, εν τούτοις θα πρέπει να επιδιώκεται μια τιμή 50-60 %. Ο φωτισμός θα πρέπει να είναι τεχνητός με φωτοπερίοδο 12 ωρών. Είναι επίσης δυνατόν να αντιστραφεί ο κύκλος του φωτός πριν από το ζευγάρωμα και κατά τη διάρκεια της μελέτης, ώστε οι αξιολογήσεις των τελικών σημείων που σχετίζονται με τις λειτουργίες και τη συμπεριφορά να πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια της περιόδου σκότους (υπό ερυθρό φως), δηλ. κατά τον χρόνο της φυσιολογικής δραστηριότητας των ζώων (22). Σε περίπτωση αλλαγής του κύκλου φωτός-σκότους πρέπει να προβλέπεται επαρκής χρόνος εγκλιματισμού, ώστε να μπορούν τα ζώα να προσαρμοστούν στον νέο κύκλο. Για τη διατροφή μπορούν να χρησιμοποιούνται συμβατικά εργαστηριακά σιτηρέσια με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού. Πρέπει να αναφέρεται το είδος της τροφής και του νερού και να υποβάλλονται και τα δύο σε ανάλυση για προσμείξεις.

▼M5

9. Τα ζώα μπορούν να στεγάζονται ατομικά ή σε κλωβούς, σε μικρές ομάδες του ίδιου φύλου. Οι διαδικασίες ζευγαρώματος θα πρέπει να εκτελούνται σε κλωβούς κατάλληλους για τον σκοπό αυτό. Μόλις υπάρξουν ενδείξεις συνουσίας ή, το αργότερο, τη 15η ημέρα κύησης, τα ζευγαρωμένα ζώα θα πρέπει να στεγάζονται χωριστά σε κλωβούς τοκετού. Η διάταξη των κλωβών θα πρέπει να ελαχιστοποιεί την πιθανότητα επιδράσεων οφειλόμενων στη θέση των κλωβών. Στα ζευγαρωμένα θηλυκά ζώα θα πρέπει να παρέχονται κατάλληλα και καθορισμένα υλικά κατασκευής φωλιάς όταν πλησιάζει ο τοκετός. Είναι γνωστό ότι ο ακατάλληλος χειρισμός ή το άγχος κατά τη διάρκεια της κύησης μπορεί να έχει δυσμενή αποτελέσματα, μεταξύ των οποίων προγεννητική απώλεια της κύησης και αλλαγή της εμβρυικής και μεταγεννητικής ανάπτυξης. Για την αποφυγή της αποβολής εμβρύων εξαιτίας παραγόντων που δεν σχετίζονται με την αγωγή, θα πρέπει να εκτελούνται με προσοχή οι χειρισμοί των ζώων κατά την κυοφορία και να αποτρέπεται η πρόκληση άγχους από εξωτερικούς παράγοντες, όπως ο υπερβολικός εξωτερικός θόρυβος.

Προετοιμασία των ζώων

10. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή ζώα, εγκλιματισμένα στις εργαστηριακές συνθήκες, τα οποία δεν έχουν υποβληθεί στο παρελθόν σε πειραματικές διαδικασίες, εκτός εάν η μελέτη έχει ενσωματωθεί σε άλλη μελέτη (βλ. παράγραφο 3). Τα ζώα της δοκιμής θα πρέπει να χαρακτηρίζονται ως προς το είδος, το στέλεχος, την προέλευση, το φύλο, το βάρος και την ηλικία. Κάθε ζώο θα πρέπει να λαμβάνει αποκλειστικό αναγνωριστικό αριθμό και να σημαίνεται με αυτόν. Τα ζώα όλων των ομάδων δοκιμής θα πρέπει, στο μέτρο του εφικτού, να έχουν παρόμοιο βάρος και ηλικία, εντός των φυσιολογικών ορίων του είδους και του στελέχους που αποτελούν το αντικείμενο της μελέτης. Σε κάθε επίπεδο δόσης θα πρέπει να χρησιμοποιούνται νεαρά ενήλικα άτοκα θηλυκά ζώα. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για την αποφυγή ζευγαρώματος ζώων προερχόμενων από την ίδια γέννα. Η ημέρα κύησης (ΗΚ) 0 είναι η ημέρα κατά την οποία παρατηρούνται κολπικό βύσμα και/ή σπέρμα. Σε περίπτωση αγοράς ζώων με συγκεκριμένη ημερομηνία έναρξης κύησης από προμηθευτή, θα πρέπει να τους παρέχεται επαρκής χρόνος εγκλιματισμού (π.χ. 2-3 ημέρες). Τα ζευγαρωμένα θηλυκά ζώα θα πρέπει να τοποθετούνται στις ομάδες μαρτύρων και αγωγής τυχαία και χωρίς ιδιαίτερες προτιμήσεις και, εφόσον είναι δυνατόν, να κατανέμονται ομοιογενώς μεταξύ των ομάδων (π.χ. συνιστάται στρωματοποιημένη διαδικασία τυχαιοποίησης για την εξασφάλιση ομοιογενούς κατανομής μεταξύ όλων των ομάδων, όπως η διαδικασία που βασίζεται στο σωματικό βάρος). Τα θηλυκά ζώα που έχουν γονιμοποιηθεί από το ίδιο αρσενικό θα πρέπει να κατανέμονται ισομερώς σε όλες τις ομάδες.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αριθμός και φύλο των ζώων

11. Κάθε ομάδα δοκιμής και μαρτύρων θα πρέπει να περιέχει επαρκή αριθμό κυοφορούντων θηλυκών ζώων που θα εκτεθούν στην ελεγχόμενη χημική ουσία, ώστε να εξασφαλίζεται η γέννηση κατάλληλου αριθμού απογόνων για την αξιολόγηση της νευροτοξικότητας. Συνιστάται να χρησιμοποιούνται συνολικά 20 γέννες σε κάθε επίπεδο δόσης. Επιτρέπονται σχεδιασμοί που προβλέπουν ομάδες για επανάληψη χορήγησης ή κλιμακωτή χορήγηση των δόσεων, εάν επιτυγχάνονται οι συνολικοί αριθμοί γεννών ανά ομάδα και να χρησιμοποιούνται κατάλληλα στατιστικά μοντέλα για τη συνεκτίμηση των επαναλήψεων.

12. Κατά την 4η μεταγεννητική ημέρα (ΜΓΗ) ή πριν από αυτή (η ημέρα τοκετού είναι η ΜΓΗ 0), θα πρέπει να προσαρμόζεται το πλήθος νεογνών κάθε γέννας με την απομάκρυνση των πλεοναζόντων νεογνών μέσω τυχαίας επιλογής, ώστε όλες οι γέννες να έχουν ομοιόμορφο μέγεθος (23), το οποίο δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το μέσο μέγεθος γέννας στο χρησιμοποιούμενο στέλεχος τρωκτικών (8-12). Η γέννα θα πρέπει να περιλαμβάνει, στο μέτρο του δυνατού, ίσο αριθμό αρσενικών και θηλυκών νεογνών. Η επιλεκτική απομάκρυνση νεογνών, π.χ. βάσει του σωματικού βάρους, δεν είναι αποδεκτή. Μετά την τυποποίηση των γεννών (επιλογή ακατάλληλων ζώων) και πριν από τον έλεγχο των λειτουργικών τελικών σημείων, κάθε νεογνό που προορίζεται για δοκιμή πριν και μετά τον απογαλακτισμό θα πρέπει να λαμβάνει αποκλειστικό αναγνωριστικό κωδικό με τη χρήση κατάλληλης ανώδυνης μεθόδου ταυτοποίησης νεογνών (π.χ. 24).

▼M5

Ένταξη των ζώων για δοκιμές λειτουργικών ιδιοτήτων και συμπεριφοράς, αξιολόγηση του βάρους του εγκεφάλου και νευροπαθολογική αξιολόγηση

13. Η μέθοδος δοκιμών επιτρέπει διάφορες προσεγγίσεις όσον αφορά την ένταξη των ζώων που εκτίθενται ενδομητρίως και μέσω του θηλασμού σε δοκιμές λειτουργικών ιδιοτήτων και συμπεριφοράς, προσδιορισμού της σεξουαλικής ωρίμασης και του βάρους του εγκεφάλου και νευροπαθολογικής αξιολόγησης (25). Μπορούν να προστεθούν, κατά περίπτωση, και άλλες δοκιμές νευροσυμπεριφορικής λειτουργίας (π.χ. κοινωνική συμπεριφορά), νευροχημείας ή νευροφυσιολογίας, εφόσον δεν θέτουν σε κίνδυνο την αρτιότητα των αρχικών απαιτούμενων δοκιμών.

14. Την 4η ΜΓΗ ή μετά από αυτήν επιλέγονται νεογνά από κάθε ομάδα δόσης και κατανέμονται για τις αξιολογήσεις των τελικών σημείων. Η επιλογή των νεογνών πρέπει να εξασφαλίζει, στο μέτρο του δυνατού, την ίση εκπροσώπηση των δύο φύλων από κάθε γέννα σε κάθε ομάδα δόσης και σε όλες τις δοκιμές. Για τον έλεγχο της κινητικής δραστηριότητας θα πρέπει να υποβάλλεται σε δοκιμή το ίδιο ζεύγος αρσενικών και θηλυκών νεογνών σε κάθε ηλικία πριν από τον απογαλακτισμό (βλ. παράγραφο 35). Για όλους τους άλλους ελέγχους, το ίδιο ή διαφορετικά ζεύγη αρσενικών και θηλυκών ζώων μπορούν να υποβάλλονται σε διαφορετικές δοκιμές συμπεριφοράς. Ενδέχεται να είναι αναγκαία η ένταξη διαφορετικών νεογνών στις δοκιμές γνωσιακής λειτουργίας απογαλακτισμένων ζώων και στις αντίστοιχες δοκιμές σε ενήλικα ζώα προκειμένου να μη γίνεται σύγχυση με τις επιδράσεις της ηλικίας και της προηγούμενης εκπαίδευσης στις μετρήσεις αυτές (26)(27). Τα νεογνά που δεν έχουν επιλεγεί για δοκιμή είναι δυνατόν να θανατώνονται ανώδυνα μετά τον απογαλακτισμό (21η ΜΓΗ). Κάθε αλλαγή στην ένταξη νεογνών στις δοκιμές θα πρέπει να αναφέρεται. Η στατιστική μονάδα μέτρησης πρέπει να είναι η γέννα (ή η μητέρα) και όχι το νεογνό.

15. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι κατανομής των νεογνών στις εξετάσεις πριν και μετά τον απογαλακτισμό, τις γνωσιακές δοκιμές, τις παθολογικές εξετάσεις κ.λπ. (βλ. σχήμα 1 για τον γενικό σχεδιασμό και προσάρτημα 1 για παραδείγματα ένταξης στις δοκιμές). Οι συνιστώμενοι ελάχιστοι αριθμοί ζώων σε κάθε ομάδα δόσης για τις εξετάσεις πριν και μετά τον απογαλακτισμό είναι οι εξής:

Κλινικές παρατηρήσεις και σωματικό βάρος	Όλα τα ζώα
Λεπτομερείς κλινικές παρατηρήσεις	20/φύλο (1/φύλο/γέννα)
Βάρος εγκεφάλου (μετά από μονιμοποίηση), 11η-22η ΜΓΗ	10/φύλο (1/γέννα)
Βάρος εγκεφάλου (χωρίς μονιμοποίηση), ~70ή ΜΓΗ	10/φύλο (1/γέννα)
Νευροπαθολογία (μονιμοποίηση με εμβάπτιση ή έγχυση), 11η-22η ΜΓΗ	10/φύλο (1/γέννα)
Νευροπαθολογία (μονιμοποίηση με έγχυση), ~ 70ή ΜΓΗ	10/φύλο (1/γέννα)
Σεξουαλική ωρίμανση	20/φύλο (1/φύλο/γέννα)
Άλλα ορόσημα ανάπτυξης (προαιρετικά)	Όλα τα ζώα
Οντογένεση συμπεριφοράς	20/φύλο (1/φύλο/γέννα)
Κινητική δραστηριότητα	20/φύλο (1/φύλο/γέννα)
Κινητική και αισθητηριακή λειτουργία	20/φύλο (1/φύλο/γέννα)
Μάθηση και μνήμη	10/φύλο (α) (1/γέννα)

(α) Ανάλογα με την ευαισθησία των δοκιμών γνωστικής λειτουργίας, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο μελέτης μεγαλύτερου αριθμού ζώων, π.χ. έως 1 αρσενικό και 1 θηλυκό ζώο ανά γέννα (για τους τρόπους ένταξης των ζώων στις δοκιμές βλ. προσάρτημα 1) [περαιτέρω οδηγίες για το μέγεθος του δείγματος παρέχονται στο καθοδηγητικό έγγραφο αριθ. 43 του ΟΟΣΑ (8)].

▼M5

Δοσολογία

16. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τρία τουλάχιστον επίπεδα δόσης και ένας συντρέχων μάρτυρας. Τα διαστήματα μεταξύ των επιπέδων δόσης θα πρέπει να εξασφαλίζουν τη διαβάθμιση των τοξικών επιδράσεων. Εάν δεν υπάρχουν περιορισμοί λόγω του φυσικοχημικού χαρακτήρα ή των βιολογικών ιδιοτήτων της χημικής ουσίας, το ανώτατο επίπεδο δόσης θα πρέπει να επιλέγεται με στόχο την επαγωγή τοξικότητας στις μητέρες (π.χ. κλινικά σημεία, μειωμένη αύξηση σωματικού βάρους (όχι άνω του 10 %) και/ή ενδείξεις δοσοπεριοριστικής τοξικότητας σε όργανο-στόχο). Η υψηλή δόση μπορεί να περιορίζεται σε 1 000 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα, με ορισμένες εξαιρέσεις. Παραδείγματος χάριν, η αναμενόμενη έκθεση του ανθρώπου μπορεί να δείξει αν χρειάζεται να χρησιμοποιηθεί υψηλότερο επίπεδο δόσης. Εναλλακτικά, θα πρέπει να εκπονούνται πιλοτικές μελέτες ή προκαταρκτικές μελέτες καθορισμού του εύρους για τον προσδιορισμό της μέγιστης δοσολογίας που θα χρησιμοποιηθεί και η οποία θα πρέπει να προκαλεί τον ελάχιστο απαιτούμενο βαθμό τοξικότητας στη μητέρα. Εάν έχει αποδειχθεί, μέσω τυπικής μελέτης αναπτυξιακής τοξικότητας ή πιλοτικής μελέτης, ότι η ελεγχόμενη χημική ουσία είναι τοξική στην ανάπτυξη, το ανώτατο επίπεδο δόσης θα πρέπει να είναι η μέγιστη δόση που δεν θα προκαλέσει υπερβολική τοξικότητα στους απογόνους ή ενδομήτριο ή νεογνικό θάνατο ή δυσμορφίες, σε βαθμό που να αποκλείει την ουσιαστική αξιολόγηση της νευροτοξικότητας. Το κατώτατο επίπεδο δόσης θα πρέπει να έχει ως στόχο την απουσία ενδείξεων τοξικότητας στη μητέρα ή στην ανάπτυξη, συμπεριλαμβανομένης της νευροτοξικότητας. Θα πρέπει να επιλέγεται φθίνουσα σειρά επιπέδων δόσης ώστε να καταδεικνύονται η σχέση δόσης-απόκρισης και το επίπεδο στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις (NOAEL) ή δόσεις κοντά στο όριο ανίχνευσης που επιτρέπουν τον προσδιορισμό της δόσης αναφοράς. Συχνά, η βέλτιστη επιλογή για τον καθορισμό των ελαττούμενων επιπέδων δόσης είναι τα υποδιπλάσια ή υποτετραπλάσια διαστήματα μεταξύ αυτών, ενώ είναι πολλές φορές προτιμότερο να προστίθεται και τέταρτη ομάδα δοκιμής αντί να χρησιμοποιούνται πολύ μεγάλα διαστήματα μεταξύ των δόσεων (π.χ. μεγαλύτερο από 10πλάσιο).

17. Κατά την επιλογή των επιπέδων δόσης θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όλα τα υπάρχοντα δεδομένα τοξικότητας, καθώς και πρόσθετα στοιχεία για τον μεταβολισμό και την τοξικοκινητική της ελεγχόμενης χημικής ουσίας ή συγγενών υλικών. Τα στοιχεία αυτά ενδέχεται να διευκολύνουν επίσης την κατάδειξη της καταλληλότητας του δοσολογικού σχήματος. Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο απευθείας χορήγησης δόσεων σε νεογνά βάσει στοιχείων που αφορούν την έκθεση και τη φαρμακοκινητική (28)(29). Πριν από την εκπόνηση μελετών με απευθείας χορήγηση δόσεων θα πρέπει να εξετάζονται προσεκτικά τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα (30).

18. Η αντίστοιχη ομάδα μάρτυρα θα πρέπει να είναι ομάδα μαρτύρων υποβαλλόμενη σε εικονική αγωγή (sham) ή ομάδα μαρτύρων στους οποίους χορηγείται ο φορέας, εάν χρησιμοποιείται φορέας για τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Σε όλα τα ζώα θα πρέπει κανονικά να χορηγείται ο ίδιος όγκος ελεγχόμενης χημικής ουσίας ή φορέα, βάσει του σωματικού βάρους. Εάν χρησιμοποιείται φορέας ή άλλο πρόσθετο για τη διευκόλυνση της χορήγησης των δόσεων, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: οι επιδράσεις στην απορρόφηση, την κατανομή, τον μεταβολισμό ή την κατακράτηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, οι επιδράσεις στις χημικές ιδιότητές της που ενδέχεται να μεταβάλλουν τα τοξικά χαρακτηριστικά της και οι επιδράσεις στην κατανάλωση τροφής ή νερού ή στη διατροφική κατάσταση των ζώων. Ο φορέας πρέπει να μην έχει επιδράσεις που θα μπορούσαν να παρεμποδίσουν την ερμηνεία της μελέτης και να μην είναι τοξικός στη νευροσυμπεριφορά, ούτε να επιδρά στην αναπαραγωγή ή την ανάπτυξη. Στην περίπτωση χρήσης νέων (καινοτομικών) φορέων, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται και ομάδα μαρτύρων υποβαλλόμενη σε εικονική αγωγή επιπλέον της ομάδας μαρτύρων όπου χορηγείται ο φορέας. Η μεταχείριση των ζώων των ομάδων μαρτύρων θα πρέπει να είναι ακριβώς ίδια με εκείνη των ζώων των ομάδων δοκιμών.

▼M5

Χορήγηση δόσεων

19. Η ελεγχόμενη χημική ουσία ή ο φορέας θα πρέπει να χορηγούνται από την οδό μέσω της οποίας είναι πιθανότερη η έκθεση του ανθρώπου και με βάση τα διαθέσιμα στοιχεία για τον μεταβολισμό και την κατανομή στα ζώα της δοκιμής. Η οδός χορήγησης είναι γενικά η στοματική (με στομαχικό καθετήρα, μέσω της τροφής, μέσω του πόσιμου νερού), αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες οδοί (π.χ. δερματική, αναπνευστική) ανάλογα με τα χαρακτηριστικά και τις προβλεπόμενες ή γνωστές οδούς έκθεσης του ανθρώπου [περαιτέρω οδηγίες παρέχονται στο καθοδηγητικό έγγραφο αριθ. 43 (8)]. Η επιλεγόμενη οδός χορήγησης θα πρέπει να αιτιολογείται. Η ελεγχόμενη χημική ουσία θα πρέπει να χορηγείται την ίδια περίπου ώρα κάθε ημέρα.

20. Η χορηγούμενη σε κάθε ζώο δόση θα πρέπει κανονικά να βασίζεται στο πλέον πρόσφατο προσδιορισθέν σωματικό βάρος του. Ωστόσο, οι δόσεις θα πρέπει να ρυθμίζονται με ιδιαίτερη προσοχή κατά τη διάρκεια του τελευταίου τρίτου της κύησης. Εάν παρατηρείται υπερβολική τοξικότητα στις υπό αγωγή μητέρες, αυτές θα πρέπει να θανατώνονται ανώδυνα.

21. Η ελεγχόμενη χημική ουσία ή ο φορέας θα πρέπει να χορηγείται τουλάχιστον καθημερινά στα ζευγαρωμένα θηλυκά ζώα από την εμφύτευση (ΗΚ 6) έως το τέλος της γαλουχίας (21η ΜΓΗ), έτσι ώστε τα νεογνά να εκτίθενται στην ελεγχόμενη χημική ουσία κατά την προγεννητική και τη μεταγεννητική νευρολογική τους ανάπτυξη. Η ηλικία στην οποία αρχίζει η χορήγηση των δόσεων, καθώς και η διάρκεια και η συχνότητα χορήγησης, μπορούν να προσαρμόζονται, εάν υπάρχουν στοιχεία που συνηγορούν υπέρ ενός πειραματικού σχεδιασμού με μεγαλύτερη συνάφεια προς την έκθεση του ανθρώπου. Η διάρκεια χορήγησης των δόσεων θα πρέπει να προσαρμόζεται στην περίπτωση άλλων ειδών, ώστε να εξασφαλίζεται η έκθεση κατά τη διάρκεια όλων των αρχικών σταδίων ανάπτυξης του εγκεφάλου (δηλ. στάδια ισοδύναμα με την προγεννητική και την πρώιμη μεταγεννητική ανάπτυξη του ανθρώπινου εγκεφάλου). Η χορήγηση δόσεων μπορεί να αρχίζει από την έναρξη της κυοφορίας (ΗΚ 0), αν και θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η πιθανότητα απώλειας πριν από την εμφύτευση εξαιτίας της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Ο κίνδυνος αυτός αποφεύγεται αν η χορήγηση αρχίσει την 6η ΗΚ, αλλά στην περίπτωση αυτή η αγωγή δεν καλύπτει τα αναπτυξιακά στάδια μεταξύ των ΗΚ 0 και 6. Όταν ένα εργαστήριο αγοράζει ζώα που έχουν ζευγαρώσει σε συγκεκριμένη ημερομηνία, είναι πρακτικά ανέφικτο να αρχίσει η χορήγηση δόσεων την ΗΚ 0, οπότε η 6η ΗΚ αποτελεί καλή ημέρα έναρξης. Το εργαστήριο δοκιμών θα πρέπει να καθορίζει το δοσολογικό σχήμα ανάλογα με τις σχετικές πληροφορίες για τις επιδράσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, την προηγούμενη πείρα του και παραμέτρους υλικοτεχνικής υποδομής. Το εν λόγω σχήμα μπορεί να περιλαμβάνει παράταση της χορήγησης δόσεων και μετά τον απογαλακτισμό. Δεν θα πρέπει να χορηγείται δόση την ημέρα του τοκετού στα ζώα που δεν έχουν γεννήσει όλους τους απογόνους τους. Γενικά, υποτίθεται ότι τα νεογνά εκτίθενται μέσω του μητρικού γάλακτος. Ωστόσο, όταν δεν υπάρχουν αποδεικτικά στοιχεία συνεχούς έκθεσης των απογόνων, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο απευθείας χορήγησης δόσεων στα νεογνά. Η συνεχής έκθεση μπορεί να αποδειχθεί, λόγου χάριν, από στοιχεία για τη φαρμακοκινητική, την τοξικότητα στους απογόνους ή από αλλαγές στους βιοδείκτες (28).

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Παρατηρήσεις στις μητέρες

22. Όλες οι μητέρες θα πρέπει να εξετάζονται με προσοχή, τουλάχιστον μία φορά ημερησίως, όσον αφορά τη γενική κατάσταση της υγείας τους, συμπεριλαμβανομένης της νοσηρότητας και της θνησιμότητας.

23. Κατά τις περιόδους αγωγής και παρατήρησης, τουλάχιστον δέκα μητέρες ανά επίπεδο δόσης θα πρέπει να υποβάλλονται περιοδικά σε λεπτομερέστερες κλινικές παρατηρήσεις (τουλάχιστον δύο φορές κατά την περίοδο χορήγησης δόσεων στη διάρκεια της κύησης και δύο φορές κατά την περίοδο χορήγησης δόσεων στη διάρκεια της γαλουχίας). Εκπαιδευμένοι τεχνικοί, που δεν γνωρίζουν την αγωγή στην οποία υποβάλλονται τα ζώα, θα πρέπει να τα παρατηρούν έξω από τους κλωβούς, εφαρμόζοντας τυποποιημένες διαδικασίες ώστε να ελαχιστοποιούνται το άγχος των ζώων και η μεροληψία του παρατηρητή και να μεγιστοποιείται η αξιοπιστία μεταξύ παρατηρητών. Συνιστάται να αναλαμβάνει ο ίδιος τεχνικός τις παρατηρήσεις στο πλαίσιο δεδομένης μελέτης, εφόσον είναι δυνατόν.

▼M5

24. Θα πρέπει να καταγράφεται η παρουσία των παρατηρούμενων σημείων και, εφόσον είναι εφικτό, η έκτασή τους. Οι κλινικές παρατηρήσεις θα πρέπει να περιλαμβάνουν, χωρίς η απαρίθμηση αυτή να είναι περιοριστική, αλλαγές στο δέρμα, στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους, την εμφάνιση εκκρίσεων και τη δραστηριότητα του αυτόνομου νευρικού συστήματος (π.χ. δακρύρροια, ανόρθωση του τριχώματος, μεταβολή του μεγέθους της κόρης των οφθαλμών, ασυνήθης ρυθμός αναπνοής και/ή αναπνοή από το στόμα και τυχόν ανωμαλίες ούρησης και κενώσεων).

25. Θα πρέπει επίσης να σημειώνονται οι ασυνήθεις αποκρίσεις όσον αφορά τη θέση του σώματος, τη δραστηριότητα (π.χ. αύξηση ή μείωση της διάθεσης εξερεύνησης του τυποποιημένου χώρου) και τον συντονισμό των κινήσεων. Θα πρέπει να καταγράφονται ακόμη οι αλλαγές στη βάδιση (π.χ. ταλάντευση, αταξία), στη στάση του σώματος (π.χ. κύρτωση της ράχης) και στην αντίδραση στους χειρισμούς, την τοποθέτηση και σε άλλα ερεθίσματα από το περιβάλλον, καθώς και η εμφάνιση κλονικών ή τονικών κρίσεων, σπασμών, τρόμου και στερεότυπων κινήσεων (π.χ. υπερβολική περιποίηση του τριχώματος, ασυνήθεις κινήσεις της κεφαλής, συνεχείς περιστροφές), η περίεργη συμπεριφορά (π.χ. δήγματα ή υπερβολική λείξη, αυτοακρωτηριασμός, οπισθοβάδιση, φώνηση) και η επιθετικότητα.

26. Θα πρέπει να καταγράφονται τα σημεία τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένων της ημέρας και ώρας εκδήλωσης, του βαθμού και της διάρκειάς τους.

27. Τα ζώα θα πρέπει να ζυγίζονται την ώρα που χορηγείται η δόση, τουλάχιστον μία φορά εβδομαδιαίως καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης, καθώς και την ημέρα του τοκετού ή κοντά σε αυτή και την 21η ΜΓΗ (απογαλακτισμός). Στις μελέτες με χρήση στομαχικού καθετήρα, οι μητέρες θα πρέπει να ζυγίζονται τουλάχιστον δύο φορές εβδομαδιαίως. Οι δόσεις θα πρέπει να ρυθμίζονται αναλόγως κατά τον χρόνο προσδιορισμού του σωματικού βάρους. Η κατανάλωση τροφής θα πρέπει να μετράται σε εβδομαδιαία βάση, τουλάχιστον κατά την κύηση και τη γαλουχία. Σε περίπτωση έκθεσης μέσω του πόσιμου νερού, θα πρέπει να μετράται η κατανάλωση νερού τουλάχιστον σε εβδομαδιαία βάση.

Παρατηρήσεις στους απογόνους

28. Όλοι οι απόγονοι θα πρέπει να παρατηρούνται με προσοχή, τουλάχιστον ημερησίως, για σημεία τοξικότητας, καθώς και για νοσηρότητα και θνησιμότητα.

29. Κατά τις περιόδους αγωγής και παρατήρησης, οι απόγονοι θα πρέπει να υποβάλλονται σε λεπτομερέστερες κλινικές παρατηρήσεις. Εκπαιδευμένοι τεχνικοί που δεν γνωρίζουν την αγωγή στην οποία υποβάλλονται τα ζώα θα πρέπει να παρατηρούν τους απογόνους (τουλάχιστον 1 νεογνό/φύλο/γέννα), εφαρμόζοντας τυποποιημένες διαδικασίες ώστε να ελαχιστοποιείται η μεροληψία και να μεγιστοποιείται η αξιοπιστία μεταξύ παρατηρητών. Συνιστάται να αναλαμβάνει τις παρατηρήσεις ο ίδιος τεχνικός, εφόσον είναι δυνατόν. Θα πρέπει να παρακολουθούνται τουλάχιστον τα τελικά σημεία που περιγράφονται στις παραγράφους 24 και 25, όπως ενδείκνυται για το παρατηρούμενο στάδιο της ανάπτυξης.

30. Θα πρέπει να καταγράφονται όλα τα τελικά σημεία τοξικότητας στους απογόνους, συμπεριλαμβανομένων της ημέρας και ώρας εκδήλωσης, του βαθμού και της διάρκειάς τους.

Ορόσημα σωματικής διάπλασης και ανάπτυξης

31. Οι αλλαγές στα ορόσημα ανάπτυξης πριν από τον απογαλακτισμό (π.χ. εκτύλιξη του πτερυγίου του ωτός, άνοιγμα των οφθαλμών, εμφάνιση κοπτήρων) συσχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με το σωματικό βάρος (30)(31). Το σωματικό βάρος αποτελεί ίσως τον καλύτερο δείκτη σωματικής ανάπτυξης. Ως εκ τούτου, συνιστάται να μετρώνται τα ορόσημα ανάπτυξης μόνο όταν υπάρχουν προγενέστερες ενδείξεις ότι θα προκύψουν πρόσθετες πληροφορίες από τα συγκεκριμένα τελικά σημεία. Ο χρόνος αξιολόγησης των παραμέτρων αυτών αναφέρεται στον πίνακα 1. Ανάλογα με τις προβλεπόμενες επιδράσεις και τα αποτελέσματα των αρχικών μετρήσεων, ενδέχεται να είναι σκόπιμη η προσθήκη και άλλων χρονικών σημείων ή η εκτέλεση των μετρήσεων σε άλλα στάδια της ανάπτυξης.

▼M5

32. Είναι σκόπιμο να χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της σωματικής ανάπτυξης η μετά τη συνουσία ηλικία αντί της μεταγεννητικής ηλικίας (33). Εάν τα νεογνά εξετάζονται την ημέρα του απογαλακτισμού, συνιστάται να προηγείται η εξέταση αυτή του καθαυτό απογαλακτισμού, ώστε να αποφεύγεται το πειραματικό σφάλμα λόγω του άγχους που συνδέεται με τον απογαλακτισμό. Επιπλέον, δεν θα πρέπει να εξετάζονται τα νεογνά κατά τις δύο πρώτες ημέρες μετά τον απογαλακτισμό.

Πίνακας 1

Χρόνος αξιολόγησης των οροσήμων σωματικής διάπλασης και ανάπτυξης και τελικά σημεία λειτουργιών/συμπεριφοράς (α)

Ηλικιακές περίοδοι / Τελικά σημεία	Πριν από τον απογαλακτισμό (β)	Ήβη (β)	Νεαρά ενήλικα ζώα (β)
Ορόσημα σωματικής διάπλασης και ανάπτυξης			
Σωματικό βάρος και κλινικές παρατηρήσεις	Εβδομαδιαίως (γ)	τουλάχιστον ανά δύο εβδομάδες	τουλάχιστον ανά δύο εβδομάδες
Βάρος εγκεφάλου	22η ΜΓΗ (δ)		κατά τη λήξη της μελέτης
Νευροπαθολογία	22η ΜΓΗ (δ)		κατά τη λήξη της μελέτης
Σεξουαλική ωρίμαση	—	κατά περίπτωση	—
Άλλα ορόσημα ανάπτυξης (ε)	κατά περίπτωση	—	—
Τελικά σημεία λειτουργιών/συμπεριφοράς			
Οντογένεση συμπεριφοράς	Τουλάχιστον δύο μετρήσεις		
Κινητική δραστηριότητα (συμπεριλαμβανομένης της εξοικείωσης)	1-3 φορές (στ)	—	μία φορά
Κινητική και αισθητηριακή λειτουργία	—	μία φορά	μία φορά
Μάθηση και μνήμη	—	μία φορά	μία φορά

(α) Στον πίνακα παρουσιάζεται η ελάχιστη συχνότητα μετρήσεων. Ανάλογα με τις προβλεπόμενες επιδράσεις και τα αποτελέσματα των αρχικών μετρήσεων, ενδέχεται να είναι σκόπιμη η προσθήκη και άλλων χρονικών σημείων (π.χ. ηλικιωμένα ζώα) ή η εκτέλεση των μετρήσεων σε άλλα στάδια της ανάπτυξης.

(β) Συνιστάται να μην εξετάζονται τα νεογνά κατά τις δύο πρώτες ημέρες μετά τον απογαλακτισμό (βλ. παράγραφο 32). Συνιστώμενες ηλικίες για τις δοκιμές κατά την περίοδο της ήβης: μάθηση και μνήμη = (25±2)η ΜΓΗ, κινητική και αισθητηριακή λειτουργία = (25±2)η ΜΓΗ. Η συνιστώμενη ηλικία για τις δοκιμές σε νεαρά ενήλικα ζώα είναι η 60ή-70ή ΜΓΗ.

(γ) Σε περίπτωση απευθείας χορήγησης δόσεων σε νεογνά, το σωματικό βάρος θα πρέπει να μετράται τουλάχιστον δύο φορές εβδομαδιαίως, για τη ρύθμιση των δόσεων όταν η αύξηση του σωματικού βάρους είναι ταχεία.

(δ) Το βάρος του εγκεφάλου και τα νευροπαθολογικά ευρήματα μπορούν να αξιολογούνται νωρίτερα (π.χ. την 11η ΜΓΗ), εάν κρίνεται σκόπιμο (βλ. παράγραφο 39).

(ε) Θα πρέπει να καταγράφονται και άλλα ορόσημα ανάπτυξης πέραν του σωματικού βάρους (π.χ. άνοιγμα των οφθαλμών), όταν κρίνεται σκόπιμο (βλ. παράγραφο 31).

(στ) Βλ. παράγραφο 35.

33. Θα πρέπει να καταμετρώνται τα ζωντανά νεογνά και να προσδιορίζεται το φύλο τους, π.χ. με οπτική εξέταση ή μέτρηση της πρωκτογεννητικής απόστασης (34)(35). Κάθε νεογνό μιας γέννας θα πρέπει να ζυγίζεται κατά τη γέννησή του ή αμέσως μετά, τουλάχιστον μία φορά εβδομαδιαίως καθ' όλη την περίοδο γαλουχίας και τουλάχιστον μία φορά ανά δύο εβδομάδες στη συνέχεια. Εφόσον αξιολογείται η σεξουαλική ωρίμαση, θα πρέπει να προσδιορίζονται, τουλάχιστον σε ένα αρσενικό και ένα θηλυκό ζώο ανά γέννα, η ηλικία και το σωματικό βάρος του ζώου όταν εμφανίζεται άνοιγμα του κόλπου (36) ή διαχωρισμός της πόσθης (37).

▼M5

Οντογένεση συμπεριφοράς

34. Θα πρέπει να μετράται η οντογένεση επιλεγμένων συμπεριφορών σε ένα τουλάχιστον νεογνό/φύλο/γέννα κατά την κατάλληλη ηλικιακή περίοδο και να χρησιμοποιούνται τα ίδια νεογνά όλες τις ημέρες δοκιμής για όλες τις αξιολογούμενες συμπεριφορές. Οι ημέρες μέτρησης θα πρέπει να είναι ομοιόμορφα κατανεμημένες στην εν λόγω περίοδο ώστε να καθορίζονται οι φυσιολογικές ή οι σχετικές με την αγωγή μεταβολές της οντογένεσης της εκάστοτε συμπεριφοράς (38). Παραδείγματα συμπεριφορών των οποίων η οντογένεση θα μπορούσε να αξιολογηθεί είναι το διορθωτικό αντανακλαστικό, ο αρνητικός γεωτακτισμός και η κινητική δραστηριότητα (38)(39)(40).

Κινητική δραστηριότητα

35. Θα πρέπει να παρακολουθείται η κινητική δραστηριότητα (41)(42)(43)(44)(45) κατά την ηλικιακή περίοδο πριν από τον απογαλακτισμό και κατά την ενήλικη ζωή. Για την εξέταση κατά τον χρόνο του απογαλακτισμού, βλ. παράγραφο 32. Η συνεδρία εξέτασης θα πρέπει να έχει αρκετά μεγάλη διάρκεια ώστε να καταδεικνύεται η ενδοσυνεδριακή εξοικείωση των μαρτύρων που δεν υποβάλλονται σε αγωγή. Συνιστάται ιδιαιτέρως η χρήση της κινητικής δραστηριότητας για την αξιολόγηση της οντογένεσης συμπεριφοράς. Εάν η κινητική δραστηριότητα χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της οντογένεσης συμπεριφοράς, θα πρέπει να εξετάζονται τα ίδια ζώα σε όλες τις συνεδρίες πριν από τον απογαλακτισμό. Οι εξετάσεις θα πρέπει να είναι αρκετά συχνές ώστε να αξιολογείται η οντογένεση της ενδοσυνεδριακής εξοικείωσης (44). Για τον σκοπό αυτό ενδέχεται να απαιτούνται τρεις ή περισσότερες χρονικές περίοδοι πριν από τον απογαλακτισμό, συμπεριλαμβανομένης της ημέρας απογαλακτισμού (π.χ.13η, 17η και 21η ΜΓΗ). Θα πρέπει επίσης να εξετάζονται τα ίδια ζώα ή ζώα της ίδιας γέννας σε στάδιο της ενήλικης ζωής τους κοντά στη λήξη της μελέτης (π.χ. 60ή-70ή ΜΓΗ). Εάν είναι απαραίτητο, μπορούν να προστεθούν και άλλες ημέρες εξέτασης. Η κινητική δραστηριότητα θα πρέπει να παρακολουθείται με συσκευή αυτόματης καταγραφής δραστηριοτήτων, ικανή να ανιχνεύει τόσο τις αυξήσεις όσο και τις μειώσεις τους (δηλ. η δραστηριότητα γραμμής βάσης που μετράται από τη συσκευή δεν θα πρέπει να είναι τόσο χαμηλή ώστε να αποκλείεται η ανίχνευση μειώσεων ούτε τόσο υψηλή ώστε να αποκλείεται η ανίχνευση αυξήσεων της δραστηριότητας). Κάθε συσκευή θα πρέπει να ελέγχεται με τυποποιημένες διαδικασίες ώστε να διασφαλίζεται, στο μέτρο του δυνατού, η αξιοπιστία της λειτουργίας όλων των συσκευών, όλες τις ημέρες. Εφόσον είναι δυνατόν, οι ομάδες αγωγής θα πρέπει να είναι ισόρροπα κατανεμημένες στις διάφορες συσκευές. Κάθε ζώο θα πρέπει να εξετάζεται χωριστά. Οι ομάδες αγωγής θα πρέπει να είναι αντισταθμισμένες ως προς τους χρόνους εξέτασης ώστε να αποφεύγονται πειραματικά σφάλματα οφειλόμενα στους κιρκάδιους ρυθμούς. Θα πρέπει να καταβάλλεται προσπάθεια ώστε οι διακυμάνσεις των συνθηκών δοκιμής να είναι ελάχιστες και να μη σχετίζονται συστηματικά με την αγωγή. Μεταξύ των μεταβλητών που μπορούν να επηρεάσουν πολλά μέτρα συμπεριφοράς, συμπεριλαμβανομένης της κινητικής δραστηριότητας, συγκαταλέγονται η ηχητική στάθμη, το μέγεθος και το σχήμα του κλωβού δοκιμής, η θερμοκρασία, η σχετική υγρασία, οι συνθήκες φωτός, οι οσμές, η χρήση των κλωβών στέγασης ή νέων κλωβών δοκιμής και οι περισπασμοί που προέρχονται από το περιβάλλον.

Κινητική και αισθητηριακή λειτουργία

36. Η κινητική και αισθητηριακή λειτουργία θα πρέπει να εξετάζονται λεπτομερώς τουλάχιστον μία φορά κατά την περίοδο της ήβης και μία φορά κατά την πρώτη περίοδο ενήλικης ζωής (π.χ. την 60ή-70ή ΜΓΗ). Για την εξέταση κατά τον χρόνο απογαλακτισμού, βλ. παράγραφο 32. Θα πρέπει να εκτελούνται επαρκείς δοκιμασίες ώστε να διασφαλίζεται κατάλληλη ποσοτική δειγματοληψία των αισθητηριακών διαδικασιών (σωματοαισθητικές, αιθουσαίες) και των κινητικών λειτουργιών (π.χ. δύναμη, συντονισμός). Παραδείγματα δοκιμασιών της κινητικής και αισθητηριακής λειτουργίας είναι το νωτιαίο αντανακλαστικό εκτατικού σπασμού (46), το διορθωτικό αντανακλαστικό (47)(48), η εξοικείωση με τον αιφνιδιασμό από ακουστικό ερέθισμα (40)(49)(50)(51)(52)(53)(54) και τα προκλητά δυναμικά (55).

▼M5

Δοκιμασίες μάθησης και μνήμης

37. Θα πρέπει να εκτελείται δοκιμασία συσχετιστικής μάθησης και μνήμης μετά τον απογαλακτισμό (π.χ. ημέρα 25±2) και σε νεαρά ενήλικα ζώα (από την 60ή ΜΓΗ και έπειτα). Για την υποβολή στη δοκιμασία κατά τον χρόνο απογαλακτισμού, βλ. παράγραφο 32. Σε αυτά τα δύο στάδια ανάπτυξης μπορούν να χρησιμοποιούνται οι ίδιες ή χωριστές δοκιμασίες. Παρέχεται ευελιξία στην επιλογή δοκιμασιών μάθησης και μνήμης για απογαλακτισμένους και ενήλικες επίμυες. Ωστόσο, οι δοκιμασίες θα πρέπει να είναι σχεδιασμένες κατά τρόπο ώστε να πληρούν δύο κριτήρια. Πρώτον, η μάθηση θα πρέπει να αξιολογείται είτε ως μεταβολή μεταξύ διαφόρων επαναλαμβανόμενων πειραμάτων ή συνεδριών μάθησης ή, στην περίπτωση των δοκιμασιών που περιλαμβάνουν μόνο ένα πείραμα, μεταβολή σε σχέση με μια κατάσταση βάσει της οποίας ελέγχονται οι μη συσχετιστικές επιδράσεις της εκπαίδευσης. Δεύτερον, οι δοκιμασίες θα πρέπει να περιλαμβάνουν κάποιο μέτρο της μνήμης (βραχυπρόθεσμης ή μακροπρόθεσμης) πέραν της αρχικής μάθησης (απόκτηση γνώσεων), το οποίο όμως δεν μπορεί να αναφέρεται εάν δεν έχει προκύψει από την ίδια δοκιμασία μέτρο της απόκτησης γνώσεων. Εάν από τις δοκιμασίες μάθησης και μνήμης προκύψει επίδραση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, μπορεί να εξεταστεί το ενδεχόμενο διεξαγωγής συμπληρωματικών δοκιμασιών για να αποκλειστούν εναλλακτικές ερμηνείες βάσει αλλαγών στις αισθητηριακές ή κινητικές ικανότητες ή στις ικανότητες που συνδέονται με κίνητρα συμπεριφοράς. Επιπλέον των ανωτέρω δύο κριτηρίων, συνιστάται να επιλέγεται η δοκιμασία μάθησης και μνήμης με βάση την αποδεδειγμένη ευαισθησία της στην κατηγορία της εξεταζόμενης χημικής ουσίας, εάν υπάρχουν σχετικές πληροφορίες στη βιβλιογραφία. Παραδείγματα δοκιμασιών που μπορούν να διεξάγονται για την εκπλήρωση των ανωτέρω κριτηρίων, όταν δεν υπάρχουν τέτοιες πληροφορίες, είναι τα εξής: παθητική αποφυγή (43)(56)(57), καθυστέρηση ταύτισης αντικειμένου με θέση σε ενήλικους (58) και ανήλικους επίμυες (59), οσφρητική εξάρτηση (43)(60), υδατικός λαβύρινθος κατά Morris (61)(62)(63), λαβύρινθος κατά Biel ή Cincinnati (64)(65), λαβύρινθος ακτινωτών βραχιόνων (66), λαβύρινθος T (43) και υιοθέτηση και διατήρηση ελεγχόμενης βάσει προγράμματος συμπεριφοράς (26)(67)(68). Πρόσθετες δοκιμές περιγράφονται στη βιβλιογραφία, για απογαλακτισμένους (26)(27) και ενήλικους επίμυες (19)(20).

Μεταθανάτια εξέταση

38. Οι μητέρες μπορούν να υποβάλλονται σε ευθανασία μετά τον απογαλακτισμό των απογόνων.

39. Διενεργείται νευροπαθολογική αξιολόγηση των απογόνων με τη χρήση ιστών από ζώα που έχουν θανατωθεί ανώδυνα την 22η ΜΓΗ ή νωρίτερα, μεταξύ της 11ης και της 22ης ΜΓΗ, καθώς και κατά τη λήξη της μελέτης. Στην περίπτωση των απογόνων που θανατώνονται έως και την 22η ΜΓΗ, θα πρέπει να αξιολογούνται ιστοί του εγκεφάλου, ενώ στην περίπτωση των ζώων που θανατώνονται κατά τη λήξη της μελέτης, θα πρέπει να αξιολογούνται ιστοί τόσο του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), όσο και του περιφερειακού (ΠΝΣ). Τα ζώα που θανατώνονται την 22η ΜΓΗ ή νωρίτερα μπορούν να μονιμοποιούνται είτε με εμβάπτιση είτε με έγχυση. Τα ζώα που θανατώνονται κατά τη λήξη της μελέτης θα πρέπει να μονιμοποιούνται με έγχυση. Θα πρέπει να εφαρμόζεται σχεδιασμός με αντιστάθμιση για όλες τις πτυχές της παρασκευής ιστικών δειγμάτων, από την έγχυση του μέσου στερέωσης στα ζώα και την ανατομή των ιστών έως την επεξεργασία των δειγμάτων τους και τη χρώση των αντικειμενοφόρων πλακών, ώστε κάθε παρτίδα να περιέχει αντιπροσωπευτικά δείγματα από κάθε ομάδα δόσης. Πρόσθετες οδηγίες για τη νευροπαθολογία παρέχονται στο καθοδηγητικό έγγραφο αριθ. 20 του ΟΟΣΑ (9), βλ. επίσης (103).

Επεξεργασία των δειγμάτων ιστών

40. Θα πρέπει να σημειώνονται όλες οι μακροσκοπικές ανωμαλίες που είναι εμφανείς κατά τη νεκροψία. Τα λαμβανόμενα δείγματα ιστών θα πρέπει να αντιπροσωπεύουν όλες τις σημαντικές περιοχές του νευρικού συστήματος, να διατηρούνται σε κατάλληλο μέσο μονιμοποίησης και να υποβάλλονται σε επεξεργασία σύμφωνα με τυποποιημένα δημοσιευμένα ιστολογικά πρωτόκολλα (69)(70)(71) (103). Ο εγκλεισμός σε παραφίνη είναι αποδεκτός για τους ιστούς του ΚΝΣ και του ΠΝΣ, αλλά ενδέχεται να είναι σκόπιμη η

▼M5

χρήση οσμίου μετά τη μονιμοποίηση, σε συνδυασμό με εγκλεισμό σε εποξειδική ρητίνη, όταν απαιτείται υψηλότερος βαθμός ανάλυσης (π.χ. για περιφερειακά νεύρα, όταν υπάρχουν υπόνοιες περιφερειακής νευροπάθειας και/ή για τη μορφομετρική ανάλυση περιφερειακών νεύρων. Οι εγκεφαλικοί ιστοί που συλλέγονται για μορφομετρική ανάλυση θα πρέπει να εγκλείονται σε κατάλληλα μέσα σε όλα τα επίπεδα δόσης ταυτόχρονα, ώστε να αποφεύγονται τεχνικά σφάλματα λόγω συρρίκνωσης που μπορεί να συνδέονται με παρατεταμένη φύλαξη σε μέσο μονιμοποίησης (6).

Νευροπαθολογική εξέταση

41. Η ποιοτική εξέταση αποσκοπεί στον προσδιορισμό:

i) των περιοχών του νευρικού συστήματος που εμφανίζουν ενδείξεις νευροπαθολογικών αλλοιώσεων·

ii) των τύπων των νευροπαθολογικών αλλοιώσεων που οφείλονται στην έκθεση στην ελεγχόμενη χημική ουσία και

iii) του βαθμού σοβαρότητας των νευροπαθολογικών αλλοιώσεων.

Θα πρέπει να εξετάζονται μικροσκοπικά από κατάλληλα εκπαιδευμένο παθολογοανατόμο αντιπροσωπευτικές ιστολογικές τομές από τα δείγματα ιστών, για ενδείξεις νευροπαθολογικών αλλοιώσεων. Όλες οι νευροπαθολογικές αλλοιώσεις θα πρέπει να βαθμολογούνται υποκειμενικά βάσει της σοβαρότητάς τους. Η χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης ενδέχεται να επαρκεί για την αξιολόγηση τομών του εγκεφάλου των ζώων που θανατώνονται ανώδυνα την 22η ΜΓΗ ή νωρίτερα. Ωστόσο, συνιστάται χρώση μυελίνης (π.χ. luxol fast blue/cresyl violet) και χρώση αργύρου (π.χ. χρώση Bielschowsky ή Bodians) για τομές ιστών του ΚΝΣ και του ΠΝΣ των ζώων που θανατώνονται κατά τη λήξη της μελέτης. Κατά την επαγγελματική κρίση του παθολογοανατόμου και ανάλογα με το είδος των αλλοιώσεων που παρατηρούνται, μπορούν και άλλες χρώσεις να θεωρηθούν κατάλληλες για τον προσδιορισμό και τον χαρακτηρισμό ιδιαίτερων τύπων αλλοιώσεων [π.χ. ιστοχημική χρώση όξινης γλοιακής ινιδικής πρωτεΐνης (GFAP) ή με λεκτίνες για την αξιολόγηση νευρογλοιακών και μικρονευρογλοιακών αλλοιώσεων (72), χρώση fluoro-jade για την ανίχνευση νέκρωσης (73)(74) ή χρώσεις αργύρου ειδικές για τον νευροεκφυλισμό (75)].

42. Θα πρέπει να διενεργείται μορφομετρική (ποσοτική) αξιολόγηση, διότι τα σχετικά δεδομένα μπορούν να υποβοηθήσουν την ανίχνευση επιδράσεων που σχετίζονται με την αγωγή και έχουν μεγάλη αξία για την ερμηνεία των σχετικών με την αγωγή διαφορών βάρους ή μορφολογίας του εγκεφάλου (76)(77). Θα πρέπει να λαμβάνονται δείγματα νευρικού ιστού και να προετοιμάζονται για μορφομετρική αξιολόγηση, η οποία μπορεί να περιλαμβάνει, παραδείγματος χάριν, γραμμικές ή εμβαδικές μετρήσεις συγκεκριμένων περιοχών του εγκεφάλου (78). Για τις γραμμικές ή εμβαδικές μετρήσεις απαιτείται η χρήση ομόλογων τομών, επιλεγμένων με προσοχή και βάσει αξιόπιστων μικροσκοπικών σημείων αναφοράς (6). Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί στερεολογία για τον προσδιορισμό σχετικών με την αγωγή επιδράσεων σε παραμέτρους όπως ο όγκος ή ο αριθμός κυττάρων συγκεκριμένων νευροανατομικών περιοχών (79)(80)(81)(82)(83)(84).

43. Θα πρέπει να εξετάζεται ο εγκέφαλος για ενδείξεις σχετικών με την αγωγή νευροπαθολογικών αλλοιώσεων και να λαμβάνονται κατάλληλα δείγματα από όλες τις σημαντικές περιοχές του (π.χ. οσφρητικοί βολβοί, φλοιός εγκεφάλου, ιππόκαμπος, βασικά γάγγλια, θάλαμος, υποθάλαμος, μεσεγκέφαλος (τετράδυμο, καλύπτρα και εγκεφαλικά σκέλη), γέφυρα, προμήκης μυελός, παρεγκεφαλίδα), ώστε να εξασφαλίζεται ενδελεχής εξέταση. Είναι σημαντικό να λαμβάνονται οι τομές στο ίδιο επίπεδο από όλα τα ζώα. Στην περίπτωση των ενήλικων ζώων που θανατώνονται ανώδυνα κατά τη λήξη της μελέτης, θα πρέπει να λαμβάνονται δείγματα αντιπροσωπευτικών τομών του νωτιαίου μυελού και του ΠΝΣ. Οι εξεταζόμενες περιοχές θα πρέπει να περιλαμβάνουν τον οφθαλμό με το οπτικό νεύρο και τον αμφιβληστροειδή, τον νωτιαίο μυελό στο ύψος του αυχενικού και του οσφυϊκού ογκώματος, τις ίνες της ραχιαίας και της κοιλιακής ρίζας, το εγγύς ισχιακό νεύρο, το εγγύς κνημιαίο νεύρο (στο γόνατο) και τους κλάδους του κνημιαίου νεύρου στον γαστροκνήμιο μυ. Οι τομές νωτιαίου μυελού και περιφερειακών νεύρων θα πρέπει να είναι τόσο εγκάρσιες, όσο και διαμήκεις.

▼M5

44. Πέραν των κυτταρικών αλλοιώσεων (π.χ. σχηματισμός κενοτοπίων, εκφυλισμός, νέκρωση στους νευρώνες) και των αλλαγών στους ιστούς (π.χ. γλοίωση, διείσδυση λεμφοκυττάρων, σχηματισμός κύστεων), η νευροπαθολογική αξιολόγηση θα πρέπει να περιλαμβάνει εξέταση για ενδείξεις βλαβών στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος (6)(85)(86)(87)(88)(89). Είναι σημαντική εν προκειμένω η διάκριση μεταξύ επιδράσεων που σχετίζονται με την αγωγή και φυσιολογικών αναπτυξιακών συμβάντων, τα οποία είναι γνωστό ότι λαμβάνουν χώρα στο στάδιο της ανάπτυξης που αντιστοιχεί στον χρόνο θανάτωσης (90). Παραδείγματα σημαντικών αλλοιώσεων που είναι ενδεικτικές προσβολής του νευρικού συστήματος κατά την ανάπτυξή του, είναι μεταξύ άλλων, τα εξής:

— μεταβολές του μακροσκοπικού μεγέθους ή σχήματος των οσφρητικών βολβών, του εγκεφάλου ή της παρεγκεφαλίδας·

— μεταβολές του σχετικού μεγέθους διαφόρων εγκεφαλικών περιοχών, συμπεριλαμβανομένων των αυξήσεων ή μειώσεων του μεγέθους τους που οφείλονται στην απώλεια ή την παραμονή φυσιολογικά παροδικών πληθυσμών κυττάρων ή νευραξονικών προβολών (π.χ. εξωτερικό βλαστικό στρώμα της παρεγκεφαλίδας, μεσολόβιο)·

— αλλαγές στον πολλαπλασιασμό, τη μετακίνηση και τη διαφοροποίηση, ενδείξεις των οποίων αποτελούν οι περιοχές εκτεταμένης απόπτωσης ή νέκρωσης, οι συστάδες ή διάσπαρτοι πληθυσμοί έκτοπων, αποπροσανατολισμένων ή παραμορφωμένων νευρώνων και οι μεταβολές του σχετικού μεγέθους διαφόρων στρωμάτων των δομών του εγκεφαλικού φλοιού·

— αλλαγές στα πρότυπα μυελίνωσης, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η συνολική μείωση του μεγέθους των μυελινωμένων δομών ή μεταβολές της χρώσης τους·

— ενδείξεις υδροκέφαλου, ειδικότερα διεύρυνση των κοιλιών, στένωση του υδραγωγού και λέπτυνση των ημισφαιρίων του εγκεφάλου.

Ανάλυση της σχέσης δόσης-απόκρισης στις νευροπαθολογικές αλλοιώσεις

45. Για την ποιοτική και ποσοτική νευροπαθολογική ανάλυση συνιστάται η ακόλουθη βαθμιδωτή διαδικασία. Πρώτον, τομές από την ομάδα υψηλής δόσης συγκρίνονται με τομές από την ομάδα μαρτύρων. Εάν δεν εντοπιστούν ενδείξεις νευροπαθολογικών αλλοιώσεων στα ζώα της ομάδας υψηλής δόσης, δεν απαιτείται περαιτέρω ανάλυση. Εάν εντοπιστούν ενδείξεις νευροπαθολογικών αλλοιώσεων στην ομάδα υψηλής δόσης, εξετάζονται ζώα των ομάδων ενδιάμεσης και χαμηλής δόσης. Σε περίπτωση τερματισμού της μελέτης για την ομάδα υψηλής δόσης, λόγω θανάτων ή άλλης τοξικότητας που προκαλεί πειραματικό σφάλμα, οι ομάδες υψηλής και ενδιάμεσης δόσης θα πρέπει να υποβάλλονται σε ανάλυση για τον εντοπισμό νευροπαθολογικών αλλοιώσεων. Εάν υπάρχουν ενδείξεις νευροτοξικότητας στις ομάδες χαμηλότερων δόσεων, οι ομάδες αυτές θα πρέπει να υποβάλλονται σε νευροπαθολογική ανάλυση. Εάν κατά την ποιοτική ή την ποσοτική εξέταση διαπιστωθούν σχετικές με την αγωγή νευροπαθολογικές αλλοιώσεις, θα πρέπει να προσδιοριστούν η εξάρτηση της επίπτωσης από τη δόση, καθώς και η συχνότητα και η σοβαρότητα των αλλοιώσεων ή των μορφομετρικών αλλαγών, με βάση αξιολόγηση όλων των ζώων όλων των ομάδων δόσης. Η αξιολόγηση αυτή θα πρέπει να περιλαμβάνει όλες τις εγκεφαλικές περιοχές που παρουσιάζουν ενδείξεις νευροπαθολογικής αλλοίωσης. Για κάθε τύπο αλλοίωσης, θα πρέπει να περιγράφονται τα χαρακτηριστικά που χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό κάθε βαθμού σοβαρότητας, με αναφορά των γνωρισμάτων που χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση των βαθμών. Θα πρέπει να καταγράφονται η συχνότητα κάθε τύπου βλάβης και ο βαθμός σοβαρότητάς της και να εκτελείται στατιστική ανάλυση για την αξιολόγηση του είδους της σχέσης δόσης-απόκρισης. Συνιστάται η χρήση κωδικοποιημένων αντικειμενοφόρων πλακών (91).

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Δεδομένα

46. Τα δεδομένα θα πρέπει να αναφέρονται κατ' άτομο και να συνοψίζονται σε πίνακα, στον οποίο εμφαίνονται, για κάθε ομάδα δοκιμής, τα είδη των αλλαγών και ο αριθμός των μητέρων, των απογόνων κατά φύλο και των γεννών που εμφάνισαν κάθε είδος αλλαγής. Σε περίπτωση απευθείας μεταγεννητικής έκθεσης των απογόνων, θα πρέπει να αναφέρονται η οδός, η διάρκεια και η περίοδος έκθεσης.

▼M5

Αξιολόγηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

47. Η μελέτη αναπτυξιακής νευροτοξικότητας παρέχει πληροφορίες για τις επιδράσεις της επανειλημμένης έκθεσης σε μια χημική ουσία ενδομητρίως και κατά τα πρώτα στάδια της μεταγεννητικής ανάπτυξης. Δεδομένου ότι δίνεται έμφαση σε τελικά σημεία τόσο γενικής τοξικότητας όσο και αναπτυξιακής νευροτοξικότητας, τα αποτελέσματα της μελέτης επιτρέπουν τη διάκριση μεταξύ των επιδράσεων στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος χωρίς γενική τοξικότητα στη μητέρα και εκείνων που εκφράζονται μόνον σε επίπεδα τα οποία είναι τοξικά και στη μητέρα. Λόγω των πολύπλοκων διασυνδέσεων μεταξύ του σχεδιασμού της μελέτης, της στατιστικής ανάλυσης και της βιολογικής σημαντικότητας των δεδομένων, απαιτείται η κρίση των ειδικών για την κατάλληλη ερμηνεία των δεδομένων αναπτυξιακής νευροτοξικότητας (107)(109). Για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμής θα πρέπει να εφαρμόζεται προσέγγιση βασιζόμενη στο βάρος της μαρτυρίας (20)(92)(93)(94). Θα πρέπει να συζητούνται τα πρότυπα των σχετικών με τη συμπεριφορά ή τη μορφολογία ευρημάτων, εφόσον υπάρχουν, καθώς και οι ενδείξεις για τη σχέση δόσης-απόκρισης. Στον εν λόγω χαρακτηρισμό θα πρέπει να περιλαμβάνονται δεδομένα από όλες τις μελέτες που αφορούν την αξιολόγηση της αναπτυξιακής νευροτοξικότητας, συμπεριλαμβανομένων των επιδημιολογικών μελετών σε ανθρώπους ή εκθέσεων περιστατικών και των πειραματικών μελετών σε ζώα (π.χ. τοξικοκινητικά δεδομένα, πληροφορίες για τη σχέση δομής-δράσης, δεδομένα από άλλες μελέτες τοξικότητας). Σε αυτά περιλαμβάνεται η σχέση μεταξύ των δόσεων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και της παρουσίας ή απουσίας, της συχνότητας εμφάνισης (επίπτωση) και της έκτασης των νευροτοξικών επιδράσεων σε κάθε φύλο (20)(95).

48. Η αξιολόγηση των δεδομένων θα πρέπει να περιλαμβάνει συζήτηση τόσο της βιολογικής, όσο και της στατιστικής σημαντικότητας. Η στατιστική ανάλυση θα πρέπει να θεωρείται εργαλείο που κατευθύνει αλλά δεν καθορίζει την ερμηνεία των δεδομένων. Η έλλειψη στατιστικής σημαντικότητας δεν θα πρέπει να αποτελεί τον μοναδικό λόγο συναγωγής του συμπεράσματος ότι η αγωγή δεν έχει επιδράσεις και, αντιστρόφως, η στατιστική σημαντικότητα δεν θα πρέπει να αποτελεί το μοναδικό λόγο συναγωγής του συμπεράσματος ότι η αγωγή έχει επιδράσεις. Θα πρέπει να συζητούνται τα διαθέσιμα δεδομένα για θετικούς και ιστορικούς μάρτυρες, ιδίως όταν δεν εντοπίζονται σχετικές με την αγωγή επιδράσεις, ως ένας τρόπος προφύλαξης από πιθανά ψευδαρνητικά ευρήματα και από τις δυσκολίες που ενέχει η «απόδειξη της απουσίας» (102)(106). Η πιθανότητα ψευδοθετικών ευρημάτων θα πρέπει να συζητείται υπό το πρίσμα της συνολικής στατιστικής αξιολόγησης των δεδομένων (96). Η αξιολόγηση θα πρέπει να περιλαμβάνει τη σχέση μεταξύ των νευροπαθολογικών αλλοιώσεων και των αλλαγών στη συμπεριφορά που παρατηρήθηκαν, εάν υπάρχει,.

49. Θα πρέπει να αναλύονται όλα τα αποτελέσματα με τη χρήση στατιστικών μοντέλων κατάλληλων για τον σχεδιασμό του πειράματος (108). Η επιλογή παραμετρικής ή μη παραμετρικής ανάλυσης θα πρέπει να αιτιολογείται λαμβανομένων υπόψη παραγόντων όπως η φύση των δεδομένων (μετασχηματισμένα ή μη) και η κατανομή τους, καθώς και η σχετική ανθεκτικότητα της επιλεγμένης στατιστικής ανάλυσης. Η επιλογή στατιστικών αναλύσεων θα πρέπει να βασίζεται στο σκοπό και τον σχεδιασμό της μελέτης ώστε να ελαχιστοποιούνται τα σφάλματα τύπου I (ψευδοθετικά) και τύπου II (ψευδαρνητικά) (96)(97)(104)(105). Στις μελέτες ανάπτυξης με τη χρήση πολύτοκων ειδών, κατά τις οποίες υποβάλλονται σε δοκιμή πολλά νεογνά ανά γέννα, το στατιστικό μοντέλο θα πρέπει να περιλαμβάνει τη γέννα ώστε να αποφεύγονται διογκωμένα ποσοστά σφαλμάτων τύπου I (98)(99)(100)(101). Η στατιστική μονάδα μέτρησης θα πρέπει να είναι η γέννα και όχι το νεογνό. Τα πειράματα θα πρέπει να σχεδιάζονται κατά τρόπο ώστε τα νεογνά της ίδιας γέννας να μην αντιμετωπίζονται ως ανεξάρτητες παρατηρήσεις. Κάθε τελικό σημείο που μετράται επανειλημμένα στο ίδιο υποκείμενο θα πρέπει να αναλύεται με τη χρήση στατιστικών μοντέλων που λαμβάνουν υπόψη την έλλειψη ανεξαρτησίας αυτών των μετρήσεων.

Έκθεση δοκιμής

50. Η έκθεση της δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη χημική ουσία:

— φυσική μορφή και, εφόσον έχουν σημασία, φυσικοχημικές ιδιότητες·

— στοιχεία ταυτότητας, συμπεριλαμβανομένης της προέλευσης·

▼M5

— καθαρότητα του παρασκευάσματος και γνωστές και/ή αναμενόμενες προσμείξεις.

Φορέας (εάν χρησιμοποιείται):

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα, εάν δεν πρόκειται για νερό ή φυσιολογικό ορό.

Πειραματόζωα:

— χρησιμοποιούμενο είδος και στέλεχος και αιτιολόγηση, εάν δεν χρησιμοποιούνται επίμυες·

— προμηθευτής των πειραματόζωων·

— αριθμός, ηλικία κατά την έναρξη της δοκιμής και φύλο των ζώων·

— προέλευση, συνθήκες στέγασης, τροφή, νερό κ.λπ.·

— βάρος κάθε ζώου κατά την έναρξη της δοκιμής.

Συνθήκες δοκιμής:

— αιτιολόγηση της επιλογής των επιπέδων δόσης·

— αιτιολόγηση της οδού και της χρονικής περιόδου χορήγησης των δόσεων·

— προδιαγραφές των δόσεων που χορηγήθηκαν, με λεπτομέρειες για τον φορέα, τον όγκο και τη φυσική μορφή της ύλης που χορηγήθηκε·

— λεπτομέρειες σχετικά με το παρασκεύασμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας/τροφής και την επιτευχθείσα συγκέντρωση, σταθερότητα και ομοιογένεια του παρασκευάσματος·

— μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των μητέρων και των απογόνων·

— λεπτομερής περιγραφή των διαδικασιών τυχαιοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν για την κατανομή των μητέρων στις ομάδες αγωγής, την επιλογή ακατάλληλων νεογνών για απομάκρυνση και την κατανομή των νεογνών στις ομάδες δοκιμής·

— λεπτομέρειες σχετικά με τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας·

— κατά περίπτωση, μετατροπή της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην τροφή/στο πόσιμο νερό ή κατά την εισπνοή (ppm) σε πραγματική δόση (mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα)·

— περιβαλλοντικές συνθήκες:

— λεπτομέρειες για την ποιότητα της τροφής και του νερού (π.χ. νερό βρύσης, απεσταγμένο)·

— ημερομηνίες έναρξης και λήξης της μελέτης.

Διαδικασίες παρατήρησης και εξέτασης:

— λεπτομερής περιγραφή των διαδικασιών που χρησιμοποιήθηκαν για την τυποποίηση των παρατηρήσεων και των διαδικασιών, καθώς και λειτουργικοί ορισμοί για τη βαθμολόγηση των παρατηρήσεων·

— κατάλογος όλων των διαδικασιών εξέτασης που χρησιμοποιήθηκαν και αιτιολόγηση της χρήσης τους·

— λεπτομέρειες για τις διαδικασίες συμπεριφορικών/λειτουργικών, παθολογικών, νευροχημικών ή ηλεκτροφυσιολογικών εξετάσεων που χρησιμοποιήθηκαν, με πληροφορίες και στοιχεία για τις αυτόματες συσκευές·

— διαδικασίες βαθμονόμησης και εξασφάλισης της ισοδυναμίας των συσκευών και της εξισορρόπησης των ομάδων αγωγής στις διαδικασίες εξετάσεων·

— συνοπτική εξήγηση των αποφάσεων που περιλαμβάνουν κρίση επαγγελματιών.

▼**M5**

Αποτελέσματα (ατομικά και συνοπτικά, συμπεριλαμβανομένης της μέσης τιμής και της μεταβλητότητας, όταν κρίνεται σκόπιμο):

— αριθμός ζώων κατά την έναρξη και κατά τη λήξη της μελέτης·

— αριθμός ζώων και γέννες που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε μέθοδο δοκιμασιών·

— αριθμός ταυτότητας κάθε ζώου και της γέννας από την οποία προήλθε·

— μέγεθος γέννας και μέσο βάρος κατά τη γέννηση, ανά φύλο·

— δεδομένα για το σωματικό βάρος και τη μεταβολή του, συμπεριλαμβανομένου του σωματικού βάρους των μητέρων και των απογόνων κατά τη λήξη της μελέτης·

— δεδομένα για την κατανάλωση τροφής και, εάν κρίνεται σκόπιμο, για την κατανάλωση νερού (π.χ. εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται μέσω του νερού)·

— δεδομένα για τις τοξικές αντιδράσεις ανά φύλο και δόση, συμπεριλαμβανομένων των σημείων τοξικότητας ή θνησιμότητας, καθώς και του χρόνου και της αιτίας θανάτου, εάν κρίνεται σκόπιμο·

— είδος, σοβαρότητα, διάρκεια, ημέρα και ώρα εκδήλωσης και εξέλιξη των λεπτομερών κλινικών παρατηρήσεων·

— βαθμολογία κάθε ορόσημου ανάπτυξης (βάρος, σεξουαλική ωρίμαση και οντογένεση συμπεριφοράς) σε κάθε χρόνο παρατήρησης·

— λεπτομερής περιγραφή όλων των συμπεριφορικών, λειτουργικών, νευροπαθολογικών, νευροχημικών και ηλεκτροφυσιολογικών ευρημάτων ανά φύλο, συμπεριλαμβανομένων των αυξήσεων και μειώσεων σε σχέση με τις ομάδες μαρτύρων·

— ευρήματα νεκροψίας·

— βάρος εγκεφάλου·

— τυχόν διαγνώσεις που βασίστηκαν σε νευρολογικά σημεία και αλλοιώσεις, συμπεριλαμβανομένων των φυσικώς απαντώμενων ασθενειών ή παθολογικών καταστάσεων·

— εικόνες αντιπροσωπευτικών ευρημάτων·

— εικόνες χαμηλής ισχύος για την αξιολόγηση της ομολογίας των τομών που χρησιμοποιήθηκαν για μορφομετρία·

— δεδομένα απορρόφησης και μεταβολισμού, συμπεριλαμβανομένων συμπληρωματικών δεδομένων από χωριστή μελέτη τοξικοκινητικής, εάν υπάρχουν·

— στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, συμπεριλαμβανομένων των στατιστικών μοντέλων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των δεδομένων, και αποτελέσματα, ανεξαρτήτως της σημαντικότητάς τους·

— κατάλογος του προσωπικού που συμμετείχε στη μελέτη, με αναφορά της επαγγελματικής του κατάρτισης.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων:

— πληροφορίες για τη σχέση δόσης-απόκρισης, ανά φύλο και ομάδα·

— συνεκτίμηση άλλων τοξικών επιδράσεων για τη συναγωγή συμπεράσματος σχετικά με το νευροτοξικό δυναμικό της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, ανά φύλο και ομάδα·

— επιπτώσεις τοξικοκινητικών στοιχείων στα συμπεράσματα·

— ομοιότητα επιδράσεων με γνωστές νευροτοξικές ουσίες·

▼M5

— δεδομένα που τεκμηριώνουν την αξιοπιστία και την ευαισθησία της μεθόδου δοκιμών (π.χ. δεδομένα για θετικούς και ιστορικούς μάρτυρες)·

— σχέσεις μεταξύ των νευροπαθολογικών και των λειτουργικών επιδράσεων, εάν υπάρχουν·

— NOAEL ή δόση αναφοράς για μητέρες και απογόνους, ανά φύλο και ομάδα.

Συμπεράσματα:

— συζήτηση της γενικής ερμηνείας των δεδομένων με βάση τα αποτελέσματα, συμπεριλαμβανομένου συμπεράσματος σχετικά με το κατά πόσον η ελεγχόμενη χημική ουσία προκάλεσε αναπτυξιακή νευροτοξικότητα και του NOAEL.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (1995). Draft Report of the OECD *Ad Hoc* Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. Copenhagen, Denmark, 13-14 June 1995.

(2) US EPA (1998). U.S. Environmental Protection Agency Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.6300. Developmental Neurotoxicity Study. US EPA 712-C-98-239. Διαθέσιμη στη διεύθυνση: [http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/].

(3) US EPA (1998). Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment. US EPA 630/R-95/001F. Διαθέσιμη στη διεύθυνση: [http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?PrintVersion=True&deid=12479].

(4) Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss, B., Mileson, B. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: I. Behavioral effects. Environ. Health Perspect., 109:79-91.

(5) Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E. Jr., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, S.L., Padilla, S., Sultatos, L.G., Mileson, B.E. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. Environ. Health Perspect., 109:101-111.

(6) Garman, R.H., Fix,A.S., Jortner, B.S., Jensen, K.F., Hardisty, J.F., Claudio, L., Ferenc, S. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: II. Neuropathology. Environ. Health Perspect., 109:93-100.

(7) OECD (2003). Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing. Washington D.C., US, 23-25 October 2000.

(8) OECD (2008). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 43. Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment Directorate, OECD, Paris. July 2008 Διαθέσιμη στη διεύθυνση: [http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(200816&doclanguage=en)].

(9) OECD (2003). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OECD, Paris, September 2003. Διαθέσιμη στη διεύθυνση: [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].

(10) Kimmel, C.A., Rees, D.C., Francis, E.Z. (1990) Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. Neurotoxicol. Teratol., 12: 173-292.

(11) Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000) *Experimental and Clinical Neurotoxicology, 2nd Edition,* ISBN 0195084772, Oxford University Press, New York.

▼**M5**

(12) Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D. (2002) Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. 8:188-197.

(13) Slikker, W.B., Chang, L.W. (1998) *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, *1st Edition*, ISBN 0126488606, Academic Press, New York.

(14) Κεφάλαιο B.34 του παρόντος παραρτήματος: Τοξικολογική δοκιμασία αναπαραγωγής μιας γενεάς.

(15) Κεφάλαιο B.35 του παρόντος παραρτήματος: Μελέτη τοξικότητας στην αναπαραγωγή δυο γενεών.

(16) Κεφάλαιο B.43 του παρόντος παραρτήματος: Μελέτη νευροτοξικότητας σε τρωκτικά.

(17) Κεφάλαιο B.31 του παρόντος παραρτήματος: Μελέτη προγεννητικής τοξικότητας στην ανάπτυξη.

(18) Οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 22ας Σεπτεμβρίου 2010, περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς, ΕΕ L 276 της 20.10.2010, σ. 33.

(19) WHO (1986) *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals*, (Environmental Health Criteria 60), Albany, New York: World Health Organization Publications Center, USA. Διαθέσιμη στη διεύθυνση: [http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc060.htm].

(20) WHO (2001) *Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches,* (Environmental Health Criteria 223), World Health Organization Publications, Geneva. Διαθέσιμη στη διεύθυνση: [http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supp/ehc223.htm].

(21) Chang, L.W., Slikker, W. (1995) *Neurotoxicology: Approaches and Methods*, *1st Edition*, ISBN 012168055X, Academic Press, New York.

(22) De Cabo, C., Viveros, M.P. (1997) Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders. Neurotoxicol. Teratol., 19:499-509.

(23) Agnish, N.D., Keller, K.A. (1997) The rationale for culling of rodent litters. Fundam. Appl. Toxicol., 38:2-6.

(24) Avery, D.L., Spyker, J.M. (1977) Foot tattoo of neonatal mice. Lab. Animal Sci., 27:110-112.

(25) Wier, P.J., Guerriero, F.J., Walker, R.F. (1989) Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity. Fundam. Appl. Toxicol., 13:118-136.

(26) Spear, N.E., Campbell, B.A. (1979) *Ontogeny of Learning and Memory*. ISBN 0470268492, Erlbaum Associates, New Jersey.

(27) Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., Smotherman, W. (1987) *Perinatal Development: A Psychobiological Perspective.* Academic Press, Orlando.

(28) Zoetis, T., Walls, I. (2003) *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*. ILSI Press, Washington, DC.

(29) Moser, V., Walls, I., Zoetis, T. (2005) Direct dosing of preweaning rodents in toxicity testing and research: Deliberations of an ILSI RSI expert working group. Int. J. Toxicol., 24:87-94.

(30) Conolly, R.B., Beck, B.D., Goodman, J.I. (1999) Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment. Toxicol. Sci., 49: 1-4.

(31) ICH (1993) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5A). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Phamaceuticals for Human Use.

(32) Lochry, E.A. (1987) Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations. J. Am. Coll. Toxicol., 6:433-439.

▼**M5**

(33) Tachibana, T., Narita, H., Ogawa, T., Tanimura, T. (1998) Using postnatal age to determine test dates leads to misinterpretation when treatments alter gestation length, results from a collaborative behavioral teratology study in Japan. Neurotoxicol. Teratol., 20:449-457.

(34) Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L. (1999) Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. Reprod. Toxicol., 13:383-390.

(35) Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L. (2000) Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. Toxicol. Sci., 58:350-365.

(36) Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H.A., Nelson, B.K. (1985) Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7:579-586.

(37) Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.W. (1977) Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. Biol. Reprod., 17:298-303.

(38) Spear, L.P. (1990) Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. Neurotoxicol. Teratol., 12:489-95.

(39) Altman, J., Sudarshan, K. (1975) Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. Anim. Behav., 23:896-920.

(40) Adams, J. (1986) Methods in Behavioral Teratology. In: *Handbook of Behavioral Teratology.* Riley, E.P., Vorhees, C.V. (eds.) Plenum Press, New York, pp. 67-100.

(41) Reiter, L.W., MacPhail, R.C. (1979) Motor activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing. Neurobehav. Toxicol., 1:53-66.

(42) Robbins, T.W. (1977) A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H., (eds.) Plenum Press, New York, pp. 37-82.

(43) Crofton, K.M., Peele, D.B., Stanton, M.E. (1993) Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3′-iminodipropionitrile in the rat. Neurotoxicol. Teratol., 15:117-129.

(44) Ruppert, P.H., Dean, K.F., Reiter, L.W. (1985) Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes. Dev. Psychobiol., 18:247-260.

(45) Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory comparison of motor activity experiments: Implications for neurotoxicological assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13:599-609.

(46) Ross, J. F., Handley, D. E., Fix, A. S., Lawhorn, G. T., Carr, G. J. (1997) Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 19:1997. 405-411.

(47) Handley, D.E., Ross, J.F., Carr, G.J. (1998) A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals. Physiol. Behav., 64:661-669.

(48) Edwards, P.M., Parker, V.H. (1977) A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 40:589-591.

(49) Davis, M. (1984) The mammalian startle response. In: *Neural Mechanisms of Startle Behavior*, Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, New York, pp. 287-351

(50) Koch, M. (1999) The neurobiology of startle. Prog. Neurobiol., 59:107-128.

(51) Crofton, K.M. (1992) Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction. In *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicology*, Tilson, H., Mitchell, C. (eds). Raven Press, New York, pp. 181-211.

▼**M5**

(52) Crofton, K.M., Sheets, L.P. (1989) Evaluation of sensory system function using reflex modification of the startle response. J. Am. Coll. Toxicol., 8:199-211.

(53) Crofton, K.M, Lassiter, T.L, Rebert, C.S. (1994) Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit. Hear. Res., 80:25-30.

(54) Ison, J.R. (1984) Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 6:437–445.

(55) Mattsson, J.L., Boyes, W.K., Ross, J.F. (1992) Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes. In: *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicity*, Tilson, H., Mitchell, C., (eds.), Raven Press, New York. pp. 125-145.

(56) Peele, D.B., Allison, S.D., Crofton, K.M. (1990) Learning and memory deficits in rats following exposure to 3,3′-iminopropionitrile. Toxicol. Appl. Pharmacol., 105:321-332.

(57) Bammer, G. (1982) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. Neurosci. Behav. Rev., 6:247-296.

(58) Bushnell, P.J. (1988) Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 10:237-244.

(59) Green, R.J., Stanton, M.E. (1989) Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat. Behav. Neurosci., 103:98-105.

(60) Kucharski, D., Spear, N.E. (1984) Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. Develop. Psychobiol., 17:465-479.

(61) Morris, R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J. Neurosci. Methods, 11:47-60.

(62) Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S. (1989) The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. Int. J. Neurosci., 48:29-69.

(63) D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. Brain Res. Rev, 36:60-90.

(64) Vorhees, C.V. (1987) Maze learning in rats: A comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin. Neurotoxicol. Teratol., 9:235-241.

(65) Vorhees, C.V. (1997) Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. Drug Chem. Toxicol., 20:387-399.

(66) Akaike, M., Tanaka, K., Goto, M., Sakaguchi, T. (1988) Impaired Biel and Radial arm maze learning in rats with methyl-nitrosurea induced microcephaly. Neurotoxicol. Teratol., 10:327-332.

(67) Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., Cox, C. (1983) Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. Toxicol. Appl. Pharmacol., 71:342-352.

(68) Campbell, B.A., Haroutunian, V. (1981) Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. J. Gerontol., 36:338–341.

(69) Fix, A.S, Garman, R.H. (2000) Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with the nervous system. Toxicol. Pathol., 28: 122-131.

(70) Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. (1994) *Laboratory Methods in Histotechnology*, American Registry of Pathology, Washington, DC, pp. 84-107.

(71) Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002) *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5th edition, Churchill Livingstone, London.

▼**M5**

(72) Fix, A.S., Ross, J.F., Stitzel, S.R., Switzer, R.C. (1996) Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex. Toxicol. Pathol., 24: 291-304.

(73) Schmued, L.C., Hopkins, K.J. (2000) Fluoro-Jade B: A high affinity tracer for the localization of neuronal degeneration. Brain Res., 874:123-130.

(74) Krinke, G.J., Classen, W., Vidotto, N., Suter, E., Wurmlin, C.H. (2001) Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain. Exp. Toxic. Pathol., 53:365-372.

(75) De Olmos, I.S., Beltramino, C.A., and de Olmos de Lorenzo, S. (1994) Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma. Neurotoxicol. Teratol., 16, 545-561.

(76) De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Waanders, M.M., Gundersen, H.J. (2005a) Regulatory developmental neurotoxicity testing: A model study focusing on conventional neuropathology endpoints and other perspectives. Environ. Toxicol. Pharmacol., 19:745-755.

(77) De Groot, D.M.G., Hartgring, S., van de Horst, L., Moerkens, M., Otto, M., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Pakkenberg, B., Gundersen, H.J. (2005b) 2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity. Reprod. Toxicol., 20:417-432.

(78) Rodier, P.M., Gramann, W.J. (1979) Morphologic effects of interference with cell proliferation in the early fetal period. Neurobehav. Toxicol., 1:129–135.

(79) Howard, C.V., Reed, M.G. (1998) *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*, Springer-Verlag, New York.

(80) Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C. (1998) Stereology: A practical primer for neuropathology. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 57: 305-310.

(81) Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O., Møller, A. (1993) Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. Brain Res., 609: 262-268.

(82) Schmitz, C. (1997) Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology. J. Neurocytol., 26:707-710.

(83) West, M.J. (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. Trends Neurosci., 22:51-61.

(84) Schmitz, C., Hof, P.R. (2005) Design-based stereology in neuroscience. Neuroscience, 130: 813–831.

(85) Gavin, C.E., Kates, B., Gerken, L.A., Rodier, P.M. (1994) Patterns of growth deficiency in rats exposed *in utero* to undernutrition, ethanol, or the neuroteratogen methylazoxymethanol (MAM). Teratology, 49:113-121.

(86) Ohno, M., Aotani, H., Shimada, M. (1995) Glial responses to hypoxic/ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum. Develop. Brain Res., 84:294-298.

(87) Jensen KF, Catalano SM. (1998) Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology. In: *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (eds) Academic Press, New York, pp. 3-41.

(88) Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovska, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. Science, 283:70-74.

▼**M5**

(89) Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Sefovska, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. (2000) Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome. Science, 287:1056–1060.

(90) Friede, R. L. (1989) *Developmental Neuropathology*. Second edition. Springer-Verlag, Berlin.

(91) House, D.E., Berman, E., Seeley, J.C., Simmons, J.E. (1992) Comparison of open and blind histopathologic evaluation of hepatic lesions. Toxicol. Let., 63:127-133.

(92) Tilson, H.A., MacPhail, R.C., Crofton, K.M. (1996) Setting exposure standards: a decision process. Environ. Health Perspect., 104:401-405.

(93) US EPA (2005) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. US EPA NCEA-F-0644A.

(94) US EPA (1996) Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Federal Register 61(212): 56274-56322.

(95) Danish Environmental Protection Agency (1995) *Neurotoxicology.* Review of Definitions, Methodology, and Criteria. Miljøprojekt nr. 282. Ladefoged, O., Lam, H.R., Østergaard, G., Nielsen, E., Arlien-Søborg, P.

(96) Muller, K.E., Barton, C.N., Benignus, V.A. (1984). Recommendations for appropriate statistical practice in toxicologic experiments. Neurotoxicology, 5:113-126.

(97) Gad, S.C. (1989) Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology. J. Am. Coll. Toxicol., 8:21-27.

(98) Abby, H., Howard, E. (1973) Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring. Dev. Psychobiol., 6:329-335.

(99) Haseman, J.K., Hogan, M.D. (1975) Selection of the experimental unit in teratology studies. Teratology, 12:165-172.

(100) Holson, R.R., Pearce, B. (1992) Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. Neurotoxicol. Teratol., 14: 221-228.

(101) Nelson, C.J., Felton, R.P., Kimmel, C.A., Buelke-Sam, J., Adams, J. (1985) Collaborative Behavioral Teratology Study: Statistical approach. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7:587-90.

(102) Crofton, K.M., Makris, S.L., Sette, W.F., Mendez, E., Raffaele, K.C. (2004) A qualitative retrospective analysis of positive control data in developmental neurotoxicity studies. Neurotoxicol. Teratol., 26:345-352.

(103) Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., and an *ad hoc* working group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee. (2006) A 'best practices' approach to neuropathologica assessment in developmental neurotoxicity testing — for today. Toxicol. Pathol. 34:296-313.

(104) Tamura, R.N., Buelke-Sam, J. (1992) The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies. Neurotoxicol. Teratol., 14(3):205-210.

(105) Tukey, J.W., Ciminera, J.L., Heyse, J.F. (1985) Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug. Biometrics, 41:295-301.

(106) Crofton, K.M., Foss, J.A., Haas, U., Jensen, K., Levin, E.D., and Parker, S.P. (2008) Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):266-287.

(107) Raffaele, K.C., Fisher, E., Hancock, S., Hazelden, K., and Sobrian, S.K. (2008) Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology,* 30(4):288-325.

▼**M5**

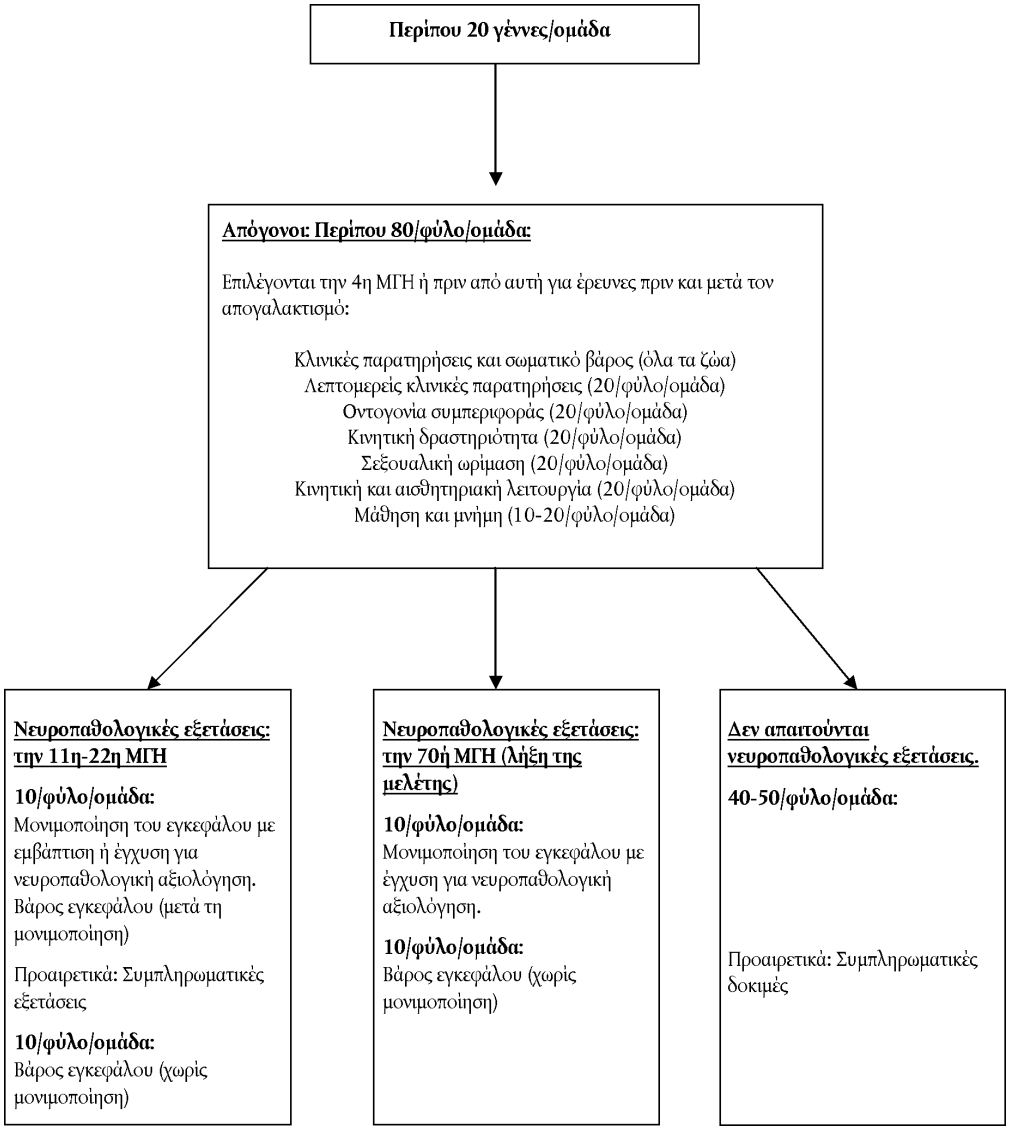
(108) Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2008) Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):326-348.

(109) Tyl, R.W., Crofton, K.M., Moretto, A., Moser, V.C., Sheets, L.P., and Sobotka, T.J. (2008) Identification and interpretation of developmental neurotoxicity effects: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):349-381.

▼**M5**

Σχήμα 1

Γενικό διάγραμμα δοκιμής για λειτουργικές/συμπεριφορικές δοκιμασίες, νευροπαθολογική αξιολόγηση και προσδιορισμό του βάρους του εγκεφάλου. Το διάγραμμα αυτό βασίζεται στην περιγραφή στις παραγράφους 13-15 (ΜΓΗ = μεταγεννητική ημέρα). Παραδείγματα ένταξης των ζώων στις δοκιμές παρατίθενται στο προσάρτημα 1



▼M5

Προσάρτημα 1

1. Ακολούθως περιγράφονται και παρουσιάζονται σε πίνακα παραδείγματα πιθανών τρόπων ένταξης των ζώων στις δοκιμές. Τα παραδείγματα αυτά παρέχονται για να εξηγηθεί ότι η ένταξη των ζώων της μελέτης στις διάφορες τυπικές δοκιμασίες μπορεί να επιτευχθεί με διαφορετικούς τρόπους.

Παράδειγμα 1

2. Χρησιμοποιείται ένα σύνολο 20 νεογνών/φύλο/επίπεδο δόσης (ήτοι, 1 αρσενικό και 1 θηλυκό ανά γέννα) για τον έλεγχο της οντογένεσης συμπεριφοράς πριν από τον απογαλακτισμό. Από αυτά, 10 νεογνά/φύλο/επίπεδο δόσης (ήτοι, 1 αρσενικό ή 1 θηλυκό ανά γέννα) θανατώνονται ανώδυνα την 22η ΜΓΗ. Αφαιρείται ο εγκέφαλος, ζυγίζεται και υποβάλλεται σε επεξεργασία για ιστοπαθολογική αξιολόγηση. Επιπλέον, συλλέγονται δεδομένα για το βάρος του εγκεφάλου με τη χρήση εγκεφάλων που δεν έχουν μονιμοποιηθεί από τα εναπομένοντα 10 αρσενικά και 10 θηλυκά ζώα ανά επίπεδο δόσης.

3. Ένα άλλο σύνολο 20 ζώων/φύλο/επίπεδο δόσης (ήτοι, 1 αρσενικό και 1 θηλυκό ανά γέννα) χρησιμοποιείται για λειτουργικές/συμπεριφορικές δοκιμασίες μετά τον απογαλακτισμό (λεπτομερείς κλινικές παρατηρήσεις και δοκιμασίες κινητικής δραστηριότητας, αιφνιδιασμού από ακουστικό ερέθισμα και γνωσιακής λειτουργίας σε ζώα στην ήβη) και για την εκτίμηση της ηλικίας σεξουαλικής ωρίμασης. Από αυτά, 10 ζώα/φύλο/επίπεδο δόσης (ήτοι, 1 αρσενικό ή 1 θηλυκό ανά γέννα) υποβάλλονται σε αναισθησία και μονιμοποίηση με έγχυση κατά τη λήξη της μελέτης (την 70ή ΜΓΗ περίπου). Έπειτα από πρόσθετη μονιμοποίηση in situ, αφαιρείται ο εγκέφαλος και υποβάλλεται σε επεξεργασία για νευροπαθολογική αξιολόγηση.

4. Για τη δοκιμασία γνωσιακής λειτουργίας σε νεαρά ενήλικα ζώα (π.χ. την 60ή-70ή ΜΓΗ), χρησιμοποιείται ένα τρίτο σύνολο 20 νεογνών/φύλο/επίπεδο δόσης (ήτοι, 1 αρσενικό ή 1 θηλυκό ανά γέννα). Από αυτά, 10 ζώα/φύλο/ομάδα (1 αρσενικό ή 1 θηλυκό ανά γέννα) θανατώνονται κατά τη λήξη της μελέτης και ο εγκέφαλός τους αφαιρείται και ζυγίζεται.

5. Τα υπόλοιπα 20 ζώα/φύλο/ομάδα διατηρούνται για ενδεχόμενες συμπληρωματικές δοκιμές.

Πίνακας 1

Αύξων αριθμός νεογνού ([α])		Αριθμός νεογνών στη δοκιμασία	Εξέταση/δοκιμασία
α	θ		
1	5	20 α + 20 θ	Οντογένεση συμπεριφοράς
		10 α + 10 θ	Βάρος εγκεφάλου/νευροπαθολογία/μορφομετρία την 22η ΜΓΗ
		10 α + 10 θ	Βάρος εγκεφάλου την 22η ΜΓΗ
2	6	20 α + 20 θ	Λεπτομερείς κλινικές παρατηρήσεις
		20 α + 20 θ	Κινητική δραστηριότητα
		20 α + 20 θ	Σεξουαλική ωρίμαση
		20 α + 20 θ	Κινητική και αισθητηριακή λειτουργία
		20 α + 20 θ	Μάθηση και μνήμη (25η ΜΓΗ)
		10 α + 10 θ	Βάρος εγκεφάλου/νευροπαθολογία/μορφομετρία νεαρών ενήλικων ζώων ~ 70ή ΜΓΗ

▼**M5**

Αύξων αριθμός νεογνού (α)		Αριθμός νεογνών στη δοκιμασία	Εξέταση/δοκιμασία
α	θ		
3	7	20 α + 20 θ	Μάθηση και μνήμη (νεαρά ενήλικα ζώα)
		10 α + 10 θ	Βάρος εγκεφάλου νεαρών ενήλικων ζώων ~ 70ή ΜΓΗ
4	8	—	Εφεδρικά ζώα για αντικαταστάσεις ή συμπληρωματικές δοκιμές

(α) Στο συγκεκριμένο παράδειγμα επιλέγονται από τις γέννες 4 αρσενικά + 4 θηλυκά ζώα· τα αρσενικά αριθμούνται από το 1 έως το 4 και τα θηλυκά από το 5 έως το 8.

Παράδειγμα 2

6. Χρησιμοποιείται ένα σύνολο 20 νεογνών/φύλο/επίπεδο δόσης (ήτοι, 1 αρσενικό και 1 θηλυκό ανά γέννα) για τον έλεγχο της οντογένεσης συμπεριφοράς πριν από τον απογαλακτισμό. Από αυτά, 10 νεογνά/φύλο/επίπεδο δόσης (1 αρσενικό ή 1 θηλυκό ανά γέννα) θανατώνονται ανώδυνα την 11η ΜΓΗ. Αφαιρείται ο εγκέφαλος, ζυγίζεται και υποβάλλεται σε επεξεργασία για ιστοπαθολογική αξιολόγηση.

7. Ένα άλλο σύνολο 20 ζώων/φύλο/επίπεδο δόσης (1 αρσενικό και 1 θηλυκό ανά γέννα) χρησιμοποιείται για εξετάσεις μετά τον απογαλακτισμό (λεπτομερείς κλινικές παρατηρήσεις, κινητική δραστηριότητα, εκτίμηση της ηλικίας σεξουαλικής ωρίμασης και της κινητικής και αισθητηριακής λειτουργίας). Από αυτά, 10 ζώα/φύλο/επίπεδο δόσης (ήτοι, 1 αρσενικό ή 1 θηλυκό ανά γέννα) υποβάλλονται σε αναισθησία και μονιμοποίηση με έγχυση κατά τη λήξη της μελέτης (την 70ή ΜΓΗ περίπου). Έπειτα από πρόσθετη μονιμοποίηση in situ, αφαιρείται ο εγκέφαλος, ζυγίζεται και υποβάλλεται σε επεξεργασία για νευροπαθολογική αξιολόγηση.

8. Για τη δοκιμασία γνωσιακής λειτουργίας σε ζώα στην ήβη και νεαρά ενήλικα ζώα χρησιμοποιούνται 10 νεογνά/φύλο/επίπεδο δόσης (ήτοι, 1 αρσενικό ή 1 θηλυκό ανά γέννα). Χρησιμοποιούνται διαφορετικά ζώα στις δοκιμασίες γνωσιακής λειτουργίας την 23η ΜΓΗ και σε νεαρά ενήλικα ζώα. Κατά τη λήξη της μελέτης, τα 10 ζώα/φύλο/ομάδα που υποβλήθηκαν στη δοκιμασία ως ενήλικα θανατώνονται και ο εγκέφαλός τους αφαιρείται και ζυγίζεται.

9. Τα υπόλοιπα 20 ζώα/φύλο/ομάδα που δεν επιλέχθηκαν για τη δοκιμασία θανατώνονται και απορρίπτονται κατά τον απογαλακτισμό.

Πίνακας 2

Αύξων αριθμός νεογνού (α)		Αριθμός νεογνών στη δοκιμασία	Εξέταση/δοκιμασία
α	θ		
1	5	20 α + 20 θ	Οντογένεση συμπεριφοράς
		10 α + 10 θ	Βάρος εγκεφάλου/νευροπαθολογία/μορφομετρία την11η ΜΓΗ
2	6	20 α + 20 θ	Λεπτομερείς κλινικές παρατηρήσεις
		20 α + 20 θ	Κινητική δραστηριότητα
		20 α + 20 θ	Σεξουαλική ωρίμαση
		20 α + 20 θ	Κινητική και αισθητηριακή λειτουργία
		10 α + 10 θ	Βάρος εγκεφάλου/νευροπαθολογία/μορφομετρία νεαρών ενήλικων ζώων ~70ή ΜΓΗ

▼**M5**

Αύξων αριθμός νεογνού ([α])		Αριθμός νεογνών στη δοκιμασία	Εξέταση/δοκιμασία
α	θ		
3	7	10 α + 10 θ ([β])	Μάθηση και μνήμη (23η ΜΓΗ)
3	7	10 α + 10 θ ([β])	Μάθηση και μνήμη (νεαρά ενήλικα ζώα) Βάρος εγκεφάλου νεαρών ενήλικων ζώων
4	8	—	Ζώα που θανατώνονται και απορρίπτονται την 21η ΜΓΗ

([α]) Στο συγκεκριμένο παράδειγμα επιλέγονται από τις γέννες 4 αρσενικά + 4 θηλυκά ζώα· τα αρσενικά αριθμούνται από το 1 έως το 4 και τα θηλυκά από το 5 έως το 8.

([β]) Χρησιμοποιούνται διαφορετικά νεογνά στις δοκιμασίες γνωσιακής λειτουργίας την 23η ΜΓΗ και σε νεαρά ενήλικα ζώα (π.χ. νεογνά με περιττό/άρτιο αριθμό από το σύνολο των 20 ζώων).

Παράδειγμα 3

10. Χρησιμοποιείται ένα σύνολο 20 νεογνών/φύλο/επίπεδο δόσης (ήτοι, 1 αρσενικό και 1 θηλυκό ανά γέννα) για προσδιορισμό του βάρους του εγκεφάλου και νευροπαθολογική αξιολόγηση την 11η ΜΓΗ. Από αυτά, 10 νεογνά/φύλο/επίπεδο δόσης (ήτοι 1 αρσενικό ή 1 θηλυκό ανά γέννα) θανατώνονται ανώδυνα την 11η ΜΓΗ και ο εγκέφαλός τους αφαιρείται, ζυγίζεται και υποβάλλεται σε επεξεργασία για ιστοπαθολογική αξιολόγηση. Επιπλέον, συλλέγονται δεδομένα για το βάρος του εγκεφάλου με τη χρήση εγκεφάλων που δεν έχουν μονιμοποιηθεί από τα εναπομένοντα 10 αρσενικά και 10 θηλυκά ζώα ανά επίπεδο δόσης.

11. Ένα άλλο σύνολο 20 ζώων/φύλο/επίπεδο δόσης (ήτοι, 1 αρσενικό και 1 θηλυκό ανά γέννα) χρησιμοποιείται για έλεγχο της οντογένεσης συμπεριφοράς (κινητική δραστηριότητα), εξετάσεις μετά τον απογαλακτισμό (κινητική δραστηριότητα και εκτίμηση της ηλικίας σεξουαλικής ωρίμασης) και δοκιμασίες γνωσιακής λειτουργίας σε ζώα στην ήβη.

12. Ένα άλλο σύνολο 20 ζώων/φύλο/επίπεδο δόσης (ήτοι, 1 αρσενικό και 1 θηλυκό ανά γέννα) χρησιμοποιείται για δοκιμασίες κινητικής και αισθητηριακής λειτουργίας (αιφνιδιασμός από ακουστικό ερέθισμα) και λεπτομερείς κλινικές παρατηρήσεις. Από αυτά, 10 ζώα/φύλο/επίπεδο δόσης (ήτοι, 1 αρσενικό ή 1 θηλυκό ανά γέννα) υποβάλλονται σε αναισθησία και μονιμοποίηση με έγχυση κατά τη λήξη της μελέτης (την 70ή ΜΓΗ περίπου). Έπειτα από πρόσθετη μονιμοποίηση in situ, αφαιρείται ο εγκέφαλος, ζυγίζεται και υποβάλλεται σε επεξεργασία για νευροπαθολογική αξιολόγηση.

13. Ένα άλλο σύνολο 20 νεογνών/φύλο/επίπεδο δόσης (ήτοι, 1 αρσενικό και 1 θηλυκό ανά γέννα) χρησιμοποιείται για τη δοκιμασία γνωσιακής λειτουργίας σε νεαρά ενήλικα ζώα. Από αυτά, 10 ζώα/φύλο/ομάδα (ήτοι, 1 αρσενικό ή 1 θηλυκό ανά γέννα) θανατώνονται κατά τη λήξη της μελέτης και ο εγκέφαλός τους αφαιρείται και ζυγίζεται.

Πίνακας 3

Αύξων αριθμός νεογνού ([α])		Αριθμός νεογνών στη δοκιμασία	Εξέταση/δοκιμασία
α	θ		
1	5	10 α + 10 θ	Βάρος εγκεφάλου/νευροπαθολογία/μορφομετρία την 11η ΜΓΗ
		10 α + 10 θ	Βάρος εγκεφάλου την 11η ΜΓΗ
2	6	20 α + 20 θ	Οντογένεση συμπεριφοράς (κινητική δραστηριότητα)
		20 α + 20 θ	Κινητική δραστηριότητα
		20 α + 20 θ	Σεξουαλική ωρίμαση
		20 α + 20 θ	Μάθηση και μνήμη (27η ΜΓΗ)

▼**M5**

Αύξων αριθμός νεογνού ([α])		Αριθμός νεογνών στη δοκιμασία	Εξέταση/δοκιμασία
α	θ		
3	7	20 α + 20 θ	Αιφνιδιασμός από ακουστικό ερέθισμα (ζώα στην ήβη και νεαρά ενήλικα ζώα)
		20 α + 20 θ	Λεπτομερείς κλινικές παρατηρήσεις
		10 α + 10 θ	Βάρος εγκεφάλου/νευροπαθολογία/μορφομετρία νεαρών ενήλικων ζώων ~70ή ΜΓΗ
4	8	20 α + 20 θ	Μάθηση και μνήμη (νεαρά ενήλικα ζώα)
		10 α + 10 θ	Βάρος εγκεφάλου νεαρών ενήλικων ζώων

([α]) Στο συγκεκριμένο παράδειγμα επιλέγονται από τις γέννες 4 αρσενικά + 4 θηλυκά ζώα· τα αρσενικά αριθμούνται από το 1 έως το 4 και τα θηλυκά από το 5 έως το 8.

▼**M5**

Προσάρτημα 2

Ορισμοί

Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

▼M5

Β.54. ΜΗΤΡΟΤΡΟΦΙΚΟΣ ΒΙΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΕ ΤΡΩΚΤΙΚΑ: ΒΡΑΧΥΠΡΟΘΕΣΜΗ ΔΟΚΙΜΗ ΔΙΑΛΟΓΗΣ ΓΙΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή δοκιμών (TG) 440 (2007). Το 1998 ο ΟΟΣΑ ανέλαβε μια δραστηριότητα πρώτης προτεραιότητας για την αναθεώρηση των υφιστάμενων κατευθυντήριων γραμμών, και την εκπόνηση νέων, σχετικά με τη διαλογή και τις δοκιμές δυνητικών ενδοκρινικών διαταρακτών (1). Ένα στοιχείο της δραστηριότητας ήταν η εκπόνηση κατευθυντήριας γραμμής δοκιμών για τον μητροτροφικό βιοπροσδιορισμό σε τρωκτικά. Ο μητροτροφικός βιοπροσδιορισμός σε τρωκτικά υποβλήθηκε στη συνέχεια σε εκτενές πρόγραμμα επικύρωσης, το οποίο περιλάμβανε τη σύνταξη λεπτομερούς εγγράφου τεκμηρίωσης (2)(3) και τη διεξαγωγή εκτενών ενδοεργαστηριακών και διεργαστηριακών μελετών για να καταδειχθεί η συνάφεια και η αναπαραγωγιμότητα του βιοπροσδιορισμού με ένα ισχυρό οιστρογόνο αναφοράς, ασθενείς αγωνιστές υποδοχέων οιστρογόνων, έναν ισχυρό ανταγωνιστή υποδοχέων οιστρογόνων και με μια αρνητική χημική ουσία αναφοράς (4)(5)(6)(7)(8)(9). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών Β.54 είναι προϊόν της πείρας που αποκομίστηκε κατά τη διάρκεια του προγράμματος δοκιμών επικύρωσης και των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από αυτό με αγωνιστές οιστρογόνων.

2. Ο μητροτροφικός βιοπροσδιορισμός είναι βραχυπρόθεσμη δοκιμή διαλογής που εμφανίστηκε τη δεκαετία του '30 (27)(28) και τυποποιήθηκε πρώτα από μια επιτροπή εμπειρογνωμόνων το 1962 με σκοπό τη διαλογή (32)(35). Βασίζεται στην αύξηση του βάρους της μήτρας ή μητροτροφική αντίδραση [για ανασκόπηση, βλ. (29)] και αξιολογεί την ικανότητα μιας χημικής ουσίας να προκαλεί βιολογικές δραστηριότητες που αντιστοιχούν σε αγωνιστές ή ανταγωνιστές φυσικών οιστρογόνων (π.χ. 17β-οιστραδιόλη). Ωστόσο, η χρήση της για την ανίχνευση ανταγωνιστών είναι λιγότερο συνήθης από ό,τι για την ανίχνευση αγωνιστών. Η μήτρα αντιδρά στα οιστρογόνα με δύο τρόπους. Μια πρώτη αντίδραση είναι η αύξηση του βάρους λόγω της απορρόφησης νερού. Μετά την αντίδραση αυτή ακολουθεί αύξηση του βάρους λόγω της ανάπτυξης των ιστών (30). Οι αντιδράσεις της μήτρας επιμύων και ποντικών είναι ποιοτικά συγκρίσιμες.

3. Ο παρών βιοπροσδιορισμός λειτουργεί ως προσδιορισμός διαλογής in vivo και η εφαρμογή του θα πρέπει να εντάσσεται στο «Εννοιολογικό πλαίσιο του ΟΟΣΑ για τις δοκιμές και την αξιολόγηση χημικών ενδοκρινικών διαταρακτών» (προσάρτημα 2). Στο εν λόγω εννοιολογικό πλαίσιο, ο μητροτροφικός βιοπροσδιορισμός περιλαμβάνεται στο 3ο επίπεδο ως προσδιορισμόςin vivo που παρέχει δεδομένα σχετικά με έναν και μόνο ενδοκρινικό μηχανισμό, την οιστρογονικότητα.

4. Προορισμός του μητροτροφικού βιοπροσδιορισμού είναι να συμπεριλαμβάνεται σε μια δέσμη δοκιμών in vitro και in vivo για τον εντοπισμό χημικών ουσιών που μπορούν να αλληλεπιδρούν με το ενδοκρινικό σύστημα, με τελικό αποτέλεσμα εκτιμήσεις κινδύνων για την ανθρώπινη υγεία ή το περιβάλλον. Στο πρόγραμμα επικύρωσης του ΟΟΣΑ χρησιμοποιήθηκαν τόσο ισχυροί όσο και ασθενείς αγωνιστές οιστρογόνων για να αξιολογηθούν οι επιδόσεις του προσδιορισμού στον εντοπισμό χημικών οιστρογόνων (4)(5)(6)(7)(8). Ως εκ τούτου, πέραν της καλής ενδοεργαστηριακής και διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, καταδείχθηκε σαφώς η ευαισθησία της διαδικασίας δοκιμών στους αγωνιστές οιστρογόνων.

5. Όσον αφορά τις αρνητικές ενώσεις, στο πρόγραμμα επικύρωσης συμπεριελήφθη μόνο μία «αρνητική» χημική ουσία αναφοράς, που ήδη είχε αναφερθεί ως αρνητική σε μητροτροφικό προσδιορισμό, καθώς και σε προσδιορισμούς σύνδεσης με υποδοχέα και υποδοχέων in vitro, αλλά αξιολογήθηκαν πρόσθετα δεδομένα δοκιμών που δεν είχαν σχέση με το πρόγραμμα επικύρωσης του ΟΟΣΑ και με τα οποία τεκμηριώθηκε περαιτέρω η ειδικότητα του μητροτροφικού βιοπροσδιορισμού για τη διαλογή αγωνιστών των οιστρογόνων (16).

▼**M5**

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

6. Οι αγωνιστές και οι ανταγωνιστές οιστρογόνων δρουν ως συνδέτες των υποδοχέων οιστρογόνων α και β και μπορούν να ενεργοποιούν ή να αναστέλλουν, αντιστοίχως, τη μεταγραφική δράση των υποδοχέων. Η δράση αυτή ενδεχομένως εγκυμονεί κινδύνους δυσμενών επιδράσεων στην υγεία, συμπεριλαμβανομένων επιδράσεων στην αναπαραγωγή και την ανάπτυξη. Είναι επομένως αναγκαία η ταχεία εξέταση και αξιολόγηση των χημικών ουσιών ως πιθανών αγωνιστών ή ανταγωνιστών των οιστρογόνων. Η συγγένεια ενός συνδέτη με έναν υποδοχέα οιστρογόνων ή η μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων έκφρασης in vitro, παρόλο που παρέχει πληροφορίες, είναι απλώς ένας από τους πολλούς παράγοντες που καθορίζουν τον ενδεχόμενο κίνδυνο. Μεταξύ των άλλων καθοριστικών παραγόντων συγκαταλέγονται η μεταβολική ενεργοποίηση και αδρανοποίηση μετά την είσοδο στο σώμα, η κατανομή στους ιστούς-στόχους και η απέκκριση από το σώμα, οι οποίες εξαρτώνται, τουλάχιστον εν μέρει, από την οδό χορήγησης και την ελεγχόμενη χημική ουσία. Ανακύπτει έτσι η ανάγκη ελέγχου της πιθανής δράσης μιας χημικής ουσίας in vivo υπό τις σχετικές συνθήκες, εκτός εάν τα χαρακτηριστικά της όσον αφορά την απορρόφηση, την κατανομή, τον μεταβολισμό και την απέκκριση (ADME) παρέχουν ήδη κατάλληλες πληροφορίες. Οι ιστοί της μήτρας αντιδρούν με ταχεία και έντονη αύξηση στην διέγερση από τα οιστρογόνα, ιδίως στην περίπτωση των εργαστηριακών τρωκτικών, στα οποία ο οιστρικός κύκλος διαρκεί περίπου 4 ημέρες. Είδη τρωκτικών, ιδίως ο επίμυς, χρησιμοποιούνται επίσης ευρέως σε μελέτες τοξικότητας για τον χαρακτηρισμό των κινδύνων. Συνεπώς, η μήτρα των τρωκτικών αποτελεί κατάλληλο όργανο-στόχο για την in vivo διαλογή αγωνιστών και ανταγωνιστών των οιστρογόνων.

7. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών βασίζεται στα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη επικύρωσης του ΟΟΣΑ και έχουν αποδειχθεί αξιόπιστα και αναπαραγώγιμα σε ενδοεργαστηριακές και διεργαστηριακές μελέτες (5)(7). Σήμερα είναι διαθέσιμες δύο μέθοδοι: η μέθοδος στην οποία χρησιμοποιούνται ενήλικα θηλυκά ζώα που έχουν υποβληθεί σε ωοθηκεκτομή (μέθοδος με ενήλικα ζώα που έχουν υποστεί ωοθηκεκτομή) και η μέθοδος στην οποία χρησιμοποιούνται άνηβα ζώα που δεν έχουν υποβληθεί σε ωοθηκεκτομή (μέθοδος με άνηβα ζώα). Στο πρόγραμμα δοκιμών επικύρωσης του ΟΟΣΑ καταδείχθηκε ότι και οι δύο μέθοδοι έχουν συγκρίσιμη ευαισθησία και αναπαραγωγιμότητα. Ωστόσο, η μέθοδος με άνηβα ζώα, καθώς διατηρεί άθικτο τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων (HPG), είναι σχετικά λιγότερο εξειδικευμένη, αλλά καλύπτει μεγαλύτερο πεδίο διερεύνησης σε σύγκριση με τη μέθοδο με ζώα που έχουν υποστεί ωοθηκεκτομή, διότι ανταποκρίνεται σε χημικές ουσίες που αλληλεπιδρούν με τον άξονα HPG και όχι μόνο με τον υποδοχέα οιστρογόνων. Ο άξονας HPG των επιμύων καθίσταται λειτουργικός σε ηλικία περίπου 15 ημερών. Πριν από αυτή, δεν είναι δυνατόν να επισπευστεί η ήβη με αγωγή, π.χ. με ορμόνη έκλυσης γοναδοτροπινών (GnRH). Καθώς τα θηλυκά ζώα πλησιάζουν στην ήβη, πριν από το άνοιγμα του κόλπου, έχουν πολλούς «σιωπηρούς» κύκλους που δεν οδηγούν σε άνοιγμα του κόλπου ή ωορρηξία, αλλά συνεπάγονται ορισμένες ορμονικές διακυμάνσεις. Εάν μια χημική ουσία διεγείρει τον άξονα HPG, άμεσα ή έμμεσα, το αποτέλεσμα είναι πρόωρη ήβη, πρόωρη ωορρηξία και ταχύτερο άνοιγμα του κόλπου. Δεν είναι μόνο οι χημικές ουσίες που επενεργούν στον άξονα HPG υπεύθυνες για το αποτέλεσμα αυτό, αλλά και ορισμένα σιτηρέσια με υψηλότερα επίπεδα μεταβολίσιμης ενέργειας από άλλα διεγείρουν την ανάπτυξη και επιταχύνουν το άνοιγμα του κόλπου, χωρίς να είναι οιστρογόνα. Οι εν λόγω χημικές ουσίες δεν επάγουν μητροτροφική αντίδραση σε ενήλικα ζώα που έχουν υποστεί ωοθηκεκτομή, καθώς σε αυτά δεν λειτουργεί ο άξονας HPG.

8. Για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων, θα πρέπει να προτιμάται η μέθοδος στην οποία χρησιμοποιούνται άνηβοι επίμυες, ώστε να αποφεύγονται, αφενός η χειρουργική προετοιμασία των ζώων και, αφετέρου, το ενδεχόμενο να μην χρησιμοποιηθούν τα ζώα που παρουσιάζουν ενδείξεις έναρξης του οιστρικού κύκλου (βλ. παράγραφο 30).

▼**M5**

9. Η μητροτροφική αντίδραση δεν οφείλεται αποκλειστικά στα οιστρογόνα, δηλ. είναι δυνατόν να προκληθεί και από άλλες χημικές ουσίες πέραν των αγωνιστών ή ανταγωνιστών των οιστρογόνων. Παραδείγματος χάριν, σχετικά υψηλές δόσεις προγεστερόνης, τεστοστερόνης ή διαφόρων συνθετικών προγεστινών μπορούν να οδηγήσουν σε διεγερτική αντίδραση (30). Οποιαδήποτε αντίδραση μπορεί να αποτελέσει το αντικείμενο ιστολογικής ανάλυσης για την ανίχνευση κερατινοποίησης του κόλπου (30). Ανεξαρτήτως του πιθανού αιτίου της αντίδρασης, το θετικό αποτέλεσμα ενός μητροτροφικού βιοπροσδιορισμού θα πρέπει κανονικά να αποτελεί το έναυσμα για ενέργειες με σκοπό την περαιτέρω διασαφήνιση. Συμπληρωματικά αποδεικτικά στοιχεία οιστρογονικότητας θα μπορούσαν να προέλθουν από προσδιορισμούς in vitro, όπως οι προσδιορισμοί σύνδεσης με υποδοχέα οιστρογόνων και μεταγραφικής ενεργοποίησης, ή από άλλους προσδιορισμούς in vivo, όπως ο προσδιορισμός σε θηλυκά ζώα στην ήβη.

10. Λαμβανομένου υπόψη ότι ο μητροτροφικός βιοπροσδιορισμός λειτουργεί ωςπροσδιορισμός διαλογής in vivo, η προσέγγιση επικύρωσης που υιοθετήθηκε εξυπηρετούσε τόσο την καλή μεταχείριση των ζώων, όσο και μια στρατηγική βαθμιδωτών δοκιμών. Για τον σκοπό αυτό, οι προσπάθειες επικεντρώθηκαν στην αυστηρή επικύρωση της αναπαραγωγιμότητας και της ευαισθησίας όσον αφορά την οιστρογονικότητα -το κύριο πρόβλημα με πολλές χημικές ουσίες-, ενώ λίγη προσπάθεια καταβλήθηκε όσον αφορά το αντιοιστρογονικό σκέλος του προσδιορισμού. Δεδομένου ότι ο αριθμός των χημικών ουσιών με σαφή χαρακτηριστικά αντιοιστρογόνου (τα οποία δεν επισκιάζονται από οιστρογονική δράση) είναι πολύ περιορισμένος, ελέγχθηκε μόνο ένα αντιοιστρογόνο με ισχυρή δράση. Ως εκ τούτου, η παρούσα μέθοδος δοκιμών περιλαμβάνει αποκλειστικά το πρωτόκολλο με οιστρογόνα, ενώ το πρωτόκολλο που περιγράφει τη λειτουργία του προσδιορισμού με ανταγωνιστές περιλαμβάνεται σε καθοδηγητικό έγγραφο (37). Η αναπαραγωγιμότητα και η ευαισθησία του προσδιορισμού στην περίπτωση των χημικών ουσιών με αμιγώς αντιοιστρογονική δράση θα καθοριστούν ακριβέστερα σε μεταγενέστερο στάδιο, αφού εφαρμοστεί η διαδικασία δοκιμής ως συνήθης πρακτική για αρκετό χρόνο και προσδιοριστούν περισσότερες χημικές ουσίες που δρουν με αυτόν τον τρόπο.

11. Αναγνωρίζεται ότι όλες οι διαδικασίες που περιλαμβάνουν ζώα πρέπει να είναι σύμφωνες με τα τοπικά πρότυπα φροντίδας των ζώων. Οι κατωτέρω περιγραφές φροντίδας και αγωγής αποτελούν ελάχιστα πρότυπα επιδόσεων και αντικαθίστανται από τοπικές ρυθμίσεις, όπως η οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 22ας Σεπτεμβρίου 2010, περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς (38). Περαιτέρω καθοδήγηση για την ανώδυνη μεταχείριση των ζώων παρέχει ο ΟΟΣΑ (25).

12. Όπως σε όλους τους προσδιορισμούς για τους οποίους χρησιμοποιούνται ζωντανά ζώα, είναι απαραίτητο να διασφαλίζεται ότι τα δεδομένα είναι πραγματικά απαραίτητα πριν από την έναρξη του προσδιορισμού. Παραδείγματος χάριν, δύο περιπτώσεις στις οποίες ενδέχεται να απαιτούνται τα δεδομένα είναι:

— η μεγάλη πιθανότητα έκθεσης (1ο επίπεδο του εννοιολογικού πλαισίου, προσάρτημα 2) ή οι ενδείξεις οιστρογονικότητας (2ο επίπεδο), για να διερευνηθεί αν οι επιδράσεις αυτές είναι δυνατόν να ανακύψουν in vivo·

— οι επιδράσεις που υποδηλώνουν οιστρογονικότητα σε in vivo δοκιμές4ου ή 5ου επιπέδου, για να τεκμηριωθεί ότι οι επιδράσεις σχετίζονται με οιστρογονικό μηχανισμό που δεν μπορεί να διαλευκανθεί με δοκιμή in vitro.

13. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

▼**M5**

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

14. Η ευαισθησία του μητροτροφικού βιοπροσδιορισμού βασίζεται σε ένα σύστημα δοκιμών σε ζώα στο οποίο ο άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-ωοθηκών δεν είναι λειτουργικός, με αποτέλεσμα χαμηλά ενδογενή επίπεδα κυκλοφορούντων οιστρογόνων. Με τον τρόπο αυτόν εξασφαλίζεται μικρό βάρος γραμμής βάσης της μήτρας και μέγιστο εύρος αντίδρασης στα χορηγούμενα οιστρογόνα. Δύο καταστάσεις ευαισθησίας των θηλυκών τρωκτικών στα οιστρογόνα πληρούν την απαίτηση αυτή:

i) άνηβα θηλυκά ζώα μετά τον απογαλακτισμό και πριν από την ήβη και

ii) νεαρά ενήλικα θηλυκά ζώα μετά από ωοθηκεκτομή, αφού δοθεί πρώτα επαρκής χρόνος στους ιστούς της μήτρας να υποχωρήσουν.

15. Η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται καθημερινά με στομαχικό καθετήρα ή υποδόρια ένεση. Χορηγούνται κλιμακωτές δόσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε δύο τουλάχιστον ομάδες πειραματόζωων αγωγής (βλ. παράγραφο 33 για καθοδήγηση), με ένα επίπεδο δόσης ανά ομάδα και περίοδο χορήγησης τριών συνεχών ημερών στη μέθοδο με άνηβα ζώα, ενώ στη μέθοδο με ενήλικα ζώα που έχουν υποστεί ωοθηκεκτομή, η ελάχιστη περίοδος χορήγησης είναι τρεις συνεχείς ημέρες. Τα ζώα νεκροτομούνται περίπου 24 ώρες μετά την τελευταία δόση. Στην περίπτωση των αγωνιστών των οιστρογόνων, εξετάζεται το μέσο βάρος μήτρας στις ομάδες των ζώων που υποβάλλονται σε αγωγή σε σχέση με την ομάδα μαρτύρων με τον φορέα, για να διαπιστωθεί στατιστικά σημαντική αύξηση. Μια στατιστικά σημαντική αύξηση του μέσου βάρους μήτρας σε ομάδα δοκιμής υποδηλώνει θετική αντίδραση στον παρόντα βιοπροσδιορισμό.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Επιλογή ζωικού είδους

16. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα στελέχη εργαστηριακών τρωκτικών που χρησιμοποιούνται συνήθως. Παραδείγματος χάριν, κατά την επικύρωση χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη επιμύων Sprague-Dawley και Wistar. Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται στελέχη τρωκτικών για τα οποία είναι γνωστό ή υπάρχουν υπόνοιες ότι η μήτρα τους ανταποκρίνεται λιγότερο. Το εργαστήριο θα πρέπει να αποδεικνύει την ευαισθησία του χρησιμοποιούμενου στελέχους, όπως περιγράφεται στις παραγράφους 26 και 27.

17. Η χρήση επιμύων και ποντικών στον μητροτροφικό βιοπροσδιορισμό αποτελεί συνήθη πρακτική από τη δεκαετία του '30. Οι μελέτες επικύρωσης του ΟΟΣΑ διεξήχθησαν μόνο με επίμυες, επειδή θεωρείται ότι τα δύο είδη αναμένεται να είναι ισοδύναμα και, επομένως, ένα είδος αρκεί για την παγκόσμια επικύρωση, ώστε να εξοικονομηθούν πόροι και ζώα. Ο επίμυς είναι το προτιμώμενο είδος στις περισσότερες μελέτες αναπαραγωγικής και αναπτυξιακής τοξικότητας. Λαμβανομένου υπόψη ότι υπάρχει μια τεράστια ιστορική βάση δεδομένων για τους ποντικούς και για να επεκταθεί το πεδίο εφαρμογής του μητροτροφικού βιοπροσδιορισμού σε τρωκτικά στη χρήση ποντικών ως ζωικού είδους δοκιμής, διεξήχθη περιορισμένη μελέτη επικύρωσης συνέχειας σε ποντικούς (16). Επιλέχθηκε προσέγγιση παρεκβολής με περιορισμένο αριθμό ελεγχόμενων χημικών ουσιών και συμμετεχόντων εργαστηρίων, χωρίς δοκιμές κωδικοποιημένων δειγμάτων, ώστε να διατηρηθεί η αρχική πρόθεση εξοικονόμησης πόρων και ζώων. Από την εν λόγω μελέτη επικύρωσης με προσέγγιση παρεκβολής προέκυψε ότι, όσον αφορά τον μητροτροφικό βιοπροσδιορισμό σε νεαρούς ενήλικους ποντικούς που έχουν υποστεί ωοθηκεκτομή, τα δεδομένα που λαμβάνονται με επίμυες και ποντικούς είναι ποιοτικά και ποσοτικά αντίστοιχα. Κατ' αυτόν τον τρόπο, όταν το αποτέλεσμα του μητροτροφικού βιοπροσδιορισμού είναι προκαταρκτικό δεδομένο σε μακροπρόθεσμη μελέτη, μπορούν να χρησιμοποιούνται και στις δύο μελέτες ζώα της ίδιου στελέχους και προέλευσης. Η προσέγγιση παρεκβολής περιορίστηκε στους ποντικούς που έχουν υποστεί ωοθηκεκτομή, ενώ για την επικύρωση του μοντέλου με άνηβα ζώα δεν προέκυψε ανθεκτικό σύνολο δεδομένων. Κατόπιν τούτου, το μοντέλο με άνηβα ζώα δεν λαμβάνεται υπόψη στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

▼M5

18. Συνεπώς, σε ορισμένες περιπτώσεις είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν ποντικοί αντί των επιμύων. Η χρήση του είδους αυτού θα πρέπει να αιτιολογείται βάσει τοξικολογικών, φαρμακοκινητικών και/ή άλλων κριτηρίων. Ενδέχεται να απαιτούνται τροποποιήσεις του πρωτοκόλλου για τους ποντικούς. Παραδείγματος χάριν, η κατανάλωση τροφής από τους ποντικούς ως προς το σωματικό τους βάρος είναι μεγαλύτερη σε σύγκριση με τους επίμυες και, επομένως, η περιεκτικότητα της τροφής σε φυτοοιστρογόνα θα πρέπει να είναι μικρότερη στην περίπτωση των ποντικών σε σύγκριση με τους επίμυες (9)(20)(22).

Συνθήκες στέγασης και διατροφής

19. Όλες οι διαδικασίες θα πρέπει να είναι σύμφωνες με τα τοπικά πρότυπα φροντίδας των πειραματόζωων. Οι παρούσες περιγραφές φροντίδας και αγωγής αποτελούν ελάχιστα πρότυπα και αντικαθίστανται από τοπικές ρυθμίσεις, όπως η οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 22ας Σεπτεμβρίου 2010, περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς (38). Η θερμοκρασία του θαλάμου πειραματόζωων θα πρέπει να είναι 22 °C (με εύρος ± 3 °C περίπου). Η σχετική υγρασία πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει μέγιστο ποσοστό 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου. Στόχος θα πρέπει να είναι μια τιμή σχετικής υγρασίας 50-60 %. Ο φωτισμός θα πρέπει να είναι τεχνητός με ημερήσια φωτοπερίοδο 12 ωρών.

20. Το εργαστηριακό σιτηρέσιο και πόσιμο νερό θα πρέπει να παρέχονται κατά βούληση. Τα νεαρά ενήλικα ζώα μπορούν να στεγάζονται ατομικά ή σε κλωβούς σε ομάδες έως τριών ζώων. Λόγω του νεαρού της ηλικίας των άνηβων ζώων, συνιστάται η στέγαση σε κοινωνικές ομάδες.

21. Είναι γνωστό ότι τα υψηλά επίπεδα φυτοοιστρογόνων στα εργαστηριακά σιτηρέσια προκαλούν αύξηση του βάρους της μήτρας των τρωκτικών σε βαθμό που παρεμποδίζει τον μητροτροφικό βιοπροσδιορισμό (13)(14)(15). Τα υψηλά επίπεδα φυτοοιστρογόνων και μεταβολίσιμης ενέργειας στα εργαστηριακά σιτηρέσια είναι επίσης δυνατόν να προκαλέσουν πρόωρη ήβη, εάν χρησιμοποιούνται άνηβα ζώα. Η παρουσία φυτοοιστρογόνων είναι κυρίως αποτέλεσμα της ένταξης προϊόντων σόγιας και τριφυλλιού στα εργαστηριακά σιτηρέσια, ενώ έχει αποδειχθεί ότι οι συγκεντρώσεις φυτοοιστρογόνων διαφέρουν μεταξύ των διαφόρων παρτίδων ενός τυπικού εργαστηριακού σιτηρεσίου (23). Το σωματικό βάρος αποτελεί σημαντική μεταβλητή, δεδομένου ότι η ποσότητα τροφής που καταναλώνεται σχετίζεται με αυτό. Επομένως, η πραγματική δόση φυτοοιστρογόνων που προσλαμβάνεται μέσω του ίδιου σιτηρεσίου μπορεί να διαφέρει μεταξύ των ειδών και ανάλογα με την ηλικία (9). Στην περίπτωση των άνηβων θηλυκών επιμύων, η κατανάλωση τροφής ως προς το σωματικό βάρος ενδέχεται να είναι περίπου διπλάσια σε σύγκριση με τους νεαρούς ενήλικες θηλυκούς επίμυες που έχουν υποστεί ωοθηκεκτομή. Στην περίπτωση των νεαρών ενήλικων ποντικών, η κατανάλωση τροφής ως προς το σωματικό βάρος ενδέχεται να είναι περίπου τετραπλάσια σε σύγκριση με τους νεαρούς ενήλικους θηλυκούς ποντικούς που έχουν υποστεί ωοθηκεκτομή.

22. Ωστόσο, τα αποτελέσματα του μητροτροφικού βιοπροσδιορισμού (9)(17)(18)(19) δείχνουν ότι περιορισμένες ποσότητες φυτοοιστρογόνων προερχόμενων από την τροφή είναι αποδεκτές και δεν μειώνουν την ευαισθησία του. Γενικά, τα επίπεδα φυτοοιστρογόνων στην τροφή δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν τα 350 μg ισοδυνάμων γενιστεΐνης ανά γραμμάριο εργαστηριακού σιτηρεσίου στην περίπτωση των άνηβων θηλυκών επιμύων Sprague Dawley και Wistar (6)(9). Τα σιτηρέσια αυτά αναμένεται να είναι επίσης κατάλληλα για τις δοκιμές σε νεαρούς ενήλικους επίμυες που έχουν υποστεί ωοθηκεκτομή, διότι η κατανάλωση τροφής ως προς το σωματικό βάρος είναι μικρότερη στα νεαρά ενήλικα ζώα σε σύγκριση με τα άνηβα. Εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν ενήλικες ποντικοί που έχουν υποστεί ωοθηκεκτομή ή επίμυες περισσότερο ευαίσθητοι στα φυτοοιστρογόνα, πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο αναλογικής μείωσης των επιπέδων φυτοοιστρογόνων στην τροφή (20). Επιπλέον, οι διαφορές μεταξύ των σιτηρεσίων όσον αφορά τη διαθέσιμη μεταβολίσιμη ενέργεια μπορούν να οδηγήσουν σε χρονική μετάθεση της εμφάνισης της ήβης (21)(22).

▼M5

23. Πριν από τη μελέτη, απαιτείται προσεκτική επιλογή σιτηρεσίου χωρίς υψηλά επίπεδα φυτοοιστρογόνων [για καθοδήγηση, βλ. βιβλιογραφικές παραπομπές (6)(9)] ή μεταβολίσιμης ενέργειας που μπορούν να επηρεάσουν τα αποτελέσματα (15)(17)(19)(22)(36). Η εξασφάλιση των κατάλληλων επιδόσεων του συστήματος δοκιμών που χρησιμοποιεί το εργαστήριο, όπως εξειδικεύεται στις παραγράφους 26 και 27, αποτελεί σημαντικό έλεγχο και των δύο αυτών παραγόντων. Ως ασφαλιστική δικλείδα που συνάδει με την ορθή εργαστηριακή πρακτική, θα πρέπει να λαμβάνεται αντιπροσωπευτικό δείγμα κάθε παρτίδας τροφής που χορηγείται κατά τη διάρκεια της μελέτης για το ενδεχόμενο ανάλυσης της περιεκτικότητας σε φυτοοιστρογόνα (π.χ. σε περίπτωση μεγάλου βάρους μήτρας στους μάρτυρες σε σύγκριση με ιστορικούς μάρτυρες ή ανεπαρκούς αντίδρασης στο οιστρογόνο αναφοράς, τη 17α-αιθινυλοιστραδιόλη). Θα πρέπει να αναλύονται γνωστά κλάσματα των δειγμάτων στο πλαίσιο της μελέτης ή να καταψύχονται στους – 20 °C ή να φυλάσσονται κατά τρόπο ώστε να αποφεύγεται η αποσύνθεση του δείγματος πριν από την ανάλυση.

24. Ορισμένα υλικά στρωμνής μπορεί να περιέχουν χημικά οιστρογόνα ή αντιοιστρογόνα που απαντούν στη φύση (π.χ. είναι γνωστό ότι η κορύνη του αραβοσίτου επηρεάζει την κυκλικότητα του οίστρου των επιμύων και φαίνεται να δρα ως αντιοιστρογόνο). Το επιλεγόμενο υλικό στρωμνής θα πρέπει να περιέχει ελάχιστα επίπεδα φυτοοιστρογόνων.

Προετοιμασία των ζώων

25. Πειραματόζωα που δεν εμφανίζουν ενδείξεις ασθένειας ή σωματικών ανωμαλιών κατανέμονται τυχαία στις ομάδες μαρτύρων και αγωγής. Η διάταξη των κλωβών θα πρέπει να ελαχιστοποιεί την πιθανότητα επιδράσεων οφειλόμενων στη θέση των κλωβών. Τα ζώα θα πρέπει να λαμβάνουν αποκλειστικό για το καθένα αναγνωριστικό. Κατά προτίμηση, τα άνηβα ζώα θα πρέπει να στεγάζονται σε κλωβούς με τις μητέρες τους ή με ανάδοχες μητέρες έως τον απογαλακτισμό κατά την περίοδο εγκλιματισμού. Η περίοδος εγκλιματισμού πριν από την έναρξη της μελέτης θα πρέπει να είναι περίπου 5 ημέρες για τα νεαρά ενήλικα ζώα και για τα άνηβα ζώα που παραδίδονται μαζί με τις μητέρες τους ή με ανάδοχες μητέρες. Εάν τα άνηβα ζώα παραλαμβάνονται ως απογαλακτισμένα ζώα χωρίς μητέρες, ενδέχεται να απαιτείται συντομότερη περίοδος εγκλιματισμού, δεδομένου ότι η χορήγηση δόσεων θα πρέπει να αρχίζει αμέσως μετά τον απογαλακτισμό (βλ. παράγραφο 29).

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Έλεγχος της ικανότητας του εργαστηρίου

26. Για τον έλεγχο της ικανότητας του εργαστηρίου υπάρχουν δύο επιλογές:

— περιοδικός έλεγχος που βασίζεται σε μια αρχική βασική μελέτη θετικών μαρτύρων (βλ. παράγραφο 27). Τουλάχιστον ανά εξάμηνο και κάθε φορά που επέρχεται αλλαγή η οποία ενδέχεται να επηρεάσει τις επιδόσεις του προσδιορισμού (π.χ. νέα σύνθεση σιτηρεσίου, αλλαγή του προσωπικού που διενεργεί την ανατομή, αλλαγή του στελέχους ή του προμηθευτή των ζώων κ.λπ.), θα πρέπει να επαληθεύεται η ανταπόκριση του συστήματος δοκιμών (ζωικού μοντέλου) με τη χρήση κατάλληλης δόσης (βάσει της βασικής μελέτης θετικών μαρτύρων που περιγράφεται στην παράγραφο 27) ενός οιστρογόνου αναφοράς, της 17α-αιθινυλοιστραδιόλης (αριθ. CAS 57-63-6).

— χρήση συντρεχόντων μαρτύρων, με την προσθήκη σε κάθε προσδιορισμό μιας ομάδας στην οποία χορηγείται κατάλληλη δόση του οιστρογόνου αναφοράς.

Εάν το σύστημα δεν ανταποκριθεί όπως αναμένεται, οι πειραματικές συνθήκες θα πρέπει να εξεταστούν και να τροποποιηθούν αναλόγως. Συνιστάται να χρησιμοποιείται δόση του οιστρογόνου αναφοράς περίπου ίση με την αποτελεσματική δόση ED70 έως ED80, ανεξαρτήτως προσέγγισης.

▼M5

27. **Βασική μελέτη θετικών μαρτύρων** — Προτού ένα εργαστήριο εκπονήσει για πρώτη φορά μελέτη βάσει της παρούσας μεθόδου δοκιμών, θα πρέπει να αποδεικνύει την ικανότητά του ελέγχοντας την ανταπόκριση του ζωικού μοντέλου, με προσδιορισμό της σχέσης δόσης-απόκρισης ενός οιστρογόνου αναφοράς, της 17α-αιθινυλοιστραδιόλης (αριθ. CAS 57-63-6) (ΕΕ), με τέσσερις τουλάχιστον δόσεις. Η απόκριση όσον αφορά το βάρος μήτρας συγκρίνεται με επίσημα ιστορικά δεδομένα [βλ. βιβλιογραφική παραπομπή (5)]. Εάν αυτή η βασική μελέτη θετικών μαρτύρων δεν αποδώσει τα αναμενόμενα αποτελέσματα, οι πειραματικές συνθήκες θα πρέπει να εξεταστούν και να τροποποιηθούν.

Αριθμός και κατάσταση των ζώων

28. Κάθε ομάδα αγωγής και μαρτύρων θα πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον 6 ζώα (και για τα δύο πρωτόκολλα της μεθόδου — με άνηβα ζώα και με ενήλικα ζώα που έχουν υποστεί ωοθηκεκτομή).

Ηλικία των άνηβων ζώων

29. Στην περίπτωση του μητροτροφικού βιοπροσδιορισμού με άνηβα ζώα, θα πρέπει να προσδιορίζεται η ημέρα γέννησης. Η χορήγηση δόσεων θα πρέπει να αρχίζει σε αρκετά πρώιμο στάδιο ώστε να διασφαλίζεται ότι, στο τέλος της χορήγησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, δεν έχει συντελεστεί ακόμα η φυσιολογική αύξηση των ενδογενών οιστρογόνων που συνδέεται με την ήβη. Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι τα πολύ νεαρά ζώα ενδέχεται να είναι λιγότερο ευαίσθητα. Για τον καθορισμό της βέλτιστης ηλικίας, κάθε εργαστήριο θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη τα δικά του προϋπάρχοντα δεδομένα σχετικά με την ωρίμαση.

Γενικά, η χορήγηση δόσεων σε επίμυες μπορεί να αρχίζει αμέσως μετά τον πρώιμο απογαλακτισμό κατά τη 18η μεταγεννητική ημέρα (η ημέρα γέννησης θεωρείται ως η μεταγεννητική ημέρα 0). Κατά προτίμηση, θα πρέπει να ολοκληρώνεται την 21η μεταγεννητική ημέρα και, σε κάθε περίπτωση, πριν από την 25η μεταγεννητική ημέρα, διότι, μετά από αυτήν, ο άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-ωοθηκών καθίσταται λειτουργικός και τα ενδογενή επίπεδα οιστρογόνων είναι δυνατόν να αρχίσουν να αυξάνονται, με ταυτόχρονη αύξηση των μέσων τιμών βάρους γραμμής βάσης της μήτρας και αύξηση των τυπικών αποκλίσεων της ομάδας (2)(3)(10)(11)(12).

Διαδικασία ωοθηκεκτομής

30. Στην περίπτωση των θηλυκών επιμύων και ποντικών που υποβάλλονται σε ωοθηκεκτομή (ομάδες αγωγής και μαρτύρων), η ωοθηκεκτομή πρέπει να πραγματοποιείται μεταξύ της 6ης και της 8ης εβδομάδας ζωής. Στην περίπτωση των επιμύων, θα πρέπει να μεσολαβούν τουλάχιστον 14 ημέρες μεταξύ της ωοθηκεκτομής και της πρώτης ημέρας χορήγησης δόσεων, ώστε να δίνεται η δυνατότητα στη μήτρα να επανέλθει σε μια ελάχιστη, σταθερή γραμμή βάσης. Στην περίπτωση των ποντικών, θα πρέπει να μεσολαβούν τουλάχιστον 7 ημέρες μεταξύ της ωοθηκεκτομής και της πρώτης ημέρας χορήγησης δόσεων. Δεδομένου ότι μικρές ποσότητες ωοθηκικού ιστού αρκούν για να παραχθούν σημαντικά κυκλοφορούντα επίπεδα οιστρογόνων (3), τα ζώα θα πρέπει να ελέγχονται πριν από τη χρήση τους, μέσω παρατήρησης δειγμάτων επιθηλιακών κυττάρων από τον κόλπο για τουλάχιστον πέντε συνεχείς ημέρες (π.χ. 10η-14η ημέρα μετά την ωοθηκεκτομή, στην περίπτωση των επιμύων). Εάν τα ζώα παρουσιάζουν ενδείξεις έναρξης του οίστρου, δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Επίσης, κατά τη νεκροψία, θα πρέπει να εξετάζονται τα στελέχη των ωοθηκών για να διαπιστωθεί τυχόν παρουσία ωοθηκικού ιστού. Εάν διαπιστωθεί παρουσία ωοθηκικού ιστού, τα ζώα δεν θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν στους υπολογισμούς (3).

31. Η διαδικασία ωοθηκεκτομής αρχίζει με το ζώο σε πρηνή θέση, αφού προηγουμένως έχει αναισθητοποιηθεί καταλλήλως. Η τομή για τη διάνοιξη του πλαγιοραχιαίου κοιλιακού τοιχώματος θα πρέπει να πραγματοποιείται κατά μήκος περίπου 1 εκατοστού στο μέσο της απόστασης μεταξύ του κατώτερου ορίου των πλευρών και της λαγονίου ακρολοφίας και λίγα χιλιοστά πλαγίως του πλευρικού περιθωρίου του οσφυϊκού μυός. Η ωοθήκη θα πρέπει να αφαιρείται από την κοιλιακή κοιλότητα πάνω σε άσηπτη επιφάνεια και να αποκόπτεται στη συμβολή σάλπιγγας και σώματος της μήτρας. Αφού επιβεβαιωθεί ότι δεν έχει προκληθεί μεγάλη αιμορραγία, κλείνεται το κοιλιακό τοίχωμα με ράμμα και το δέρμα με συνδετήρες ή κατάλληλο ράμμα. Τα σημεία απολίνωσης εμφαίνονται στο σχήμα 1. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται κατάλληλη μετεγχειρητική αναλγησία που συνιστάται από κτηνίατρο με πείρα στη φροντίδα τρωκτικών.

▼M5

Σωματικό βάρος

32. Στη μέθοδο με τα ενήλικα ζώα που έχουν υποστεί ωοθηκεκτομή, το σωματικό βάρος δεν συσχετίζεται με το βάρος της μήτρας, επειδή το τελευταίο επηρεάζεται από ορμόνες όπως τα οιστρογόνα, αλλά όχι από τους αυξητικούς παράγοντες που ρυθμίζουν το μέγεθος του σώματος. Αντιθέτως, το σωματικό βάρος συνδέεται με το βάρος της μήτρας στο μοντέλο με τα άνηβα ζώα, καθώς το σώμα ωριμάζει (34). Επομένως, στην αρχή της μελέτης, οι διαφορές βάρους των ζώων που χρησιμοποιούνται στο μοντέλο με τα άνηβα ζώα δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν το ± 20 % της μέσης τιμής βάρους. Αυτό σημαίνει ότι το μέγεθος της γέννας θα πρέπει να τυποποιείται από τον εκτροφέα ώστε να εξασφαλίζεται ότι οι απόγονοι διαφορετικών μητέρων λαμβάνουν περίπου την ίδια τροφή. Τα ζώα θα πρέπει να εντάσσονται στις ομάδες (μαρτύρων και αγωγής) με τυχαιοποιημένη κατανομή βάρους, έτσι ώστε το μέσο σωματικό βάρος να μη διαφέρει στατιστικά μεταξύ των ομάδων. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για την αποφυγή, στο μέτρο του εφικτού, της ένταξης ζώων από την ίδια γέννα στην ίδια ομάδα αγωγής, χωρίς αυτό να συνεπάγεται αύξηση του αριθμού των γεννών που θα χρησιμοποιηθούν για την έρευνα.

Δοσολογία

33. Για να διαπιστωθεί αν η ελεγχόμενη χημική ουσία μπορεί να έχει οιστρογονική δράση in vivo, αρκούν συνήθως δύο ομάδες δόσης και μία ομάδα μαρτύρων. Επομένως, ο συγκεκριμένος σχεδιασμός προτιμάται για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων. Εάν επιδιώκεται η χάραξη καμπύλης δόσης-απόκρισης ή η παρέκταση σε χαμηλότερα επίπεδα δόσης, χρειάζονται τουλάχιστον 3 ομάδες δόσης. Εάν απαιτούνται πληροφορίες πέραν του εντοπισμού οιστρογονικής δράσης (π.χ. εκτίμηση ισχύος), θα πρέπει να εξετάζονται διαφορετικά δοσολογικά σχήματα. Τα ζώα της ομάδας μαρτύρων θα πρέπει να υφίστανται την ίδια ακριβώς μεταχείριση όπως τα υποκείμενα των ομάδων δοκιμής, με εξαίρεση τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Εάν χρησιμοποιείται φορέας για τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, η ομάδα μαρτύρων θα πρέπει να λαμβάνει την ίδια ποσότητα φορέα με αυτή που χρησιμοποιείται στις ομάδες αγωγής (ή τον μέγιστο όγκο που χρησιμοποιείται στις ομάδες αγωγής, εάν αυτός διαφέρει μεταξύ των ομάδων).

34. Στόχος στην περίπτωση του μητροτροφικού βιοπροσδιορισμού είναι η επιλογή δόσεων που εξασφαλίζουν την επιβίωση των ζώων και δεν τους προκαλούν σημαντική τοξικότητα ή αγωνία μετά από τρεις συνεχείς ημέρες χορήγησης της χημικής ουσίας σε μέγιστη δόση 1 000 mg/kg/ημέρα. Όλα τα επίπεδα δόσης θα πρέπει να προτείνονται και να επιλέγονται λαμβανομένων υπόψη των διαθέσιμων δεδομένων για την τοξικότητα και την (τοξικο)κινητική της ελεγχόμενης χημικής ουσίας ή συγγενών υλών. Για το ανώτατο επίπεδο δόσης θα πρέπει να λαμβάνονται πρώτα υπόψη η τιμή LD50 και/ή οι πληροφορίες σχετικά με την οξεία τοξικότητα, ώστε να αποφεύγονται ο θάνατος, η μεγάλη ταλαιπωρία ή η αγωνία των ζώων (24)(25)(26). Η ανώτατη δόση θα πρέπει να αντανακλά τη μέγιστη ανεκτή δόση (ΜΑΔ). Είναι επίσης αποδεκτές οι μελέτες με επίπεδο δόσης που επάγει θετική μητροτροφική αντίδραση. Ως κριτήριο διαλογής είναι γενικά αποδεκτά τα μεγάλα διαστήματα μεταξύ των δόσεων (π.χ. μία ημιλογαριθμική μονάδα — που αντιστοιχεί σε ακολουθία δόσεων με λόγο 3,2 — ή ακόμη και μία λογαριθμική μονάδα). Εάν δεν διατίθενται κατάλληλα δεδομένα, είναι δυνατόν να διεξαχθεί μελέτη καθορισμού εύρους για τη διευκόλυνση του προσδιορισμού των δόσεων που θα χρησιμοποιηθούν.

35. Εναλλακτικά, εάν η οιστρογονική ισχύς ενός αγωνιστή μπορεί να εκτιμηθεί από δεδομένα in vitro (ή in silico), τα δεδομένα αυτά επιτρέπεται να λαμβάνονται υπόψη για την επιλογή των δόσεων. Παραδείγματος χάριν, η ποσότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που θα προκαλούσε μητροτροφικές αντιδράσεις ισοδύναμες του αγωνιστή αναφοράς (αιθινυλοιστραδιόλη) εκτιμάται μέσω της in vitro ισχύος της σε σχέση με την αιθινυλοιστραδιόλη. Η ανώτατη δόση δοκιμής προκύπτει με πολλαπλασιασμό αυτής της ισοδύναμης δόσης επί κατάλληλο συντελεστή, π.χ. 10 ή 100.

▼M5

Ζητήματα σχετικά με τον καθορισμό εύρους

36. Εάν είναι απαραίτητο, μπορεί να διεξαχθεί προκαταρκτική μελέτη καθορισμού εύρους με λίγα ζώα. Για τη μελέτη αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί το καθοδηγητικό έγγραφο αριθ. 19 του ΟΟΣΑ (25) που ορίζει τα κλινικά σημεία τοξικότητας ή αγωνίας στα ζώα. Εάν είναι εφικτό στο πλαίσιο της εν λόγω μελέτης καθορισμού εύρους, μετά από τρεις ημέρες χορήγησης δόσεων η μήτρα εκτέμνεται και ζυγίζεται περίπου 24 ώρες μετά την τελευταία δόση. Τα δεδομένα αυτά μπορούν έπειτα να χρησιμοποιηθούν ως βοήθημα κατά τον σχεδιασμό της κυρίως μελέτης (επιλογή αποδεκτής μέγιστης δόσης και αποδεκτών χαμηλότερων δόσεων, καθώς και του συνιστώμενου αριθμού ομάδων δόσης).

Χορήγηση δόσεων

37. Η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με στομαχικό καθετήρα ή υποδόρια ένεση. Κατά την επιλογή οδού χορήγησης θα πρέπει να συνεκτιμώνται παράμετροι καλής μεταχείρισης των ζώων, καθώς και οι τοξικολογικές πτυχές, όπως η συνάφεια με την οδό έκθεσης του ανθρώπου στη χημική ουσία (π.χ. στομαχικός καθετήρας για έκθεση μέσω κατάποσης, υποδόρια ένεση για έκθεση μέσω της εισπνοής ή της επιδερμίδας), οι φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης ύλης και, ιδίως, τα υφιστάμενα τοξικολογικά στοιχεία και δεδομένα για τον μεταβολισμό και την κινητική (π.χ. ανάγκη αποφυγής του μεταβολισμού πρώτης διόδου, μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα μέσω συγκεκριμένης οδού).

38. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατό, να εξετάζεται πρώτα η χρήση υδατικού διαλύματος/εναιωρήματος. Δεδομένου όμως ότι οι περισσότεροι συνδέτες οιστρογόνων ή οι μεταβολικοί πρόδρομοι αυτών είναι συνήθως υδρόφοβοι, η χρήση διαλύματος/εναιωρήματος σε έλαιο (π.χ. αραβοσιτέλαιο, φιστικέλαιο, σησαμέλαιο ή ελαιόλαδο) αποτελεί τη συνηθέστερη προσέγγιση. Ωστόσο, τα έλαια αυτά έχουν διαφορετική περιεκτικότητα σε θερμίδες και λίπη και, ως εκ τούτου, ο φορέας ενδέχεται να επηρεάζει τη συνολική πρόσληψη μεταβολίσιμης ενέργειας, μεταβάλλοντας με τον τρόπο αυτό τα μετρούμενα τελικά σημεία, όπως το βάρος της μήτρας, ιδίως στη μέθοδο με τα άνηβα ζώα (33). Συνεπώς, πριν από τη μελέτη θα πρέπει να ελέγχεται οποιοσδήποτε φορέας πρόκειται να χρησιμοποιηθεί έναντι μαρτύρων χωρίς φορέα. Οι ελεγχόμενες χημικές ουσίες μπορούν να διαλύονται σε ελάχιστη ποσότητα αιθανόλης 95 % ή άλλου κατάλληλου διαλύτη και τα διαλύματά τους να αραιώνονται στον φορέα της δοκιμής μέχρι τις τελικές συγκεντρώσεις εργασίας. Τα τοξικά χαρακτηριστικά του διαλύτη πρέπει να είναι γνωστά και να ελέγχονται σε χωριστή ομάδα μαρτύρων στην οποία χορηγείται μόνο ο διαλύτης. Εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία θεωρείται σταθερή, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ήπια θέρμανση και έντονη μηχανική δράση για τη διευκόλυνση της διάλυσή της. Θα πρέπει να προσδιορίζεται η σταθερότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στον φορέα. Εάν η ουσία είναι σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης, είναι δυνατόν να παρασκευάζεται ένα αρχικό γνωστό κλάσμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και οι καθοριζόμενες αραιώσεις δοσολογίας να ετοιμάζονται καθημερινά.

39. Οι χρόνοι χορήγησης των δόσεων εξαρτώνται από το χρησιμοποιούμενο μοντέλο (βλ. παράγραφο 29 για το μοντέλο με άνηβα ζώα και παράγραφο 30 για το μοντέλο με ενήλικα ζώα που έχουν υποστεί ωοθηκεκτομή). Στους άνηβους θηλυκούς επίμυες χορηγείται η ελεγχόμενη χημική ουσία καθημερινά για τρεις συνεχόμενες ημέρες. Αγωγή τριών ημερών συνιστάται επίσης για θηλυκούς επίμυες που έχουν υποστεί ωοθηκεκτομή, αλλά είναι αποδεκτές και μεγαλύτερες περίοδοι έκθεσης, οι οποίες ενδέχεται να βελτιώνουν την ανίχνευση ασθενώς δραστικών χημικών ουσιών. Στην περίπτωση των θηλυκών ποντικών που έχουν υποστεί ωοθηκεκτομή, η χορήγηση δόσεων επί 3 ημέρες κανονικά επαρκεί, χωρίς να προκύπτει σημαντικό πλεονέκτημα από την παράταση της αγωγής έως και επτά ημέρες για ισχυρούς αγωνιστές οιστρογόνων. Ωστόσο, επειδή η σχέση αυτή δεν καταδείχθηκε για ασθενή οιστρογόνα στη μελέτη επικύρωσης (16), η χορήγηση δόσεων θα πρέπει να παρατείνεται για έως 7 συνεχείς ημέρες στην περίπτωση των ενήλικων ποντικών που έχουν υποστεί ωοθηκεκτομή. Οι δόσεις θα πρέπει να χορηγούνται την ίδια περίπου ώρα κάθε ημέρα και να ρυθμίζονται όπως είναι απαραίτητο, ώστε να διατηρείται σταθερό επίπεδο δόσης σε σχέση με το σωματικό βάρος του ζώου (π.χ. mg ελεγχόμενης χημικής ουσίας ανά kg σωματικού βάρους ανά ημέρα). Όσον αφορά τον όγκο δοκιμής, η μεταβλητότητά του βάσει του σωματικού βάρους πρέπει να ελαχιστοποιείται με ρύθμιση της συγκέντρωσης του διαλύματος δόσης, ώστε να εξασφαλίζεται σταθερός όγκος σε σχέση με το σωματικό βάρος σε όλα τα επίπεδα δόσης και για κάθε οδό χορήγησης.

▼M5

40. Όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται από το στόμα, θα πρέπει να χορηγείται σε εφάπαξ ημερήσια δόση, με τη βοήθεια στομαχικού καθετήρα ή κατάλληλης διασωλήνωσης. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Θα πρέπει να εφαρμόζονται οι τοπικές κατευθυντήριες γραμμές για τη φροντίδα των ζώων, αλλά ο όγκος να μην υπερβαίνει τα 5 ml/kg σωματικού βάρους, με εξαίρεση τα υδατικά διαλύματα, στην περίπτωση των οποίων μπορούν να χρησιμοποιούνται 10 ml/kg σωματικού βάρους.

41. Όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με υποδόρια ένεση, θα πρέπει να χορηγείται με εφάπαξ ημερήσια δόση. Οι ενέσεις θα πρέπει να πραγματοποιούνται στη ραχιαία περιοχή της ωμοπλάτης ή την οσφυϊκή περιοχή με αποστειρωμένη βελόνα (π.χ. διαμετρήματος 23 ή 25) και σύριγγα φυματίνης. Το ξύρισμα του σημείου της ένεσης είναι προαιρετικό. Θα πρέπει να καταγράφονται τυχόν απώλειες, διαρροή στο σημείο της ένεσης ή ελλιπής χορήγηση της δόσης. Ο συνολικός όγκος ένεσης ανά επίμυ ανά ημέρα δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 5 ml/kg σωματικού βάρους, διαιρούμενος σε 2 σημεία ένεσης, με εξαίρεση τα υδατικά διαλύματα, στην περίπτωση των οποίων μπορούν να χρησιμοποιούνται 10 ml/kg σωματικού βάρους.

Παρατηρήσεις

Γενικές κλινικές παρατηρήσεις

42. Θα πρέπει να διεξάγονται γενικές κλινικές παρατηρήσεις τουλάχιστον μία φορά ημερησίως και συχνότερα όταν εμφανίζονται σημεία τοξικότητας. Οι παρατηρήσεις θα πρέπει να διεξάγονται κατά προτίμηση την(τις) ίδια(-ες) ώρα(-ες) κάθε μέρα και λαμβανομένου υπόψη του χρόνου των αναμενόμενων μέγιστων επιδράσεων μετά τη χορήγηση της δόσης. Πρέπει να παρατηρούνται όλα τα ζώα για θνησιμότητα, νοσηρότητα και γενικά κλινικά σημεία, όπως αλλαγές στη συμπεριφορά, το δέρμα, το τρίχωμα, τους οφθαλμούς και τους βλεννογόνους, εκκρίσεις και απεκκρίσεις, καθώς και δραστηριότητα του αυτόνομου νευρικού συστήματος (π.χ. δακρύρροια, ανόρθωση των τριχών, μεταβολή του μεγέθους της κόρης του οφθαλμού, ασυνήθης ρυθμός αναπνοής).

Σωματικό βάρος και κατανάλωση τροφής

43. Όλα τα ζώα θα πρέπει να ζυγίζονται καθημερινά με ακρίβεια 0,1 g, για πρώτη φορά ακριβώς πριν από την έναρξη της αγωγής, δηλ. όταν κατανέμονται στις ομάδες. Προαιρετικά, μπορεί να μετράται η ποσότητα τροφής που καταναλώνεται κατά την περίοδο αγωγής ανά κλωβό, με ζύγιση των διατάξεων τροφοδοσίας. Τα αποτελέσματα που αφορούν την κατανάλωση τροφής θα πρέπει να εκφράζονται σε γραμμάρια ανά επίμυ ανά ημέρα.

Ανατομή και μέτρηση του βάρους της μήτρας

44. Οι επίμυες θανατώνονται ανώδυνα 24 ώρες μετά την τελευταία αγωγή. Σε ιδανικές συνθήκες, η σειρά νεκροψίας τυχαιοποιείται μεταξύ των ομάδων ώστε να αποφεύγεται η πρόοδος κατά τη σειρά των ομάδων δόσης, ανοδικά ή καθοδικά, που θα μπορούσε να επηρεάσει ελαφρώς τα δεδομένα. Στόχος του βιοπροσδιορισμού είναι η μέτρηση του βάρους της μήτρας σε υγρή και σε στυπωμένη κατάσταση. Το βάρος σε υγρή κατάσταση περιλαμβάνει τη μήτρα και το υγρό του αυλού. Το βάρος σε στυπωμένη κατάσταση μετράται αφού εκφραστεί και αφαιρεθεί το περιεχόμενο του αυλού της μήτρας.

45. Πριν από την ανατομή, εξετάζεται ο κόλπος των άνηβων ζώων για να διαπιστωθεί αν υπάρχει άνοιγμα. Η διαδικασία ανατομής αρχίζει με διάνοιξη του κοιλιακού τοιχώματος με αφετηρία την ηβική σύμφυση. Στη συνέχεια, το κέρας της μήτρας και οι ωοθήκες, εάν υπάρχουν, αποσπώνται από το οπίσθιο κοιλιακό τοίχωμα. Η ουροδόχος κύστη και οι ουρητήρες απομακρύνονται από την πρόσθια και την πλάγια πλευρά της μήτρας και του κόλπου. Αποκολλάται η ινώδης σύμφυση μεταξύ του ορθού και του κόλπου έως ότου να μπορεί να εντοπιστεί η συμβολή στομίου του κόλπου και δέρματος του περινέου. Η μήτρα και ο κόλπος αποσπώνται από το σώμα με τομή στο τοίχωμα του κόλπου ακριβώς πάνω από τη συμβολή με το δέρμα του περινέου, όπως εμφαίνεται στο σχήμα 2. Η μήτρα θα πρέπει να αποσπάται από

▼M5

το τοίχωμα του σώματος με προσεκτική τομή του μεσεντερίου της στο σημείο πρόσφυσής του σε όλο το μήκος της πλαγιοραχιαίας όψης κάθε κέρατος. Μετά την αφαίρεση της μήτρας από το σώμα, απαιτούνται αρκετά ταχείς χειρισμοί για να μην ξηρανθούν οι ιστοί. Η απώλεια βάρους λόγω ξήρανσης αποκτά μεγαλύτερη σημασία στην περίπτωση μικρών ιστών, όπως η μήτρα (23). Εάν υπάρχουν οι ωοθήκες, αφαιρούνται στη σάλπιγγα, με μέριμνα ώστε να μην υπάρξει απώλεια υγρού του αυλού από το κέρας της μήτρας. Εάν το ζώο έχει υποβληθεί σε ωοθηκεκτομή, θα πρέπει να εξετάζονται τα στελέχη για τυχόν παρουσία ωοθηκικού ιστού. Η περίσσεια λίπους και οι συνδετικοί ιστοί θα πρέπει να περικόπτονται. Ο κόλπος αφαιρείται από τη μήτρα ακριβώς κάτω από τον τράχηλο, ώστε αυτός να παραμείνει μαζί με το σώμα της μήτρας, όπως εμφαίνεται στο σχήμα 2.

46. Κάθε μήτρα θα πρέπει να μεταφέρεται σε σκεύος που φέρει αποκλειστική σήμανση και έχει ζυγιστεί (π.χ. τρυβλίο Petri ή πλαστικό σκαφίδιο ζύγισης), με αμείωτη μέριμνα για την αποφυγή της ξήρανσης πριν από τη ζύγιση (π.χ. στο σκεύος μπορεί να τοποθετηθεί διηθητικό χαρτί ελαφρώς εμποτισμένο με φυσιολογικό ορό). Η μήτρα με το υγρό του αυλού ζυγίζεται με ακρίβεια 0,1 mg (βάρος μήτρας σε υγρή κατάσταση).

47. Στη συνέχεια, κάθε μήτρα υποβάλλεται χωριστά σε επεξεργασία για την απομάκρυνση του υγρού του αυλού. Τα δύο κέρατα της μήτρας διατρυπώνται ή τέμνονται κατά μήκος. Η μήτρα τοποθετείται σε ελαφρώς βρεγμένο διηθητικό χαρτί (π.χ. Whatman No. 3) και πιέζεται απαλά με ένα δεύτερο, ελαφρώς βρεγμένο διηθητικό χαρτί ώστε να απομακρυνθεί εντελώς το υγρό του αυλού. Η μήτρα, χωρίς το περιεχόμενο του αυλού, ζυγίζεται με ακρίβεια 0,1 mg (βάρος μήτρας σε στυπωμένη κατάσταση).

48. Το βάρος της μήτρας κατά τη λήξη της μελέτης μπορεί να χρησιμοποιηθεί προκειμένου να εξασφαλιστεί ότι δεν σημειώνεται υπέρβαση της κατάλληλης ηλικίας των άνηβων άθικτων επιμύων. Ωστόσο, καθοριστικής σημασίας είναι εν προκειμένω τα ιστορικά δεδομένα για το στέλεχος επιμύων που χρησιμοποιεί το εργαστήριο (για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων βλ. παράγραφο 56).

Προαιρετικές έρευνες

49. Μετά τη ζύγιση, η μήτρα μπορεί να μονιμοποιηθεί σε ουδέτερη φορμόλη 10 % με ρυθμιστικό διάλυμα, για ιστοπαθολογική εξέταση με χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης. Ο κόλπος μπορεί να εξεταστεί αντιστοίχως (βλ. παράγραφο 9). Επιπλέον, είναι δυνατή η μορφομετρική μέτρηση των επιθηλίων του ενδομητρίου για ποσοτική σύγκριση.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Δεδομένα

50. Τα δεδομένα της μελέτης θα πρέπει να περιλαμβάνουν:

— τον αριθμό των ζώων στην αρχή του προσδιορισμού,

— τον αριθμό και την ταυτότητα των ζώων που βρέθηκαν νεκρά κατά τον προσδιορισμό ή θανατώθηκαν για να μην υποφέρουν και την ημερομηνία και ώρα θανάτου ή θανάτωσης με ανώδυνο τρόπο,

— τον αριθμό και την ταυτότητα των ζώων που εμφάνισαν σημεία τοξικότητας και περιγραφή των παρατηρηθέντων σημείων τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένων του χρόνου εκδήλωσης, της διάρκειας και της σοβαρότητας των τοξικών επιδράσεων, και

— τον αριθμό και την ταυτότητα των ζώων που εμφάνισαν αλλοιώσεις και περιγραφή του είδους των αλλοιώσεων.

▼**M5**

51. Θα πρέπει να καταγράφονται ατομικά δεδομένα για το σωματικό βάρος των ζώων και το βάρος της μήτρας τους σε υγρή και σε στυπωμένη κατάσταση. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μονόπλευρες στατιστικές αναλύσεις για τους αγωνιστές, ώστε να διαπιστώνεται αν η χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας είχε ως αποτέλεσμα στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$) αύξηση του βάρους της μήτρας. Θα πρέπει να διενεργούνται κατάλληλες στατιστικές αναλύσεις για τον έλεγχο των σχετιζόμενων με την αγωγή μεταβολών του βάρους της μήτρας σε υγρή και σε στυπωμένη κατάσταση. Παραδείγματος χάριν, τα δεδομένα μπορούν να αξιολογούνται με προσέγγιση ανάλυσης της συνδιακύμανσης (ANCOVA), κατά την οποία χρησιμοποιείται ως συμμεταβλητή το σωματικό βάρος κατά τη νεκροψία. Τα δεδομένα για τη μήτρα μπορούν να υποβάλλονται σε λογαριθμικό μετασχηματισμό σταθεροποίησης της διασποράς πριν από την ανάλυσή τους. Η δοκιμασία Dunnett και Hsu είναι κατάλληλη για τη σύγκριση κατά ζεύγη των ομάδων δόσης με την ομάδα μαρτύρων με τον φορέα και για τον υπολογισμό των διαστημάτων εμπιστοσύνης. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν τυποποιημένα υπόλοιπα Student (studentized) για τον εντοπισμό ενδεχόμενων ακραίων τιμών και την αξιολόγηση της ομοιογένειας της διασποράς. Οι διαδικασίες αυτές εφαρμόστηκαν στο πρόγραμμα επικύρωσης του ΟΟΣΑ με τη χρήση του PROC GLM στο σύστημα στατιστικής ανάλυσης (SAS Institute, Cary, NC), έκδοση 8 (6)(7).

52. Η τελική έκθεση περιλαμβάνει τα εξής:

Εγκαταστάσεις δοκιμών:

— υπεύθυνο προσωπικό και οι αρμοδιότητές του στη μελέτη·

— δεδομένα από τη βασική δοκιμή θετικών μαρτύρων και περιοδικά δεδομένα θετικών μαρτύρων (βλ. παραγράφους 26 και 27).

Ελεγχόμενη χημική ουσία:

— χαρακτηρισμός των ελεγχόμενων χημικών ουσιών·

— φυσική μορφή και, εφόσον έχουν σημασία, φυσικοχημικές ιδιότητες·

— μέθοδος και συχνότητα αραιώσεων·

— τυχόν δεδομένα που προέκυψαν σχετικά με τη σταθερότητα·

— τυχόν αναλύσεις των διαλυμάτων δόσεων.

Φορέας:

— χαρακτηρισμός του φορέα της δοκιμής (είδος, προμηθευτής και παρτίδα)·

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα (εάν δεν πρόκειται για νερό).

Πειραματόζωα:

— είδος και στέλεχος και αιτιολόγηση της επιλογής τους·

— προμηθευτής και συγκεκριμένες εγκαταστάσεις του προμηθευτή·

— ηλικία κατά την προμήθεια με ημερομηνία γέννησης·

— στην περίπτωση των άνηβων ζώων, το κατά πόσον παραδόθηκαν με τις μητέρες ή με ανάδοχες μητέρες και ημερομηνία απογαλακτισμού·

— λεπτομέρειες σχετικά με τη διαδικασία εγκλιματισμού των ζώων·

— αριθμός ζώων ανά κλωβό·

— λεπτομέρειες και μέθοδος ταυτοποίησης κάθε ζώου και ομάδας.

Συνθήκες προσδιορισμού:

— λεπτομέρειες για τη διαδικασία τυχαιοποίησης (δηλ. χρησιμοποιηθείσα μέθοδος)·

— αιτιολόγηση της επιλογής των δόσεων·

▼M5

— λεπτομέρειες σχετικά με το παρασκεύασμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τις επιτευχθείσες συγκεντρώσεις, τη σταθερότητα και την ομοιογένειά του·

— λεπτομέρειες σχετικά με τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και αιτιολόγηση της επιλογής της οδού έκθεσης·

— τροφή (όνομα, τύπος, προμηθευτής, περιεχόμενο και επίπεδα φυτοοιστρογόνων, εάν είναι γνωστά)·

— πηγή νερού (π.χ. νερό βρύσης ή φιλτραρισμένο) και παροχή (με σωλήνα από μεγάλο δοχείο, σε φιάλες κλπ.)·

— στρωμνή (όνομα, τύπος, προμηθευτής, περιεχόμενο)·

— καταγραφή των συνθηκών στέγασης στους κλωβούς, της φωτοπεριόδου, της θερμοκρασίας και υγρασίας της αίθουσας, του καθαρισμού της αίθουσας·

— λεπτομερής περιγραφή των διαδικασιών νεκροψίας και ζύγισης της μήτρας·

— περιγραφή των στατιστικών διαδικασιών.

Αποτελέσματα

Για κάθε ζώο χωριστά:

— όλες οι ημερήσιες τιμές σωματικού βάρους (από την κατανομή στις ομάδες έως και τη νεκροψία) (με ακρίβεια 0,1 g)·

— ηλικία κάθε ζώου (σε ημέρες, με την ημερομηνία γέννησης θεωρούμενη ως ημέρα 0) κατά την έναρξη της χορήγησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας·

— ημερομηνία και ώρα χορήγησης κάθε δόσης·

— υπολογισθείς όγκος και δοσολογία που χορηγήθηκε και τυχόν παρατηρηθείσες απώλειες δοσολογίας κατά τη χορήγηση ή μετά από αυτή·

— καθημερινή καταγραφή της κατάστασης του ζώου, συμπεριλαμβανομένων των σχετικών συμπτωμάτων και παρατηρήσεων·

— πιθανή αιτία θανάτου (εάν το ζώο βρέθηκε νεκρό ή ετοιμοθάνατο κατά τη διάρκεια της μελέτης)·

— ημερομηνία και ώρα ανώδυνης θανάτωσης και χρονικό διάστημα έως την τελευταία δόση·

— βάρος μήτρας σε υγρή κατάσταση (με ακρίβεια 0,1 mg) και τυχόν παρατηρηθείσες απώλειες υγρού του αυλού κατά την ανατομή και την προετοιμασία για ζύγιση·

— βάρος της μήτρας σε στυπωμένη κατάσταση (με ακρίβεια 0,1 mg).

Για κάθε ομάδα ζώων:

— μέσες ημερήσιες τιμές σωματικού βάρους (με ακρίβεια 0,1 g) και τυπικές αποκλίσεις (από την κατανομή στις ομάδες έως τη νεκροψία)·

— μέσες τιμές βάρους μήτρας σε υγρή κατάσταση και σε στυπωμένη κατάσταση (με ακρίβεια 0,1 mg) και τυπικές αποκλίσεις·

— εάν μετράται, ημερήσια κατανάλωση τροφής (υπολογιζόμενη σε γραμμάρια καταναλωθείσας τροφής ανά ζώο)·

▼M5

— τα αποτελέσματα των στατιστικών αναλύσεων με τις οποίες συγκρίθηκε το βάρος μήτρας, σε υγρή και σε στυπωμένη κατάσταση, στις ομάδες αγωγής με τις αντίστοιχες τιμές στις ομάδες μαρτύρων με τον φορέα.

— τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης με την οποία συγκρίθηκε το συνολικό σωματικό βάρος και η αύξησή του στις ομάδες αγωγής με τις αντίστοιχες τιμές στις ομάδες μαρτύρων με τον φορέα.

53. Σύνοψη των βασικών καθοδηγητικών στοιχείων της μεθόδου δοκιμών

	Επίμυς	**Ποντικός**
Ζώα		
Στέλεχος	Συνήθως χρησιμοποιούμενο στέλεχος εργαστηριακών τρωκτικών	
Αριθμός ζώων	Τουλάχιστον 6 ζώα ανά ομάδα δόσης	
Αριθμός ομάδων	Τουλάχιστον 2 ομάδες δοκιμής (βλ. παράγραφο 33 για οδηγίες) και μια ομάδα αρνητικών μαρτύρων Για οδηγίες σχετικά με τις ομάδες θετικών μαρτύρων, βλ. παραγράφους 26 και 27	
Συνθήκες στέγασης και διατροφής		
Θερμοκρασία στην αίθουσα των ζώων	22 °C ± 3 °C	
Σχετική υγρασία	50-60 % και όχι κάτω του 30 % ή άνω του 70 %	
Φωτοπερίοδος	12 ώρες φωτός, 12 ώρες σκότους	
Τροφή και πόσιμο νερό	Κατά βούληση	
Στέγαση	Ατομική ή σε ομάδες έως τριών ζώων (συνιστάται η στέγαση των άνηβων ζώων σε κοινωνικές ομάδες)	
Τροφή και στρωμνή	Συνιστώνται χαμηλά επίπεδα φυτοοιστρογόνων στην τροφή και τη στρωμνή.	
Πρωτόκολλο		
Μέθοδος	Μέθοδος με άνηβα ζώα που δεν έχουν υποστεί ωοθηκεκτομή (προτιμώμενη μέθοδος) Μέθοδος με ενήλικα θηλυκά ζώα που έχουν υποστεί ωοθηκεκτομή	Μέθοδος με ενήλικα θηλυκά ζώα που έχουν υποστεί ωοθηκεκτομή
Ηλικία χορήγησης δόσεων στα άνηβα ζώα	18η ΜΓΗ ή μεγαλύτερη ηλικία. Η χορήγηση δόσεων θα πρέπει να ολοκληρώνεται πριν από την 25η ΜΓΗ.	Δεν εμπίπτει στο πεδίο εφαρμογής της παρούσας μεθόδου δοκιμών.
Ηλικία ωοθηκεκτομής	Μεταξύ της 6ης και της 8ης εβδομάδας ζωής	
Ηλικία χορήγησης δόσεων σε ζώα που έχουν υποστεί ωοθηκεκτομή	Θα πρέπει να μεσολαβούν τουλάχιστον 14 ημέρες μεταξύ της ωοθηκεκτομής και της 1ης ημέρας χορήγησης των δόσεων.	Θα πρέπει να μεσολαβούν τουλάχιστον 7 ημέρες μεταξύ της ωοθηκεκτομής και της 1ης ημέρας χορήγησης των δόσεων.
Σωματικό βάρος	Η μεταβολή του σωματικού βάρους θα πρέπει να είναι ελάχιστη και να μην υπερβαίνει το ± 20 % του μέσου βάρους.	

▼M5

	Επίμυς	Ποντικός
Χορήγηση δόσεων		
Οδός χορήγησης	Στομαχικός καθετήρας ή υποδόρια ένεση	
Συχνότητα χορήγησης	Εφάπαξ ημερήσια δόση	
Όγκος για τον στομαχικό καθετήρα και την ένεση	≤ 5ml/kg σωματικού βάρους (ή έως 10 ml/kg σωματικού βάρους στην περίπτωση των υδατικών διαλυμάτων) (σε 2 σημεία ένεσης στην περίπτωση της υποδόριας ένεσης)	
Διάρκεια χορήγησης	3 συνεχείς ημέρες στο μοντέλο με τα άνηβα ζώα Τουλάχιστον 3 συνεχείς ημέρες στο μοντέλο με τα ζώα που έχουν υποστεί ωοθηκεκτομή	7 συνεχείς ημέρες στο μοντέλο με τα ζώα που έχουν υποστεί ωοθηκεκτομή
Χρόνος νεκροψίας	Περίπου 24 ώρες μετά την τελευταία δόση	
Αποτελέσματα		
Θετική αντίδραση	Στατιστικά σημαντική αύξηση του μέσου βάρους της μήτρας (σε υγρή και/ή στυπωμένη κατάσταση)	
Οιστρογόνο αναφοράς	17α-αιθινυλοιστραδιόλη	

ΟΔΗΓΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΟΔΟΧΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

54. Γενικά, μια δοκιμή οιστρογονικότητας θα πρέπει να θεωρείται θετική εάν προκύπτει στατιστικά σημαντική αύξηση του βάρους της μήτρας ($p < 0,05$) τουλάχιστον στο υψηλό επίπεδο δόσης σε σύγκριση με την ομάδα μαρτύρων με τον διαλύτη. Το θετικό αποτέλεσμα ενισχύεται περαιτέρω από την απόδειξη βιολογικά ευλογοφανούς σχέσης μεταξύ της δόσης και του μεγέθους της απόκρισης, χωρίς ωστόσο να παραβλέπεται ότι οι αλληλεπικαλυπτόμενες οιστρογονικές και αντιοιστρογονικές δράσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας ενδέχεται να επηρεάσουν το σχήμα της καμπύλης δόσης-απόκρισης.

55. Για να είναι δυνατή η ουσιαστική ερμηνεία των δεδομένων, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μη γίνεται υπέρβαση της μέγιστης ανεκτής δόσης. Εν προκειμένω, θα πρέπει να αξιολογούνται ενδελεχώς η μείωση του σωματικού βάρους, τα κλινικά σημεία και τα λοιπά ευρήματα.

56. Σημαντική παράμετρος για την αποδοχή των δεδομένων του μητροτροφικού βιοπροσδιορισμού είναι το βάρος της μήτρας στην ομάδα των μαρτύρων με τον ο φορέας. Οι υψηλές τιμές στους μάρτυρες είναι δυνατόν να εκθέσουν σε κίνδυνο την ανταπόκριση του βιοπροσδιορισμού και την ικανότητα ανίχνευσης πολύ ασθενών αγωνιστών των οιστρογόνων. Η ανασκόπηση της βιβλιογραφίας και τα δεδομένα που συγκεντρώθηκαν κατά την επικύρωση του μητροτροφικού βιοπροσδιορισμού δείχνουν ότι, πράγματι, εμφανίζονται φυσικές υψηλές μέσες τιμές στους μάρτυρες, ιδίως στην περίπτωση των άνηβων ζώων (2)(3)(6)(9). Δεδομένου ότι το βάρος της μήτρας των άνηβων επιμύων εξαρτάται από πολλές μεταβλητές, όπως το στέλεχος ή το σωματικό βάρος, δεν μπορεί να καθοριστεί οριστικό ανώτατο όριο βάρους της μήτρας. Γενικά, εάν το βάρος μήτρας των άνηβων επιμύων, σε στυπωμένη κατάσταση, στην ομάδα των μαρτύρων κυμαίνεται από 40 έως 45 mg, τα αποτελέσματα θα πρέπει να θεωρούνται ύποπτα, ενώ με τιμές βάρους μήτρας άνω των 45 mg ενδέχεται να πρέπει να επαναληφθεί η δοκιμή. Ωστόσο, το ενδεχόμενο αυτό θα πρέπει να εξετάζεται κατά περίπτωση (3)(6)(8). Κατά την υποβολή ενήλικων επιμύων σε δοκιμή, εάν η ωοθηκεκτομή είναι ατελής, παραμένει ωοθηκικός ιστός που μπορεί να παράγει ενδογενή οιστρογόνα και να καθυστερήσει την υποχώρηση του βάρους της μήτρας.

▼**M5**

57. Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται όταν το βάρος μήτρας στην ομάδα μαρτύρων με τον φορέα είναι, σε στυπωμένη κατάσταση, μικρότερο από 0,09 % του σωματικού βάρους, στην περίπτωση των άνηβων θηλυκών επιμύων, και μικρότερο από 0,04 % του σωματικού βάρους, στην περίπτωση των νεαρών ενήλικων θηλυκών ζώων που έχουν υποστεί ωοθηκεκτομή, φαίνεται ότι είναι αποδεκτά [βλ. πίνακα 31 (2)]. Εάν το βάρος της μήτρας των μαρτύρων υπερβαίνει τα ποσοστά αυτά, θα πρέπει να ελέγχονται σχολαστικά διάφοροι παράγοντες, μεταξύ των οποίων η ηλικία των ζώων, η άρτια ωοθηκεκτομή, τα επίπεδα φυτοοιστρογόνων στην τροφή και ούτω καθεξής, και τυχόν αρνητικό αποτέλεσμα του προσδιορισμού (καμία ένδειξη οιστρογονικής δράσης) θα πρέπει να χρησιμοποιείται με προσοχή.

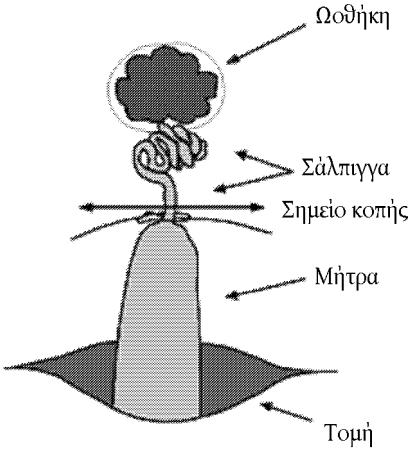
58. Το εργαστήριο θα πρέπει να διατηρεί ιστορικά δεδομένα, αφενός για τις ομάδες μαρτύρων με τον φορέα και, αφετέρου, για τις αντιδράσεις σε θετικά οιστρογόνα αναφοράς, όπως η 17α-αιθινυλοιστραδιόλη. Τα εργαστήρια μπορούν επίσης να ελέγχουν την αντίδραση σε γνωστούς ασθενείς αγωνιστές οιστρογόνων. Όλα αυτά τα δεδομένα μπορούν να συγκρίνονται με τα διαθέσιμα δεδομένα (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8) ώστε να διασφαλίζεται ότι οι μέθοδοι του εργαστηρίου παρέχουν επαρκή ευαισθησία.

59. Οι τιμές βάρους μήτρας σε στυπωμένη κατάσταση παρουσίασαν μικρότερη μεταβλητότητα κατά τη διάρκεια της μελέτης επικύρωσης του ΟΟΣΑ σε σύγκριση με τις τιμές βάρους μήτρας σε υγρή κατάσταση (6)(7). Ωστόσο, μια σημαντική αντίδραση που διαπιστώνεται με οποιαδήποτε από τις δύο μετρήσεις υποδηλώνει ότι η ελεγχόμενη χημική ουσία είναι θετική όσον αφορά την οιστρογονική δράση.

60. Η μητροτροφική αντίδραση δεν οφείλεται αποκλειστικά στα οιστρογόνα. Ωστόσο, το θετικό αποτέλεσμα του μητροτροφικού βιοπροσδιορισμού θα πρέπει να ερμηνεύεται γενικά ως απόδειξη οιστρογονικού δυναμικού in vivo και, κατά κανόνα, να αποτελεί το έναυσμα για ενέργειες με σκοπό την περαιτέρω διασαφήνιση (βλ. παράγραφο 9 και «Εννοιολογικό πλαίσιο του ΟΟΣΑ για τις δοκιμές και την αξιολόγηση χημικών ενδοκρινικών διαταρακτών», παράρτημα 2).

Σχήμα 1

Διάγραμμα που απεικονίζει τη χειρουργική αφαίρεση των ωοθηκών



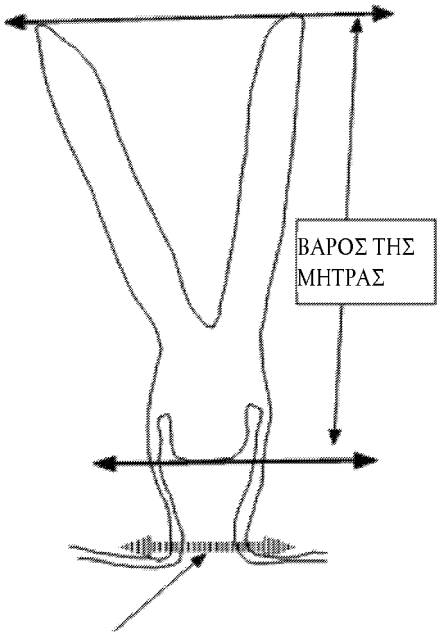
Το μεσομήτριο, το αγγειακό σύστημα και το λιπώδες στρώμα δεν απεικονίζονται.

Η διαδικασία αρχίζει με διάνοιξη του πλαγιοραχιαίου κοιλιακού τοιχώματος στο μέσο της απόστασης μεταξύ του κατώτερου ορίου των πλευρών και της λαγονίου ακρολοφίας και λίγα χιλιοστά πλαγίως του πλευρικού περιθωρίου του οσφυϊκού μυός. Εντοπίζονται οι ωοθήκες στην κοιλιακή κοιλότητα. Στη συνέχεια, οι ωοθήκες αφαιρούνται με φυσικό τρόπο από την κοιλιακή κοιλότητα πάνω σε αποστειρωμένη επιφάνεια: γίνεται απολίνωση μεταξύ της ωοθήκης και της μήτρας για τον έλεγχο της αιμορραγίας και οι ωοθήκες αποσπώνται με τομή πάνω από την απολίνωση, στη συμβολή σάλπιγγας και κέρατος της μήτρας. Αφού επιβεβαιωθεί η απουσία σημαντικής αιμορραγίας, κλείνεται το κοιλιακό τοίχωμα με ράμμα και το δέρμα με συνδετήρες ή ράμμα. Πριν χρησιμοποιηθούν τα ζώα, θα πρέπει να παρέχεται ελάχιστος χρόνος 14 ημερών για να αναρρώσουν και να υποχωρήσει το βάρος της μήτρας.

▼**M5**

Σχήμα 2

Αφαίρεση και προετοιμασία των ιστών της μήτρας για μέτρηση του βάρους



Η διαδικασία αρχίζει με διάνοιξη του κοιλιακού τοιχώματος στην ηβική σύμφυση. Στη συνέχεια, κάθε ωοθήκη, εάν υπάρχει, και κέρας της μήτρας αποσπώνται από το οπίσθιο κοιλιακό τοίχωμα. Η ουροδόχος κύστη και οι ουρητήρες απομακρύνονται από την πρόσθια και την πλάγια πλευρά της μήτρας και του κόλπου. Αποκολλάται η ινώδης σύμφυση μεταξύ του ορθού και του κόλπου έως ότου να μπορεί να εντοπιστεί η συμβολή στομίου του κόλπου και δέρματος του περινέου. Η μήτρα και ο κόλπος αποσπώνται από το σώμα με τομή στο τοίχωμα του κόλπου ακριβώς πάνω από τη συμβολή με το δέρμα του περινέου, όπως εμφαίνεται στο σχήμα. Η μήτρα θα πρέπει να αποσπάται από το τοίχωμα του σώματος με προσεκτική τομή του μεσεντερίου της στο σημείο πρόσφυσής του σε όλο το μήκος της πλαγιοραχιαίας όψης κάθε κέρατος. Μετά την απομάκρυνση από το σώμα, περικόπτονται η περίσσεια λίπους και ο συνδετικός ιστός. Εάν υπάρχουν οι ωοθήκες, αφαιρούνται στη σάλπιγγα, με μέριμνα ώστε να μην υπάρξει απώλεια υγρού του αυλού από το κέρας της μήτρας. Εάν το ζώο έχει υποβληθεί σε ωοθηκεκτομή, θα πρέπει να εξετάζονται τα στελέχη για τυχόν παρουσία ωοθηκικού ιστού. Ο κόλπος αφαιρείται από τη μήτρα ακριβώς κάτω από τον τράχηλο, ώστε αυτός να παραμείνει μαζί με το σώμα της, όπως εμφαίνεται στο σχήμα. Η μήτρα είναι τότε έτοιμη για ζύγιση.

▼**M5**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ:

Αντιοιστρογονικότητα: η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να καταστέλλει τη δράση της 17β-οιστραδιόλης στον οργανισμό θηλαστικού.

Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Ημερομηνία γέννησης: η μεταγεννητική ημέρα 0.

Δοσολογία: γενικός όρος που περικλείει τη δόση, καθώς και τη συχνότητα και τη διάρκεια χορήγησής της.

Δόση: η χορηγούμενη ποσότητα ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Στον μητροτροφικό βιοπροσδιορισμό, η δόση εκφράζεται ως βάρος της ελεγχόμενης χημικής ουσίας ανά μονάδα σωματικού βάρους του ζώου που υποβάλλεται στη δοκιμή ανά ημέρα (π.χ. mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα).

Μέγιστη ανεκτή δόση (ΜΑΔ): η μέγιστη ποσότητα μιας χημικής ουσίας που, όταν εισαχθεί στο σώμα, δεν προκαλεί τον θάνατο των ζώων της δοκιμής (συμβολίζεται με LD_0) (IUPAC, 1993).

Οιστρογονικότητα: η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να δρα όπως η 17β-οιστραδιόλη στον οργανισμό θηλαστικού.

Μεταγεννητική ημέρα X: η Χη ημέρα ζωής από την ημερομηνία γέννησης.

Ευαισθησία: το ποσοστό του συνόλου των θετικών/δραστικών χημικών ουσιών που ταξινομούνται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο της ορθότητας μιας μεθόδου δοκιμών με την οποία λαμβάνονται κατηγορικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας μιας μεθόδου δοκιμών.

Ειδικότητα: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών/αδρανών χημικών ουσιών που ταξινομούνται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο της ορθότητας μιας μεθόδου δοκιμών με την οποία λαμβάνονται κατηγορικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας μιας μεθόδου δοκιμών.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Μητροτροφική: όρος που χρησιμοποιείται για την περιγραφή θετικών επιδράσεων στην ανάπτυξη των ιστών της μήτρας

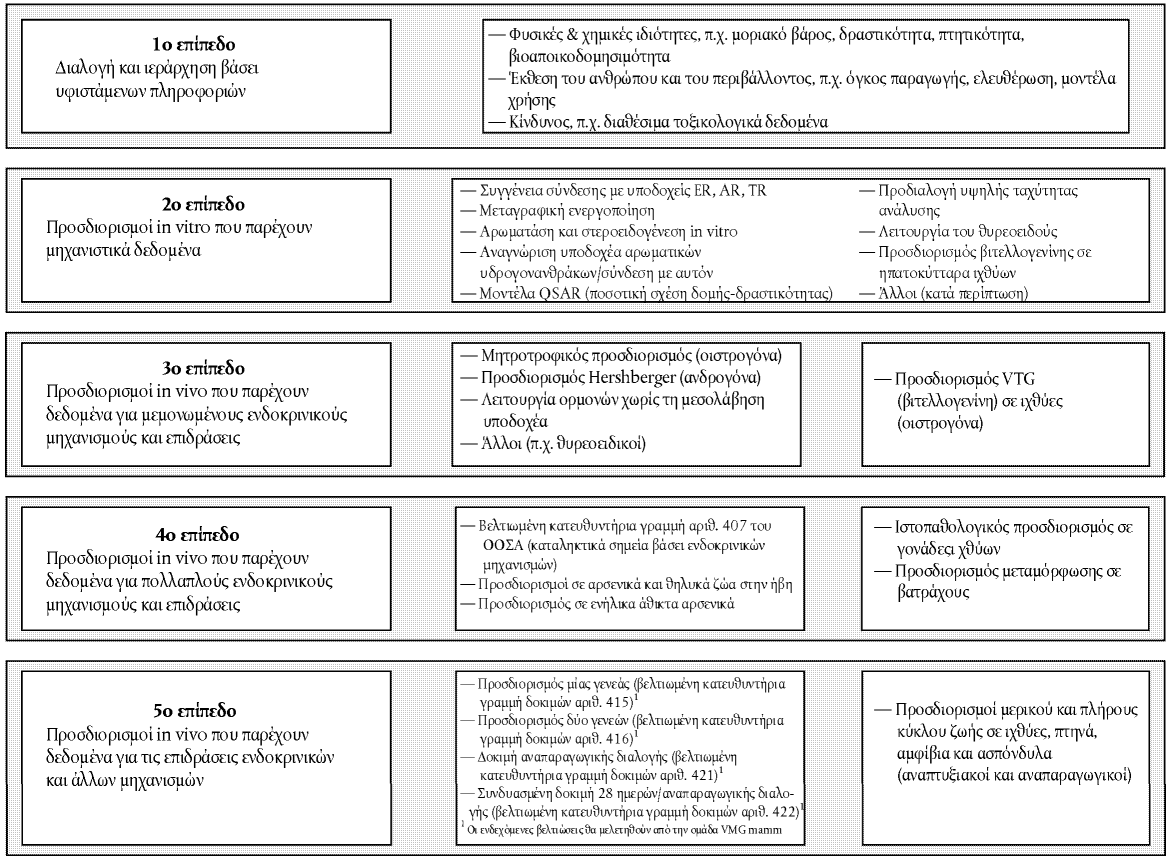
Επικύρωση: επιστημονική διαδικασία που έχει σχεδιαστεί για τον χαρακτηρισμό των λειτουργικών απαιτήσεων και περιορισμών μιας μεθόδου δοκιμών και για την απόδειξη της αξιοπιστίας της και της καταλληλότητάς της για συγκεκριμένο σκοπό.

▼M5

Προσάρτημα 2

Σημείωση: Έγγραφο που έχει καταρτιστεί από τη Γραμματεία του Προγράμματος Κατευθυντήριων Γραμμών Δοκιμών βάσει της συμφωνίας που επιτεύχθηκε κατά την 6η συνεδρίαση της ειδικής ομάδας για τις δοκιμές και την αξιολόγηση ενδοκρινικών διαταρακτών (EDTA)

Εννοιολογικό πλαίσιο του ΟΟΣΑ για τις δοκιμές και την αξιολόγηση χημικών ενδοκρινικών διαταρακτών



VMG mamm: ομάδα διαχείρισης της επικύρωσης για τις δοκιμές και την αξιολόγηση σε θηλαστικά

▼**M5**

ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ΤΟΥ ΕΝΝΟΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΠΛΑΙΣΙΟΥ:

Σημείωση 1: Η είσοδος και η έξοδος είναι δυνατή σε όλα τα επίπεδα και εξαρτάται από το είδος των υφιστάμενων αναγκών σε πληροφορίες για την εκτίμηση επικινδυνότητας και κινδύνων.

Σημείωση 2: Στο 5ο επίπεδο, η οικοτοξικολογία θα πρέπει να περιλαμβάνει τελικά σημεία που υποδηλώνουν μηχανισμούς δυσμενών επιδράσεων και ενδεχόμενες βλάβες στον πληθυσμό.

Σημείωση 3: Όταν ένα πολυτροπικό μοντέλο καλύπτει περισσότερους από έναν προσδιορισμούς με ένα τελικό σημείο, το μοντέλο αυτό θα πρέπει να αντικαθιστά τη χρήση των εν λόγω προσδιορισμών ενός τελικού σημείου.

Σημείωση 4: Κάθε χημική ουσία θα πρέπει να αξιολογείται κατά περίπτωση, λαμβανομένων υπόψη όλων των διαθέσιμων πληροφοριών και με γνώμονα τη λειτουργία των επιπέδων του πλαισίου.

Σημείωση 5: Το πλαίσιο δεν θα πρέπει επί του παρόντος να θεωρείται ότι περιλαμβάνει τα πάντα. Στο 3ο, το 4ο και το 5ο επίπεδο, περιλαμβάνει προσδιορισμούς που είτε είναι διαθέσιμοι είτε βρίσκονται στο στάδιο της επικύρωσης. Στη δεύτερη περίπτωση, οι προσδιορισμοί έχουν συμπεριληφθεί προσωρινά. Όταν αναπτυχθούν και επικυρωθούν, θα προστεθούν επισήμως στο πλαίσιο.

Σημείωση 6: Το 5ο επίπεδο δεν πρέπει να θεωρείται ότι περιλαμβάνει μόνο οριστικές δοκιμές. Οι δοκιμές αυτού του επιπέδου θεωρείται ότι συμβάλλουν στη γενική εκτίμηση επικινδυνότητας και κινδύνων.

▼M5

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10^{th}-11^{th} March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(2) OECD (2003). Detailed Background Review of the Uterotrophic Bioassay: Summary of the Available Literature in Support of the Project of the OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) to Standardise and Validate the Uterotrophic Bioassay. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 38. ENV/JM/MONO(2003)1.

(3) Owens JW, Ashby J. (2002). Critical Review and Evaluation of the Uterotrophic Bioassay for the Identification of Possible Estrogen Agonists and Antagonists: In Support of the Validation of the OECD Uterotrophic Protocols for the Laboratory Rodent. Crit. Rev. Toxicol. 32:445-520.

(4) OECD (2006). OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay — Phase 1. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 65. ENV/JM/MONO(2006)33.

(5) Kanno, J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. (2001). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: Phase 1. Environ Health Perspect. 109:785-94.

(6) OECD (2006). OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay: Phase 2 — Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 66. ENV/JM/MONO(2006)34.

(7) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dose Response Studies. Environ. Health Persp. 111:1530-1549

(8) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Coded Single Dose Studies. Environ. Health Persp. 111:1550-1558.

(9) Owens W, Ashby J, Odum J, Onyon L. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dietary phytoestrogen analyses. Environ. Health Persp. 111:1559-1567.

(10) Ogasawara Y, Okamoto S, Kitamura Y, Matsumoto K. (1983). Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized mice assayed by incorporation of [I^{25}]iododeoxyuridine. Endocrinology 113:582-587.

(11) Branham WS, Sheehan DM, Zehr DR, Ridlon E, Nelson CJ. (1985). The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17β-estradiol. Endocrinology 117:2229-2237.

(12) Schlumpf M, Berger L, Cotton B, Conscience-Egli M, Durrer S, Fleischmann I, Haller V, Maerkel K, Lichtensteiger W. (2001). Estrogen active UV screens. SÖFW-J. 127:10-15.

(13) Zarrow MX, Lazo-Wasem EA, Shoger RL. (1953). Estrogenic activity in a commercial animal ration. Science 118:650-651.

(14) Drane HM, Patterson DSP, Roberts BA, Saba N. (1975). The chance discovery of oestrogenic activity in laboratory rat cake. Fd. Cosmet. Toxicol. 13:425-427.

(15) Boettger-Tong H, Murphy L, Chiappetta C, Kirkland JL, Goodwin B, Adlercreutz H, Stancel GM, Makela S. (1998). A case of a laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on *in vivo* responses to exogenously administered estrogens. Environ. Health Perspec. 106:369-373.

▼M5

(16) OECD (2007). Additional data supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in rodents. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 67.

(17) Degen GH, Janning P, Diel P, Bolt HM. (2002). Estrogenic isoflavones in rodent diets. Toxicol. Lett. 128:145-157.

(18) Wade MG, Lee A, McMahon A, Cooke G, Curran I. (2003). The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats. Food Chem. Toxicol. 41:1517-1525.

(19) Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Wada T, Hara T, Takatsuki M. (2002). Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given different phytoestrogen content diets and the ovarian changes in the immature rat uterotrophic of estrogenic compounds with ICI 182,780 or antide. Arch. Toxicol. 76:613-620.

(20) Thigpen JE, Haseman JK, Saunders HE, Setchell KDR, Grant MF, Forsythe D. (2003). Dietary phytoestrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice. Comp. Med. 53:477-485.

(21) Ashby J, Tinwell H, Odum J, Kimber I, Brooks AN, Pate I, Boyle CC. (2000). Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development. J. Appl. Toxicol. 20:343-347.

(22) Thigpen JE, Lockear J, Haseman J, Saunders HE, Caviness G, Grant MF, Forsythe DB. (2002). Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays. Cancer Detect. Prev. 26:381-393.

(23) Thigpen JE, Li L-A, Richter CB, Lebetkin EH, Jameson CW. (1987). The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: I. A standardized method for conducting the mouse bioassay. Lab. Anim. Sci. 37:596-601.

(24) OECD (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.

(25) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(26) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

(27) Bulbring, E., and Burn, J.H. (1935). The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution. J. Physiol. 85: 320 — 333.

(28) Dorfman, R.I., Gallagher, T.F. and Koch, F.C (1936). The nature of the estrogenic substance in human male urine and bull testis. Endocrinology 19: 33 — 41.

(29) Reel, J.R., Lamb IV, J.C. and Neal, B.H. (1996). Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. Fundam. Appl. Toxicol. 34: 288 — 305.

(30) Jones, R.C. and Edgren, R.A. (1973). The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat. Fertil. Steril. 24: 284 — 291.

(31) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.

(32) Dorfman R.I. (1962). Methods in Hormone Research, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization. New York, Academic Press.

(33) Thigpen J. E. et al. (2004). Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. ILAR J 45(4): 401-416.

▼**M5**

(34) Gray L.E. and Ostby J. (1998). Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanism. Toxicol Ind Health. 14 (1-2): 159-184.

(35) Booth AN, Bickoff EM and Kohler GO. (1960). Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products. Science 131:1807-1808.

(36) Kato H, Iwata T, Katsu Y, Watanabe H, Ohta Y, Iguchi T (2004). Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using in vitro assay. J. Agric Food Chem. 52, 1410-1414.

(37) OECD (2007). Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay Procedure to Test for Antioestrogenicity. Series on Testing and Assessment. No. 71.

(38) Οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 22ας Σεπτεμβρίου 2010, περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς, ΕΕ L 276 της 20.10.2010, σ. 33.

▼M5

Β.55. ΒΙΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ HERSHBERGER ΣΕ ΕΠΙΜΥΕΣ: ΒΡΑΧΥΠΡΟΘΕΣΜΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ ΓΙΑ (ΑΝΤΙ)ΑΝΔΡΟΓΟΝΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή δοκιμών (TG) 441 (2009). Το 1998 ο ΟΟΣΑ ανέλαβε μια δραστηριότητα πρώτης προτεραιότητας για την αναθεώρηση των υφιστάμενων κατευθυντήριων γραμμών, και την εκπόνηση νέων, σχετικά με τη διαλογή και τις δοκιμές δυνητικών ενδοκρινικών διαταρακτών (1). Ένα στοιχείο της δραστηριότητας ήταν η εκπόνηση κατευθυντήριας γραμμής δοκιμών για τον βιοπροσδιορισμό Hershberger σε επίμυες. Μετά από αρκετές δεκαετίες χρήσης του από τον φαρμακευτικό κλάδο, ο παρών προσδιορισμός τυποποιήθηκε για πρώτη φορά από επίσημη επιτροπή εμπειρογνωμόνων, το 1962, ως εργαλείο διαλογής ανδρογόνων χημικών ουσιών (2). Την περίοδο 2001-2007, ο βιοπροσδιορισμός Hershberger σε επίμυες υποβλήθηκε σε εκτενές πρόγραμμα επικύρωσης, το οποίο περιλάμβανε τη σύνταξη ενός εγγράφου τεκμηρίωσης με επισκόπηση (23), ενός αναλυτικού εγγράφου μεθόδων (3) και ενός οδηγού ανατομής (21), καθώς και τη διεξαγωγή εκτενών ενδοεργαστηριακών και διεργαστηριακών μελετών για να καταδειχθούν η αξιοπιστία και η αναπαραγωγιμότητα του βιοπροσδιορισμού. Οι εν λόγω μελέτες επικύρωσης διεξήχθησαν με ένα ισχυρό ανδρογόνο αναφοράς (προπιονική τεστοστερόνη), δύο ισχυρά συνθετικά ανδρογόνα (οξική τρενβολόνη και μεθυλοτεστοστερόνη), μια ισχυρή αντιανδρογόνο φαρμακευτική ουσία (φλουταμίδη), έναν ισχυρό αναστολέα της σύνθεσης (φιναστερίδη) του φυσικού ανδρογόνου διυδροτεστοστερόνη (DHT), διάφορα ασθενή αντιανδρογόνα φυτοφάρμακα (λινουρόν, βινκλοζολίνη, προκυμιδόνη, p,p'-DDE), έναν ισχυρό αναστολέα της 5α-ρεδουκτάσης (φιναστερίδη) και δύο γνωστές αρνητικές χημικές ουσίες (δινιτροφαινόλη και εννεϋλοφαινόλη) (4) (5) (6) (7) (8). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι προϊόν της μακράς πείρας του παρελθόντος στον βιοπροσδιορισμό, καθώς και της πείρας που αποκομίστηκε κατά τη διάρκεια του προγράμματος δοκιμών επικύρωσης και των αποτελεσμάτων του.

2. Ο βιοπροσδιορισμός Hershberger είναι βραχυπρόθεσμη δοκιμή διαλογής in vivo με τη χρήση επικουρικών ιστών του αρσενικού αναπαραγωγικού συστήματος. Ο προσδιορισμός αναπτύχθηκε τη δεκαετία του '30 και τροποποιήθηκε τη δεκαετία του '40 για να συμπεριληφθούν μύες του αρσενικού αναπαραγωγικού συστήματος που ανταποκρίνονται στα ανδρογόνα (2) (9-15). Τη δεκαετία του '60 αξιολογήθηκαν περισσότερα από 700 πιθανά ανδρογόνα με τη χρήση τυποποιημένης έκδοσης του πρωτοκόλλου (2) (14), ενώ η χρήση του προσδιορισμού, τόσο για τα ανδρογόνα όσο και για τα αντιανδρογόνα, θεωρούνταν πρότυπη μέθοδος τη συγκεκριμένη δεκαετία (2) (15). Ο ισχύων βιοπροσδιορισμός βασίζεται στις μεταβολές του βάρους πέντε ανδρογονοεξαρτώμενων ιστών ευνουχισμένων αρσενικών επιμύων περιηβικής ηλικίας. Με αυτόν αξιολογείται η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να προκαλεί βιολογικές δραστηριότητες που αντιστοιχούν σε αγωνιστές ανδρογόνων, ανταγωνιστές ανδρογόνων ή αναστολείς της 5α-ρεδουκτάσης. Οι πέντε ανδρογονοεξαρτώμενοι ιστοί-στόχοι που περιλαμβάνονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών είναι ο κοιλιακός λοβός του προστάτη, οι σπερματοδόχοι κύστεις (μαζί με τα υγρά και τους πηκτοειδείς αδένες), οι ανελκτήρες του πρωκτού και οι βολβοσηραγγώδεις μύες, το ζεύγος των βολβοουρηθραίων αδένων (αδένες του Cowper) και η βάλανος του πέους. Στους ευνουχισμένους αρσενικούς επίμυες περιηβικής ηλικίας και οι πέντε αυτοί ιστοί αντιδρούν στα ανδρογόνα με αύξηση του απόλυτου βάρους τους. Όταν οι ίδιοι ιστοί διεγείρονται με τη χορήγηση ενός ισχυρού ανδρογόνου αναφοράς για να αυξηθεί το βάρος τους, ανταποκρίνονται και οι πέντε στα αντιανδρογόνα με μείωση του απόλυτου βάρους τους. Το βασικό μοντέλο για τον βιοπροσδιορισμό Hershberger ήταν τα χειρουργικώς ευνουχισμένα αρσενικά ζώα περιηβικής ηλικίας και επικυρώθηκε κατά την 1η, τη 2η και την 3η φάση του προγράμματος επικύρωσης του Hershberger.

3. Ο βιοπροσδιορισμός Hershberger λειτουργεί ως μηχανιστικός προσδιορισμός διαλογήςin vivo για αγωνιστές ανδρογόνων, ανταγωνιστές ανδρογόνων και αναστολείς της 5α-ρεδουκτάσης και η εφαρμογή του θα πρέπει να εντάσσεται στο «Εννοιολογικό πλαίσιο του ΟΟΣΑ για τις δοκιμές και την αξιολόγηση χημικών ενδοκρινικών διαταρακτών» (προσάρτημα 2). Στο εν λόγω εννοιολογικό πλαίσιο, ο βιοπροσδιορισμός Hershberger περιλαμβάνεται στο 3ο επίπεδο ως προσδιορισμόςin vivo που παρέχει δεδομένα σχετικά

▼M5

με έναν και μόνο ενδοκρινικό μηχανισμό, την (αντι)ανδρογονικότητα. Προορισμός του είναι να συμπεριλαμβάνεται σε μια δέσμη δοκιμών in vitro καιin vivo για τον εντοπισμό χημικών ουσιών που μπορούν να αλληλεπιδρούν με το ενδοκρινικό σύστημα, με τελικό αποτέλεσμα εκτιμήσεις επικινδυνότητας και κινδύνων για την ανθρώπινη υγεία ή το περιβάλλον.

4. Λόγω του ότι η διαδικασία ευνουχισμού εγείρει ζητήματα καλής μεταχείρισης των ζώων, επιδιώχθηκε η χρήση άθικτων (μη ευνουχισμένων) διεγερμένων απογαλακτισμένων αρσενικών ζώων ως εναλλακτικού μοντέλου αντί του βιοπροσδιορισμού Hershberger, ώστε να αποφευχθεί το στάδιο του ευνουχισμού. Η μέθοδος δοκιμών σε διεγερμένα απογαλακτισμένα ζώα επικυρώθηκε (24). Ωστόσο, στις μελέτες επικύρωσης, η έκδοση του βιοπροσδιορισμού Hershberger με απογαλακτισμένα ζώα δεν αποδείχθηκε ικανή να ανιχνεύει με συνέπεια επιδράσεις στο βάρος των ανδρογονοεξαρτώμενων οργάνων από ασθενή αντιανδρογόνα στις ελεγχθείσες δόσεις. Για τον λόγο αυτό, δεν συμπεριελήφθη στην παρούσα μέθοδο δοκιμών. Η εν λόγω έκδοση είναι εν τούτοις διαθέσιμη στο καθοδηγητικό έγγραφο αριθ. 115 του ΟΟΣΑ (25), επειδή αναγνωρίζεται ότι η χρήση της μπορεί να προσφέρει όχι μόνο οφέλη από πλευράς καλής μεταχείρισης των ζώων, αλλά και πληροφορίες σχετικά με άλλους τρόπους δράσης.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

5. Οι αγωνιστές και οι ανταγωνιστές ανδρογόνων δρουν ως συνδέτες των υποδοχέων ανδρογόνων και μπορούν να ενεργοποιούν ή να αναστέλλουν, αντιστοίχως, τη μεταγραφή γονιδίων που ελέγχεται από τους υποδοχείς. Επιπλέον, ορισμένες χημικές ουσίες αναστέλλουν τη μετατροπή της τεστοστερόνης σε ένα ισχυρότερο φυσικό ανδρογόνο, τη διυδροτεστοστερόνη, σε ορισμένους ιστούς-στόχους των ανδρογόνων (αναστολείς της 5α-ρεδουκτάσης). Αυτές οι χημικές ουσίες ενδεχομένως εγκυμονούν κινδύνους δυσμενών επιδράσεων στην υγεία, συμπεριλαμβανομένων επιδράσεων στην αναπαραγωγή και την ανάπτυξη. Είναι επομένως αναγκαία, για ρυθμιστικούς λόγους, η ταχεία εξέταση και αξιολόγηση χημικών ουσιών ως πιθανών αγωνιστών ή ανταγωνιστών των ανδρογόνων ή αναστολέων της 5α-ρεδουκτάσης. Η συγγένεια ενός συνδέτη με υποδοχέα ανδρογόνων, όπως μετράται από τη σύνδεση με τον υποδοχέα ή τη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων αναφοράς in vitro, παρόλο που παρέχει πληροφορίες, δεν είναι ο μοναδικός παράγοντας που καθορίζει τον ενδεχόμενο κίνδυνο. Άλλοι καθοριστικοί παράγοντες είναι η μεταβολική ενεργοποίηση και αδρανοποίηση μετά την είσοδο στο σώμα, η χημική κατανομή στους ιστούς-στόχους και η απέκκριση από το σώμα. Ανακύπτει επομένως η ανάγκη ελέγχου της πιθανής δράσης μιας χημικής ουσίας in vivo υπό τις σχετικές συνθήκες και έκθεση. Η αξιολόγηση in vivo δεν είναι τόσο κρίσιμης σημασίας, εάν είναι γνωστά τα χαρακτηριστικά της χημικής ουσίας που αφορούν την απορρόφηση, την κατανομή, τον μεταβολισμό και την απέκκριση (ADME). Οι ανδρογονοεξαρτώμενοι ιστοί ανταποκρίνονται με ταχεία και έντονη αύξηση στη διέγερση από τα ανδρογόνα, ιδίως στην περίπτωση των ευνουχισμένων αρσενικών επιμύων περιηβικής ηλικίας. Είδη τρωκτικών, ιδίως ο επίμυς, χρησιμοποιούνται επίσης ευρέως σε μελέτες τοξικότητας για τον χαρακτηρισμό των κινδύνων. Συνεπώς, η έκδοση του προσδιορισμού στην οποία χρησιμοποιούνται ευνουχισμένοι επίμυες περιηβικής ηλικίας και πέντε ιστοί-στόχοι είναι κατάλληλη για την in vivodιαλογή αγωνιστών και ανταγωνιστών των ανδρογόνων και αναστολέων της 5α-ρεδουκτάσης.

6. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών βασίζεται στα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη επικύρωσης του ΟΟΣΑ και έχουν αποδειχθεί αξιόπιστα και αναπαραγώγιμα σε ενδοεργαστηριακές και διεργαστηριακές μελέτες (4) (5) (6) (7) (8). Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών παρουσιάζονται διαδικασίες τόσο με ανδρογόνα όσο και με αντιανδρογόνα.

7. Παρά την ελαφρώς διαφορετική δόση προπιονικής τεστοστερόνης που χρησιμοποίησαν τα διάφορα εργαστήρια για την ανίχνευση αντιανδρογόνων στο πλαίσιο του προγράμματος του ΟΟΣΑ για την επικύρωση του βιοπροσδιορισμού Hershberger (0,2 έναντι 0,4 mg/kg/ημέρα με υποδόρια ένεση), υπήρξε μικρή διαφορά μεταξύ αυτών των δύο παραλλαγών του πρωτοκόλλου ως προς την ικανότητα ανίχνευσης ασθενούς ή ισχυρής αντιανδρογονικής δράσης. Ωστόσο, είναι σαφές ότι η δόση προπιονικής τεστοστερόνης δεν θα πρέπει να είναι τόσο υψηλή ώστε να αναστέλλει τις επιδράσεις ασθενών ανταγωνιστών των υποδοχέων ανδρογόνων ούτε τόσο χαμηλή ώστε οι διεγερμένοι από ανδρογόνο ιστοί να εμφανίζουν μικρή αυξητική αντίδραση ακόμα και χωρίς συγχορήγηση αντιανδρογόνων.

▼M5

8. Η αυξητική αντίδραση των επιμέρους ανδρογονοεξαρτώμενων ιστών δεν οφείλεται αποκλειστικά στα ανδρογόνα, δηλ. και άλλες χημικές ουσίες εκτός των αγωνιστών των ανδρογόνων μπορούν να μεταβάλλουν το βάρος ορισμένων ιστών. Ωστόσο, η ταυτόχρονη αυξητική αντίδραση πολλών ιστών τεκμηριώνει την ύπαρξη ενός ειδικότερου ανδρογονικού μηχανισμού. Παραδείγματος χάριν, υψηλές δόσεις ισχυρών οιστρογόνων μπορούν να αυξήσουν το βάρος των σπερματοδόχων κύστεων. Ωστόσο, οι υπόλοιποι ανδρογονοεξαρτώμενοι ιστοί του προσδιορισμού δεν αντιδρούν με ανάλογο τρόπο. Τα χημικά αντιανδρογόνα μπορούν να δράσουν είτε ως ανταγωνιστές υποδοχέων ανδρογόνων είτε ως αναστολείς της 5α-ρεδουκτάσης. Οι αναστολείς της 5α-ρεδουκτάσης έχουν ποικίλες επιδράσεις, διότι η μετατροπή στην ισχυρότερη διυδροτεστοστερόνη διαφέρει μεταξύ των ιστών. Τα αντιανδρογόνα που αναστέλλουν την 5α-ρεδουκτάση, όπως η φιναστερίδη, έχουν εντονότερες επιδράσεις στον κοιλιακό λοβό του προστάτη από ό,τι σε άλλους ιστούς, σε σύγκριση με έναν ισχυρό ανταγωνιστή υποδοχέων ανδρογόνων, όπως η φλουταμίδη. Αυτή η διαφορά στην αντίδραση των ιστών μπορεί να αξιοποιηθεί για τη διαφοροποίηση των τρόπων δράσης μέσω υποδοχέα ανδρογόνων και μέσω της 5α-ρεδουκτάσης. Επιπλέον, ο υποδοχέας ανδρογόνων σχετίζεται εξελικτικά με τους υποδοχείς άλλων στεροειδών ορμονών και ορισμένες άλλες ορμόνες, όταν χορηγούνται σε υψηλά επίπεδα δόσης που υπερβαίνουν τα φυσιολογικά όρια, μπορούν να δεσμεύσουν και να ανταγωνιστούν τις αυξητικές επιδράσεις της προπιονικής τεστοστερόνης (13). Είναι επίσης ευλογοφανές ότι η ενίσχυση του μεταβολισμού των στεροειδών και η συνακόλουθη μείωση της τεστοστερόνης ορού θα μπορούσαν να μειώσουν την αύξηση των ανδρογονοεξαρτώμενων ιστών. Συνεπώς, κάθε θετικό αποτέλεσμα του βιοπροσδιορισμού Hershberger θα πρέπει κανονικά να αξιολογείται με προσέγγιση βάρους της μαρτυρίας, συμπεριλαμβανομένων προσδιορισμών in vitro, όπως οι προσδιορισμοί σύνδεσης με υποδοχείς ανδρογόνων και οιστρογόνων και οι αντίστοιχοι προσδιορισμοί μεταγραφικής ενεργοποίησης, ή μέσω άλλων προσδιορισμώνin vivo κατά τους οποίους εξετάζονται ανάλογοι ιστοί-στόχοι των ανδρογόνων, όπως ο προσδιορισμός με αρσενικά ζώα στην ήβη, ο προσδιορισμός 15 ημερών με άθικτα ενήλικα αρσενικά ζώα ή οι μελέτες 28 ή 90 ημερών με επαναλαμβανόμενη δόση.

9. Η πείρα έχει δείξει ότι τα ξενοβιοτικά ανδρογόνα είναι σπανιότερα από τα ξενοβιοτικά αντιανδρογόνα. Αναμένεται επομένως ότι ο βιοπροσδιορισμός Hershberger θα χρησιμοποιείται συχνότερα για τη διαλογή αντιανδρογόνων. Παρόλα αυτά, η διαδικασία δοκιμής ανδρογόνων θα μπορούσε να συνιστάται για στεροειδείς χημικές ουσίες, χημικές ουσίες που δρουν όπως τα στεροειδή ή χημικές ουσίες για τις οποίες προέκυψαν ενδείξεις πιθανών ανδρογονικών επιδράσεων από μεθόδους που περιλαμβάνονται στο 1ο ή το 2ο επίπεδο του εννοιολογικού πλαισίου (προσάρτημα 2). Ομοίως, είναι δυνατόν να παρατηρηθούν δυσμενείς επιδράσεις που σχετίζονται με (αντι)ανδρογονικά χαρακτηριστικά στους προσδιορισμούς του 5ου επιπέδου, καθιστώντας αναγκαία την αξιολόγηση του κατά πόσον μια χημική ουσία δρα ενδοκρινικά ή όχι.

10. Αναγνωρίζεται ότι όλες οι διαδικασίες που περιλαμβάνουν ζώα πρέπει να είναι σύμφωνες με τα τοπικά πρότυπα περί φροντίδας των ζώων. Οι περιγραφές φροντίδας και αγωγής που παρατίθενται κατωτέρω αποτελούν ελάχιστα πρότυπα επιδόσεων και αντικαθίστανται από τοπικές ρυθμίσεις, όπως η οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 22ας Σεπτεμβρίου 2010, περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς (26). Περαιτέρω καθοδήγηση για την ανώδυνη μεταχείριση των ζώων παρέχει ο ΟΟΣΑ (17).

11. Όπως σε κάθε βιοπροσδιορισμό στον οποίο χρησιμοποιούνται πειραματόζωα, θα πρέπει να εξετάζεται προσεκτικά η ανάγκη διεξαγωγής της παρούσας μελέτης. Κατά βάση, δύο είναι ενδεχομένως οι λόγοι που υπαγορεύουν τη λήψη μιας τέτοιας απόφασης:

— υψηλή πιθανότητα έκθεσης (1ο επίπεδο του εννοιολογικού πλαισίου) ή ενδείξεις (αντι)ανδρογονικότητας σε προσδιορισμούς in vitro (2ο επίπεδο), που συνηγορούν υπέρ του διερευνηθεί αν οι επιδράσεις αυτές είναι δυνατόν να ανακύψουν in vivo·

— επιδράσεις αντίστοιχες της (αντι)ανδρογονικότητας σε δοκιμές in vivo 4ου ή 5ου επιπέδου, που συνηγορούν υπέρ της διερεύνησης του συγκεκριμένου τρόπου δράσης, π.χ. για να διαπιστωθεί αν οι επιδράσεις οφείλονται σε (αντι)ανδρογονικό μηχανισμό.

▼M5

12. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

13. Η ευαισθησία του βιοπροσδιορισμού Hershberger εξασφαλίζεται μέσω της χρήσης αρσενικών ζώων με ελάχιστη παραγωγή ενδογενών ανδρογόνων. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση ευνουχισμένων αρσενικών ζώων στα οποία έχει δοθεί επαρκής χρόνος μετά τον ευνουχισμό ώστε οι ιστοί-στόχοι να επανέλθουν σε ένα ελάχιστο και ομοιόμορφο βάρος. γραμμής βάσης. Ως εκ τούτου, κατά τον έλεγχο της δυνητικής ανδρογονικής δράσης, τα ενδογενή επίπεδα κυκλοφορούντων ανδρογόνων είναι χαμηλά, ο άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων έχει καταστεί ανίκανος να αντισταθμίσει τα χαμηλά αυτά επίπεδα μέσω μηχανισμών ανατροφοδότησης, η ικανότητα ανταπόκρισης των ιστών έχει μεγιστοποιηθεί και η μεταβλητότητα του αρχικού βάρους των ιστών έχει ελαχιστοποιηθεί. Κατά τον έλεγχο της δυνητικής αντιανδρογονικής δράσης, μπορεί να επιτευχθεί ουσιαστικότερη αύξηση του βάρους των ιστών μέσω της διέγερσής τους με ένα ανδρογόνο αναφοράς. Αποτέλεσμα των ανωτέρω είναι να απαιτούνται για τον βιοπροσδιορισμό Hershberger μόνο 6 ζώα ανά ομάδα δόσης, ενώ για άλλους προσδιορισμούς με άθικτα αρσενικά ζώα στην ήβη ή ενήλικα συνιστάται η χρήση 15 αρσενικών ζώων ανά ομάδα δόσης.

14. Οι αρσενικοί επίμυες περιηβικής ηλικίας θα πρέπει να ευνουχίζονται με τον ενδεδειγμένο τρόπο και με τη χρήση εγκεκριμένων αναισθητικών και άσηπτης τεχνικής. Τις πρώτες μέρες μετά τη χειρουργική επέμβαση θα πρέπει να χορηγούνται αναλγητικά ώστε να εξαφανίζεται η μετεγχειρητική δυσφορία. Ο ευνουχισμός βελτιώνει την ακρίβεια του προσδιορισμού όσον αφορά την ανίχνευση ασθενών ανδρογόνων και αντιανδρογόνων, εξαλείφοντας, αφενός τους αντισταθμιστικούς ενδοκρινικούς μηχανισμούς ανατροφοδότησης που υπάρχουν στα άθικτα ζώα και μπορούν να μετριάσουν τις επιδράσεις των χορηγούμενων ανδρογόνων και αντιανδρογόνων και, αφετέρου, τη μεγάλη μεταβλητότητα των επιπέδων τεστοστερόνης στον ορό μεταξύ των ζώων. Συνεπώς, με τον ευνουχισμό μειώνεται ο απαιτούμενος αριθμός ζώων για τη διαλογή ως προς τις συγκεκριμένες ενδοκρινικές δράσεις.

15. Κατά τη διαλογή ως προς τη δυνητική ανδρογονική δράση, η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται καθημερινά με στομαχικό καθετήρα ή υποδόρια ένεση για περίοδο δέκα συνεχών ημερών. Οι ελεγχόμενες χημικές ουσίες χορηγούνται σε δύο τουλάχιστον ομάδες πειραματόζωων αγωγής, με ένα επίπεδο δόσης ανά ομάδα. Τα ζώα νεκροτομούνται περίπου 24 ώρες μετά την τελευταία δόση. Μια στατιστικά σημαντική αύξηση του βάρους δύο ή περισσότερων οργάνων-στόχων στις ομάδες αγωγής με την ελεγχόμενη χημική ουσία σε σύγκριση με την ομάδα μαρτύρων που έχει λάβει τον φορέα υποδηλώνει ότι η ελεγχόμενη χημική ουσία είναι θετική για δυνητική ανδρογονική δράση (βλ. παράγραφο 60). Τα ανδρογόνα όπως η τρενβολόνη, που δεν μπορούν να αναχθούν μέσω της 5α-ρεδουκτάσης, έχουν εντονότερες επιδράσεις στους ανελκτήρες του πρωκτού και τους βολβοσηραγγώδεις μύες, καθώς και στη βάλανο του πέους, σε σύγκριση με την προπιονική τεστοστερόνη, αλλά όλοι οι ιστοί θα πρέπει να εμφανίζουν αυξημένη ανάπτυξη.

16. Κατά τη διαλογή ως προς την αντιανδρογονική δράση, η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται καθημερινά με στομαχικό καθετήρα ή υποδόρια ένεση για περίοδο δέκα συνεχών ημερών, μαζί με καθημερινές δόσεις προπιονικής τεστοστερόνης (0,2 ή 0,4 mg/kg/ημέρα) με υποδόρια ένεση. Στο πρόγραμμα επικύρωσης προσδιορίστηκε ότι μπορούν να χρησιμοποιούνται είτε 0,2 είτε 0,4 mg προπιονικής τεστοστερόνης/kg/ημέρα, καθώς οι δύο ποσότητες είναι εξίσου αποτελεσματικές στην ανίχνευση αντιανδρογόνων, και επομένως, θα πρέπει να επιλέγεται μόνο μία δόση για να χρησιμοποιηθεί στον προσδιορισμό. Χορηγούνται κλιμακωτές δόσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε τρεις τουλάχιστον ομάδες πειραματόζωων αγωγής, με ένα επίπεδο δόσης ανά ομάδα. Τα ζώα νεκροτομούνται περίπου 24 ώρες μετά την τελευταία δόση. Μια στατιστικά σημαντική μείωση του βάρους δύο ή περισσότερων οργάνων-στόχων στις ομάδες που έχουν λάβει την ελεγχόμενη χημική ουσία και προπιονική τεστοστερόνη, σε σύγκριση με την ομάδα μαρτύρων στην οποία χορηγείται μόνο προπιονική τεστοστερόνη, υποδηλώνει ότι η ελεγχόμενη χημική ουσία είναι θετική για δυνητική αντιανδρογονική δράση (βλ. παράγραφο 61).

▼M5

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Επιλογή είδους και στελέχους

17. Η χρήση επιμύων στον βιοπροσδιορισμό Hershberger αποτελεί συνήθη πρακτική από τη δεκαετία του '30. Παρόλο που είναι βιολογικά ευλογοφανές να παρουσιάζουν οι επίμυες και οι ποντικοί παρόμοιες αντιδράσεις, οι επίμυες αποτελούν το προτιμώμενο είδος για τον βιοπροσδιορισμό Hershberger βάσει της 70ετούς πείρας με το μοντέλο επιμύων. Επιπλέον, δεδομένου ότι ο βιοπροσδιορισμός Hershberger ενδέχεται να είναι το προκαταρκτικό στάδιο μακροπρόθεσμης μελέτης πολλών γενεών, μπορούν να χρησιμοποιούνται και στις δύο μελέτες ζώα του ίδιου είδους και του ίδιου στελέχους και προέλευσης.

18. Το παρόν πρωτόκολλο παρέχει στα εργαστήρια τη δυνατότητα να επιλέγουν το στέλεχος επιμύων που θα χρησιμοποιήσουν στον προσδιορισμό, η οποία θα πρέπει γενικά να είναι η εκείνη που χρησιμοποιεί παραδοσιακά το εκάστοτε εργαστήριο. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα συνήθη στελέχη εργαστηριακών επιμύων. Ωστόσο, δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται στελέχη που ωριμάζουν αρκετά αργότερα από την ηλικία των 42 ημερών, δεδομένου ότι ο ευνουχισμός των αρσενικών ζώων των στελεχών αυτών σε ηλικία 42 ημερών αποκλείει μάλλον τη μέτρηση του βάρους της βαλάνου του πέους, η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο μετά τον διαχωρισμό της πόσθης από τον κορμό του πέους. Συνεπώς, δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται στελέχη που προέρχονται από τον επίμυ Fisher 344, εκτός από σπάνιες περιπτώσεις. Ο επίμυς Fisher 344 παρουσιάζει διαφορετικό χρόνο σεξουαλικής ανάπτυξης σε σύγκριση με άλλες συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα στελέχη, όπως οι Sprague Dawley και Wistar (16). Εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί αυτό το στέλεχος, το εργαστήριο θα πρέπει να ευνουχίσει τους επίμυες σε ελαφρώς μεγαλύτερη ηλικία και να μπορεί να αποδείξει την ευαισθησία του χρησιμοποιούμενου στελέχους. Το εργαστήριο θα πρέπει να αναφέρει επακριβώς τους λόγους επιλογής του στελέχους επιμύων. Σε περίπτωση που ο προσδιορισμός διαλογής είναι προκαταρκτικό στάδιο μελέτης με επαναλαμβανόμενη δόση από το στόμα, μελέτης της ανάπτυξης και της αναπαραγωγής ή μακροπρόθεσμης μελέτης, θα πρέπει κατά προτίμηση να χρησιμοποιούνται ζώα του ίδιου στελέχους και προέλευσης σε όλες τις μελέτες.

Συνθήκες στέγασης και διατροφής

19. Όλες οι διαδικασίες θα πρέπει να είναι σύμφωνες με το σύνολο των τοπικών προτύπων φροντίδας των πειραματόζωων. Οι παρούσες περιγραφές φροντίδας και αγωγής αποτελούν ελάχιστα πρότυπα και αντικαθίστανται από τις αυστηρότερες τοπικές ρυθμίσεις, όπως η οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 22ας Σεπτεμβρίου 2010, περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς (26). Η θερμοκρασία του θαλάμου πειραματόζωων θα πρέπει να είναι 22 °C (με εύρος τιμών ± 3 °C περίπου). Η σχετική υγρασία θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει μέγιστο ποσοστό 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου. Στόχος θα πρέπει να είναι μια τιμή σχετικής υγρασίας 50-60 %. Ο φωτισμός πρέπει να είναι τεχνητός με ημερήσια φωτοπερίοδο 12 ωρών.

20. Η ομαδική στέγαση είναι προτιμότερη από την απομόνωση, λόγω του νεαρού της ηλικίας των ζώων και του ότι οι επίμυες είναι κοινωνικά ζώα. Με τη στέγαση δύο ή τριών ζώων ανά κλωβό αποφεύγεται ο συνωστισμός και το συνακόλουθη ένταση που ενδέχεται να παρεμποδίσει τον ορμονικό έλεγχο της ανάπτυξης των επικουρικών γεννητικών ιστών. Οι κλωβοί θα πρέπει να καθαρίζονται σχολαστικά ώστε να απομακρύνονται πιθανές προσμείξεις, η δε διάταξή τους θα πρέπει να ελαχιστοποιεί την πιθανότητα επιδράσεων οφειλόμενων στη θέση των κλωβών. Με τη χρήση κλωβών κατάλληλου μεγέθους (περίπου 2 000 τετραγ. εκατοστών) αποφεύγεται ο υπερπληθυσμός.

21. Κάθε ζώο θα πρέπει να φέρει ατομικό αναγνωριστικό (π.χ. ενώτιο ή ετικέτα) τοποθετούμενο με ανώδυνη μέθοδο. Η μέθοδος ταυτοποίησης θα πρέπει να καταγράφεται.

▼M5

22. Το εργαστηριακό σιτηρέσιο και πόσιμο νερό πρέπει να παρέχονται κατά βούληση. Τα εργαστήρια που εκτελούν τον βιοπροσδιορισμό Hershberger θα πρέπει να χρησιμοποιούν το εργαστηριακό σιτηρέσιο που χρησιμοποιούν συνήθως στις οικείες εργασίες δοκιμών χημικών ουσιών. Στις μελέτες επικύρωσης του βιοπροσδιορισμού δεν παρατηρήθηκαν επιδράσεις ούτε μεταβλητότητα που να μπορούν να αποδοθούν στην τροφή. Θα πρέπει να καταγράφεται το χρησιμοποιούμενο εργαστηριακό σιτηρέσιο και ένα δείγμα του να φυλάσσεται για ενδεχόμενη μελλοντική ανάλυση.

Κριτήρια επιδόσεων όσον αφορά το βάρος των ανδρογονοεξαρτώμενων οργάνων

23. Κατά τη διάρκεια της μελέτης επικύρωσης δεν προέκυψαν στοιχεία που να δείχνουν ότι η μείωση του σωματικού βάρος επηρεάζει προς τα πάνω ή προς τα κάτω την αύξηση του βάρους των ιστών-στόχων (δηλ. αυτών που πρέπει να ζυγίζονται στην παρούσα μελέτη).

24. Μεταξύ των διαφόρων στελεχών επιμύων που χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία στο πρόγραμμα επικύρωσης, το βάρος των ανδρογονοεξαρτώμενων οργάνων ήταν μεγαλύτερο στα στελέχη με μεγαλύτερο βάρος σε σύγκριση με τα ελαφρότερα στελέχη. Κατόπιν τούτου, στα κριτήρια επιδόσεων του βιοπροσδιορισμού Hershberger δεν περιλαμβάνεται το αναμενόμενο απόλυτο βάρος των οργάνων των θετικών και των αρνητικών μαρτύρων.

25. Λόγω του ότι ο συντελεστής μεταβλητότητας (CV) για έναν ιστό είναι αντιστρόφως ανάλογος της στατιστικής ισχύος, τα κριτήρια επιδόσεων του βιοπροσδιορισμού Hershberger βασίζονται σε μέγιστες τιμές CV για κάθε ιστό (πίνακας 1). Οι τιμές CV προέρχονται από τις μελέτες επικύρωσης του ΟΟΣΑ. Σε περίπτωση αρνητικού αποτελέσματος, τα εργαστήρια θα πρέπει να εξετάζουν τους CV της ομάδας μαρτύρων και της ομάδας αγωγής με την υψηλή δόση, για να διαπιστώνουν αν έχει σημειωθεί υπέρβαση των κριτηρίων επιδόσεων βάσει του μέγιστου CV.

26. Η μελέτη θα πρέπει να επαναλαμβάνεται εάν 1) τρεις ή περισσότεροι από τους δέκα πιθανούς ατομικούς CV στην ομάδα μαρτύρων και στην ομάδα αγωγής με την υψηλή δόση υπερβαίνουν τις μέγιστες τιμές που καθορίζονται για τις μελέτες αγωνιστών και ανταγωνιστών στον πίνακα 1 και 2) τουλάχιστον δύο ιστοί-στόχοι είναι οριακά αμελητέοι, ήτοι οι τιμές ρ κυμαίνονται μεταξύ 0,05 και 0,10.

Πίνακας 1

Μέγιστοι επιτρεπτοί CV που προσδιορίστηκαν στις μελέτες επικύρωσης του ΟΟΣΑ για τους επικουρικούς γεννητικούς ιστούς-στόχους στο μοντέλο με ευνουχισμένα ζώα [1]

Ιστός	Αντιανδρογονικές επιδράσεις	Ανδρογονικές επιδράσεις
Σπερματοδόχοι κύστεις	40 %	40 %
Κοιλιακός λοβός του προστάτη	40 %	45 %
Ανελκτήρες του πρωκτού και βολβοσηραγγώδεις μύες	20 %	30 %
Βολβοουρηθραίοι αδένες	35 %	55 %
Βάλανος του πέους	17 %	22 %

[1] Η τιμή καστωφλίου του CV για δεδομένο ιστό καθορίστηκε από ένα διάγραμμα τιμών CV —διατεταγμένων κατ' αύξουσα σειρά— για όλες τις μέσες τιμές από όλα τα πειράματα της διαδικασίας επικύρωσης με τη χρήση συγκεκριμένου μοντέλου (αγωνιστών ή ανταγωνιστών). Η τιμή καστωφλίου του CV ελήφθη από το σημείο στο οποίο οι αυξήσεις μεταξύ ενός CV και του αμέσως υψηλότερου στη σειρά είναι ιδιαιτέρως μεγαλύτερες από αυτές μεταξύ των προηγούμενων CV, δηλ. από το «σημείο διαχωρισμού». Πρέπει να σημειωθεί ότι, παρόλο που με την ανάλυση αυτή καθορίστηκαν σχετικά αξιόπιστα «σημεία διαχωρισμού» για το μοντέλο ανταγωνιστών του προσδιορισμού, οι καμπύλες του CV για τον προσδιορισμό με αγωνιστές παρουσίαζαν περισσότερο ομοιόμορφη αύξηση, καθιστώντας τον καθορισμό τιμής κατωφλίου του CV με τη συγκεκριμένη μέθοδο κάπως αυθαίρετο.

▼M5

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Συμμόρφωση με τις ρυθμίσεις και έλεγχος των εργαστηρίων

27. Σε αντίθεση με τον μητροτροφικό προσδιορισμό (κεφάλαιο B.54 του παρόντος παραρτήματος), δεν απαιτείται για τον προσδιορισμό Hershberger απόδειξη της ικανότητας του εργαστηρίου πριν από την έναρξη της μελέτης, διότι εξετάζονται συντρέχοντες θετικοί (προπιονική τεστοστερόνη και φλουταμίδη) και αρνητικοί μάρτυρες ως αναπόσπαστο μέρος του προσδιορισμού.

Αριθμός και κατάσταση των ζώων

28. Κάθε ομάδα αγωγής και μαρτύρων θα πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον 6 ζώα. Αυτό ισχύει τόσο για το πρωτόκολλο με ανδρογόνα, όσο και για το πρωτόκολλο με αντιανδρογόνα.

Ευνουχισμός

29. Θα πρέπει να προβλέπεται μια αρχική περίοδος εγκλιματισμού, διάρκειας αρκετών ημερών, μετά την παραλαβή των ζώων, ώστε να εξασφαλίζεται ότι αυτά είναι υγιή και ακμαία ζώων. Δεδομένου ότι, εάν τα ζώα ευνουχιστούν πριν από την ηλικία των 42 ημερών ή 42η μεταγεννητική ημέρα (ΜΓΗ), ενδέχεται να μην έχει ακόμη διαχωριστεί η πόσθη, τα ζώα πρέπει να ευνουχίζονται την 42η ΜΓΗ ημέρα ή αργότερα, όχι νωρίτερα. Τα ζώα ευνουχίζονται υπό αναισθησία, με τομή στο όσχεο και αφαίρεση των όρχεων και των επιδιδυμίδων και με απολίνωση των αιμοφόρων αγγείων και των σπερματικών πόρων. Αφού επιβεβαιωθεί η απουσία αιμορραγίας, το όσχεο κλείνεται με ράμμα ή συνδετήρες. Τις πρώτες ημέρες μετά τη χειρουργική επέμβαση θα πρέπει να χορηγούνται αναλγητικά στα ζώα για να ανακουφίζονται από τυχόν μετεγχειρητική δυσφορία. Σε περίπτωση αγοράς ευνουχισμένων ζώων από προμηθευτή, ο τελευταίος θα πρέπει να βεβαιώνει την ηλικία των ζώων και το στάδιο σεξουαλικής ωρίμασης.

Εγκλιματισμός μετά τον ευνουχισμό

30. Ο εγκλιματισμός των ζώων στις εργαστηριακές συνθήκες θα πρέπει να συνεχίζεται τουλάχιστον για 7 ημέρες μετά τον ευνουχισμό, ώστε να παρέχεται χρόνος για την υποχώρηση του βάρους των ιστών-στόχων. Τα ζώα θα πρέπει να παρατηρούνται καθημερινά και όσα εμφανίζουν ενδείξεις ασθένειας ή σωματικές ανωμαλίες θα πρέπει να απομακρύνονται. Συνεπώς, η αγωγή με τη χορήγηση δόσεων (στο πλαίσιο της μελέτης) μπορεί να αρχίζει από την ηλικία των 49 ημερών αλλά όχι αργότερα από την 60ή ΜΓΗ. Η ηλικία κατά τη νεκροψία δεν θα πρέπει να υπερβαίνει την 70ή ΜΓΗ. Αυτή η ευελιξία επιτρέπει στο εργαστήριο να προγραμματίζει αποδοτικά το πειραματικό έργο.

Σωματικό βάρος και τυχαιοποιημένη συγκρότηση των ομάδων

31. Οι διαφορές ατομικού σωματικού βάρους αποτελούν πηγή μεταβλητότητας του βάρους των ιστών, τόσο στο εσωτερικό όσο και μεταξύ των ομάδων ζώων. Η αύξηση της μεταβλητότητας του βάρους των ιστών οδηγεί σε αυξημένο συντελεστή μεταβλητότητας (CV) και μειώνει τη στατιστική ισχύ του προσδιορισμού (καλούμενη ορισμένες φορές ευαισθησία του προσδιορισμού). Ως εκ τούτου, οι αποκλίσεις του σωματικού βάρους θα πρέπει να ελέγχονται, τόσο πειραματικά όσο και στατιστικά.

32. Ο πειραματικός έλεγχος περιλαμβάνει την εξασφάλιση μικρών αποκλίσεων του σωματικού βάρους εντός και μεταξύ των ομάδων της μελέτης. Πρώτον, τα ασυνήθιστα μικρά ή μεγάλα ζώα θα πρέπει να αποφεύγονται και να μην τοποθετούνται στην κοόρτη της μελέτης. Κατά την έναρξη της μελέτης, η απόκλιση του βάρους των χρησιμοποιούμενων ζώων δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το ± 20 % του μέσου βάρους (π.χ. 175 g ± 35 g στην περίπτωση των ευνουχισμένων επιμύων περιηβικής ηλικίας). Δεύτερον, τα ζώα θα πρέπει να κατανέμονται σε ομάδες (μαρτύρων και αγωγής) με τυχαιοποιημένη κατανομή βαρών, ώστε το μέσο σωματικό βάρος κάθε ομάδας να μη διαφέρει στατιστικά από εκείνο οποιασδήποτε άλλης ομάδας. Θα πρέπει να καταγράφεται η εφαρμοζόμενη διαδικασία τυχαιοποίησης σε ομάδες.

▼M5

33. Δεδομένου ότι η τοξικότητα μπορεί να επιφέρει μείωση του σωματικού βάρους στις ομάδες αγωγής σε σύγκριση με την ομάδα μαρτύρων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως στατιστική συμμεταβλητή το σωματικό βάρος κατά την πρώτη ημέρα χορήγησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και όχι το σωματικό βάρος κατά τη νεκροψία.

Δοσολογία

34. Για να διαπιστωθεί αν μια ελεγχόμενη χημική ουσία μπορεί να έχει ανδρογονική δράση in vivo, αρκούν κατά κανόνα δύο ομάδες δόσης στις οποίες χορηγείται η ελεγχόμενη χημική ουσία και ομάδες θετικών μαρτύρων και μαρτύρων στους οποίους χορηγείται ο φορέας (αρνητικοί μάρτυρες) (βλ. παράγραφο 43). Συνεπώς, ο συγκεκριμένος σχεδιασμός προτιμάται για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων. Εάν σκοπός είναι είτε η χάραξη καμπύλης δόσης-απόκρισης είτε η παρέκταση σε χαμηλότερα επίπεδα δόσης, απαιτούνται τουλάχιστον 3 ομάδες δόσης. Εάν απαιτούνται πληροφορίες πέραν του προσδιορισμού της ανδρογονικής δράσης (π.χ. εκτίμηση ισχύος), θα πρέπει να εξετάζονται διαφορετικά δοσολογικά σχήματα. Για τον έλεγχο αντιανδρογόνων, η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται μαζί με έναν αγωνιστή ανδρογόνων αναφοράς. θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 3 ομάδες αγωγής με διαφορετικές δόσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, μία ομάδα θετικών μαρτύρων και μία ομάδα αρνητικών (βλ. παράγραφο 44). Εκτός από τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τα ζώα της ομάδας μαρτύρων θα πρέπει να υφίστανται την ίδια ακριβώς μεταχείριση όπως τα υποκείμενα των ομάδων δοκιμής. Εάν χρησιμοποιείται φορέας για τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τα ζώα της ομάδας μαρτύρων θα πρέπει να λαμβάνουν τον φορέα στον μεγαλύτερο όγκο που χρησιμοποιείται στις ομάδες δοκιμής.

35. Όλα τα επίπεδα δόσης θα πρέπει να προτείνονται και να επιλέγονται λαμβανομένων υπόψη των διαθέσιμων δεδομένων για την τοξικότητα και την (τοξικο)κινητική της ελεγχόμενης χημικής ουσίας ή συγγενών υλών. Για το ανώτατο επίπεδο δόσης θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη, πρώτον, η τιμή LD_{50} και/ή οι πληροφορίες για την οξεία τοξικότητα, ώστε να αποφεύγονται ο θάνατος, η σοβαρή ταλαιπωρία και το άγχος των ζώων (17) (18) (19) (20), και δεύτερον, οι διαθέσιμες πληροφορίες για τις δόσεις που χρησιμοποιούνται σε υποχρόνιες και χρόνιες μελέτες. Γενικά, η μέγιστη δόση δεν θα πρέπει να προκαλεί μείωση του τελικού σωματικού βάρους των ζώων κατά περισσότερο από 10 % του βάρους των μαρτύρων. Η μέγιστη δόση θα πρέπει να είναι είτε 1) η μέγιστη δόση που εξασφαλίζει την επιβίωση των ζώων και δεν τους προκαλεί σημαντική τοξικότητα ή αγωνία μετά από 10 συνεχείς ημέρες χορήγησης δόσεων, με ανώτατο όριο τα 1 000 mg/kg/ημέρα (βλ. παράγραφο 36), ή 2) μια δόση που επάγει (αντι)ανδρογονικές επιδράσεις, αναλόγως του ποια από τις δύο είναι χαμηλότερη. Ως κριτήριο διαλογής, είναι αποδεκτά τα μεγάλα διαστήματα μεταξύ των δόσεων, π.χ. μία ημιλογαριθμική μονάδα (που αντιστοιχεί σε λόγο ακολουθίας δόσεων 3,2) ή ακόμη και μία λογαριθμική μονάδα. Εάν δεν διατίθενται κατάλληλα δεδομένα είναι δυνατόν να διεξαχθεί μελέτη καθορισμού εύρους (βλ. παράγραφο 37) για τη διευκόλυνση του προσδιορισμού των δόσεων που θα χρησιμοποιηθούν.

Οριακή δόση

36. Εάν μια δοκιμή με οριακή δόση 1 000 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα και μια χαμηλότερη δόση, με την εφαρμογή των διαδικασιών που περιγράφονται στην παρούσα μελέτη, δεν έχει ως αποτέλεσμα στατιστικά σημαντική μεταβολή του βάρους των αναπαραγωγικών οργάνων, τα πρόσθετα επίπεδα δόσεων μπορούν να θεωρηθούν περιττά. Η οριακή δόση εφαρμόζεται εφόσον από τα δεδομένα έκθεσης του ανθρώπου δεν προκύπτει ανάγκη χρησιμοποίησης υψηλότερου επίπεδου δόσης.

Ζητήματα σχετικά με τον καθορισμό εύρους

37. Εάν είναι απαραίτητο, μπορεί να διεξαχθεί προκαταρκτική μελέτη καθορισμού εύρους με λίγα ζώα για την επιλογή κατάλληλων ομάδων δόσης [με τη χρήση των μεθόδων δοκιμών οξείας τοξικότητας (κεφάλαια Β.1 α και Β.1 β του παρόντος παραρτήματος (27), TG 425 του ΟΟΣΑ (19))]. Στόχος στην περίπτωση του βιοπροσδιορισμού Hershberger είναι η επιλογή δόσεων που εξασφαλίζουν την επιβίωση των ζώων και δεν τους προκαλούν σημαντική τοξικότητα ή αγωνία μετά από δέκα συνεχείς ημέρες χορήγησης της

▼M5

χημικής ουσίας σε δόσεις που δεν υπερβαίνουν την οριακή δόση των 1 000 mg/kg/ημέρα, όπως σημειώνεται στις παραγράφους 35 και 36. Για τη μελέτη αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα καθοδηγητικό έγγραφο του ΟΟΣΑ (17) που ορίζει τα κλινικά σημεία τοξικότητας ή αγωνίας στα ζώα. Εάν είναι εφικτό στο πλαίσιο της εν λόγω μελέτης καθορισμού εύρους, μετά από δέκα ημέρες χορήγησης δόσεων οι ιστοί-στόχοι εκτέμνονται και ζυγίζονται περίπου 24 ώρες μετά τη χορήγηση της τελευταίας δόσης. Τα δεδομένα αυτά μπορούν έπειτα να χρησιμοποιηθούν ως βοήθημα κατά την επιλογή δόσεων για την κυρίως μελέτη.

Χημικές ουσίες αναφοράς και φορέας

38. Ο αγωνιστής ανδρογόνων αναφοράς θα πρέπει να είναι η προπιονική τεστοστερόνη, αριθ. CAS 57-82-5. Η δοσολογία αναφοράς της προπιονικής τεστοστερόνης μπορεί να είναι είτε 0,2 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα είτε 0,4 mg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα. Ο ανταγωνιστής ανδρογόνων αναφοράς θα πρέπει να είναι η φλουταμίδη (Flutamide), αριθ. CAS 1311-84-7. Η δοσολογία αναφοράς της φλουταμίδης θα πρέπει να είναι 3 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα και να συγχορηγείται με τη δοσολογία αναφοράς της προπιονικής τεστοστερόνης.

39. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατό, να εξετάζεται πρώτα η χρήση υδατικού διαλύματος/εναιωρήματος. Δεδομένου όμως ότι πολλοί συνδέτες ανδρογόνων ή οι μεταβολικοί τους πρόδρομοι είναι συνήθως υδρόφοβοι, η χρήση διαλύματος/εναιωρήματος σε έλαιο (π.χ. αραβοσιτέλαιο, φιστικέλαιο, σησαμέλαιο ή ελαιόλαδο) αποτελεί τη συνηθέστερη προσέγγιση. Οι ελεγχόμενες χημικές ουσίες μπορούν να διαλύονται σε ελάχιστη ποσότητα αιθανόλης 95 % ή άλλου κατάλληλου διαλύτη και τα διαλύματά τους να αραιώνονται στον φορέα της δοκιμής μέχρι τις τελικές συγκεντρώσεις εργασίας. Τα τοξικά χαρακτηριστικά του διαλύτη θα πρέπει να είναι γνωστά και να ελέγχονται σε χωριστή ομάδα μαρτύρων στην οποία χορηγείται μόνο ο διαλύτης. Εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία θεωρείται σταθερή, μπορεί να χρησιμοποιείται ήπια θέρμανση και έντονη μηχανική δράση για τη διευκόλυνση της διάλυσής της. Θα πρέπει να προσδιορίζεται η σταθερότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στον φορέα. Εάν αυτή είναι σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης, είναι δυνατόν να παρασκευάζεται ένα αρχικό γνωστό κλάσμα του δείγματος της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και οι καθορισμένες αραιώσεις δοσολογίας να ετοιμάζονται καθημερινά, με προσοχή ώστε να αποφεύγεται η μόλυνση και η αλλοίωση των δειγμάτων.

Χορήγηση δόσεων

40. Η προπιονική τεστοστερόνη θα πρέπει να χορηγείται με υποδόρια ένεση, ενώ η φλουταμίδη με στομαχικό καθετήρα.

41. Η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με στομαχικό καθετήρα ή υποδόρια ένεση. Κατά την επιλογή οδού χορήγησης θα πρέπει να συνεκτιμώνται ζητήματα καλής μεταχείρισης των ζώων και οι φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Επιπλέον, πριν από την έναρξη εκτενούς μακροπρόθεσμης δοκιμής, λόγω θετικού αποτελέσματος με την ένεση, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τοξικολογικές πτυχές, όπως η συνάφεια με την οδό έκθεσης του ανθρώπου στη χημική ουσία (π.χ. στομαχικός καθετήρας για έκθεση μέσω κατάποσης, υποδόρια ένεση για έκθεση μέσω της εισπνοής ή της επιδερμίδας) και τα υφιστάμενα τοξικολογικά στοιχεία και δεδομένα για τον μεταβολισμό και την κινητική (π.χ. ανάγκη αποφυγής του μεταβολισμού πρώτης διόδου, μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα μέσω συγκεκριμένης οδού).

42. Οι δόσεις θα πρέπει να χορηγούνται στα ζώα κατά τον ίδιο τρόπο και με την ίδια χρονική ακολουθία για δέκα συνεχείς ημέρες κατά διαστήματα περίπου 24 ωρών. Το επίπεδο δοσολογίας πρέπει να ρυθμίζεται καθημερινά, με βάση σύγχρονων καθημερινές μετρήσεις του σωματικού βάρους. Ο όγκος των δόσεων και ο χρόνος χορήγησής τους θα πρέπει να καταγράφονται κάθε ημέρα έκθεσης. Για να είναι δυνατή η ουσιαστική ερμηνεία των δεδομένων, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μη σημειώνεται υπέρβαση της μέγιστης δόσης που αναφέρεται στην παράγραφο 35. Εν προκειμένω, θα πρέπει να αξιολογούνται ενδελεχώς η μείωση του σωματικού βάρους, τα κλινικά σημεία και τα λοιπά ευρήματα. Για τη χορήγηση από το στόμα θα πρέπει να χρησιμοποιείται στομαχικός καθετήρας ή

▼M5

κατάλληλη διασωλήνωση. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Θα πρέπει να εφαρμόζονται οι τοπικές κατευθυντήριες γραμμές για τη φροντίδα των ζώων, αλλά ο όγκος δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 5 ml/kg σωματικού βάρους, εξαιρουμένων των υδατικών διαλυμάτων, στην περίπτωση των οποίων μπορούν να χρησιμοποιούνται 10 ml/kg σωματικού βάρους. Όσον αφορά τις υποδόριες ενέσεις, οι δόσεις θα πρέπει να χορηγούνται στη ραχιαία περιοχή της ωμοπλάτης και/ή στην οσφυϊκή περιοχή με αποστειρωμένη βελόνα (π.χ. διαμετρήματος 23 ή 25) και σύριγγα φυματίνης. Το ξύρισμα του σημείου ένεσης είναι προαιρετικό. Θα πρέπει να καταγράφονται τυχόν απώλειες, διαρροή στο σημείο ένεσης ή ελλιπής χορήγηση. Ο συνολικός όγκος που χορηγείται με ένεση ανά επίμυ ανά ημέρα δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 0,5 ml/kg σωματικού βάρους.

Ειδικές διαδικασίες για τους αγωνιστές ανδρογόνων

43. Στη δοκιμή αγωνιστών των ανδρογόνων, η ομάδα στην οποία χορηγείται ο φορέας αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ η ομάδα στην οποία χορηγείται προπιονική τεστοστερόνη αποτελεί τον θετικό μάρτυρα. Η βιολογική δράση που αντιστοιχεί σε αγωνιστές ανδρογόνων ελέγχεται με τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε ομάδες αγωγής στις επιλεγμένες δόσεις για 10 συνεχείς ημέρες. Το βάρος των πέντε επικουρικών γεννητικών ιστών στις ομάδες αγωγής με την ελεγχόμενη χημική ουσία συγκρίνεται με το αντίστοιχο βάρος στις ομάδες που λαμβάνουν τον φορέα για να διαπιστωθούν στατιστικά σημαντικές αυξήσεις του βάρους.

Ειδικές διαδικασίες για τους ανταγωνιστές ανδρογόνων και τους αναστολείς της 5α-ρεδουκτάσης

44. Στη δοκιμή ανταγωνιστών των ανδρογόνων και αναστολέων της 5α-ρεδουκτάσης, η ομάδα στην οποία χορηγείται προπιονική τεστοστερόνη αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ η ομάδα στην οποία συγχορηγούνται δόσεις αναφοράς προπιονικής τεστοστερόνης και φλουταμίδης αποτελεί τον θετικό μάρτυρα. Η βιολογική δράση που αντιστοιχεί σε ανταγωνιστές ανδρογόνων και αναστολείς της 5α-ρεδουκτάσης ελέγχεται με τη χορήγηση δόσης αναφοράς προπιονικής τεστοστερόνης, καθώς και της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, για 10 συνεχείς ημέρες. Το βάρος των πέντε επικουρικών γεννητικών ιστών στις ομάδες στις οποίες χορηγείται προπιονική τεστοστερόνη και η ελεγχόμενη χημική ουσία συγκρίνεται με το αντίστοιχο βάρος στις ομάδες που λαμβάνουν μόνο δόσεις αναφοράς προπιονικής τεστοστερόνης για να διαπιστωθούν στατιστικά σημαντικές μειώσεις του βάρους.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Κλινικές παρατηρήσεις

45. Θα πρέπει να διεξάγονται γενικές κλινικές παρατηρήσεις τουλάχιστον μία φορά ημερησίως και συχνότερα όταν παρατηρούνται σημεία τοξικότητας. Οι παρατηρήσεις θα πρέπει να διεξάγονται κατά προτίμηση την (τις) ίδια(-ες) ώρα(-ες) κάθε μέρα και λαμβανομένου υπόψη του χρόνου των αναμενόμενων μέγιστων επιδράσεων μετά τη χορήγηση της δόσης. Θα πρέπει να παρατηρούνται όλα τα ζώα για θνησιμότητα, νοσηρότητα και γενικά κλινικά σημεία, όπως αλλαγές στη συμπεριφορά, το δέρμα, το τρίχωμα, τους οφθαλμούς και τους βλεννογόνους, εκκρίσεις και απεκκρίσεις, καθώς και δραστηριότητα του αυτόνομου νευρικού συστήματος (π.χ. δακρύρροια, ανόρθωση τριχών, μεταβολή του μεγέθους της κόρης του οφθαλμού, ασυνήθης ρυθμός αναπνοής).

46. Κάθε ζώο που βρίσκεται νεκρό θα πρέπει να απομακρύνεται και να απορρίπτεται χωρίς περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων. Τυχόν θνησιμότητα ζώων πριν από τη νεκροψία, καθώς και οι προφανείς αιτίες της, θα πρέπει να καταγράφονται στο πρακτικό της μελέτης. Τα ετοιμοθάνατα ζώα θα πρέπει να θανατώνονται ανώδυνα. Τα ετοιμοθάνατα ζώα που υποβάλλονται σε ευθανασία, καθώς και οι προφανείς αιτίες της νοσηρότητάς τους, θα πρέπει να καταγράφονται στο πρακτικό της μελέτης.

▼M5

Σωματικό βάρος και κατανάλωση τροφής

47. Όλα τα ζώα θα πρέπει να ζυγίζονται καθημερινά με ακρίβεια 0,1 g, για πρώτη φορά ακριβώς πριν από την έναρξη της αγωγής, δηλ. όταν κατανέμονται στις ομάδες. Προαιρετικά, μπορεί να μετράται η ποσότητα τροφής που καταναλώνεται κατά την περίοδο αγωγής ανά κλωβό, με ζύγιση των διατάξεων τροφοδοσίας. Τα αποτελέσματα που αφορούν την κατανάλωση τροφής θα πρέπει να εκφράζονται σε γραμμάρια ανά επίμυ ανά ημέρα.

Ανατομή και μέτρηση του βάρους των ιστών και των οργάνων

48. Περίπου 24 ώρες μετά την τελευταία χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, οι επίμυες θα πρέπει να υποβάλλονται σε ευθανασία και αφαίμαξη, σύμφωνα με τις συνήθεις διαδικασίες του εργαστηρίου που διεξάγει τη δοκιμή, και να νεκροτομούνται. Η μέθοδος ευθανασίας θα πρέπει να καταγράφεται στην έκθεση του εργαστηρίου.

49. Σε ιδανικές συνθήκες, η σειρά νεκροψίας θα πρέπει να τυχαιοποιείται μεταξύ των ομάδων, ώστε να αποφεύγεται η πρόοδος κατά τη σειρά των ομάδων δόσης, ανοδικά ή καθοδικά, που θα μπορούσε να επηρεάσει τα δεδομένα. Όλα τα ευρήματα της νεκροψίας, π.χ. παθολογικές αλλαγές/ορατές αλλοιώσεις, θα πρέπει να σημειώνονται και να αναφέρονται.

50. Θα πρέπει να ζυγίζονται οι πέντε ανδρογονοεξαρτώμενοι ιστοί (κοιλιακός λοβός του προστάτη, σπερματοδόχοι κύστεις, ανελκτήρες του πρωκτού και βολβοσηραγγώδεις μύες, βολβοουρηθραίοι αδένες, βάλανος του πέους). Οι ιστοί αυτοί εκτέμνονται, απαλλάσσονται από την περίσσεια προσκολλημένων ιστών και λίπους και προσδιορίζεται το βάρος τους σε νωπή κατάσταση (χωρίς μονιμοποίηση). Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά τον χειρισμό κάθε ιστού ώστε να αποφεύγεται η απώλεια υγρών και η ξήρανση, η οποία ενδέχεται να προκαλέσει σημαντικά σφάλματα και μεταβλητότητα, μειώνοντας το καταγραφόμενο βάρος. Ορισμένοι από τους ιστούς μπορεί να είναι πολύ μικροί ή να ανατέμνονται με δυσκολία, γεγονός που συνεπάγεται μεταβλητότητα. Είναι επομένως σημαντικό τα άτομα που ανατέμνουν τους επικουρικούς γεννητικούς ιστούς να είναι εξοικειωμένα με τις τυποποιημένες διαδικασίες ανατομής των ιστών αυτών. Ένα εγχειρίδιο τυποποιημένης διαδικασίας λειτουργίας (SOP) σχετικά με την ανατομή είναι διαθέσιμο από τον ΟΟΣΑ (21). Η επιμελής κατάρτιση του προσωπικού σύμφωνα με τον οδηγό SOP ελαχιστοποιεί μια δυνητική πηγή μεταβλητότητας στη μελέτη. Σε ιδανικές συνθήκες, ο ίδιος παθολογοανατόμος θα πρέπει να είναι υπεύθυνος για την ανατομή ενός δεδομένου ιστού, ώστε να μην υπάρχουν διαφορές στην επεξεργασία των ιστών λόγω διαφορετικών προσώπων. Εάν αυτό δεν είναι δυνατόν, η νεκροψία θα πρέπει να σχεδιάζεται κατά τρόπο ώστε κάθε παθολογοανατόμος να ανατέμνει ένα δεδομένο ιστό από όλες τις ομάδες αγωγής και όχι ένα άτομο να ανατέμνει όλους τους ιστούς από μια ομάδα μαρτύρων, ενώ ένα άλλο είναι υπεύθυνο για τις ομάδες αγωγής. Κάθε επικουρικός γεννητικός ιστός θα πρέπει να ζυγίζεται με ακρίβεια 0,1 mg, χωρίς να προηγείται στύπωση, και το βάρος του να καταγράφεται για κάθε ζώο.

51. Ορισμένοι από τους ιστούς μπορεί να είναι πολύ μικροί ή να ανατέμνονται με δυσκολία, γεγονός που συνεπάγεται μεταβλητότητα. Από προγενέστερες εργασίες προέκυψε ένα εύρος συντελεστών μεταβλητότητας (CV) που φαίνεται να διαφέρει ανάλογα με την ικανότητα του εργαστηρίου. Σε λίγες περιπτώσεις, έχουν παρατηρηθεί μεγάλες διαφορές εντός συγκεκριμένου εργαστηρίου στο απόλυτο βάρος ιστών όπως ο κοιλιακός λοβός του προστάτη και οι βολβοουρηθραίοι αδένες.

52. Η μέτρηση του βάρους του ήπατος, του ζεύγους των νεφρών και του ζεύγους των επινεφριδίων είναι προαιρετική. Θα πρέπει, και στην περίπτωση αυτή, να απαλλάσσονται οι ιστοί από τυχόν προσκολλημένη περιτονία και λίπος. Το ήπαρ θα πρέπει να ζυγίζεται με ακρίβεια 0,1 g και το βάρος του να καταγράφεται με την ίδια ακρίβεια και τα ζεύγη των νεφρών και των επινεφριδίων θα πρέπει να ζυγίζονται με ακρίβεια 0,1 mg και το βάρος τους να καταγράφεται με την ίδια ακρίβεια. Το ήπαρ, οι νεφροί και τα επινεφρίδια δεν επηρεάζονται απλώς μόνο από τα ανδρογόνα, αλλά παρέχουν και χρήσιμες ενδείξεις συστημικής τοξικότητας.

▼**M5**

53. Η μέτρηση της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH), της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH) και της τεστοστερόνης στον ορό του αίματος είναι προαιρετική. Τα επίπεδα της τεστοστερόνης ορού είναι χρήσιμα προκειμένου να διαπιστωθεί αν η ελεγχόμενη χημική ουσία επάγει μεταβολισμό της τεστοστερόνης στο ήπαρ, μειώνοντας τα επίπεδά της στον ορό. Εάν δεν υπάρχουν δεδομένα για την τεστοστερόνη, αυτή η επίδραση θα μπορούσε να αποδοθεί σε αντιανδρογονικό μηχανισμό. Τα επίπεδα της LH παρέχουν πληροφορίες για την ικανότητα ενός αντιανδρογόνου όχι μόνο να μειώνει το βάρος οργάνων, αλλά και να επηρεάζει τη λειτουργία του υποθαλάμου και της υπόφυσης, επίδραση που μπορεί να επάγει όγκους των όρχεων σε μακροπρόθεσμες μελέτες. Η FSH είναι ορμόνη σημαντική για τη σπερματογένεση. Προαιρετικές είναι και οι μετρήσεις της θυροξίνης ορού (T4) και της τριιωδοθυρονίνης ορού (T3), που παρέχουν χρήσιμες συμπληρωματικές πληροφορίες σχετικά με την ικανότητα διατάραξης της ομοιόστασης των θυρεοειδικών ορμονών. Εάν πρόκειται να γίνουν μετρήσεις ορμονών, θα πρέπει να αναισθητοποιούνται οι επίμυες πριν από τη νεκροψία και να λαμβάνονται δείγματα αίματος με παρακέντηση της καρδιάς. Η μέθοδος αναισθησίας θα πρέπει να επιλέγεται με προσοχή ώστε να μην επηρεάζει τη μέτρηση των ορμονών. Θα πρέπει να καταγράφονται η μέθοδος προετοιμασίας του ορού, η προέλευση των συνόλων αντιδραστηρίων (κιτ) ραδιοανοσοχημικού προσδιορισμού ή άλλων μετρήσεων, οι διαδικασίες ανάλυσης και τα αποτελέσματα. Τα επίπεδα της LH και της τεστοστερόνης θα πρέπει να αναφέρονται σε ng ανά ml ορού.

54. Η ανατομή των ιστών περιγράφεται κατωτέρω, ενώ λεπτομερής οδηγός ανατομής με φωτογραφίες έχει δημοσιευθεί ως συμπληρωματικό υλικό στο πλαίσιο του προγράμματος επικύρωσης (21). Διατίθεται επίσης ένα βίντεο ανατομής στην ιστοσελίδα της Υπηρεσίας Τροφίμων και Φαρμάκων της Κορέας (22).

— Με το ζώο σε ύπτια θέση, προσδιορίζεται αν η πόσθη του πέους έχει διαχωριστεί από τη βάλανο. Εάν έχει, συμπτύσσεται η ακροποσθία και αφαιρείται η βάλανος του πέους, η οποία ζυγίζεται (με ακρίβεια 0,1 mg) και το βάρος της καταγράφεται.

— Διανοίγονται το δέρμα της κοιλιάς και το κοιλιακό τοίχωμα, ώστε να αποκαλυφθούν τα σπλάχνα. Εάν προβλέπεται ζύγιση προαιρετικών οργάνων, αφαιρείται το ήπαρ και ζυγίζεται με ακρίβεια 0,1 g, αφαιρούνται το στομάχι και τα έντερα, αφαιρούνται οι νεφροί και τα επινεφρίδια και ζυγίζονται με ακρίβεια 0,1 mg. Με την ανατομή αυτή αποκαλύπτεται η ουροδόχος κύστη και αρχίζει η ανατομή των επικουρικών γεννητικών ιστών-στόχων των αρσενικών ζώων.

— Για την ανατομή του κοιλιακού λοβού του προστάτη, διαχωρίζεται η ουροδόχος κύστη από το μυϊκό στρώμα της κοιλιάς, με τομή του συνδετικού ιστού κατά μήκος της μέσης γραμμής. Μετατοπίζεται η ουροδόχος κύστη προς τα εμπρός, προς τις σπερματοδόχους κύστεις, αποκαλύπτοντας τον αριστερό και τον δεξιό κοιλιακό λοβό του προστάτη (που καλύπτονται από στρώμα λίπους). Αφαιρείται προσεκτικά το λίπος από τον δεξιό και τον αριστερό κοιλιακό λοβό του προστάτη. Απομακρύνεται με απαλές κινήσεις ο δεξιός κοιλιακός λοβός του προστάτη από την ουρήθρα και αποκόπτεται από αυτήν. Χωρίς να αφεθεί ο δεξιός κοιλιακός λοβός του προστάτη, απομακρύνεται με απαλές κινήσεις ο αριστερός κοιλιακός λοβός του προστάτη από την ουρήθρα και αποκόπτεται. Οι λοβοί ζυγίζονται με ακρίβεια 0,1 mg και το βάρος τους καταγράφεται.

— Για την ανατομή των σπερματοδόχων κύστεων και των πηκτοειδών αδένων, μετατοπίζεται η ουροδόχος κύστη προς την ουρά, αποκαλύπτοντας τον σπερματικό πόρο και τον δεξιό και τον αριστερό λοβό των σπερματοδόχων κύστεων και των πηκτοειδών αδένων. Προλαμβάνεται η διαρροή υγρών με τη χρήση αιμοστατικής λαβίδας στη βάση των σπερματοδόχων κύστεων και των πηκτοειδών αδένων, στο σημείο όπου ο σπερματικός πόρος συνδέεται με την ουρήθρα. Ανατέμνονται προσεκτικά οι σπερματοδόχοι κύστεις και οι πηκτοειδείς αδένες και, με την αιμοστατική λαβίδα στη θέση της, απαλλάσσονται από το λίπος και τα εξαρτήματά τους, τοποθετούνται σε προζυγισμένο σκαφίδιο ζύγισης, αφαιρείται η αιμοστατική λαβίδα, ζυγίζονται με ακρίβεια 0,1 mg και καταγράφεται το βάρος τους.

▼M5

— Για την ανατομή των ανελκτήρων του πρωκτού και των βολβοσηραγγωδών μυών αποκαλύπτονται οι μύες και η βάση του πέους. Οι ανελκτήρες του πρωκτού περιβάλλουν το κόλον, ενώ οι πρόσθιοι ανελκτήρες του πρωκτού και οι βολβοσηραγγώδεις μύες είναι συνδεδεμένοι με τους βολβούς του πέους. Αφαιρούνται το δέρμα και τα εξαρτήματα από την περιπρωκτική περιοχή, που εκτείνεται από τη βάση του πέους έως το πρόσθιο άκρο του πρωκτού. Αποκόπτονται σταδιακά οι βολβοσηραγγώδεις μύες από τον βολβό και τους ιστούς του πέους. Αφού τεμαχιστεί το κόλον στη μέση, μπορεί να αποκοπεί και να αφαιρεθεί ολόκληρο το σύμπλεγμα των ανελκτήρων του πρωκτού και βολβοσηραγγωδών μυών. Το σύμπλεγμα αυτό απαλλάσσεται από το λίπος και τα εξαρτήματα, ζυγίζεται με ακρίβεια 0,1 mg και το βάρος του καταγράφεται.

— Μετά την αφαίρεση των ανελκτήρων του πρωκτού και των βολβοσηραγγωδών μυών, οι στρογγυλοί βολβοουρηθραίοι αδένες ή αδένες του Cowper είναι ορατοί στη βάση των βολβών του πέους, ελαφρώς προς τη ράχη. Απαιτείται προσοχή κατά την ανατομή για να μην προκληθεί εντομή στη λεπτή κάψα και διαρροή υγρών. Ζυγίζεται το ζεύγος των βολβοουρηθραίων αδένων με ακρίβεια 0,1 mg και καταγράφεται το βάρος τους.

— Επιπλέον, θα πρέπει να καταγράφεται κάθε απώλεια υγρού από αδένα κατά τη νεκροψία και την ανατομή.

55. Εάν για την αξιολόγηση καθεμίας από τις χημικές ουσίας απαιτείται νεκροψία μεγαλύτερου αριθμού ζώων από τον εύλογο ημερήσιο αριθμό, η έναρξη της μελέτης μπορεί να κλιμακωθεί σε δύο συνεχείς ημέρες, με αποτέλεσμα την κλιμάκωση της νεκροψίας και των σχετικών εργασιών σε δύο ημέρες. Σε περίπτωση κλιμάκωσης κατ' αυτόν τον τρόπο, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ανά ημέρα τα μισά ζώα κάθε ομάδας αγωγής.

56. Μετά τη νεκροψία, τα πτώματα θα πρέπει να απορρίπτονται καταλλήλως.

ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Δεδομένα

57. Θα πρέπει να αναφέρονται δεδομένα για κάθε ζώο (σωματικό βάρος, βάρος των επικουρικών γεννητικών ιστών, προαιρετικές μετρήσεις και άλλες αντιδράσεις και παρατηρήσεις) και για κάθε ομάδα ζώων (μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις όλων των μετρήσεων). Τα εν λόγω δεδομένα θα πρέπει να συγκεφαλαιώνονται με τη μορφή πίνακα και να περιλαμβάνουν τον αριθμό των ζώων στην αρχή της δοκιμής, τον αριθμό των ζώων που βρέθηκαν νεκρά κατά τη διάρκεια της δοκιμής ή εμφάνισαν σημεία τοξικότητας, καθώς και περιγραφή των παρατηρηθέντων σημείων τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένων του χρόνου εκδήλωσης, της διάρκειας και της σοβαρότητάς τους.

58. Η τελική έκθεση θα πρέπει να περιλαμβάνει τα εξής:

Εγκαταστάσεις δοκιμών

— όνομα και γεωγραφική θέση των εγκαταστάσεων·

— διευθυντής και λοιπό προσωπικό της μελέτης και οι αρμοδιότητές τους στη μελέτη·

— ημερομηνίες έναρξης και λήξης της μελέτης, ήτοι πρώτη ημέρα χορήγησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και τελευταία ημέρα νεκροψίας, αντιστοίχως.

Ελεγχόμενη χημική ουσία

— προέλευση, αριθμός παρτίδας, ταυτότητα, καθαρότητα, πλήρης διεύθυνση του προμηθευτή και χαρακτηρισμός των ελεγχόμενων χημικών ουσιών·

— φυσική μορφή και, εφόσον έχουν σημασία, φυσικοχημικές ιδιότητες·

— συνθήκες αποθήκευσης και μέθοδος και συχνότητα αραιώσεων·

— τυχόν δεδομένα που προέκυψαν σχετικά με τη σταθερότητα·

— τυχόν αναλύσεις των διαλυμάτων/εναιωρημάτων δόσης.

▼M5

Φορέας

— χαρακτηρισμός του φορέα (ταυτότητα, προμηθευτής και αριθμός παρτίδας)·

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα (εάν δεν πρόκειται για νερό).

Πειραματόζωα και ζωοκομικές διαδικασίες

— χρησιμοποιούμενο είδος/στέλεχος και αιτιολόγηση της επιλογής του/της·

— προέλευση ή προμηθευτής των ζώων, με πλήρη διεύθυνση·

— αριθμός και ηλικία των αγορασθέντων ζώων·

— συνθήκες στέγασης (θερμοκρασία, φωτισμός κ.λπ.)·

— τροφή (όνομα, τύπος, προμηθευτής, αριθμός παρτίδας, περιεχόμενο και επίπεδα φυτοοιστρογόνων, εάν είναι γνωστά)·

— στρωμνή (όνομα, τύπος, προμηθευτής, περιεχόμενο)·

— συνθήκες στέγασης σε κλωβούς και αριθμός ζώων ανά κλωβό.

Συνθήκες προσδιορισμού

— ηλικία κατά τον ευνουχισμό και περίοδος εγκλιματισμού μετά τον ευνουχισμό·

— ατομικό βάρος των ζώων κατά την έναρξη της μελέτης (με ακρίβεια 0,1 g)·

— διαδικασία τυχαιοποίησης και καταγραφή της ένταξης στις ομάδες του φορέα, της ουσίας αναφοράς και της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, καθώς και στους κλωβούς·

— μέση τιμή και τυπική απόκλιση σωματικού βάρους ανά ομάδα και ανά ημέρα ζύγισης, καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης·

— αιτιολόγηση της επιλογής των δόσεων·

— οδός χορήγησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και αιτιολόγηση της επιλογής της·

— στην περίπτωση του προσδιορισμού αντιανδρογονικότητας, αγωγή με προπιονική τεστοστερόνη (δόση και όγκος)·

— αγωγή με την ελεγχόμενη χημική ουσία (δόση και όγκος)·

— χρόνος χορήγησης των δόσεων·

— διαδικασίες νεκροψίας, συμπεριλαμβανομένων των μέσων αφαίμαξης και της ενδεχόμενης αναισθησίας.

— Εάν εκτελούνται αναλύσεις ορού, θα πρέπει να παρέχονται λεπτομέρειες σχετικά με τη μέθοδο. Παραδείγματος χάριν, εάν χρησιμοποιείται ραδιοανοσοχημικός προσδιορισμός (RIA), θα πρέπει να αναφέρονται η διαδικασία RIA, η προέλευση των συνόλων αντιδραστηρίων (κιτ) RIA, οι ημερομηνίες λήξης των κιτ, η διαδικασία απαρίθμησης σπινθηρισμών και η τυποποίηση.

Αποτελέσματα

— καθημερινές παρατηρήσεις κατά τη χορήγηση των δόσεων, για κάθε ζώο, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται τα εξής:

— σωματικό βάρος (με ακρίβεια 0,1 g),

— κλινικά σημεία (εάν υπήρξαν),

— τυχόν μετρήσεις ή σημειώσεις σχετικά με την κατανάλωση τροφής·

— παρατηρήσεις σχετικά με τη νεκροψία, για κάθε ζώο, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται τα εξής:

▼M5

— ημερομηνία νεκροψίας,

— ομάδα αγωγής του ζώου,

— αναγνωριστικό του ζώου,

— παθολογοανατόμος,

— ώρα διενέργειας της νεκροψίας και της ανατομής,

— ηλικία του ζώου,

— τελικό σωματικό βάρος κατά τη νεκροψία, με σημείωση κάθε στατιστικά σημαντικής αύξησης ή μείωσης,

— σειρά αφαίμαξης και ανατομής του ζώου κατά τη νεκροψία,

— βάρος των πέντε ανδρογονοεξαρτώμενων ιστών-στόχων:

— κοιλιακός λοβός του προστάτη (με ακρίβεια 0,1 mg)

— σπερματοδόχοι κύστεις και πηκτοειδείς αδένες, μαζί με το υγρό (σε ζεύγη, με ακρίβεια 0,1 mg)

— σύμπλεγμα ανελκτήρων του πρωκτού και βολβοσηραγγωδών μυών (με ακρίβεια 0,1 mg)

— βολβοουρηθραίοι αδένες (βάρος σε νωπή κατάσταση, σε ζεύγος, με ακρίβεια 0,1 mg)

— βάλανος του πέους (βάρος σε νωπή κατάσταση, με ακρίβεια 0,1 mg),

— βάρος προαιρετικών ιστών, εάν έχει μετρηθεί:

— ήπαρ (με ακρίβεια 0,1 g)

— νεφροί (σε ζεύγος, με ακρίβεια 0,1 mg)

— επινεφρίδια (σε ζεύγος, με ακρίβεια 0,1 mg),

— γενικές παρατηρήσεις και σχόλια·

— αναλύσεις ορμονών ορού, εάν έχουν εκτελεστεί:

— LH ορού (προαιρετικά — ng ανά ml ορού) και

— τεστοστερόνη ορού (προαιρετικά — ng ανά ml ορού),

— γενικές παρατηρήσεις και σχόλια.

Σύνοψη δεδομένων

Τα δεδομένα θα πρέπει να συνοψίζονται σε μορφή πίνακα που περιέχει το μέγεθος του δείγματος για κάθε ομάδα, τη μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής ή την τυπική απόκλιση. Οι πίνακες θα πρέπει να περιλαμβάνουν το σωματικό βάρος κατά τη νεκροψία, τις μεταβολές του από την έναρξη της χορήγησης των δόσεων έως τη νεκροψία, το βάρος των επικουρικών γεννητικών ιστών-στόχων και, ενδεχομένως, το προαιρετικά μετρούμενο βάρος οργάνων.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Ανάλυση των αποτελεσμάτων

59. Το βάρος του σώματος και των οργάνων κατά τη νεκροψία θα πρέπει να υποβάλλεται σε στατιστική ανάλυση όσον αφορά χαρακτηριστικά όπως η ομοιογένεια της διασποράς, με κατάλληλους μετασχηματισμούς δεδομένων, εφόσον είναι αναγκαίοι. Οι ομάδες αγωγής θα πρέπει να συγκρίνονται με ομάδα μαρτύρων, με τη χρήση τεχνικών όπως η ανάλυση συνδιακύμανσης (ANCOVA), ακολουθούμενη από συγκρίσεις κατά ζεύγη (π.χ. μονόπλευρη δοκιμασία Dunnett), και του κριτηρίου της στατιστικής διαφοράς, π.χ. $p \leq 0,05$. Θα πρέπει να προσδιορίζονται οι ομάδες που αποκτούν στατιστική σημαντικότητα. Ωστόσο, οι τιμές «σχετικού βάρους οργάνων» θα πρέπει να αποφεύγονται, λόγω του ότι δεν είναι έγκυρες οι στατιστικές παραδοχές στις οποίες βασίζεται ο συγκεκριμένος χειρισμός των δεδομένων.

▼**M5**

60. Στην περίπτωση της δράσης αγωνιστών των ανδρογόνων, ο μάρτυρας θα πρέπει να είναι η ομάδα δοκιμής στην οποία χορηγείται μόνο ο φορέας. Τα χαρακτηριστικά του τρόπου δράσης μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας μπορούν να προκαλέσουν διαφορετικές σχετικές αντιδράσεις μεταξύ των ιστών: παραδείγματος χάριν, η τρενβολόνη, η οποία δεν μπορεί να αναχθεί μέσω της 5α-ρεδουκτάσης, έχει εντονότερες επιδράσεις στο σύμπλεγμα των ανελκτήρων του πρωκτού και βολβοσηραγγωδών μυών και στη βάλανο του πέους σε σύγκριση με την προπιονική τεστοστερόνη. Μια στατιστικά σημαντικά αύξηση ($p \leq 0,05$) του βάρους δύο ή περισσότερων από τους πέντε ανδρογονοεξαρτώμενους ιστούς-στόχους (κοιλιακός λοβός του προστάτη, ανελκτήρες του πρωκτού και βολβοσηραγγώδεις μυς, βάλανος του πέους, βολβοουρηθραίοι αδένες και σπερματοδόχοι κύστεις με τους πηκτοειδείς αδένες), αδιακρίτως, θα πρέπει να θεωρείται θετικό αποτέλεσμα αγωνιστή ανδρογόνων, ενώ όλοι οι ιστοί-στόχοι θα πρέπει να εμφανίζουν αυξημένη σε κάποιο βαθμό ανάπτυξη. Η συνδυασμένη αξιολόγηση των αντιδράσεων όλων των ιστών επικουρικών γεννητικών αδένων μπορεί να επιτευχθεί με κατάλληλη πολυπαραμετρική ανάλυση. Με τον τρόπο αυτό βελτιώνεται η ανάλυση, ιδίως σε περιπτώσεις όπου στατιστικά σημαντική αντίδραση παρουσιάζει μόνο ένας ιστός.

61. Στην περίπτωση της δράσης ανταγωνιστών των ανδρογόνων, ο μάρτυρας θα πρέπει να είναι η ομάδα δοκιμής στην οποία χορηγείται το ανδρογόνο αναφοράς (μόνο προπιονική τεστοστερόνη). Τα χαρακτηριστικά του τρόπου δράσης μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας μπορούν να προκαλέσουν διαφορετικές σχετικές αντιδράσεις μεταξύ των ιστών: παραδείγματος χάριν, οι αναστολείς της 5α-ρεδουκτάσης, όπως η φιναστερίδη, έχουν εντονότερες επιδράσεις στον κοιλιακό λοβό του προστάτη από ό,τι σε άλλους ιστούς, σε σύγκριση με ισχυρούς ανταγωνιστές υποδοχέων ανδρογόνων, όπως η φλουταμίδη. Μια στατιστικά σημαντικά μείωση ($p \leq 0,05$) του βάρους δύο ή περισσότερων από τους πέντε ανδρογονοεξαρτώμενους ιστούς-στόχους (κοιλιακός λοβός του προστάτη, ανελκτήρες του πρωκτού και βολβοσηραγγώδεις μυς, βάλανος του πέους, βολβοουρηθραίοι αδένες και σπερματοδόχοι κύστεις με πηκτοειδείς αδένες) αδιακρίτως, σε σχέση με την αγωγή μόνο με προπιονική τεστοστερόνη, θα πρέπει να θεωρείται θετικό αποτέλεσμα ανταγωνιστή ανδρογόνων, ενώ όλοι οι ιστοί-στόχοι θα πρέπει να εμφανίζουν μειωμένη σε κάποιο βαθμό ανάπτυξη. Η συνδυασμένη αξιολόγηση των αντιδράσεων όλων των ιστών επικουρικών γεννητικών αδένων μπορεί να επιτευχθεί με κατάλληλη πολυπαραμετρική ανάλυση δεδομένων. Με τον τρόπο αυτό βελτιώνεται η ανάλυση, ιδίως σε περιπτώσεις όπου στατιστικά σημαντική αντίδραση παρουσιάζει μόνο ένας ιστός.

62. Τα δεδομένα θα πρέπει να συνοψίζονται σε μορφή πίνακα που περιέχει τη μέση τιμή, το τυπικό σφάλμα SE της μέσης τιμής (η τυπική απόκλιση SD είναι επίσης αποδεκτή) και το μέγεθος δείγματος για κάθε ομάδα. Θα πρέπει να περιλαμβάνονται επίσης πίνακες με ατομικά δεδομένα. Οι επιμέρους τιμές, η μέση τιμή και οι τιμές SE (SD) και CV για τα δεδομένα που αφορούν τον μάρτυρα θα πρέπει να εξετάζονται για να διαπιστώνεται αν πληρούν αποδεκτά κριτήρια συμφωνίας με τις αναμενόμενες ιστορικές τιμές. Οι CV που υπερβαίνουν τις τιμές CV του πίνακα 1 (βλ. παραγράφους 25 και 26) για το βάρος κάθε οργάνου θα πρέπει να κρίνουν το κατά πόσον υπάρχουν σφάλματα στην καταγραφή ή την ηλεκτρονική καταχώριση των δεδομένων ή το εργαστήριο δεν έχει ακόμη αποκτήσει την ικανότητα να ανατέμνει με ακρίβεια τους ανδρογονοεξαρτώμενους ιστούς και χρειάζεται περαιτέρω κατάρτιση/εξάσκηση. Γενικά, οι CV (πηλίκο της τυπικής απόκλισης δια του μέσου βάρους οργάνου) είναι αναπαραγώγιμοι μεταξύ εργαστηρίων και μεταξύ μελετών. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται θα πρέπει να περιλαμβάνουν τουλάχιστον το βάρος του κοιλιακού λοβού του προστάτη, των σπερματοδόχων κύστεων, των ανελκτήρων του πρωκτού και των βολβοσηραγγωδών μυών, των βολβοουρηθραίων αδένων, της βαλάνου του πέους και του ήπατος, καθώς και το σωματικό βάρος και τη μεταβολή του από την έναρξη της χορήγησης των δόσεων έως τη νεκροψία. Είναι επίσης δυνατόν να παρουσιάζονται τα δεδομένα μετά από προσαρμογή συμμεταβλητής για να ληφθεί υπόψη το σωματικό βάρος, αλλά η παρουσίαση αυτή δεν πρέπει να αντικαθιστά την παρουσίαση των μη προσαρμοσμένων δεδομένων. Επιπλέον, εάν σε οποιαδήποτε από τις ομάδες δεν έχει διαχωριστεί η πόσθη, θα πρέπει να καταγράφεται η συχνότητα εμφάνισης (επίπτωση) της κατάστασης αυτής και να συγκρίνεται στατιστικά με την ομάδα μαρτύρων με τη χρήση της δοκιμασίας Fisher Exact.

▼**M5**

63. Κατά τον έλεγχο της ακρίβειας των δεδομένων που έχουν καταχωριστεί στον υπολογιστή με παραβολή με τα αρχικά δελτία δεδομένων, οι τιμές βάρους οργάνων που δεν είναι βιολογικά ευλογοφανείς ή διαφέρουν κατά περισσότερες από τρεις τυπικές αποκλίσεις από τις μέσες τιμές της οικείας ομάδας αγωγής θα πρέπει να εξετάζονται με προσοχή και, ενδεχομένως, να απορρίπτονται, καθώς πρόκειται μάλλον για σφάλματα καταγραφής.

64. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων της μελέτης με τις τιμές CV του ΟΟΣΑ (πίνακας 1) αποτελεί συχνά σημαντικό στάδιο της ερμηνείας, όσον αφορά την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων της μελέτης. Τα εργαστήρια θα πρέπει να διατηρούν ιστορικά δεδομένα, αφενός για τις ομάδες μαρτύρων με τον φορέα και, αφετέρου, για τις αντιδράσεις σε θετικές χημικές ουσίες αναφοράς, όπως η προπιονική τεστοστερόνη και η φλουταμίδη. Τα εργαστήρια μπορούν επίσης να ελέγχουν περιοδικά την αντίδραση σε γνωστούς ασθενείς αγωνιστές και ανταγωνιστές ανδρογόνων και να φυλάσσουν τα σχετικά δεδομένα. Τα δεδομένα αυτά μπορούν να συγκρίνονται με τα διαθέσιμα δεδομένα του ΟΟΣΑ ώστε να διασφαλίζεται ότι οι μέθοδοι του εργαστηρίου παρέχουν επαρκή στατιστική ακρίβεια και ισχύ.

▼**M5**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ:

Αντιοιστρογονικότητα: η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να καταστέλλει τη δράση της 17β-οιστραδιόλης στον οργανισμό θηλαστικού.

Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Ημερομηνία γέννησης: η μεταγεννητική ημέρα 0.

Δοσολογία: γενικός όρος που περικλείει τη δόση, καθώς και τη συχνότητα και τη διάρκεια χορήγησής της.

Δόση: η χορηγούμενη ποσότητα ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Στον μητροτροφικό βιοπροσδιορισμό, η δόση εκφράζεται ως βάρος της ελεγχόμενης χημικής ουσίας ανά μονάδα σωματικού βάρους του ζώου που υποβάλλεται στη δοκιμή ανά ημέρα (π.χ. mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα).

Μέγιστη ανεκτή δόση (ΜΑΔ): η μέγιστη ποσότητα μιας χημικής ουσίας που, όταν εισαχθεί στο σώμα, δεν προκαλεί τον θάνατο των ζώων της δοκιμής (συμβολίζεται με LD_0) (IUPAC, 1993).

Οιστρογονικότητα: η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να δρα όπως η 17β-οιστραδιόλη στον οργανισμό θηλαστικού.

Μεταγεννητική ημέρα Χ: η Χη ημέρα ζωής από την ημερομηνία γέννησης.

Ευαισθησία: το ποσοστό του συνόλου των θετικών/δραστικών χημικών ουσιών που ταξινομούνται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο της ορθότητας μιας μεθόδου δοκιμών με την οποία λαμβάνονται κατηγορικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας μιας μεθόδου δοκιμών.

Ειδικότητα: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών/αδρανών χημικών ουσιών που ταξινομούνται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο της ορθότητας μιας μεθόδου δοκιμών με την οποία λαμβάνονται κατηγορικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας μιας μεθόδου δοκιμών.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Μητροτροφική: όρος που χρησιμοποιείται για την περιγραφή θετικών επιδράσεων στην ανάπτυξη των ιστών της μήτρας

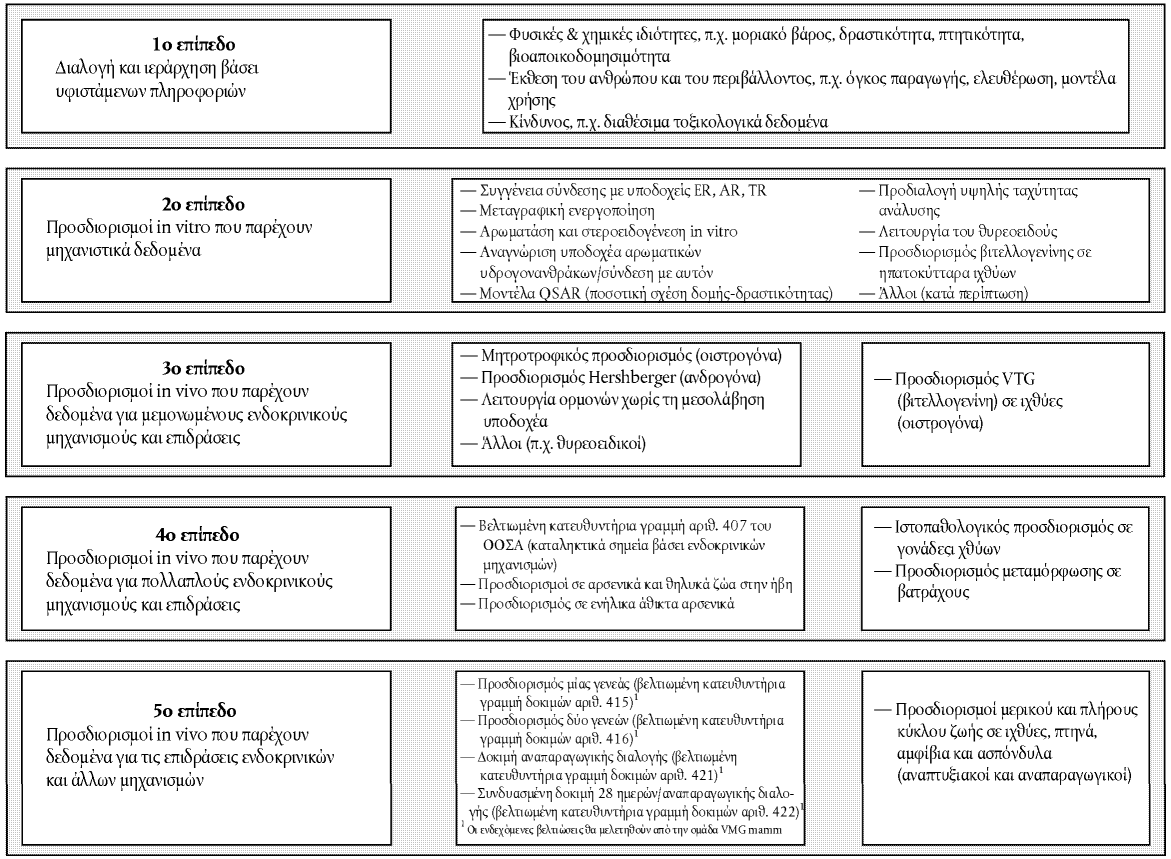
Επικύρωση: επιστημονική διαδικασία που έχει σχεδιαστεί για τον χαρακτηρισμό των λειτουργικών απαιτήσεων και περιορισμών μιας μεθόδου δοκιμών και για την απόδειξη της αξιοπιστίας της και της καταλληλότητάς της για συγκεκριμένο σκοπό.

▼M5

Προσάρτημα 2

Σημείωση: Έγγραφο που έχει καταρτιστεί από τη Γραμματεία του Προγράμματος Κατευθυντήριων Γραμμών Δοκιμών βάσει της συμφωνίας που επιτεύχθηκε κατά την 6η συνεδρίαση της ειδικής ομάδας για τις δοκιμές και την αξιολόγηση ενδοκρινικών διαταρακτών (EDTA)

Εννοιολογικό πλαίσιο του ΟΟΣΑ για τις δοκιμές και την αξιολόγηση χημικών ενδοκρινικών διαταρακτών



VMG mamm: ομάδα διαχείρισης της επικύρωσης για τις δοκιμές και την αξιολόγηση σε θηλαστικά

02008R0440 — EL — 16.10.2019 — 008.001 — 934

▼**M5**

ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ΤΟΥ ΕΝΝΟΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΠΛΑΙΣΙΟΥ:

Σημείωση 1: Η είσοδος και η έξοδος είναι δυνατή σε όλα τα επίπεδα και εξαρτάται από το είδος των υφιστάμενων αναγκών σε πληροφορίες για την εκτίμηση επικινδυνότητας και κινδύνων.

Σημείωση 2: Στο 5ο επίπεδο, η οικοτοξικολογία θα πρέπει να περιλαμβάνει τελικά σημεία που υποδηλώνουν μηχανισμούς δυσμενών επιδράσεων και δυνητικές βλάβες στον πληθυσμό.

Σημείωση 3: Όταν ένα πολυτροπικό μοντέλο καλύπτει περισσότερους από έναν προσδιορισμούς με ένα τελικό σημείο, το μοντέλο αυτό θα πρέπει να αντικαθιστά τη χρήση των εν λόγω προσδιορισμών ενός τελικού σημείου.

Σημείωση 4: Κάθε χημική ουσία θα πρέπει να αξιολογείται κατά περίπτωση, λαμβανομένων υπόψη όλων των διαθέσιμων πληροφοριών και με γνώμονα τη λειτουργία των επιπέδων του πλαισίου.

Σημείωση 5: Το πλαίσιο δεν θα πρέπει να θεωρείται επί του παρόντος ότι περιλαμβάνει τα πάντα. Στο 3ο, το 4ο και το 5ο επίπεδο, περιλαμβάνει προσδιορισμούς που είτε είναι διαθέσιμοι είτε βρίσκονται στο στάδιο της επικύρωσης. Στη δεύτερη περίπτωση, οι προσδιορισμοί έχουν συμπεριληφθεί προσωρινά. Όταν αναπτυχθούν και επικυρωθούν, θα προστεθούν επισήμως στο πλαίσιο.

Σημείωση 6: Το 5ο επίπεδο δεν θα πρέπει να θεωρείται ότι περιλαμβάνει μόνο οριστικές δοκιμές. Οι δοκιμές αυτού του επιπέδου θεωρείται ότι συμβάλλουν στη γενική εκτίμηση επικινδυνότητας και κινδύνων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(2) Dorfman RI (1962). Standard methods adopted by official organization. Academic Press, NY.

(3) Gray LE Jr, Furr J and Ostby JS (2005). Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and antiandrogenic activity in castrate-immature male rats. In: *Current Protocols in Toxicology* 16.9.1-16.9.15. J Wiley and Sons Inc.

(4) OECD (2006). Final OECD report of the initial work towards the validation of the rat Hershberger assay. Phase 1. Androgenic response to testosterone propionate and anti-androgenic effects of flutamide. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment Nº 62. ENV/JM/MONO(2006)30.

(5) OECD (2008). Report of the OECD Validation of the Rat Hershberger Bioassay: Phase 2: Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and a 5α-Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment Nº 86. ENV/JM/MONO(2008)3.

(6) OECD (2007). Report of the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase 3: Coded Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and Negative Reference Chemicals by Multiple Laboratories. Surgical Castrate Model Protocol. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment Nº 73. ENV/JM/MONO(2007)20.

(7) Owens, W, Zeiger E, Walker M, Ashby J, Onyon L, Gray, Jr, LE (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265-1269.

▼M5

(8) Owens W, Gray LE, Zeiger E, Walker M, Yamasaki K, Ashby J, Jacob E (2007). The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses: phase 2 dose-response studies. Environ Health Perspect. 115(5):671-8.

(9) Korenchevsky V (1932). The assay of testicular hormone preparations. Biochem J 26:413-422.

(10) Korenchevsky V, Dennison M, Schalit R (1932). The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone. Biochem J 26:1306-1314.

(11) Eisenberg E, Gordan GS (1950). The levator ani muscle of the rat as an index of myotrophic activity of steroidal hormones. J Pharmacol Exp Therap 99:38-44.

(12) Eisenberg E, Gordan GS, Elliott HW (1949). Testosterone and tissue respiration of the castrate male rat with a possible test for mytrophic activity. Endocrinology 45:113-119.

(13) Hershberger L, Shipley E, Meyer R (1953). Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. Proc Soc Exp Biol Med 83:175-180.

(14) Hilgar AG, Vollmer EP (1964). Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic. Washington DC: United States Public Health Service.

(15) Dorfman RI (1969). Androgens and anabolic agents. In: Methods in Hormone Research, volume IIA. (Dorfman RI, ed.) New York:Academic Press, 151-220.

(16) Massaro EJ (2002). Handbook of Neurotoxicology, volume I. New York: Humana Press, p 38.

(17) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(18) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.

(19) OECD (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.

(20) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

(21) Supplemental materials for Owens et al. (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265-1269. Bλ. section II, The dissection guidance provided to the laboratories: http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf.

(22) Korea Food and Drug Administration. Visual reference guide on Hershberger assay procedure, including a dissection video. http://rndmoa.kfda.go.kr/endocrine/reference/education_fr.html.

(23) OECD (2008). Background Review Document on the Rodent Hershberger Bioassay. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 90. ENV/JM/MONO(2008)17.

(24) OECD (2008). Draft Validation report of the Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay.

(25) OECD (2009). Guidance Document on the Weanling Hershberger Bioassay in rats: A shortterm screening assay for (anti)androgenic properties. Series on Testing and Assessment, Number 115.

▼**M5**

(26) Οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 22ας Σεπτεμβρίου 2010, περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς (ΕΕ L 276 της 20.10.2010, σ. 33).

(27) Τα ακόλουθα κεφάλαια του παρόντος παραρτήματος:

Β.1 α. Οξεία τοξικότητα από το στόμα — Διαδικασία προκαθορισμένων δόσεων

Β.1 β. Οξεία τοξικότητα από το στόμα — Μέθοδος των κλάσεων οξείας τοξικότητας

▼M5

B.56 **ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΙΑΣ ΓΕΝΕΑΣ**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή δοκιμών (TG) 443 (2012). Βασίζεται στην πρόταση της Τεχνικής Επιτροπής για την Εκτίμηση Ασφάλειας Γεωργικών Χημικών Ουσιών (ACSA), του Διεθνούς Ινστιτούτου Επιστημών Υγείας (International Life Science Institute — ILSI)-του Ινστιτούτου Επιστημών Περιβάλλοντος και Υγείας (Health and Environmental Sciences Institute -HESI) για τη διεξαγωγή εκτεταμένης μελέτης αναπαραγωγής μίας γενεάς στο στάδιο ζωής F_1, η οποία δημοσιεύθηκε από τους Cooper et al., 2006 (1). Έχουν γίνει πολλές βελτιώσεις και διασαφηνίσεις στον σχεδιασμό της μελέτης, ώστε να εξασφαλιστεί ευελιξία και να τονιστεί η σημασία της χρήσης των υφιστάμενων γνώσεων ως αφετηρίας, με παράλληλη παρατήρηση των ζωντανών ζώων για την καθοδήγηση και την προσαρμογή της δοκιμής. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών παρέχει αναλυτική περιγραφή της επιχειρησιακής διεξαγωγής εκτεταμένης μελέτης τοξικότητας στην αναπαραγωγή μίας γενεάς. Περιγράφονται τρεις κοόρτεις ζώων πρώτης γενεάς (F_1):

κοόρτη 1: αξιολόγηση τελικών σημείων αναπαραγωγής/ανάπτυξης· η κοόρτη αυτή μπορεί να επεκταθεί ώστε να περιλαμβάνει και τη δεύτερη γενεά (F_2)·

κοόρτη 2: αξιολόγηση των δυνητικών επιπτώσεων της έκθεσης σε χημική ουσία στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα·

κοόρτη 3: αξιολόγηση των δυνητικών επιπτώσεων της έκθεσης σε χημική ουσία στο αναπτυσσόμενο ανοσοποιητικό σύστημα.

2. Οι αποφάσεις σχετικά με την αξιολόγηση της δεύτερης γενεάς και την παράλειψη της κοόρτης αναπτυξιακής νευροτοξικότητας και/ή της κοόρτης αναπτυξιακής ανοσοτοξικότητας θα πρέπει να αντανακλούν τις υφιστάμενες γνώσεις για την αξιολογούμενη χημική ουσία, καθώς και τις ανάγκες των διαφόρων ρυθμιστικών αρχών. Σκοπός της μεθόδου δοκιμών είναι η παροχή λεπτομερών πληροφοριών για τον τρόπο με τον οποίο μπορεί να διεξαχθεί η μελέτη και η κάλυψη του τρόπου με τον οποίο θα πρέπει να αξιολογείται κάθε κοόρτη.

3. Για τις ρυθμιστικές αρχές που χρησιμοποιούν εσωτερικά σημεία ενεργοποίησης, η διαδικασία λήψης αποφάσεων σχετικά με την εσωτερική ενεργοποίηση της παραγωγής της δεύτερης γενεάς περιγράφεται στο καθοδηγητικό έγγραφο αριθ. 117 του ΟΟΣΑ (39).

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

4. Κύριος στόχος της εκτεταμένης μελέτης τοξικότητας στην αναπαραγωγή μίας γενεάς είναι η αξιολόγηση συγκεκριμένων σταδίων της ζωής που δεν καλύπτονται από άλλους τύπους μελετών τοξικότητας και ο έλεγχος για τον εντοπισμό επιδράσεων που ενδέχεται να είναι αποτέλεσμα προγεννητικής και μεταγεννητικής έκθεσης σε χημικές ουσίες. Όσον αφορά τα τελικά σημεία της αναπαραγωγής, προβλέπεται η χρήση, ως πρώτο βήμα και όταν υπάρχουν, πληροφοριών από μελέτες με επαναλαμβανόμενη δόση [συμπεριλαμβανομένων των μελετών διαλογής ως προς την τοξικότητα στην αναπαραγωγή, π.χ. κατευθυντήρια γραμμή του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή TG 422 (32)] ή από βραχυπρόθεσμους προσδιορισμούς διαλογής ενδοκρινικών διαταρακτών [π.χ. μητροτροφικός προσδιορισμός — μέθοδος δοκιμών B.54 (36) και προσδιορισμός Hershberger — μέθοδος δοκιμών B.55 (37)] για την ανίχνευση επιδράσεων στα αναπαραγωγικά όργανα των αρσενικών και των θηλυκών ζώων. Οι πληροφορίες αυτές είναι δυνατόν να περιλαμβάνουν τη σπερματογένεση (ιστοπαθολογία των όρχεων) στα αρσενικά ζώα και τον οιστρικό κύκλο, τους αριθμούς ωοθυλακίων/την ωρίμαση των ωοκυττάρων και την αρτιότητα των ωοθηκών (ιστοπαθολογία) στα θηλυκά. Η εκτεταμένη μελέτη τοξικότητας στην αναπαραγωγή μίας γενεάς λειτουργεί στη συνέχεια ως δοκιμή για τελικά σημεία της αναπαραγωγής τα οποία απαιτούν αλληλεπίδραση αρσενικών ζώων με θηλυκά, θηλυκών ζώων με το κυοφορούμενο και θηλυκών ζώων με απογόνους και ζώα της γενεάς F_1 έως μετά τη σεξουαλική ωρίμαση [βλ. καθοδηγητικό έγγραφο αριθ. 151 του ΟΟΣΑ που τεκμηριώνει την παρούσα μέθοδο δοκιμών (40)].

▼**M5**

5. Η μέθοδος δοκιμών έχει σχεδιαστεί για την αξιολόγηση των προγεννητικών και μεταγεννητικών επιδράσεων των χημικών ουσιών στην ανάπτυξη, καθώς και για την ενδελεχή αξιολόγηση της συστημικής τοξικότητας σε κυοφορούντα και θηλάζοντα θηλυκά ζώα και νεαρούς και ενήλικους απογόνους. Με τη λεπτομερή εξέταση βασικών τελικών σημείων της ανάπτυξης, όπως η βιωσιμότητα των απογόνων, η υγεία των νεογνών, η ανάπτυξη κατά τη γέννηση και η σωματική και λειτουργική ανάπτυξη έως την ενηλικίωση, αναμένεται ότι θα προσδιορίζονται συγκεκριμένα όργανα-στόχοι στους απογόνους. Επιπλέον, η μελέτη θα παρέχει και/ή θα επιβεβαιώνει πληροφορίες για τις επιδράσεις της εκάστοτε ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην αρτιότητα και στις επιδόσεις του αναπαραγωγικού συστήματος των ενήλικων αρσενικών και θηλυκών ζώων. Ειδικότερα, λαμβάνονται υπόψη, μεταξύ άλλων, οι ακόλουθες παράμετροι: λειτουργία των γονάδων, οιστρικός κύκλος, ωρίμαση του σπέρματος στις επιδιδυμίδες, συζευκτική συμπεριφορά, σύλληψη, κύηση, τοκετός και γαλουχία. Επιπροσθέτως, χάρη στις πληροφορίες που προέρχονται από τις αξιολογήσεις αναπτυξιακής νευροτοξικότητας και ανοσοτοξικότητας θα χαρακτηρίζονται οι ενδεχόμενες επιδράσεις στα συστήματα αυτά. Τα δεδομένα που προκύπτουν από τις εν λόγω δοκιμές αυτές αναμένεται ότι θα επιτρέπουν τον προσδιορισμό των επιπέδων στα οποία δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις (NOAEL), των κατώτατων επιπέδων στα οποία παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις (LOAEL) και/ή δόσεων αναφοράς για τα διάφορα τελικά σημεία και/ή θα χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό επιδράσεων που έχουν ανιχνευθεί σε προγενέστερες μελέτες με επαναλαμβανόμενη δόση και/ή θα χρησιμεύουν ως οδηγός για επόμενες δοκιμές.

6. Στο σχήμα 1 παρατίθεται σχεδιάγραμμα του πρωτοκόλλου. Η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται συνεχώς σε κλιμακωτές δόσεις σε διάφορες ομάδες σεξουαλικά ώριμων αρσενικών και θηλυκών ζώων. Χορηγούνται δόσεις στη γονική γενεά (P) κατά τη διάρκεια καθορισμένης περιόδου πριν από το ζευγάρωμα (που επιλέγεται βάσει των διαθέσιμων πληροφοριών για την ελεγχόμενη χημική ουσία, αλλά έχει ελάχιστη διάρκεια δύο εβδομάδων) και κατά την περίοδο ζευγαρώματος, που διαρκεί δύο εβδομάδες. Τα αρσενικά ζώα P υποβάλλονται περαιτέρω σε αγωγή τουλάχιστον έως τον απογαλακτισμό της γενεάς F_1. Η αγωγή αυτή θα πρέπει να έχει ελάχιστη διάρκεια 10 εβδομάδων και μπορεί να παρατείνεται, εάν χρειάζεται να διασαφηνιστούν επιδράσεις στην αναπαραγωγή. Η αγωγή των θηλυκών ζώων P συνεχίζεται κατά την κύηση και τη γαλουχία έως τη λήξη της μελέτης, μετά τον απογαλακτισμό των νεογνών τους (ήτοι, 8-10 εβδομάδες αγωγής). Οι απόγονοι F_1 υποβάλλονται σε περαιτέρω αγωγή με την ελεγχόμενη χημική ουσία από τον απογαλακτισμό έως την ενηλικίωσή τους. Εάν αξιολογείται δεύτερη γενεά [βλ. καθοδηγητικό έγγραφο αριθ. 117 του ΟΟΣΑ (39)], η αγωγή των απογόνων F_1 συνεχίζει έως τον απογαλακτισμό της γενεάς F_2 ή τη λήξη της μελέτης.

7. Όλα τα ζώα υποβάλλονται σε κλινικές παρατηρήσεις και παθολογικές εξετάσεις για σημεία τοξικότητας, με ιδιαίτερη έμφαση στην αρτιότητα και τις επιδόσεις των αρσενικών και θηλυκών αναπαραγωγικών συστημάτων, καθώς και στην υγεία, την αύξηση, την ανάπτυξη και τις λειτουργίες των απογόνων. Κατά τον απογαλακτισμό, επιλεγμένοι απόγονοι κατανέμονται σε συγκεκριμένες υποομάδες (κοόρτεις 1-3, βλ. παραγράφους 33 και 34 και σχήμα 1) για περαιτέρω διερεύνηση, η οποία καλύπτει, μεταξύ άλλων, τη σεξουαλική ωρίμαση, την αρτιότητα και τη λειτουργία των αναπαραγωγικών οργάνων, νευρολογικά και συμπεριφορικά τελικά σημεία και τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος.

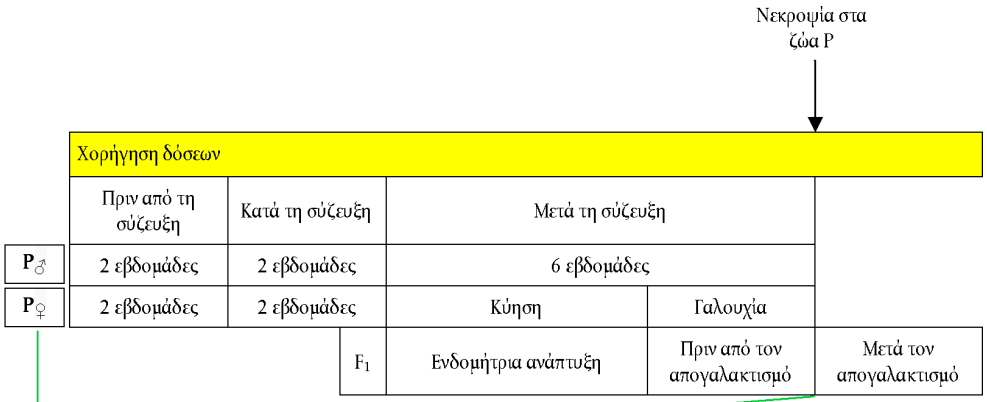
8. Κατά τη διεξαγωγή της μελέτης θα πρέπει να εφαρμόζονται οι γενικές αρχές και τα κριτήρια που περιγράφονται στο καθοδηγητικό έγγραφο αριθ. 19 του ΟΟΣΑ σχετικά με την αναγνώριση, την αξιολόγηση και τη χρήση κλινικών σημείων ως ανώδυνων τελικών σημείων για τα πειραματόζωα που χρησιμοποιούνται σε αξιολογήσεις ασφάλειας (34).

▼**M5**

9. Όταν θα είναι διαθέσιμος επαρκής αριθμός μελετών για να διαπιστωθεί ο αντίκτυπος αυτού του νέου σχεδιασμού της μελέτης, η μέθοδος δοκιμών θα επανεξεταστεί και, εάν κριθεί απαραίτητο, θα αναθεωρηθεί βάσει της πείρας που θα έχει αποκομιστεί.

Σχήμα 1

Σχεδιάγραμμα της εκτεταμένης μελέτης τοξικότητας στην αναπαραγωγή μίας γενεάς



Γονική γενεά	Κοόρτη	Χαρακτηρισμός	Ζώα/κοόρτη	Σεξουαλική ωρίμαση	Κατά προσέγγιση ηλικία κατά τη νεκροψία (σε εβδομάδες)
Στόχος είναι οι 20 γέννες ανά ομάδα	1A	Αναπαραγωγική	20 Α + 20 Θ	Ναί	13
	1B	Αναπαραγωγική	20 Α + 20 Θ	Ναί	14 ή 20-25, εάν ενεργοποιηθεί
	2A	Νευροτοξικότητα	10 Α + 10 Θ @	Ναί	11-12
	2B	Νευροτοξικότητα	10 Α + 10 Θ @	Όχι	3
	3	Ανοσοτοξικότητα	10 Α + 10 Θ @	Ναί	8
	Πλεόνασμα	Εφεδρικά ζώα		Όχι	3

@ ένα ανά γέννα και αντιπροσωπευτικό 20 γεννών συνολικά, ει δυνατόν

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ/ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΟΚΙΜΗ

Ζώα

Επιλογή είδους και στελέχους ζώων

10. Η επιλογή ζωικού είδους για τη δοκιμή τοξικότητας στην αναπαραγωγή θα πρέπει να μελετάται με προσοχή βάσει όλων των διαθέσιμων πληροφοριών. Ωστόσο, λόγω του όγκου των δεδομένων τεκμηρίωσης και της συγκρισιμότητας με τις δοκιμές γενικής τοξικότητας, προτιμώμενο είδος είναι συνήθως ο επίμυς, τον οποίο και αφορούν τα κριτήρια και οι συστάσεις της παρούσας μεθόδου δοκιμών. Σε περίπτωση χρήσης άλλου είδους, θα πρέπει να αναφέρονται οι σχετικοί λόγοι και απαιτούνται κατάλληλες τροποποιήσεις του πρωτοκόλλου. Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται στελέχη με χαμηλή γονιμότητα ή γνωστή υψηλή συχνότητα εμφάνισης (επίπτωση) αυτόματων αναπτυξιακών διαμαρτιών.

Κριτήρια σχετικά με την ηλικία, το σωματικό βάρος και την ένταξη στη μελέτη

11. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή γονικά ζώα, τα οποία δεν έχουν υποβληθεί σε πειραματικές διαδικασίες στο παρελθόν. Θα πρέπει να μελετώνται και τα δύο φύλα και τα θηλυκά ζώα να είναι άτοκα και να μη βρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης. Τα ζώα P πρέπει να είναι σεξουαλικά ώριμα, να έχουν παρόμοιο βάρος (ανάλογα με το φύλο) κατά την έναρξη της χορήγησης δόσεων, παρόμοια ηλικία (περίπου 90 ημερών) κατά το ζευγάρωμα και να είναι αντιπροσωπευτικά του είδους και του στελέχους που μελετάται. Μετά την άφιξή τους, τα ζώα θα πρέπει να εγκλιματίζονται για 5 τουλάχιστον ημέρες. Κατανέμονται τυχαία στις ομάδες μαρτύρων και αγωγής, κατά τρόπο ώστε οι μέσες τιμές σωματικού βάρους να είναι συγκρίσιμες μεταξύ των ομάδων (ήτοι ± 20 % της μέσης τιμής).

▼M5

Συνθήκες στέγασης και διατροφής

12. Η θερμοκρασία του θαλάμου πειραματόζωων θα πρέπει να είναι 22 °C (± 3 °C). Η σχετική υγρασία θα πρέπει να είναι 30-70 %, με ιδανικό εύρος τιμών 50-60 %. Ο τεχνητός φωτισμός ρυθμίζεται σε φωτοπερίοδο 12 ωρών. Μπορούν να χρησιμοποιούνται συμβατικά εργαστηριακά σιτηρέσια, με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού. Θα πρέπει να δίδεται ιδιαίτερη προσοχή στην περιεκτικότητα του σιτηρεσίου σε φυτοοιστρογόνα, διότι τα υψηλά επίπεδα φυτοοιστρογόνων στην τροφή είναι πιθανόν να επηρεάσουν ορισμένα τελικά σημεία της αναπαραγωγής. Συνιστάται η χρήση τυποποιημένων σιτηρεσίων ελεύθερης σύνθεσης, η περιεκτικότητα των οποίων σε χημικά οιστρογόνα έχει μειωθεί (2) (30). Όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται μέσω της τροφής, η επιλογή σιτηρεσίου ενδέχεται να επηρεάζεται από την ανάγκη κατάλληλης πρόσμειξης της ουσίας. Θα πρέπει να εξακριβώνονται η περιεκτικότητα, η ομοιογένεια και η σταθερότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο σιτηρέσιο. Η τροφή και το πόσιμο νερό θα πρέπει να υποβάλλονται σε τακτική ανάλυση για προσμείξεις. Δείγματα κάθε παρτίδας του σιτηρεσίου που χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια της μελέτης θα πρέπει να φυλάσσονται σε κατάλληλες συνθήκες (π.χ. κατεψυγμένα στους – 20 °C) έως την οριστικοποίηση της έκθεσης, για το ενδεχόμενο να απαιτηθεί περαιτέρω ανάλυση των συστατικών του σιτηρεσίου λόγω των αποτελεσμάτων.

13. Τα ζώα θα πρέπει να στεγάζονται σε κλωβούς σε μικρές ομάδες του ίδιου φύλου και της ίδιας αγωγής. Επιτρέπεται να στεγάζονται ατομικά προκειμένου να αποφευχθούν πιθανοί τραυματισμοί (π.χ. των αρσενικών ζώων μετά την περίοδο ζευγαρώματος). Οι διαδικασίες ζευγαρώματος θα πρέπει να εκτελούνται σε κατάλληλους κλωβούς. Αφού υπάρξουν ενδείξεις συνουσίας, τα θηλυκά ζώα που θεωρείται ότι κυοφορούν στεγάζονται χωριστά σε κλωβούς τοκετού, όπου τους παρέχονται κατάλληλα και καθορισμένα υλικά κατασκευής φωλιάς. Τα νεογνά στεγάζονται με τις μητέρες τους έως τον απογαλακτισμό. Τα ζώα της γενεάς F_1 θα πρέπει να στεγάζονται σε μικρές ομάδες του ίδιου φύλου και της ίδιας αγωγής από τον απογαλακτισμό έως τη λήξη της μελέτης. Εάν δικαιολογείται επιστημονικά, τα ζώα μπορούν να στεγάζονται ατομικά. Τα επίπεδα φυτοοιστρογόνων στο επιλεγμένο υλικό στρωμνής θα πρέπει να είναι ελάχιστα.

Αριθμός και ταυτοποίηση των ζώων

14. Κατά κανόνα, κάθε ομάδα αγωγής και μαρτύρων θα πρέπει να περιέχει επαρκή αριθμό αναπαραγωγικών ζευγών ώστε να προκύπτουν τουλάχιστον 20 κυοφορούντα θηλυκά ζώα ανά ομάδα δόσης. Στόχος είναι να προκαλούνται επαρκείς κυοφορίες για να εξασφαλίζεται η ουσιαστική αξιολόγηση της ικανότητας της χημικής ουσίας να επιδρά στη γονιμότητα, στην κύηση και στη μητρική συμπεριφορά των ζώων της γενεάς P, καθώς και στην αύξηση και την ανάπτυξη των απογόνων F_1 από τη σύλληψη ως την ενηλικίωση. Η αδυναμία επίτευξης του επιθυμητού αριθμού κυοφορούντων ζώων δεν ακυρώνει, κατ' ανάγκη, τη μελέτη και θα πρέπει να αξιολογείται κατά περίπτωση, λαμβανομένης υπόψη της πιθανής αιτιώδους σχέσης με την ελεγχόμενη χημική ουσία.

15. Κάθε ζώο P λαμβάνει αποκλειστικό αναγνωριστικό αριθμό πριν από την έναρξη της χορήγησης των δόσεων. Εάν τα ιστορικά δεδομένα του εργαστηρίου δείχνουν ότι ένα σημαντικό ποσοστό των θηλυκών ζώων ενδέχεται να μην έχουν τακτικό οιστρικό κύκλο (4 ή 5 ημερών), συνιστάται εκτίμηση του οιστρικού κύκλου πριν από την έναρξη της αγωγής. Εναλλακτική λύση είναι η αύξηση του μεγέθους της ομάδας, ώστε να εξασφαλίζεται ότι τουλάχιστον 20 θηλυκά ζώα σε κάθε ομάδα θα έχουν τακτικό οιστρικό κύκλο (4 ή 5 ημερών) κατά την έναρξη της αγωγής. Όλοι οι απόγονοι F_1 λαμβάνουν μοναδικό αναγνωριστικό αριθμό κατά την πρώτη εξέταση των νεογνών τη μεταγεννητική ημέρα (ΜΓΗ) 0 ή 1. Καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης θα πρέπει να τηρούνται αρχεία που να αναφέρουν τις γέννες από τις οποίες προέρχονται όλα τα ζώα F_1 και, κατά περίπτωση, τα ζώα F_2.

▼M5

Ελεγχόμενη χημική ουσία

Διαθέσιμες πληροφορίες για την ελεγχόμενη χημική ουσία

16. Η ανασκόπηση των υφιστάμενων πληροφοριών είναι σημαντική για τη λήψη αποφάσεων σχετικά με την οδό χορήγησης, την επιλογή φορέα, ζωικού είδους και δοσολογίας και με τις ενδεχόμενες τροποποιήσεις του δοσολογικού σχήματος. Συνεπώς, όταν προγραμματίζεται η εκτεταμένη μελέτη τοξικότητας στην αναπαραγωγή μίας γενεάς, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όλες οι σχετικές διαθέσιμες πληροφορίες για την ελεγχόμενη χημική ουσία, ήτοι φυσικοχημικές, τοξικοκινητικές (συμπεριλαμβανομένου του μεταβολισμού στο συγκεκριμένο είδος) και τοξικοδυναμικές ιδιότητες, σχέσεις δομής-δράσης, μεταβολικές διαδικασίες in vitro, αποτελέσματα προγενέστερων μελετών τοξικότητας και αντίστοιχες πληροφορίες για ουσίες ανάλογης δομής. Προκαταρκτικές πληροφορίες για την απορρόφηση, την κατανομή, τον μεταβολισμό και την απέκκριση (ADME), καθώς και για τη βιοσυσσώρευση, είναι δυνατόν να προκύψουν από τη χημική δομή, τα φυσικοχημικά δεδομένα και από μελέτες με αντικείμενο τον βαθμό σύνδεσης με πρωτεΐνες του πλάσματος ή την τοξικοκινητική, ενώ τα αποτελέσματα μελετών τοξικότητας παρέχουν συμπληρωματικές πληροφορίες, π.χ. για το επίπεδο NOAEL, τον μεταβολισμό ή την επαγωγή μεταβολισμού.

Εξέταση τοξικοκινητικών δεδομένων

17. Τα τοξικοκινητικά δεδομένα από μελέτες καθορισμού εύρους δόσεων ή άλλες μελέτες που έχουν διεξαχθεί στο παρελθόν, παρόλο που δεν απαιτούνται, είναι εξαιρετικά χρήσιμα για τον σχεδιασμό της μελέτης, την επιλογή των επιπέδων δόσης και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Ιδιαιτέρως χρήσιμα είναι τα δεδομένα που 1) επαληθεύουν την έκθεση των αναπτυσσόμενων εμβρύων και νεογνών στην ελεγχόμενη χημική ουσία (ή στους αντίστοιχους μεταβολίτες), 2) παρέχουν εκτιμήσεις εσωτερικής δοσιμετρίας και 3) αξιολογούν τον δυνητικό δοσοεξαρτώμενο κορεσμό των διαδικασιών κινητικής. Θα πρέπει να εξετάζονται επίσης, εφόσον είναι διαθέσιμα, και επιπλέον τοξικοκινητικά δεδομένα, όπως η τυπολογία των μεταβολιτών, η πορεία της συγκέντρωσης συναρτήσει του χρόνου κ.λπ. Συμπληρωματικά τοξικοκινητικά δεδομένα είναι επίσης δυνατόν να συγκεντρωθούν κατά τη διάρκεια της κυρίως μελέτης, υπό τον όρο ότι δεν παρεμποδίζεται η συλλογή και ερμηνεία των τελικών σημείων της.

Γενικά, το ακόλουθο σύνολο τοξικοκινητικών δεδομένων είναι χρήσιμο για τον προγραμματισμό της εκτεταμένης μελέτης τοξικότητας στην αναπαραγωγή μίας γενεάς:

— προχωρημένη κύηση (π.χ. 20ή ημέρα κύησης) — αίμα από τη μητέρα και το έμβρυο·

— μέσα της γαλουχίας (10η ΜΓΗ) — αίμα από τη μητέρα και το νεογνό και/ή γάλα·

— αρχές του απογαλακτισμού (π.χ. 28η ΜΓΗ) — δείγματα αίματος από τα απογαλακτισμένα ζώα.

Απαιτείται ευελιξία κατά τον προσδιορισμό των ειδικών αναλυτών (π.χ. μητρική χημική ουσία και/ή μεταβολίτες) και του σχήματος δειγματοληψίας. Παραδείγματος χάριν, ο αριθμός των δειγμάτων και η ώρα συλλογής τους σε μια δεδομένη ημέρα δειγματοληψίας εξαρτώνται από την οδό έκθεσης και τις υφιστάμενες γνώσεις σχετικά με τις τοξικοκινητικές ιδιότητες σε μη κυοφορούντα ζώα. Στην περίπτωση των διατροφικών μελετών, αρκεί η λήψη δειγμάτων μια σταθερή ώρα κάθε ημέρας δειγματοληψίας, ενώ η χορήγηση δόσεων με στομαχικό καθετήρα ενδέχεται να καθιστά αναγκαία την προσθήκη και άλλων χρόνων δειγματοληψίας προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερη εκτίμηση του εύρους των εσωτερικών δόσεων. Ωστόσο, δεν είναι απαραίτητο να προκύπτει πλήρης πορεία της συγκέντρωσης συναρτήσει του χρόνου όλες τις ημέρες δειγματοληψίας. Εάν είναι απαραίτητο, τα δείγματα αίματος μπορούν να συνενώνονται ανά φύλο στο εσωτερικό της ίδιας γέννας για τις αναλύσεις στα έμβρυα και τα νεογνά.

▼M5

Οδός χορήγησης

18. Για την επιλογή της οδού χορήγησης θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι οδοί με τη μεγαλύτερη συνάφεια προς την έκθεση του ανθρώπου. Παρόλο που το πρωτόκολλο έχει σχεδιαστεί για τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας μέσω της τροφής, μπορεί να τροποποιηθεί για χορήγηση μέσω άλλων οδών (πόσιμο νερό, στομαχικός καθετήρας, εισπνοή, δέρμα) ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της χημικής ουσίας και τις απαιτούμενες πληροφορίες.

Επιλογή του φορέα

19. Εφόσον είναι αναγκαίο, παρασκευάζεται διάλυμα ή εναιώρημα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε κατάλληλο φορέα. Συνιστάται να εξετάζεται πρώτα, στο μέτρο του δυνατού, η χρήση υδατικών διαλυμάτων/εναιωρημάτων, με δεύτερα κατά σειρά προτίμησης τα διαλύματα/εναιωρήματα σε έλαιο (π.χ. αραβοσιτέλαιο). Σε περίπτωση που ο φορέας δεν είναι το νερό, θα πρέπει να είναι γνωστά τα τοξικά χαρακτηριστικά του. Θα πρέπει να αποφεύγεται η χρήση φορέων με δυνητική εγγενή τοξικότητα (π.χ. ακετόνη, DMSO) και να προσδιορίζεται η σταθερότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στον φορέα. Εάν χρησιμοποιείται φορέας ή άλλο πρόσθετο για τη διευκόλυνση της χορήγησης των δόσεων, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: επιδράσεις στην απορρόφηση, την κατανομή, τον μεταβολισμό ή την κατακράτηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, επιδράσεις στις χημικές της ιδιότητες που είναι δυνατόν να μεταβάλουν τα τοξικά χαρακτηριστικά της και επιδράσεις στην κατανάλωση τροφής ή νερού ή στη διατροφική κατάσταση των ζώων.

Επιλογή δόσεων

20. Η μελέτη θα πρέπει κανονικά να περιλαμβάνει τρία τουλάχιστον επίπεδα δόσεων και έναν συντρέχοντα μάρτυρα. Κατά την επιλογή κατάλληλων επιπέδων δόσης, ο ερευνητής θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη όλες τις διαθέσιμες πληροφορίες, μεταξύ άλλων, πληροφορίες για τη χορήγηση δόσεων από προγενέστερες μελέτες, τοξικοκινητικά δεδομένα για κυοφορούντα ή μη ζώα, τον βαθμό μεταφοράς μέσω του θηλασμού και εκτιμήσεις της έκθεσης του ανθρώπου. Εάν υπάρχουν τοξικοκινητικά δεδομένα που καταδεικνύουν δοσοεξαρτώμενο κορεσμό των τοξικοκινητικών διαδικασιών, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για την αποφυγή των υψηλών επιπέδων δόσης που εμφανίζουν σαφώς κορεσμό, υπό τον όρο, βεβαίως, ότι η έκθεση του ανθρώπου αναμένεται να είναι αρκετά μικρότερη από το σημείο κορεσμού. Στις περιπτώσεις αυτές, το ανώτατο επίπεδο δόσης θα πρέπει να είναι το σημείο καμπής για μετάβαση σε μη γραμμική τοξικοκινητική συμπεριφορά ή ελάχιστα υψηλότερο.

21. Εάν δεν υπάρχουν σχετικά τοξικοκινητικά δεδομένα, τα επίπεδα δόσης θα πρέπει να βασίζονται στις τοξικές επιδράσεις, εκτός εάν τα περιορίζουν οι φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Εάν τα επίπεδα δόσης βασίζονται στην τοξικότητα, η μέγιστη δόση θα πρέπει να επιλέγεται με στόχο να επαχθεί ως έναν βαθμό συστημική τοξικότητα, χωρίς όμως να προκληθεί θάνατος ή μεγάλη ταλαιπωρία στα ζώα.

22. Θα πρέπει να επιλέγεται φθίνουσα σειρά επιπέδων δόσης, ώστε να καταδεικνύονται οι σχετιζόμενες με τη δόση επιδράσεις και να καθορίζονται τιμές NOAEL ή δόσεις κοντά στο όριο ανίχνευσης, που καθιστούν δυνατό τον προσδιορισμό δόσεων αναφοράς για τα πλέον ευαίσθητα τελικά σημεία. Συχνά, η βέλτιστη επιλογή για να μην απέχουν πολύ οι δόσεις μεταξύ των επιπέδων NOAEL και LOAEL είναι η χρησιμοποίηση υποδιπλάσιων ή υποτετραπλάσιων διαστημάτων. Η προσθήκη μιας τέταρτης ομάδας δοκιμής είναι πολλές φορές προτιμότερη από τη χρησιμοποίηση πολύ μεγάλων διαστημάτων μεταξύ των δόσεων (π.χ. με λόγο ακολουθίας άνω του 10).

23. Εκτός από τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τα ζώα της ομάδας μαρτύρων υφίστανται την ίδια ακριβώς μεταχείριση όπως τα υποκείμενα των ομάδων δοκιμής. Η ομάδα αυτή θα πρέπει να μην υποβάλλεται σε αγωγή ή να υποβάλλεται σε εικονική αγωγή ή, όταν χρησιμοποιείται φορέας για τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, να είναι ομάδα μαρτύρων με τον φορέα. Εάν χρησιμοποιείται φορέας, πρέπει να χορηγείται στην ομάδα μαρτύρων στον μέγιστο χρησιμοποιούμενο όγκο.

▼M5

Οριακή δοκιμή

24. Εάν δεν έχει διαπιστωθεί τοξικότητα με δόση τουλάχιστον 1 000 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα σε μελέτες με επαναλαμβανόμενη δόση ή εάν δεν αναμένεται να προκληθεί τοξικότητα, με βάση δεδομένα που αφορούν χημικές ουσίες αντίστοιχης δομής και/ή μεταβολισμού και υποδηλώνουν παρόμοιες μεταβολικές ιδιότητες in vivo/in vitro, ενδέχεται να μη είναι απαραίτητη μια μελέτη με χρήση πολλών επιπέδων δόσης. Στις περιπτώσεις αυτές, η εκτεταμένη μελέτη τοξικότητας στην αναπαραγωγή μίας γενεάς θα μπορούσε να διεξαχθεί με τη χρήση μίας ομάδας μαρτύρων και μίας μόνο δόσης τουλάχιστον 1 000 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα. Ωστόσο, εάν διαπιστωθεί αναπαραγωγική ή αναπτυξιακή τοξικότητα με αυτή την οριακή δόση, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες με χαμηλότερα επίπεδα δόσης για τον προσδιορισμό του NOAEL. Οι σχετικές με την οριακή δοκιμή εκτιμήσεις ισχύουν μόνο εφόσον η ανθρώπινη έκθεση δεν καθιστά αναγκαία τη χρήση υψηλότερου επιπέδου δόσης.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ

Έκθεση των απογόνων

25. Η έκθεση μέσω της τροφής είναι η προτιμώμενη μέθοδος χορήγησης. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, στις μελέτες με χρήση στομαχικού καθετήρα, τα νεογνά λαμβάνουν κατά κανόνα την ελεγχόμενη χημική ουσία μόνον έμμεσα μέσω του γάλακτος, μέχρις ότου αρχίσει η απευθείας χορήγηση δόσεων σε αυτά μετά τον απογαλακτισμό. Στις μελέτες έκθεσης μέσω της τροφής ή του πόσιμου νερού, τα νεογνά λαμβάνουν επιπροσθέτως την ελεγχόμενη χημική ουσία άμεσα, όταν αρχίζουν να τρώνε μόνα τους κατά τη διάρκεια της τελευταίας εβδομάδας της περιόδου γαλουχίας. Όταν η απέκκριση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο γάλα είναι περιορισμένη και όταν υπάρχει έλλειψη στοιχείων σχετικά με τη συνεχή έκθεση των απογόνων, θα πρέπει να μελετάται η τροποποίηση του σχεδιασμού της μελέτης. Στις περιπτώσεις αυτές, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο απευθείας χορήγησης δόσεων στα νεογνά κατά την περίοδο της γαλουχίας βάσει των διαθέσιμων τοξικοκινητικών πληροφοριών, της τοξικότητας στους απογόνους ή αλλαγών στους βιοδείκτες (3) (4). Πρέπει να μελετώνται προσεκτικά τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα πριν από τη διεξαγωγή δοκιμής με απευθείας χορήγηση δόσεων σε νεογνά που θηλάζουν (5).

Δοσολογικό σχήμα και χορήγηση των δόσεων

26. Ενδέχεται να υπάρχουν ορισμένες πληροφορίες για τον οιστρικό κύκλο, την ιστοπαθολογία του αρσενικού και του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος και την ανάλυση του σπέρματος στους όρχεις/στις επιδιδυμίδες από προγενέστερες, κατάλληλης διάρκειας, μελέτες τοξικότητας με επαναλαμβανόμενη δόση. Ως εκ τούτου, η διάρκεια της αγωγής πριν από το ζευγάρωμα στη εκτεταμένη μελέτη τοξικότητας στην αναπαραγωγή μίας γενεάς στοχεύει στην ανίχνευση των επιδράσεων σε λειτουργικές αλλαγές, που ενδέχεται να παρεμποδίζουν τη συζευκτική συμπεριφορά και τη γονιμοποίηση. Η αγωγή πριν από το ζευγάρωμα πρέπει να έχει αρκετά μεγάλη διάρκεια ώστε να επιτυγχάνονται σταθερές συνθήκες έκθεσης των αρσενικών και θηλυκών ζώων P. Στις περισσότερες περιπτώσεις, θεωρείται επαρκής μια αγωγή διάρκειας 2 εβδομάδων πριν από το ζευγάρωμα και στα δύο φύλα. Στα θηλυκά ζώα, η διάρκεια αυτή καλύπτει 3-4 πλήρεις οιστρικούς κύκλους και κανονικά επαρκεί για την ανίχνευση δυσμενών επιδράσεων στην κυκλικότητα. Στα αρσενικά ζώα, ισοδυναμεί με τον χρόνο που απαιτείται για τη διέλευση των σπερματοζωαρίων που ωριμάζουν από τις επιδιδυμίδες και κανονικά επιτρέπει την ανίχνευση επιδράσεων στο σπέρμα μετά την έξοδό του από τους όρχεις (κατά τα τελικά στάδια της σπερμίασης και της ωρίμασης του σπέρματος στις επιδιδυμίδες) κατά το ζευγάρωμα. Κατά τη λήξη της μελέτης, όταν έχουν προγραμματιστεί ιστοπαθολογικές εξετάσεις των όρχεων και των επιδιδυμίδων και ανάλυση των παραμέτρων του σπέρματος, τα αρσενικά ζώα P και F_1 θα έχουν εκτεθεί τουλάχιστον για μία ολόκληρη διαδικασία σπερματογένεσης [(6) (7) (8) (9) και καθοδηγητικό έγγραφο αριθ. 151 του ΟΟΣΑ (40)].

▼M5

27. Τα σενάρια έκθεσης των αρσενικών ζώων πριν από το ζευγάρωμα μπορούν να προσαρμοστούν, εάν έχουν διαπιστωθεί σαφώς σε προγενέστερες μελέτες τοξικότητα στους όρχεις (μείωση της σπερματογένεσης) ή επιδράσεις στην αρτιότητα και τη λειτουργία του σπέρματος. Αντιστοίχως, στα θηλυκά ζώα, οι γνωστές επιδράσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στον οιστρικό κύκλο και, κατ' επέκταση, στη σεξουαλική δεκτικότητα μπορεί να δικαιολογούν διαφορετικά σενάρια έκθεσης πριν από το ζευγάρωμα. Σε ειδικές περιπτώσεις, ενδέχεται να είναι αποδεκτή η έναρξη της αγωγής των θηλυκών ζώων P μόνο αφού ληφθεί πρώτα θετικό για σπέρμα επίχρισμα [βλ. καθοδηγητικό έγγραφο αριθ. 151 του ΟΟΣΑ (40)].

28. Μετά τον καθορισμό της περιόδου χορήγησης δόσεων πριν από το ζευγάρωμα, τα ζώα θα πρέπει να λαμβάνουν συνεχώς την ελεγχόμενη χημική ουσία, 7 ημέρες την εβδομάδα, έως τη νεκροψία. Οι δόσεις θα πρέπει να χορηγούνται σε όλα τα ζώα με την ίδια μέθοδο. Η χορήγηση των δόσεων θα πρέπει να συνεχίζεται κατά τη διάρκεια της περιόδου ζευγαρώματος που διαρκεί 2 εβδομάδες και, στα θηλυκά ζώα P, καθ' όλη τη διάρκεια της κύησης και της γαλουχίας έως την ημέρα θανάτωσης μετά τον απογαλακτισμό. Η αγωγή θα πρέπει να χορηγείται στα αρσενικά ζώα με τον ίδιο τρόπο έως τη θανάτωση κατά τον χρόνο απογαλακτισμού των ζώων F_1. Όσον αφορά τη νεκροψία, θα πρέπει να δίδεται προτεραιότητα στα θηλυκά ζώα, που πρέπει να νεκροτομούνται την ίδια ή παραπλήσια ημέρα γαλουχίας. Η νεκροψία των αρσενικών ζώων μπορεί να εκτείνεται σε περισσότερες ημέρες, ανάλογα με τις εργαστηριακές εγκαταστάσεις. Η απευθείας χορήγηση δόσεων στα επιλεγμένα αρσενικά και θηλυκά ζώα F_1, εάν δεν έχει αρχίσει κατά τη διάρκεια της γαλουχίας, θα πρέπει να αρχίζει κατά τον απογαλακτισμό και να συνεχίζεται έως την προγραμματισμένη νεκροψία, ανάλογα με την ένταξη στις ομάδες μελέτης.

29. Στην περίπτωση των χημικών ουσιών που χορηγούνται μέσω της τροφής ή του πόσιμου νερού, έχει σημασία να εξασφαλίζεται ότι οι χορηγούμενες ποσότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας δεν επηρεάζουν το φυσιολογικό ισοζύγιο τροφής ή νερού. Όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται μέσω της τροφής, μπορεί να χρησιμοποιείται είτε μια σταθερή συγκέντρωση στο σιτηρέσιο (ppm) είτε ένα σταθερό επίπεδο δόσης ως προς το σωματικό βάρος του ζώου. Η επιλογή μεταξύ των δύο εναλλακτικών δυνατοτήτων θα πρέπει να προσδιορίζεται.

30. Όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με στομαχικό καθετήρα, ο όγκος υγρού που χορηγείται κάθε φορά θα πρέπει κανονικά να μην υπερβαίνει το 1 ml/100 g σωματικού βάρους (το ανώτατο όριο είναι 0,4 ml/100 g σωματικού βάρους σε περίπτωση χρήσης ελαίου, π.χ. αραβοσιτελαίου). Με εξαίρεση τις ερεθιστικές ή διαβρωτικές χημικές ουσίες, των οποίων οι επιδράσεις κανονικά επιδεινώνονται από τις υψηλότερες συγκεντρώσεις, η μεταβλητότητα του όγκου δοκιμής θα πρέπει να ελαχιστοποιείται με ρύθμιση της συγκέντρωσης, ώστε να εξασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλα τα επίπεδα δόσης. Η αγωγή θα πρέπει να χορηγείται την ίδια περίπου ώρα κάθε ημέρα. Η χορηγούμενη σε κάθε ζώο δόση θα πρέπει κανονικά να βασίζεται στον πλέον πρόσφατο προσδιορισμό του σωματικού βάρους του και να ρυθμίζεται τουλάχιστον εβδομαδιαίως στα ενήλικα αρσενικά και τα ενήλικα μη κυοφορούντα θηλυκά ζώα και ανά δύο ημέρες στα κυοφορούντα θηλυκά ζώα και στα ζώα F_1, όταν χορηγείται πριν από τον απογαλακτισμό και κατά τις 2 εβδομάδες που έπονται του απογαλακτισμού. Εάν τα τοξικοκινητικά δεδομένα δείχνουν χαμηλή μεταφορά της ελεγχόμενης χημικής ουσίας μέσω του πλακούντα, η δόση που χορηγείται με στομαχικό καθετήρα κατά την τελευταία εβδομάδα της κύησης ενδέχεται να πρέπει να ρυθμιστεί ώστε να προληφθεί η χορήγηση υπερβολικά τοξικής δόσης στη μητέρα. Τα θηλυκά ζώα δεν θα πρέπει να υποβάλλονται στην αγωγή με στομαχικό καθετήρα ή από οποιαδήποτε άλλη οδό απαιτεί χειρισμό των ζώων κατά την ημέρα του τοκετού. Είναι προτιμότερο να παραλείπεται η χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας τη συγκεκριμένη ημέρα παρά να διαταράσσεται η διαδικασία της γέννησης.

▼M5

Ζευγάρωμα

31. Κάθε θηλυκό ζώο P θα πρέπει να τοποθετείται μαζί με ένα μόνο, τυχαία επιλεγμένο και μη συγγενικό αρσενικό από την ίδια ομάδα δόσης (ζεύγη 1:1) μέχρις να παρατηρηθούν ενδείξεις συνουσίας ή να παρέλθουν 2 εβδομάδες. Εάν δεν υπάρχει επαρκής αριθμός αρσενικών ζώων, παραδείγματος χάριν λόγω θανάτου πριν από τον σχηματισμό των αναπαραγωγικών ζευγών, αρσενικά ζώα που έχουν ήδη συζευχθεί επιτρέπεται να συζευχθούν (1:1) με δεύτερο θηλυκό ώστε να συζευχθούν όλα τα θηλυκά ζώα. Ως ημέρα 0 της κύησης ορίζεται η ημέρα κατά την οποία επιβεβαιώνονται οι ενδείξεις ζευγαρώματος (ανιχνεύεται κολπικό βύσμα ή σπέρμα). Τα ζώα θα πρέπει να αποχωρίζονται το συντομότερο δυνατό μετά την παρατήρηση ενδείξεων συνουσίας. Ελλείψει ζευγαρώματος μετά από 2 εβδομάδες, τα ζώα θα πρέπει να αποχωρίζονται χωρίς να τους δίνεται άλλη ευκαιρία ζευγαρώματος. Στα δεδομένα θα πρέπει να προσδιορίζονται σαφώς τα αναπαραγωγικά ζεύγη.

Μέγεθος γέννας

32. Κατά την τέταρτη ημέρα μετά τη γέννηση, το μέγεθος κάθε γέννας μπορεί να διορθωθεί με την απομάκρυνση πλεοναζόντων νεογνών με τυχαία επιλογή, ώστε να προκύψουν αριθμοί ζώων ανά φύλο όσο το δυνατόν πλησιέστεροι στα πέντε αρσενικά και πέντε θηλυκά ζώα ανά γέννα. Δεν είναι ορθή η επιλεκτική απομάκρυνση νεογνών, π.χ. βάσει του σωματικού βάρους. Όταν ο αριθμός των αρσενικών ή θηλυκών νεογνών δεν επιτρέπει την επίτευξη πέντε ζώων ανά φύλο ανά γέννα, είναι αποδεκτή η μερική προσαρμογή (π.χ. έξι αρσενικά και τέσσερα θηλυκά).

Επιλογή νεογνών για μελέτες μετά τον απογαλακτισμό (βλ. σχήμα 1)

33. Μετά τον απογαλακτισμό (περίπου την 21η ΜΓΗ) επιλέγονται έως 20 νεογνά ανά ομάδα δόσης και μαρτύρων, από όλες τις γέννες, για περαιτέρω εξετάσεις και διατηρούνται έως τη σεξουαλική τους ωρίμαση (εκτός εάν απαιτείται να υποβληθούν σε εξετάσεις νωρίτερα). Τα νεογνά επιλέγονται τυχαία, χωρίς όμως να συμπεριλαμβάνονται εμφανώς καχεκτικά ζώα (ζώα με σωματικό βάρος μικρότερο του μέσου βάρους των νεογνών της οικείας γέννας κατά περισσότερο από δύο τυπικές αποκλίσεις), διότι πιθανότατα δεν είναι αντιπροσωπευτικά της ομάδας αγωγής.

Την 21η ΜΓΗ τα επιλεγμένα νεογνά F_1 κατανέμονται τυχαία σε μία από τις ακόλουθες τρεις κοόρτεις ζώων:

Κοόρτη 1 (1Α και 1Β) = Δοκιμή αναπαραγωγικής/αναπτυξιακής τοξικότητας

Κοόρτη 2 (2Α και 2Β) = Δοκιμή αναπτυξιακής νευροτοξικότητας

Κοόρτη 3 = Δοκιμή αναπτυξιακής ανοσοτοξικότητας.

Κοόρτη 1Α: ένα αρσενικό και ένα θηλυκό νεογνό/γέννα/ομάδα (20/φύλο/ομάδα) — επιλογή κατά προτεραιότητα για τη βασική αξιολόγηση των επιδράσεων στα αναπαραγωγικά συστήματα και της γενικής τοξικότητας.

Κοόρτη 1Β: ένα αρσενικό και ένα θηλυκό νεογνό/γέννα/ομάδα (20/φύλο/ομάδα) — επιλογή κατά προτεραιότητα για συνέχεια στην αξιολόγηση των αναπαραγωγικών επιδόσεων με το ζευγάρωμα ζώων F_1, όταν δίδεται συνέχεια [βλ. καθοδηγητικό έγγραφο αριθ. 117 του ΟΟΣΑ (39)], και για τη συγκέντρωση συμπληρωματικών ιστοπαθολογικών δεδομένων, σε περίπτωση υπονοιών για τοξικές για το αναπαραγωγικό ή το ενδοκρινικό σύστημα ουσίες ή όταν τα αποτελέσματα της κοόρτης 1Α είναι αμφίσημα.

Κοόρτη 2Α: συνολικά 20 νεογνά ανά ομάδα (10 αρσενικά και 10 θηλυκά ανά ομάδα, ένα αρσενικό ή ένα θηλυκό ανά γέννα), για νευροσυμπεριφορικές δοκιμασίες και, στη συνέχεια, ιστοπαθολογική αξιολόγηση ως ενήλικα ζώα.

Κοόρτη 2Β: συνολικά 20 νεογνά ανά ομάδα (10 αρσενικά και 10 θηλυκά ανά ομάδα, ένα αρσενικό ή ένα θηλυκό ανά γέννα), για νευρο-ιστοπαθολογική αξιολόγηση κατά τον απογαλακτισμό (την 21η ή 22η ΜΓΗ). Εάν δεν υπάρχει επαρκής αριθμός ζώων, θα πρέπει να δίνεται προτεραιότητα στην τοποθέτηση ζώων στην κοόρτη 2Α.

▼M5

Κοόρτη 3: συνολικά 20 νεογνά ανά ομάδα (10 αρσενικά και 10 θηλυκά ανά ομάδα, ένα ανά γέννα, εάν είναι δυνατόν). Ενδέχεται να απαιτούνται επιπλέον νεογνά από την ομάδα μαρτύρων για να χρησιμεύσουν ως θετικοί μάρτυρες στον προσδιορισμό εξαρτώμενης από κύτταρα Τ απόκρισης αντισωμάτων (TDAR) την (56 ± 3)η ΜΓΗ.

34. Εάν δεν υπάρχει επαρκής αριθμός νεογνών σε μια γέννα για να καλυφθούν όλες οι κοόρτεις, προηγείται η κοόρτη 1, καθώς μπορεί να διευρυνθεί για την παραγωγή γενεάς F_2. Είναι δυνατόν να τοποθετηθούν επιπλέον νεογνά σε οποιαδήποτε κοόρτη σε περίπτωση συγκεκριμένων ανησυχιών, π.χ. εάν υπάρχουν υπόνοιες ότι μια χημική ουσία είναι νευροτοξική, ανοσοτοξική ή τοξική για την αναπαραγωγή. Τα νεογνά αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για εξετάσεις σε διαφορετικούς χρόνους ή για την αξιολόγηση συμπληρωματικών τελικών σημείων. Τα νεογνά που δεν τοποθετούνται σε κοόρτη υποβάλλονται σε κλινικές βιοχημικές εξετάσεις (παράγραφος 55) και σε νεκροψία-νεκροτομή (παράγραφος 68).

Δεύτερο ζευγάρωμα των ζώων P

35. Κατά κανόνα, δεν συνιστάται δεύτερο ζευγάρωμα των ζώων P, επειδή συνεπάγεται απώλεια σημαντικών πληροφοριών για τον αριθμό των θέσεων εμφύτευσης όσον αφορά την πρώτη γέννα (και κατ' επέκταση, δεδομένων για απώλειες μετά την εμφύτευση και κατά την περιγεννητική περίοδο, τα οποία αποτελούν δείκτες πιθανού δυναμικού τερατογένεσης). Η ανάγκη επαλήθευσης ή διαλεύκανσης μιας επίδρασης σε θηλυκά ζώα που έχουν εκτεθεί εξυπηρετείται καλύτερα με τη διεύρυνση της μελέτης ώστε να περιλαμβάνει ζευγάρωμα ζώων της γενεάς F_1. Ωστόσο, το δεύτερο ζευγάρωμα αρσενικών ζώων P με θηλυκά που δεν έχουν υποβληθεί σε αγωγή δεν παύει να αποτελεί επιλογή για τη διασαφήνιση αμφίσημων ευρημάτων ή για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό των επιδράσεων στη γονιμότητα που παρατηρούνται κατά το πρώτο ζευγάρωμα.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ ΕΝ ΖΩΗ

Κλινικές παρατηρήσεις

36. Τα ζώα P και τα επιλεγμένα ζώα F_1 υποβάλλονται καθημερινά σε γενική κλινική παρατήρηση. Σε περίπτωση χορήγησης των δόσεων με στομαχικό καθετήρα, οι κλινικές παρατηρήσεις θα πρέπει να διεξάγονται πριν και μετά τη χορήγηση της δόσης (για πιθανά σημεία τοξικότητας που συνδέονται με τη μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα). Καταγράφονται οι σχετικές αλλαγές στη συμπεριφορά, τα σημεία δύσκολου ή παρατεταμένου τοκετού και κάθε σημείο τοξικότητας. Δύο φορές ημερησίως (μία φορά ημερησίως το Σαββατοκύριακο), όλα τα ζώα παρατηρούνται για σοβαρή τοξικότητα, νοσηρότητα και θνησιμότητα.

37. Επιπλέον, όλα τα ζώα P και F_1 (μετά τον απογαλακτισμό) υποβάλλονται εβδομαδιαίως σε λεπτομερέστερη εξέταση, η οποία, για ευκολία, μπορεί να συνδυάζεται με τη ζύγιση του ζώου, ώστε να ελαχιστοποιείται το άγχος που προκαλούν στα ζώα οι χειρισμοί. Οι παρατηρήσεις θα πρέπει να διεξάγονται και να καταγράφονται επιμελώς, με τη χρήση συστημάτων βαθμολόγησης που έχουν καθοριστεί από το εκάστοτε εργαστήριο. Θα πρέπει να καταβάλλεται προσπάθεια ώστε να ελαχιστοποιούνται οι διακυμάνσεις των συνθηκών δοκιμής. Σημεία που θα πρέπει να καταγράφονται είναι, μεταξύ άλλων, αλλαγές στο δέρμα, το τρίχωμα, τους οφθαλμούς και τους βλεννογόνους, εκκρίσεις και απεκκρίσεις, καθώς και δραστηριότητα του αυτόνομου νευρικού συστήματος (π.χ. δακρύρροια, ανόρθωση τριχών, μεταβολή του μεγέθους της κόρης του οφθαλμού, ασυνήθης ρυθμός αναπνοής). Θα πρέπει να καταγράφονται επίσης οι αλλαγές στη βάδιση, τη στάση του σώματος και την αντίδραση στους χειρισμούς, καθώς και η εμφάνιση κλονικών ή τονικών κρίσεων, στερεότυπων κινήσεων (όπως υπερβολική περιποίηση του τριχώματος, συνεχείς περιστροφές) ή περίεργης συμπεριφοράς (π.χ. αυτοακρωτηριασμός, οπισθοβάδιση).

▼M5

Σωματικό βάρος και κατανάλωση τροφής/νερού

38. Τα ζώα P ζυγίζονται την πρώτη ημέρα χορήγησης δόσεων και, στη συνέχεια, τουλάχιστον σε εβδομαδιαία βάση. Επιπλέον, τα θηλυκά ζώα P ζυγίζονται κατά τη γαλουχία την ίδια ημέρα με τα νεογνά τους (βλ. παράγραφο 44). Κάθε ζώο F_1 ζυγίζεται κατά τον απογαλακτισμό (21η ΜΓΗ) και, στη συνέχεια, τουλάχιστον σε εβδομαδιαία βάση. Το σωματικό βάρος καταγράφεται επίσης την ημέρα που φτάνουν στην ήβη (ολοκλήρωση του διαχωρισμού της πόσθης ή του ανοίγματος του κόλπου). Όλα τα ζώα ζυγίζονται όταν θανατώνονται.

39. Κατά τη διάρκεια της μελέτης, καταγράφεται η κατανάλωση τροφής και νερού (εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται μέσω του πόσιμου νερού), τουλάχιστον σε εβδομαδιαία βάση και την ίδια ημέρα με το σωματικό βάρος των ζώων (εκτός από την περίοδο της συμβίωσης). Η κατανάλωση τροφής σε κάθε κλωβό ζώων F_1 καταγράφεται σε εβδομαδιαία βάση, με αφετηρία την επιλογή του ζώου για κοόρτη.

Οιστρικοί κύκλοι

40. Προκαταρκτικές πληροφορίες για τις σχετικές με την ελεγχόμενη χημική ουσία επιδράσεις στον οιστρικό κύκλο ενδέχεται να είναι ήδη διαθέσιμες από προηγούμενες μελέτες τοξικότητας με επαναλαμβανόμενη δόση και μπορούν να χρησιμοποιούνται στον σχεδιασμό του ειδικού για την ελεγχόμενη χημική ουσία πρωτοκόλλου της εκτεταμένης μελέτης τοξικότητας στην αναπαραγωγή μίας γενεάς. Κανονικά, η αξιολόγηση της κυκλικότητας του οίστρου (μέσω κολπικής κυτταρολογίας) ξεκινά στην αρχή της περιόδου αγωγής και συνεχίζεται έως ότου επιβεβαιωθεί το ζευγάρωμα ή λήξει η περίοδος ζευγαρώματος, που διαρκεί 2 εβδομάδες. Εάν έχει ελεγχθεί η κανονικότητα του οιστρικού κύκλου των θηλυκών ζώων πριν από την αγωγή, είναι χρήσιμο να συνεχίζεται η λήψη επιχρίσματος κατά την έναρξή της. Εάν όμως υπάρχουν ανησυχίες για μη εξειδικευμένες επιδράσεις κατά την έναρξη της αγωγής (όπως αρχική εμφανής μείωση της κατανάλωσης τροφής), μπορεί να δίδεται στα ζώα μέγιστος χρόνος δύο εβδομάδων για να προσαρμοστούν στην αγωγή, πριν από την έναρξη της περιόδου 2 εβδομάδων κατά την οποία λαμβάνεται επίχρισμα και η οποία καταλήγει στον σχηματισμό των ζευγών. Όταν η διάρκεια της αγωγής των θηλυκών ζώων παρατείνεται κατ' αυτόν τον τρόπο (δηλ. σε 4 εβδομάδες πριν από το ζευγάρωμα), θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο προμήθειας ζώων μικρότερης ηλικίας και παράτασης της περιόδου αγωγής των αρσενικών ζώων πριν από τον σχηματισμό των ζευγών. Κατά τη λήψη κολπικών/τραχηλικών κυττάρων θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγεται η διατάραξη των βλεννογόνων και η επακόλουθη επαγωγή ψευδοκύησης (10) (11).

41. Θα πρέπει να εξετάζονται καθημερινά κολπικά επιχρίσματα από όλα τα θηλυκά ζώα F_1 της κοόρτης 1A, από την έναρξη του ανοίγματος του κόλπου έως ότου καταγραφεί το πρώτο κερατινοποιημένο επίχρισμα, για να προσδιορίζεται το χρονικό διάστημα μεταξύ των δύο αυτών συμβάντων. Θα πρέπει επίσης να παρακολουθούνται οι οιστρικοί κύκλοι όλων των θηλυκών ζώων F_1 της κοόρτης 1A για δύο εβδομάδες, με αφετηρία την 75η ΜΓΗ περίπου. Επιπλέον, εάν είναι απαραίτητη το ζευγάρωμα ζώων της γενεάς F_1, παρακολουθείται η κολπική κυτταρολογία στην κοόρτη 1B από τον σχηματισμό των ζευγών έως ότου διαπιστωθεί ζευγάρωμα.

Ζευγάρωμα και κύηση

42. Πέραν των τυπικών τελικών σημείων (π.χ. σωματικό βάρος, κατανάλωση τροφής, κλινικές παρατηρήσεις, συμπεριλαμβανομένων των ελέγχων θνησιμότητας/νοσηρότητας), καταγράφονται οι ημερομηνίες σχηματισμού των ζευγών, η ημερομηνία γονιμοποίησης και η ημερομηνία τοκετού και υπολογίζονται το χρονικό διάστημα πριν από τη συνουσία (από τον σχηματισμό των ζευγών έως τη γονιμοποίηση) και η διάρκεια της κύησης (από τη γονιμοποίηση έως τον τοκετό). Τα θηλυκά ζώα P θα πρέπει να εξετάζονται με προσοχή κατά τον χρόνο του αναμενόμενου τοκετού για σημεία δυστοκίας. Καταγράφεται κάθε ανωμαλία στη συμπεριφορά κατασκευής φωλιάς ή στις επιδόσεις θηλασμού.

▼M5

43. Η ημερομηνία τοκετού είναι η ημέρα γαλουχίας 0 (ΗΓ 0) για τη μητέρα και η μεταγεννητική ημέρα 0 (ΜΓΗ 0) για τους απογόνους. Εναλλακτικά, όλες οι συγκρίσεις μπορούν επίσης να βασίζονται στον χρόνο μετά τη συνουσία, ώστε να εξαλείφονται τα σφάλματα στα δεδομένα μεταγεννητικής ανάπτυξης λόγω διαφορών στη διάρκεια της κύησης. Ωστόσο, θα πρέπει να καταγράφονται και οι μετρούμενοι χρόνοι σε σχέση με τον τοκετό. Αυτό είναι ιδιαιτέρως σημαντικό όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία επηρεάζει τη διάρκεια της κύησης.

Παράμετροι σχετικά με τους απογόνους

44. Κάθε γέννα θα πρέπει να εξετάζεται το συντομότερο δυνατό μετά τον τοκετό (ΜΓΗ 0 ή 1) για να διαπιστωθούν ο αριθμός και το φύλο των νεογνών, των ζώων που γεννήθηκαν νεκρά και των ζώων που γεννήθηκαν ζωντανά, καθώς και η παρουσία μακροσκοπικών ανωμαλιών (εξωτερικά ορατές ανωμαλίες, μεταξύ των οποίων υπερωιοσχιστία, υποδόριες αιμορραγίες, μη φυσιολογικό χρώμα ή υφή της επιδερμίδας, παρουσία ομφάλιου λώρου, έλλειψη γάλακτος στον στόμαχο, παρουσία αποξηραμένων εκκρίσεων). Επιπλέον, η πρώτη κλινική εξέταση των νεογνών θα πρέπει να περιλαμβάνει ποιοτική εκτίμηση της θερμοκρασίας του σώματος, της δραστηριότητας και της αντίδρασης στους χειρισμούς. Τα νεογνά που βρίσκονται νεκρά την ΜΓΗ 0 ή αργότερα θα πρέπει να εξετάζονται για να διαπιστωθούν πιθανές διαμαρτίες και η αιτία θανάτου. Τα ζωντανά νεογνά καταμετρώνται και ζυγίζονται ατομικά τη ΜΓΗ 0 ή 1 και, στη συνέχεια, ανά τακτά διαστήματα, π.χ. τουλάχιστον την 4η, την 7η, τη 14η και την 21η ΜΓΗ. Οι κλινικές εξετάσεις, ανάλογα με την ηλικία των ζώων, θα πρέπει να επαναλαμβάνονται κατά τη ζύγιση των απογόνων ή συχνότερα, εάν έχουν προκύψει ειδικά ευρήματα κατά τη γέννηση. Μεταξύ των καταγραφόμενων σημείων συγκαταλέγονται, ενδεικτικά, οι εξωτερικές ανωμαλίες, οι αλλαγές στο δέρμα, το τρίχωμα, τα μάτια και τους βλεννογόνους, οι εκκρίσεις και απεκκρίσεις καθώς και δραστηριότητα του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Θα πρέπει να καταγράφονται επίσης οι αλλαγές στη βάδιση, τη στάση του σώματος ή την αντίδραση στους χειρισμούς, καθώς και η εμφάνιση κλονικών ή τονικών κρίσεων, στερεότυπων κινήσεων ή περίεργης συμπεριφοράς.

45. Σε κάθε νεογνό θα πρέπει να μετράται η πρωκτογεννητική απόσταση, τουλάχιστον μία φορά μεταξύ της ΜΓΗ 0 και της 4ης ΜΓΗ. Θα πρέπει να προσδιορίζεται το σωματικό βάρος του νεογνού την ημέρα μέτρησης της πρωκτογεννητικής απόστασης, η οποία θα πρέπει να κανονικοποιείται σε ένα μέτρο του μεγέθους του νεογνού, κατά προτίμηση στην κυβική ρίζα του σωματικού βάρους (12). Τη 12η ή 13η ΜΓΗ θα πρέπει να ελέγχεται η παρουσία θηλών/άλων σε αρσενικά νεογνά.

46. Όλα τα επιλεγμένα ζώα F_1 εξετάζονται καθημερινά για να διαπιστωθεί ο διαχωρισμός της πόσθης στα αρσενικά και το άνοιγμα του κόλπου στα θηλυκά. Η εξέταση αυτή αρχίζει πριν από την αναμενόμενη ημέρα επίτευξης των συγκεκριμένων τελικών σημείων για να ανιχνεύεται η πρώιμη σεξουαλική ωρίμαση. Θα πρέπει να καταγράφεται κάθε ανωμαλία των γεννητικών οργάνων, όπως μόνιμη παρουσία κολπικού νηματίου (persistent vaginal thread), υποσπαδία ή σχιστία του πέους. Η σεξουαλική ωρίμαση των ζώων F_1 συγκρίνεται με τη σωματική ανάπτυξη με προσδιορισμό της ηλικίας και του σωματικού βάρους κατά τον διαχωρισμό της πόσθης στα αρσενικά ζώα και το άνοιγμα του κόλπου στα θηλυκά ζώα (13).

Αξιολόγηση της δυνητικής αναπτυξιακής νευροτοξικότητας (κοόρτεις 2Α και 2Β)

47. Για τις αξιολογήσεις νευροτοξικότητας θα πρέπει να χρησιμοποιούνται 10 αρσενικά και 10 θηλυκά ζώα της κοόρτης 2Α και 10 αρσενικά και 10 θηλυκά ζώα της κοόρτης 2Β από κάθε ομάδα αγωγής (για κάθε κοόρτη: τυχαία επιλογή 1 αρσενικού ή 1 θηλυκού ζώου ανά γέννα και εκπροσώπηση όλων των γεννών από τουλάχιστον 1 νεογνό). Τα ζώα της κοόρτης 2Α θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμασία αιφνιδιασμού από ακουστικό ερέθισμα, δέσμη παρατηρήσεων λειτουργιών (functional observational battery/FOB), δοκιμασία κινητικής δραστηριότητας (βλ. παραγράφους 48-50) και νευροπαθολογική αξιολόγηση (βλ. παραγράφους 74-75). Θα πρέπει να

▼M5

καταβάλλονται προσπάθειες ώστε οι διακυμάνσεις όλων των συνθηκών δοκιμής να είναι ελάχιστες και να μη σχετίζονται συστηματικά με την αγωγή. Μεταξύ των μεταβλητών που μπορούν να επηρεάσουν τη συμπεριφορά συγκαταλέγονται η στάθμη ήχου (π.χ. διαλείπων θόρυβος), η θερμοκρασία, η υγρασία, ο φωτισμός, οι οσμές, η ώρα της ημέρας και οι περισπασμοί από το περιβάλλον. Τα αποτελέσματα των προσδιορισμών νευροτοξικότητας θα πρέπει να ερμηνεύονται σε σχέση με κατάλληλα πεδία τιμών αναφοράς για ιστορικούς μάρτυρες. Τα ζώα της κοόρτης 2Β θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για νευροπαθολογική αξιολόγηση την 21η ή 22η ΜΓΗ (βλ. παραγράφους 74-75).

48. Την 24η ΜΓΗ (± 1 ημέρα) θα πρέπει να εκτελείται δοκιμασία αιφνιδιασμού από ακουστικό ερέθισμα σε ζώα της κοόρτης 2Α. Η ημέρα της δοκιμασίας θα πρέπει να είναι αντισταθμισμένη μεταξύ των ομάδων αγωγής και της ομάδας μαρτύρων. Κάθε συνεδρία περιλαμβάνει 50 δοκιμασίες. Κατά την εκτέλεση της δοκιμασίας αιφνιδιασμού από ακουστικό ερέθισμα, θα πρέπει να προσδιορίζεται το μέσο μέγεθος της αντίδρασης σε κάθε σειρά 10 δοκιμασιών (5 σειρές των 10 δοκιμασιών) και να βελτιστοποιούνται οι συνθήκες δοκιμής ώστε να επιτυγχάνεται ενδοσυνεδριακή εξοικείωση. Οι διαδικασίες αυτές θα πρέπει να συνάδουν με τη μέθοδο δοκιμών Β.53 (35).

49. Σε κατάλληλη χρονική στιγμή μεταξύ της 63ης και της 75ης ΜΓΗ, τα ζώα της κοόρτης 2Α υποβάλλονται σε δέσμη παρατηρήσεων λειτουργιών και αυτόματη δοκιμασία κινητικής δραστηριότητας. Οι διαδικασίες αυτές θα πρέπει να συνάδουν με τις μεθόδους δοκιμών Β.43 (33) και Β.53 (35). Η δέσμη παρατηρήσεων λειτουργιών περιλαμβάνει ενδελεχή περιγραφή της όψης, της συμπεριφοράς και της λειτουργικής αρτιότητας του υποκειμένου, που αξιολογούνται μέσω παρατηρήσεων στον κλωβό στέγασης, αφού προηγηθεί μεταφορά σε τυπικό πεδίο παρατήρησης (ανοικτός χώρος) όπου το ζώο κινείται ελεύθερα, και μέσω δοκιμασιών χειραγώγησης. Οι δοκιμασίες θα πρέπει να εκτελούνται από τη λιγότερο προς την περισσότερο διαδραστική. Κατάλογος μετρήσεων παρατίθεται στο προσάρτημα 1. Όλα τα ζώα θα πρέπει να παρατηρούνται με προσοχή από εκπαιδευμένους παρατηρητές που δεν γνωρίζουν την αγωγή στην οποία υποβάλλονται τα ζώα, με τη χρήση τυποποιημένων διαδικασιών ώστε να ελαχιστοποιείται η μεταβλητότητα μεταξύ των παρατηρητών. Εφόσον είναι δυνατόν, συνιστάται να αξιολογεί ο ίδιος παρατηρητής όλα τα ζώα σε δεδομένη δοκιμασία. Εάν αυτό δεν είναι δυνατόν, απαιτείται κάποιου είδους απόδειξη της αξιοπιστίας μεταξύ των παρατηρητών. Για κάθε παράμετρο της δέσμης παρατηρήσεων λειτουργιών, πρέπει να χρησιμοποιούνται σαφείς, επιχειρησιακά καθορισμένες κλίμακες και κριτήρια βαθμολόγησης. Εάν είναι δυνατόν, θα πρέπει να αναπτύσσονται αντικειμενικές ποσοτικές μετρήσεις για τα τελικά σημεία παρατήρησης τα οποία περιλαμβάνουν υποκειμενική κατάταξη. Όσον αφορά την κινητική δραστηριότητα, κάθε ζώο θα πρέπει να εξετάζεται χωριστά. Η συνεδρία δοκιμασίας θα πρέπει να έχει αρκετή διάρκεια ώστε να καταδεικνύεται η ενδοσυνεδριακή εξοικείωση των μαρτύρων. Η κινητική δραστηριότητα θα πρέπει να παρακολουθείται με συσκευή αυτόματης καταγραφής δραστηριοτήτων, ικανή να ανιχνεύει τόσο τις αυξήσεις όσο και τις μειώσεις τους (δηλ. η δραστηριότητα γραμμής βάσης που μετράται από τη συσκευή δεν θα πρέπει να είναι τόσο χαμηλή ώστε να αποκλείεται η ανίχνευση μειώσεων ούτε τόσο υψηλή ώστε να αποκλείεται η ανίχνευση αυξήσεων της δραστηριότητας). Κάθε συσκευή θα πρέπει να ελέγχεται με τυποποιημένες διαδικασίες ώστε να διασφαλίζεται, στο μέτρο του δυνατού, η αξιοπιστία της λειτουργίας όλων των συσκευών, όλες τις ημέρες. Εφόσον είναι δυνατόν, οι ομάδες αγωγής θα πρέπει να είναι ισόρροπα κατανεμημένες στις διάφορες συσκευές. Οι ομάδες αγωγής θα πρέπει να είναι αντισταθμισμένες ως προς τους χρόνους εξέτασης ώστε να αποφεύγονται πειραματικά σφάλματα οφειλόμενα στους κιρκάδιους ρυθμούς.

50. Εάν οι υφιστάμενες πληροφορίες καθιστούν αναγκαία τη διεξαγωγή και άλλων δοκιμασιών λειτουργιών (π.χ. αισθητηριακών, κοινωνικών, γνωσιακών), η ενσωμάτωσή τους δεν θα πρέπει να θίγει την αρτιότητα των λοιπών άλλων αξιολογήσεων που διενεργούνται στο πλαίσιο της μελέτης. Εάν οι δοκιμασίες αυτές εκτελούνται στα ίδια ζώα όπως οι τυπικές δοκιμασίες αιφνιδιασμού από ακουστικό ερέθισμα, δέσμης παρατηρήσεων λειτουργιών και κινητικής δραστηριότητας, θα πρέπει να προγραμματίζονται διαφορετικές δοκιμασίες ώστε να ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος να θιγεί η αρτιότητα των εν λόγω δοκιμασιών. Οι συμπληρωματικές διαδικασίες ενδέχεται να είναι ιδιαίτερα χρήσιμες στις περιπτώσεις όπου οι εμπειρικές παρατηρήσεις, οι αναμενόμενες επιδράσεις ή ο μηχανισμός/τρόπος δράσης υποδηλώνουν συγκεκριμένο τύπο νευροτοξικότητας.

▼M5

Αξιολόγηση της δυνητικής αναπτυξιακής ανοσοτοξικότητας (κοόρτη 3)

51. Την 56η ΜΓΗ (± 3 ημέρες) θα πρέπει να χρησιμοποιούνται 10 αρσενικά και 10 θηλυκά ζώα της κοόρτης 3 από κάθε ομάδα αγωγής (τυχαία επιλογή 1 αρσενικού ή 1 θηλυκού ανά γέννα, εκπροσώπηση όλων των γεννών από τουλάχιστον 1 νεογνό) σε προσδιορισμό εξαρτώμενης από τα κύτταρα Τ απόκρισης αντισωμάτων, δηλ. ήτοι της κύριας απόκρισης των αντισωμάτων IgM σε ένα εξαρτώμενο από τα κύτταρα Τ αντιγόνο, όπως τα ερυθροκύτταρα προβάτου (SRBC) ή η αιμοκυανίνη του μαλακίου Megathura crenula (Keyhole Limpet Hemocyanin/KLH), σύμφωνα με τις υφιστάμενες διαδικασίες δοκιμών ανοσοτοξικότητας (14) (15). Η απόκριση μπορεί να αξιολογηθεί με την καταμέτρηση συγκεκριμένων κυττάρων που σχηματίζουν πλάκες (PFC) στον σπλήνα ή με τον προσδιορισμό του τίτλου των ειδικών αντισωμάτων IgM που συνδέονται με τα SRCM ή την KLH στον ορό, με τεχνική ELISA κατά την κορύφωση της απόκρισης. Η απόκριση κορυφώνεται συνήθως τέσσερις (PFC) ή πέντε (ELISA) ημέρες μετά την ενδοφλέβια ανοσοποίηση. Εάν η κύρια απόκριση των αντισωμάτων προσδιορίζεται με καταμέτρηση των κυττάρων που σχηματίζουν πλάκες, επιτρέπεται η αξιολόγηση υποομάδων των ζώων σε διαφορετικές ημέρες, υπό τον όρο ότι η ανοσοποίηση και η θανάτωση σε επίπεδο υποομάδας προγραμματίζονται κατά τρόπο ώστε τα PFC να μετρώνται κατά την κορύφωση της απόκρισης και ότι οι υποομάδες περιέχουν ισάριθμους αρσενικούς και θηλυκούς απογόνους από όλες τις ομάδες δόσης, συμπεριλαμβανομένων των μαρτύρων, και αξιολογούνται κατά την ίδια περίπου μεταγεννητική ημέρα. Η έκθεση στην ελεγχόμενη χημική ουσία συνεχίζεται έως την προηγούμενη ημέρα από τη συλλογή του σπλήνα για την καταμέτρηση των PFC ή ορού για τον προσδιορισμό ELISA.

Συνέχεια στην αξιολόγηση της δυνητικής τοξικότητας στην αναπαραγωγή (κοόρτη 1Β)

52. Εάν είναι απαραίτητο, τα ζώα της κοόρτης 1Β μπορούν να συνεχίσουν να λαμβάνουν αγωγή και μετά την 90ή ΜΓΗ και να αναπαραχθούν για τη λήψη γενεάς F_2. Τα αρσενικά και τα θηλυκά ζώα της ίδιας ομάδας δόσης θα πρέπει να συμβιώνουν (χωρίς να σχηματίζονται ζεύγη ζώων της ίδιας γέννας) για μέγιστο χρονικό διάστημα δύο εβδομάδων, το οποίο αρχίζει την 90ή ΜΓΗ ή αργότερα αλλά όχι μετά την 120ή ΜΓΗ. Οι διαδικασίες θα πρέπει να είναι παρόμοιες με αυτές που εφαρμόζονται για τα ζώα Ρ. Ωστόσο, βάσει του βάρους της μαρτυρίας, ενδέχεται να αρκεί η θανάτωση των νεογνών την 4η ΜΓΗ αντί της παρακολούθησής τους έως τον απογαλακτισμό ή και πέραν αυτού.

ΤΕΛΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Κλινική βιοχημεία/αιματολογία

53. Θα πρέπει να παρακολουθούνται οι συστημικές επιδράσεις στα ζώα Ρ. Κατά τη λήξη της μελέτης λαμβάνονται δείγματα αίματος μετά από νηστεία από καθορισμένο σημείο του σώματος δέκα τυχαία επιλεγμένων αρσενικών και θηλυκών ζώων Ρ ανά ομάδα δόσης, φυλάσσονται υπό κατάλληλες συνθήκες και υποβάλλονται σε μερικές ή πλήρεις αιματολογικές και κλινικές βιοχημικές εξετάσεις, προσδιορισμό θυροξίνης (Τ4) και θυρεοειδοτρόπου ορμόνης (TSH) ή άλλες εξετάσεις που υπαγορεύονται από τις γνωστές επιδράσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας [βλ. καθοδηγητικό έγγραφο αριθ. 151 του ΟΟΣΑ (40)]. Θα πρέπει να εξετάζονται οι ακόλουθες αιματολογικές παράμετροι: αιματοκρίτης, συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης, αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων, λευκών αιμοσφαιρίων και λευκοκυτταρικός τύπος, αριθμός αιμοπεταλίων και χρόνος/δυναμικό πήξης του αίματος. Οι εξετάσεις στο πλάσμα ή στον ορό του αίματος θα πρέπει να περιλαμβάνουν προσδιορισμό γλυκόζης, ολικής χοληστερόλης, ουρίας, κρεατινίνης, ολικών πρωτεϊνών, λευκωματίνης και δύο τουλάχιστον ενζύμων ενδεικτικών ηπατοκυτταρικής επίδρασης (όπως η αλανινο-αμινοτρανσφεράση, η ασπαραγινική αμινοτρασφεράση, η αλκαλική φωσφατάση, η γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάση και η αφυδρογονάση της σορβιτόλης). Σε ορισμένες περιπτώσεις η μέτρηση και άλλων ενζύμων και των χολικών οξέων είναι δυνατόν να παρέχει χρήσιμες πληροφορίες. Επιπλέον, μπορεί να ληφθεί αίμα από όλα τα ζώα και να φυλαχθεί με σκοπό να χρησιμοποιηθεί σε ενδεχόμενη μεταγενέστερη ανάλυση για τη διασαφήνιση αμφίσημων επιδράσεων ή την παραγωγή δεδομένων εσωτερικής έκθεσης. Εάν δεν

▼M5

προβλέπεται δεύτερο ζευγάρωμα των ζώων P, τα δείγματα αίματος λαμβάνονται αμέσως πριν από το διαδικασία της προγραμματισμένης θανάτωσης ή στο πλαίσιο αυτής. Εάν διατηρούνται ζώα, τα δείγματα αίματος λαμβάνονται λίγες ημέρες πριν από το δεύτερο ζευγάρωμα των ζώων. Πριν από την λήξη της μελέτης θα πρέπει να γίνεται ανάλυση ούρων και να αξιολογούνται οι ακόλουθες παράμετροι, εκτός εάν τα υφιστάμενα δεδομένα από μελέτες με επαναλαμβανόμενη δόση δείχνουν ότι δεν επηρεάζονται από την ελεγχόμενη χημική ουσία: εμφάνιση, όγκος, ωσμωτικότητα ή ειδικό βάρος, pH, πρωτεΐνες, γλυκόζη, αίμα και αιμοσφαίρια, κυτταρικά υπολείμματα. Ούρα μπορούν επίσης να συλλέγονται για την παρακολούθηση της έκκρισης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και/ή των μεταβολιτών.

54. Θα πρέπει επίσης να παρακολουθούνται οι συστημικές επιδράσεις στα ζώα F_1. Κατά τη λήξη της μελέτης λαμβάνονται δείγματα αίματος μετά από νηστεία από καθορισμένο σημείο του σώματος δέκα τυχαία επιλεγμένων αρσενικών και θηλυκών ζώων της κοόρτης A1 ανά ομάδα δόσης, φυλάσσονται υπό κατάλληλες συνθήκες και υποβάλλονται στις τυπικές κλινικές βιοχημικές εξετάσεις, συμπεριλαμβανομένης της αξιολόγησης των επιπέδων θυρεοειδικών ορμονών στον ορό (T4 και TSH), αιματολογικές εξετάσεις (αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων, λευκοκυτταρικός τύπος και αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων) και ανάλυση ούρων.

55. Τα πλεονάζοντα την 4η ΜΓΗ νεογνά υποβάλλονται σε νεκροψία-νεκροτομή και εξετάζεται το ενδεχόμενο μέτρησης των συγκεντρώσεων της θυρεοειδικής ορμόνης θυροξίνης (T4) στον ορό. Εάν είναι απαραίτητο, τα δείγματα αίματος νεογνών (4η ΜΓΗ) μπορούν να συνενώνονται ανά γέννα για βιοχημικές εξετάσεις/αναλύσεις θυρεοειδικών ορμονών. Συλλέγεται επίσης αίμα για ανάλυση T4 και TSH από τα απογαλακτισμένα ζώα που υποβάλλονται σε νεκροψία-νεκροτομή την 22η ΜΓΗ (νεογνά F_1 που δεν έχουν επιλεγεί για τις κοόρτεις).

Παράμετροι του σπέρματος

56. Θα πρέπει να μετρώνται οι παράμετροι του σπέρματος σε όλα τα αρσενικά ζώα της γενεάς P, εκτός εάν υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι αυτές δεν επηρεάζονται σε μελέτη 90 ημερών. Θα πρέπει να υποβάλλονται σε εξέταση παραμέτρων του σπέρματος όλα τα αρσενικά ζώα της κοόρτης 1A.

57. Κατά τη λήξη της μελέτης καταγράφεται το βάρος των όρχεων και των επιδιδυμίδων όλων των αρσενικών ζώων P και F_1 (κοόρτη 1A). Τουλάχιστον ένας όρχις και μία επιδιδυμίδα φυλάσσονται για ιστοπαθολογική εξέταση. Η εναπομένουσα επιδιδυμίδα χρησιμοποιείται για την καταμέτρηση του σπερματικού αποθέματος της ουράς της (16) (17). Επιπλέον, συλλέγεται σπέρμα από την ουρά της επιδιδυμίδας (ή τον σπερματικό πόρο), με μεθόδους που ελαχιστοποιούν τις βλάβες, για την αξιολόγηση της κινητικότητας και της μορφολογίας του σπέρματος (18).

58. Η κινητικότητα του σπέρματος μπορεί είτε να αξιολογείται αμέσως μετά τη θανάτωση είτε να καταγράφεται για μεταγενέστερη ανάλυση. Το ποσοστό των προοδευτικά κινούμενων σπερματοζωαρίων μπορεί να προσδιοριστεί είτε υποκειμενικά είτε αντικειμενικά, με υποβοηθούμενη από υπολογιστή ανάλυση κίνησης, (19) (20) (21) (22) (23) (24). Για τη μορφολογική αξιολόγηση του σπέρματος, θα πρέπει να εξετάζεται δείγμα σπέρματος από την επιδιδυμίδα (ή τον σπερματικό πόρο) ως μονιμοποιημένο ή υγρό παρασκεύασμα (25) και τουλάχιστον 200 σπερματοζωάρια ανά δείγμα να ταξινομούνται ως φυσιολογικά (τόσο η κεφαλή όσο και το μέσο τμήμα/η ουρά φαίνονται φυσιολογικά) ή ανώμαλα. Παραδείγματα μορφολογικών ανωμαλιών των σπερματοζωαρίων είναι η σύντηξη, η παρουσία απομονωμένων κεφαλών και η παραμόρφωση κεφαλών και/ή ουρών (26). Οι παραμορφωμένες ή μεγάλες κεφαλές σπερματοζωαρίων ενδέχεται να υποδηλώνουν ελαττωματική σπερμίαση.

59. Εάν κατά τη νεκροψία καταψυχθούν δείγματα σπέρματος, μονιμοποιηθούν επιχρίσματα και καταγραφούν εικόνες για ανάλυση της κινητικότητας του σπέρματος (27), η μετέπειτα ανάλυση μπορεί να περιοριστεί στις ομάδες μαρτύρων και υψηλής δόσης. Ωστόσο, εάν έχουν παρατηρηθεί επιδράσεις σχετιζόμενες με την αγωγή, θα πρέπει να αξιολογούνται και οι ομάδες χαμηλότερης δόσης.

▼M5

Νεκροψία-νεκροτομή

60. Κατά τη λήξη της μελέτης ή σε περίπτωση πρόωρου θανάτου, όλα τα ζώα P και F_1 νεκροτομούνται και εξετάζονται μακροσκοπικά για ανατομικές ανωμαλίες ή παθολογικές αλλαγές. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίδεται στα όργανα του αναπαραγωγικού συστήματος. Τα νεογνά που θανατώνονται ανώδυνα επειδή είναι ετοιμοθάνατα και τα νεκρά νεογνά θα πρέπει να καταγράφονται και, όταν δεν διαβρέχονται, να εξετάζονται για πιθανές διαμαρτίες και/ή για τη διαπίστωση της αιτίας θανάτου και να συντηρούνται.

61. Στα ενήλικα θηλυκά ζώα P και F_1, εξετάζεται κολπικό επίχρισμα την ημέρα της νεκροψίας για να προσδιοριστεί το στάδιο του οιστρικού κύκλου και να καταστεί δυνατή η συσχέτιση με ιστοπαθολογικά ευρήματα στα όργανα αναπαραγωγής. Οι μήτρες όλων των θηλυκών ζώων P (και των θηλυκών F_1, κατά περίπτωση) εξετάζονται ως προς την παρουσία και τον αριθμό θέσεων εμφύτευσης, κατά τρόπο ώστε να μη διακυβεύεται η ιστοπαθολογική αξιολόγηση.

Βάρος οργάνων και διατήρηση ιστών — ενήλικα ζώα P και F_1

62. Κατά τη λήξη της μελέτης, προσδιορίζονται το βάρος σώματος και το βάρος, σε νωπή κατάσταση, των οργάνων που απαριθμούνται κατωτέρω, σε όλα τα ζώα P και όλα τα ενήλικα ζώα F_1 από τις οικείες κοόρτεις (όπως περιγράφεται κατωτέρω), το συντομότερο δυνατό μετά την ανατομή ώστε να αποφεύγεται η ξήρανση. Τα όργανα αυτά θα πρέπει έπειτα να συντηρούνται σε κατάλληλες συνθήκες. Εκτός αντίθετων διατάξεων, τα όργανα σε ζεύγη μπορούν να ζυγίζονται χωριστά ή μαζί, σύμφωνα με τη συνήθη πρακτική του εργαστηρίου που εκτελεί τη δοκιμή.

— μήτρα (με τις σάλπιγγες και τον τράχηλο), ωοθήκες·

— όρχεις, επιδιδυμίδες (ολική επιδιδυμίδα και ουρά της επιδιδυμίδας για τα δείγματα που χρησιμοποιούνται για καταμέτρηση του σπέρματος)·

— προστάτης (πλαγιοραχιαίο και κοιλιακό τμήμα μαζί). Το σύμπλεγμα του προστάτη θα πρέπει να απαλλάσσεται με προσοχή από τους περιττούς ιστούς ώστε να μην προκαλείται διάτρηση των σπερματοδόχων κύστεων που είναι γεμάτες υγρό. Σε περίπτωση σχετικών με την αγωγή επιδράσεων στο συνολικό βάρος του προστάτη, το πλαγιοραχιαίο και του κοιλιακό τμήμα θα πρέπει να ανατέμνονται επιμελώς μετά τη μονιμοποίηση και να ζυγίζονται χωριστά·

— σπερματοδόχοι κύστεις με τους πηκτοειδείς αδένες και τα υγρά τους (ως μία μονάδα)·

— εγκέφαλος, ήπαρ, νεφροί, καρδιά, σπλήνας, θύμος αδένας, υπόφυση, θυρεοειδής (μετά από μονιμοποίηση), επινεφρίδια και τα όργανα ή ιστοί που αποτελούν γνωστό στόχο.

63. Πέραν των οργάνων που απαριθμούνται θα πρέπει να διατηρούνται υπό κατάλληλες συνθήκες δείγματα περιφερειακών νεύρων, μυών, νωτιαίου μυελού, οφθαλμού μαζί με το οπτικό νεύρο, του γαστρεντερικού συστήματος, της ουροδόχου κύστης, των πνευμόνων, της τραχείας (με τον θυρεοειδή και τον παραθυρεοειδή), του μυελού των οστών, του σπερματικού πόρου (αρσενικά ζώα), του μαστικού αδένα (αρσενικά και θηλυκά ζώα) και του κόλπου.

64. Ζυγίζονται και διατηρούνται για ιστοπαθολογικές εξετάσεις όλα τα όργανα των ζώων της κοόρτης 1A.

65. Για τη διερεύνηση των ανοσοτοξικών επιδράσεων που επάγονται πριν και μετά τη γέννηση, 10 αρσενικά και 10 θηλυκά ζώα της κοόρτης 1A από κάθε ομάδα αγωγής (τυχαία επιλογή 1 αρσενικού ή 1 θηλυκού ανά γέννα, εκπροσώπηση όλων των γεννών από 1 τουλάχιστον νεογνό) υποβάλλονται στα ακόλουθα κατά τη λήξη της μελέτης:

— ζύγιση των λεμφαδένων που συνδέονται με την οδό έκθεσης και βρίσκονται σε απόσταση από αυτή (επιπλέον της ζύγισης των επινεφριδίων, του θύμου αδένα και του σπλήνα όλων των ζώων της κοόρτης 1A, που έχει ήδη πραγματοποιηθεί)·

▼M5

— ανάλυση υποπληθυσμών λεμφοκυττάρων του σπλήνα (λεμφοκύτταρα Τ CD4+ και CD8+, λεμφοκύτταρα Β και φυσικά φονικά κύτταρα) στο ένα ήμισυ του οργάνου, ενώ το δεύτερο διατηρείται για ιστοπαθολογική αξιολόγηση.

Με την ανάλυση υποπληθυσμών λεμφοκυττάρων του σπλήνα σε μη ανοσοποιημένα ζώα (κοόρτη 1Α) προσδιορίζεται αν η έκθεση σχετίζεται με αλλαγή στη σταθερή ανοσολογική κατανομή των προερχόμενων από τον θύμο αδένα βοηθητικών (CD4+) ή κυτταροτοξικών (CD8+) λεμφοκυττάρων ή των φυσικών φονικών κυττάρων (ταχείες αντιδράσεις σε νεοπλασματικά κύτταρα και παθογόνους παράγοντες).

66. Στα ζώα της κοόρτης 1Β θα πρέπει να ζυγίζονται τα ακόλουθα όργανα και να υποβάλλονται σε επεξεργασία οι αντίστοιχοι ιστοί έως το στάδιο των κύβων:

— κόλπος (χωρίς ζύγιση),

— μήτρα με τον τράχηλο,

— ωοθήκες,

— όρχεις (τουλάχιστον ένας),

— επιδιδυμίδες,

— σπερματοδόχοι κύστεις και πηκτοειδείς αδένες,

— προστάτης,

— υπόφυση,

— προσδιορισμένα όργανα-στόχοι.

Εάν τα αποτελέσματα της κοόρτης 1Α είναι αμφίσημα ή σε περίπτωση υπονοιών για τοξικές για το αναπαραγωγικό και το ενδοκρινικό σύστημα ουσίες, θα πρέπει να εκτελούνται ιστοπαθολογικές εξετάσεις στην κοόρτη 1Β.

67. Κοόρτεις 2Α και 2Β: δοκιμές αναπτυξιακής νευροτοξικότητας (την 21η ή 22η ΜΓΗ και σε ενήλικους απογόνους). Τα ζώα της κοόρτης 2Α θανατώνονται μετά τις δοκιμασίες συμπεριφοράς, καταγράφεται το βάρος του εγκεφάλου τους και ακολουθεί πλήρης νευρο-ιστοπαθολογική εξέταση για την αξιολόγηση της νευροτοξικότητας. Τα ζώα της κοόρτης 2Β θανατώνονται την 21η ή την 22 ΜΓΗ, καταγράφεται το βάρος του εγκεφάλου τους και ακολουθεί μικροσκοπική εξέταση του εγκεφάλου για την αξιολόγηση της νευροτοξικότητας. Για τα ζώα της κοόρτης 2Α απαιτείται μονιμοποίηση με έγχυση, η οποία είναι προαιρετική για τα ζώα της κοόρτης 2Β, όπως προβλέπεται στη μέθοδο δοκιμών Β.53 (35).

Βάρος οργάνων και διατήρηση ιστών — απογαλακτισμένα ζώα F_1

68. Τα νεογνά που δεν επιλέγονται για τις κοόρτεις, συμπεριλαμβανομένων των καχεκτικών ζώων, θανατώνονται μετά τον απογαλακτισμό, την 22η ΜΓΗ, εκτός εάν τα αποτελέσματα καταδεικνύουν την ανάγκη περαιτέρω διερευνήσεων σε ζωντανά ζώα. Τα νεογνά που θανατώνονται υποβάλλονται σε νεκροψία-νεκροτομή, που περιλαμβάνει αξιολόγηση των αναπαραγωγικών τους οργάνων, όπως περιγράφεται στις παραγράφους 62 και 63. Θα πρέπει να ζυγίζονται και να διατηρούνται υπό κατάλληλες συνθήκες ο εγκέφαλος, ο σπλήνας και ο θύμος αδένας έως 10 νεογνών ανά φύλο και ανά ομάδα, προερχόμενων από όσο το δυνατόν περισσότερες γέννες. Επιπλέον, είναι δυνατόν να διατηρούνται οι μαστικοί ιστοί αυτών των αρσενικών και θηλυκών νεογνών για περαιτέρω μικροσκοπική ανάλυση ([1]) [βλ. καθοδηγητικό έγγραφο αριθ. 151 του ΟΟΣΑ (40)]. Οι μακροσκοπικές ανωμαλίες και οι ιστοί-στόχοι θα πρέπει να φυλάσσονται για ενδεχόμενη ιστολογική εξέταση.

([1]) Οι έρευνες έχουν δείξει ότι ο μαστικός αδένας, ιδίως στα πρώτα στάδια της ανάπτυξής του, αποτελεί ευαίσθητο τελικό σημείο όσον αφορά την οιστρογονική δράση. Συνιστάται να συμπεριληφθούν στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, όταν επικυρωθούν, τελικά σημεία που περιλαμβάνουν μαστικούς αδένες νεογνών και των δύο φύλων.

▼M5

Ιστοπαθολογία — ζώα P

69. Για όλα τα ζώα P των ομάδων υψηλής δόσης και μαρτύρων εκτελούνται πλήρεις ιστοπαθολογικές εξετάσεις των οργάνων που απαριθμούνται στις παραγράφους 62 και 63. Θα πρέπει επίσης να εξετάζονται τα όργανα που εμφανίζουν σχετιζόμενες με την αγωγή αλλαγές από όλα τα ζώα των ομάδων χαμηλότερης δόσης, για να υποβοηθείται ο προσδιορισμός του NOAEL. Επιπλέον, θα πρέπει να υποβάλλονται σε ιστοπαθολογική αξιολόγηση τα αναπαραγωγικά όργανα όλων των ζώων για τα οποία υπάρχουν υπόνοιες μειωμένης γονιμότητας, π.χ. εκείνα στα οποία απέτυχε το ζευγάρωμα, η σύλληψη, ο τοκετός ή η γέννηση υγιών απογόνων, ή στα οποία επηρεάστηκε η κυκλικότητα του οίστρου ή ο αριθμός, η κινητικότητα ή η μορφολογία των σπερματοζωαρίων, καθώς και όλες οι μακροσκοπικές αλλοιώσεις.

Ιστοπαθολογία — ζώα F_1

Ζώα της 1ης κοόρτης

70. Για όλα τα ενήλικα ζώα των ομάδων υψηλής δόσης και μαρτύρων της κοόρτης 1A εκτελούνται πλήρεις ιστοπαθολογικές εξετάσεις των οργάνων που απαριθμούνται στις παραγράφους 62 και 63. Θα πρέπει να εκπροσωπούνται όλες οι γέννες από 1 τουλάχιστον νεογνό ανά φύλο. Θα πρέπει επίσης να εξετάζονται τα όργανα και οι ιστοί που εμφανίζουν σχετιζόμενες με την αγωγή αλλαγές, καθώς και όλες οι μακροσκοπικές αλλοιώσεις, από όλα τα ζώα των ομάδων χαμηλότερης δόσης για να υποβοηθείται ο προσδιορισμός του NOAEL. Για την αξιολόγηση των επιδράσεων που επάγονται πριν και μετά τη γέννηση στα λεμφικά όργανα, θα πρέπει επίσης να αξιολογούνται από ιστοπαθολογικής πλευράς οι λεμφαδένες και ο μυελός των οστών που έχουν συλλεγεί από 10 αρσενικά και 10 θηλυκά ζώα της κοόρτης 1A, παράλληλα με την ήδη διενεργηθείσα ιστοπαθολογική αξιολόγηση του θύμου αδένα, του σπλήνα και των επινεφριδίων όλων των ζώων της κοόρτης 1A.

71. Σε περίπτωση υπονοιών για τοξικές για το αναπαραγωγικό ή το ενδοκρινικό σύστημα ουσίες, θα πρέπει να υποβάλλονται σε ιστοπαθολογικές εξετάσεις αναπαραγωγικοί και ενδοκρινικοί ιστοί από όλα τα ζώα της κοόρτης 1B, οι οποίοι έχουν υποστεί επεξεργασία έως το στάδιο του κύβου, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 66. Ιστοπαθολογικές εξετάσεις πρέπει επίσης να γίνονται στην κοόρτη 1B, εάν τα αποτελέσματα της κοόρτης 1A είναι αμφίσημα.

72. Οι ωοθήκες των ενήλικων θηλυκών ζώων πρέπει κανονικά να περιέχουν αρχέγονα και αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια, καθώς και ωχρά σωμάτια. Επομένως, η ιστοπαθολογική εξέταση θα πρέπει να στοχεύει στην ποσοτική αξιολόγηση των αρχέγονων και των μικρών αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων, καθώς και των ωχρών σωματίων, στα θηλυκά ζώα F_1. Ο αριθμός των ζώων, η επιλογή των τομών ωοθηκών και το μέγεθος του δείγματος τομής θα πρέπει να είναι στατιστικά κατάλληλα για τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο αξιολόγησης. Τα ωοθυλάκια θα πρέπει να καταμετρώνται πρώτα στα ζώα των ομάδων μαρτύρων και υψηλής δόσης και, στην περίπτωση δυσμενούς επίδρασης στην ομάδα υψηλής δόσης, θα πρέπει να εξετάζονται οι χαμηλότερες δόσεις. Η εξέταση θα πρέπει να περιλαμβάνει καταμέτρηση των αρχέγονων ωοθυλακίων, στην οποία μπορούν να προστίθενται τα μικρά αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια, με σκοπό τη σύγκριση των ωοθηκών των ζώων των ομάδων αγωγής και μαρτύρων [βλ. καθοδηγητικό έγγραφο αριθ. 151 του ΟΟΣΑ (40)]. Η αξιολόγηση των ωχρών σωματίων θα πρέπει να διενεργείται παράλληλα με τον έλεγχο της κυκλικότητας του οίστρου, ώστε να μπορεί να ληφθεί υπόψη στην αξιολόγηση το στάδιο του κύκλου. Εξετάζονται οι σάλπιγγες, η μήτρα και ο κόλπος για να διαπιστωθεί η ορθή οργανοτυπική ανάπτυξη.

73. Εκτελούνται λεπτομερείς ιστοπαθολογικές εξετάσεις των όρχεων των αρσενικών ζώων F_1 για να εντοπιστούν σχετιζόμενες με την αγωγή επιδράσεις στη διαφοροποίηση και την ανάπτυξη των όρχεων και στη σπερματογένεση (38). Όταν είναι δυνατόν, θα πρέπει να εξετάζονται τομές του ορχικού δικτύου. Εξετάζονται η κεφαλή, το σώμα και η ουρά της επιδιδυμίδας, καθώς και ο σπερματικός πόρος, για να διαπιστωθεί η ορθή οργανοτυπική ανάπτυξη και να ελεγχθούν οι παράμετροι που απαιτούνται για τα αρσενικά ζώα P.

▼M5

Ζώα της 2ης κοόρτης

74. Μετά την ολοκλήρωση των νευροσυμπεριφορικών δοκιμασιών (μετά την 75η ΜΓΗ αλλά όχι πέραν της 90ής), εκτελούνται νευρο-ιστοπαθολογικές εξετάσεις για όλα τα ζώα των ομάδων υψηλής δόσης και μαρτύρων της κοόρτης 2Α ανά φύλο. Την 21η ή 22η ΜΓΗ εκτελούνται ιστοπαθολογικές εξετάσεις του εγκεφάλου όλων των ζώων των ομάδων υψηλής δόσης και μαρτύρων της κοόρτης 2Β ανά φύλο. Θα πρέπει επίσης να εξετάζονται τα όργανα ή οι ιστοί που εμφανίζουν σχετιζόμενες με την αγωγή αλλαγές από τα ζώα των ομάδων χαμηλότερης δόσης για να υποβοηθείται ο προσδιορισμός του NOAEL. Στις κοόρτεις 2Α και 2Β εξετάζονται πολλαπλές τομές του εγκεφάλου των ζώων, ώστε να καλύπτονται οι οσφρητικοί βολβοί, ο εγκεφαλικός φλοιός, ο ιππόκαμπος, τα βασικά γάγγλια, ο θάλαμος, ο υποθάλαμος, ο μεσεγκέφαλος (τετράδυμο, καλύπτρα και εγκεφαλικά σκέλη), το εγκεφαλικό στέλεχος και η παρεγκεφαλίδα. Μόνο στην κοόρτη 2Α εξετάζονται οι οφθαλμοί (αμφιβληστροειδής και οπτικό νεύρο) και δείγματα περιφερειακών νεύρων, μυών και νωτιαίου μυελού. Όλες οι νευροιστολογικές διαδικασίες θα πρέπει να συνάδουν με τη μέθοδο δοκιμών Β.53 (35).

75. Θα πρέπει να διενεργούνται μορφομετρικές (ποσοτικές) αξιολογήσεις σε αντιπροσωπευτικά τμήματα του εγκεφάλου (ομόλογες τομές, προσεκτικά επιλεγμένες βάσει αξιόπιστων μικροσκοπικών σημείων αναφοράς), οι οποίες ενδέχεται να περιλαμβάνουν γραμμικές και/ή εμβαδικές μετρήσεις συγκεκριμένων εγκεφαλικών περιοχών. Θα πρέπει να λαμβάνονται τουλάχιστον τρεις διαδοχικές τομές σε κάθε σημείο αναφοράς (επίπεδο) ώστε να επιλέγεται η πλέον ομόλογη και αντιπροσωπευτική τομή για το συγκεκριμένο τμήμα του εγκεφάλου που πρόκειται να αξιολογηθεί. Ο νευροπαθολόγος θα πρέπει να κρίνει καταλλήλως αν οι τομές που έχουν ετοιμαστεί για μέτρηση είναι ομόλογες με τις υπόλοιπες άλλες του συνόλου του δείγματος και, επομένως, κατάλληλες να συμπεριληφθούν στη μελέτη, δεδομένου ότι οι γραμμικές μετρήσεις, ιδιαίτερα, μπορεί να μεταβάλλονται σε σχετικά μικρή απόσταση (28). Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τομές που δεν είναι ομόλογες. Παρόλο που στόχος είναι η δειγματοληψία από όλα τα ζώα που διατηρούνται για τον σκοπό αυτό (10/φύλο/επίπεδο δόσης), ενδέχεται να αρκούν μικρότεροι αριθμοί. Ωστόσο, εάν τα δείγματα προέρχονται από λιγότερα από 6 ζώα/φύλο/επίπεδο δόσης, δεν θεωρούνται γενικά επαρκή για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου δοκιμών. Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί στερεολογία για τον προσδιορισμό σχετικών με την αγωγή επιδράσεων σε παραμέτρους όπως ο όγκος ή ο αριθμός κυττάρων συγκεκριμένων νευροανατομικών περιοχών. Θα πρέπει να εφαρμόζεται αντισταθμισμένος σχεδιασμός σε κάθε πτυχή της προετοιμασίας των δειγμάτων ιστών, από τη μονιμοποίηση των ιστών και την ανατομή δειγμάτων έως την επεξεργασία τους και τη χρώση των αντικειμενοφόρων πλακών, ώστε κάθε παρτίδα να περιέχει αντιπροσωπευτικά δείγματα από κάθε ομάδα δόσης. Όταν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν μορφομετρικές ή στερεολογικές αναλύσεις, οι εγκεφαλικοί ιστοί θα πρέπει να στερεώνονται σε κατάλληλα μέσα σε όλα τα επίπεδα δόσης ταυτόχρονα, ώστε να αποφεύγονται τεχνικά σφάλματα λόγω συστολής που συνδέονται με την παρατεταμένη φύλαξη σε μέσο μονιμοποίησης.

ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Δεδομένα

76. Τα δεδομένα αναφέρονται ατομικά και συνοψίζονται σε μορφή πίνακα. Κατά περίπτωση, θα πρέπει να αναφέρονται τα ακόλουθα για κάθε ομάδα δοκιμής και κάθε γενεά: αριθμός ζώων κατά την έναρξη της δοκιμής, αριθμός ζώων που βρέθηκαν νεκρά κατά τη διάρκεια της δοκιμής ή θανατώθηκαν για να μην υποφέρουν, χρόνος θανάτου ή ευθανασίας, αριθμός γόνιμων ζώων, αριθμός κυοφορούντων θηλυκών, αριθμός θηλυκών που γέννησαν απογόνους και αριθμός ζώων που εμφάνισαν σημεία τοξικότητας. Θα πρέπει επίσης να παρατίθεται περιγραφή της τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένων του χρόνου εκδήλωσης, της διάρκειας και της σοβαρότητάς της.

77. Τα αριθμητικά αποτελέσματα θα πρέπει να αξιολογούνται με κατάλληλη και αποδεκτή στατιστική μέθοδο. Οι στατιστικές μέθοδοι θα πρέπει να επιλέγονται στο πλαίσιο του σχεδιασμού της μελέτης και να καλύπτουν δεόντως τα μη κανονικά δεδομένα (π.χ. δεδομένα καταμέτρησης), τα λογοκριμένα δεδομένα (π.χ. περιορισμένο χρονικό διάστημα παρατήρησης), την έλλειψη ανεξαρτησίας (π.χ. επιδράσεις γέννας και επαναλαμβανόμενες μετρήσεις) και τις άνισες διακυμάνσεις. Τα γενικευμένα γραμμικά

▼M5

μικτά μοντέλα και τα μοντέλα δόσης-απόκρισης καλύπτουν μια ευρεία κατηγορία αναλυτικών εργαλείων που ενδέχεται να είναι κατάλληλα για τα δεδομένα που προκύπτουν από την παρούσα μέθοδο δοκιμών. Η έκθεση θα πρέπει να περιλαμβάνει επαρκείς πληροφορίες για τη μέθοδο ανάλυσης και το χρησιμοποιηθέν πρόγραμμα υπολογιστή, ώστε ένας ανεξάρτητος αναθεωρητής/στατιστικολόγος να μπορεί να αξιολογήσει/επαναξιολογήσει την ανάλυση.

Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

78. Τα ευρήματα θα πρέπει να αξιολογούνται όσον αφορά τις παρατηρούμενες επιδράσεις, συμπεριλαμβανομένων των ευρημάτων της νεκροψίας και της μικροσκοπικής εξέτασης. Η αξιολόγηση περιλαμβάνει τη σχέση ή την απουσία σχέσης μεταξύ της δόσης και της παρουσίας ανωμαλιών, της συχνότητας εμφάνισής τους (επίπτωση) και της σοβαρότητάς τους, συμπεριλαμβανομένων των μακροσκοπικών αλλοιώσεων. Θα πρέπει να αξιολογούνται επίσης τα όργανα-στόχοι, η γονιμότητα, οι κλινικές ανωμαλίες, οι αναπαραγωγικές επιδόσεις και οι επιδόσεις της γέννας, οι μεταβολές του σωματικού βάρους, η θνησιμότητα και κάθε άλλη τοξική επίδραση ή επίδραση στην ανάπτυξη. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίδεται στις αλλαγές που παρατηρούνται μόνο στο ένα φύλο. Κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της δοκιμής, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και, όταν είναι διαθέσιμα, τα τοξικοκινητικά δεδομένα, συμπεριλαμβανομένων της μεταφοράς μέσω του πλακούντα και της απέκκρισης στο γάλα.

Έκθεση δοκιμής

79. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες, που προκύπτουν στην παρούσα μελέτη από τα ζώα P, F_1 και F_2 (κατά περίπτωση):

Ελεγχόμενη χημική ουσία:

— όλες οι σχετικές διαθέσιμες πληροφορίες για τις χημικές, τοξικοκινητικές και τοξικοδυναμικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας·

— στοιχεία ταυτότητας·

— καθαρότητα·

Φορέας (εάν χρησιμοποιείται):

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα, εάν δεν πρόκειται για νερό·

Πειραματόζωα:

— είδος/στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε·

— αριθμός, ηλικία και φύλο των ζώων·

— προέλευση, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσιο, υλικά κατασκευής φωλιάς κ.λπ.·

— βάρος κάθε ζώου κατά την έναρξη της δοκιμής·

— δεδομένα κολπικού επιχρίσματος για τα θηλυκά ζώα P πριν από την έναρξη της αγωγής (εάν συλλέγονται δεδομένα τη συγκεκριμένη στιγμή)·

— καταγεγραμμένα στοιχεία για τα ζεύγη των ζώων της γενεάς P, τα οποία αναφέρουν το αρσενικό και το θηλυκό ζώο που συμμετείχαν σε κάθε ζευγάρωμα και την επιτυχία της·

— καταγεγραμμένα στοιχεία για τη γέννα από την οποία προήλθαν τα ενήλικα ζώα της γενεάς F_1·

Συνθήκες δοκιμής:

— αιτιολόγηση της επιλογής των επιπέδων δόσης·

— λεπτομέρειες σχετικά με το παρασκεύασμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας/του σιτηρεσίου, τις επιτευχθείσες συγκεντρώσεις·

▼M5

— σταθερότητα και ομοιογένεια του παρασκευάσματος στον φορέα (π.χ. στο σιτηρέσιο, στο πόσιμο νερό), στο αίμα και/ή στο γάλα υπό τις συνθήκες χρήσης και αποθήκευσης μεταξύ των χρήσεων·

— λεπτομέρειες σχετικά με τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας·

— μετατροπή της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο σιτηρέσιο/πόσιμο νερό (ppm) σε επιτευχθείσα δόση (mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα), εφόσον έχει γίνει·

— λεπτομέρειες για την ποιότητα της τροφής και του νερού (μεταξύ άλλων, σύσταση του σιτηρεσίου, εάν είναι διαθέσιμη)·

— λεπτομερής περιγραφή των διαδικασιών τυχαιοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν για την επιλογή νεογνών προς απόρριψη και για την κατανομή νεογνών στις ομάδες δοκιμής·

— περιβαλλοντικές συνθήκες·

— κατάλογος του προσωπικού που συμμετείχε στη μελέτη, με αναφορά της επαγγελματικής του κατάρτισης·

Αποτελέσματα (συγκεφαλαιωτικά και ατομικά δεδομένα ανά φύλο και δόση):

— κατανάλωση τροφής, κατανάλωση νερού, εφόσον υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία, αποδοτικότητα της τροφής (αύξηση του σωματικού βάρους ανά γραμμάριο καταναλωθείσας τροφής, εκτός από τις περιόδους συμβίωσης και γαλουχίας) και κατανάλωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας (σε περίπτωση χορήγησης μέσω της τροφής/του πόσιμου νερού) από τα ζώα P και F_1·

— δεδομένα απορρόφησης (εάν είναι διαθέσιμα)·

— δεδομένα για το σωματικό βάρος των ζώων P·

— δεδομένα για το σωματικό βάρος των επιλεγμένων ζώων F_1 μετά τον απογαλακτισμό·

— χρόνος θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης ή επιβίωση έως τη λήξη της·

— είδος, σοβαρότητα και διάρκεια των κλινικών παρατηρήσεων (αναστρέψιμων ή μη)·

— αποτελέσματα αιματολογικών εξετάσεων, ανάλυσης ούρων και κλινικής χημικής ανάλυσης, συμπεριλαμβανομένων των τιμών TSH και T4·

— φαινοτυπική ανάλυση των κυττάρων του σπλήνα (κύτταρα T, B, φυσικά φονικά κύτταρα)·

— κυτταρικότητα του μυελού των οστών·

— δεδομένα τοξικής απόκρισης·

— αριθμός θηλυκών ζώων P και F_1 με κανονικό ή μη κανονικό οιστρικό κύκλο και διάρκεια του κύκλου·

— χρόνος έως ζευγάρωμα (χρονικό διάστημα πριν από τη συνουσία, αριθμός ημερών από τον σχηματισμό των ζευγών έως το ζευγάρωμα)·

— τοξικές ή άλλες επιδράσεις στην αναπαραγωγή, συμπεριλαμβανομένων αριθμών και ποσοστών ζώων που ολοκλήρωσαν το ζευγάρωμα, την κύηση, τον τοκετό και τη γαλουχία, αρσενικών ζώων που προκάλεσαν κύηση και θηλυκών ζώων που παρουσίασαν σημεία δυστοκίας/παρατεταμένου ή δύσκολου τοκετού·

— διάρκεια της κύησης και, εφόσον υπάρχουν δεδομένα, του τοκετού·

— αριθμός εμφυτεύσεων, μέγεθος γέννας και ποσοστό αρσενικών νεογνών·

— αριθμός και ποσοστό απωλειών εμβρύων μετά την εμφύτευση, ζώων που γεννήθηκαν ζωντανά και ζώων που γεννήθηκαν νεκρά·

▼**M5**

— δεδομένα για το βάρος της γέννας και των νεογνών (αρσενικών, θηλυκών και συνδυαστικά δεδομένα), αριθμός καχεκτικών ζώων, εάν έχει προσδιοριστεί·

— αριθμός νεογνών με μακροσκοπικά ορατές ανωμαλίες·

— τοξικές ή άλλες επιδράσεις στους απογόνους, στη μεταγεννητική ανάπτυξη, στη βιωσιμότητα κ.λπ.·

— δεδομένα για σωματικά ορόσημα στα νεογνά και άλλα δεδομένα μεταγεννητικής ανάπτυξης·

— δεδομένα για τη σεξουαλική ωρίμαση των ζώων F_1·

— δεδομένα για τις παρατηρήσεις λειτουργιών σε νεογνά και ενήλικα ζώα, κατά περίπτωση·

— σωματικό βάρος κατά τη θανάτωση και δεδομένα απόλυτου και σχετικού βάρους οργάνων για τα ζώα P και τα ενήλικα ζώα F_1·

— ευρήματα της νεκροψίας·

— λεπτομερής περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών ευρημάτων·

— συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων ουράς επιδιδυμίδας, ποσοστό προοδευτικά κινούμενων σπερματοζωαρίων, ποσοστό μορφολογικά φυσιολογικών σπερματοζωαρίων και ποσοστό σπερματοζωαρίων με κάθε προσδιορισθείσα ανωμαλία για τα αρσενικά ζώα P και F_1·

— αριθμοί και στάδια ωρίμασης των ωοθυλακίων που υπήρχαν στις ωοθήκες των θηλυκών ζώων P και F_1, κατά περίπτωση·

— καταμέτρηση των ωχρών σωματίων στις ωοθήκες των θηλυκών ζώων F_1·

— στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, όπου ενδείκνυται.

Παράμετροι της 2ης κοόρτης:

— λεπτομερής περιγραφή των διαδικασιών που χρησιμοποιήθηκαν για την τυποποίηση των παρατηρήσεων και των διαδικασιών, καθώς και λειτουργικοί ορισμοί για τη βαθμολόγηση των παρατηρήσεων·

— κατάλογος όλων των διαδικασιών δοκιμής που χρησιμοποιήθηκαν και αιτιολόγηση της χρήσης τους·

— λεπτομέρειες για τις συμπεριφορικές/λειτουργικές, νευροπαθολογικές και μορφομετρικές διαδικασίες που χρησιμοποιήθηκαν, με πληροφορίες και λεπτομέρειες για τις αυτόματες συσκευές·

— διαδικασίες βαθμονόμησης και εξασφάλισης της ισοδυναμίας των συσκευών και της εξισορρόπησης των ομάδων αγωγής στις διαδικασίες δοκιμής·

— συνοπτική επεξήγηση των αποφάσεων που περιλαμβάνουν επαγγελματική κρίση·

— λεπτομερής περιγραφή όλων των συμπεριφορικών/λειτουργικών, νευροπαθολογικών και μορφομετρικών ευρημάτων ανά φύλο και ομάδα δόσης, συμπεριλαμβανομένων των αυξήσεων και μειώσεων σε σχέση με τις ομάδες μαρτύρων·

— βάρος εγκεφάλου·

— διαγνώσεις με βάση νευρολογικά σημεία και αλλοιώσεις, συμπεριλαμβανομένων των φυσικώς απαντώμενων ασθενειών ή παθολογικών καταστάσεων·

— εικόνες αντιπροσωπευτικών ευρημάτων·

— εικόνες χαμηλής ισχύος για την εκτίμηση της ομολογίας των τομών που χρησιμοποιήθηκαν για μορφομετρία·

▼M5

— στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, συμπεριλαμβανομένων των στατιστικών μοντέλων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των δεδομένων, και αποτελέσματα, ανεξαρτήτως του αν είναι σημαντικά ή όχι·

— συνεκτίμηση τυχόν άλλων τοξικών επιδράσεων για τη συναγωγή συμπεράσματος σχετικά με το νευροτοξικό δυναμικό της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, ανά φύλο και ομάδα δόσης·

— επιπτώσεις τοξικοκινητικών πληροφοριών στα συμπεράσματα·

— δεδομένα που τεκμηριώνουν την αξιοπιστία και την ευαισθησία της μεθόδου δοκιμών (π.χ. δεδομένα για θετικούς μάρτυρες και ιστορικούς μάρτυρες)·

— σχέσεις, εάν υπάρχουν, μεταξύ των νευροπαθολογικών και των λειτουργικών επιδράσεων·

— NOAEL ή δόση αναφοράς για μητέρες και απογόνους, ανά φύλο και ομάδα δόσης·

— συζήτηση της συνολικής ερμηνείας των δεδομένων βάσει των αποτελεσμάτων, συμπεριλαμβανομένου συμπεράσματος για το αν η χημική ουσία προκάλεσε αναπτυξιακή νευροτοξικότητα ή όχι και του NOAEL.

Παράμετροι της 3ης κοόρτης:

— τίτλοι αντισώματος IgM στον ορό (ευαισθητοποίηση στα SRCM ή στην KLH) ή μονάδες PFC IgM στοn σπλήνα (ευαισθητοποίηση στα SRCM)·

— η εφαρμογή της μεθόδου TDAR θα πρέπει να επιβεβαιώνεται, στο πλαίσιο της διαδικασίας βελτιστοποίησης από τα εργαστήρια που οργανώνουν τον προσδιορισμό για πρώτη φορά και περιοδικά (π.χ. ετησίως) από όλα τα εργαστήρια·

— συζήτηση της συνολικής ερμηνείας των δεδομένων βάσει των αποτελεσμάτων, συμπεριλαμβανομένου συμπεράσματος για το αν η χημική ουσία προκάλεσε αναπτυξιακή ανοσοτοξικότητα ή όχι και του NOAEL·

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα, συμπεριλαμβανομένων τιμών NOAEL για τις επιδράσεις στα γονικά ζώα και στους απογόνους.

Θα πρέπει να παρέχεται επίσης κάθε πληροφορία που δεν προέκυψε κατά τη μελέτη αλλά είναι χρήσιμη για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων (π.χ. ομοιότητες των επιδράσεων με εκείνες γνωστών νευροτοξικών ουσιών).

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

80. Η εκτεταμένη μελέτη τοξικότητας στην αναπαραγωγή μίας γενεάς παρέχει πληροφορίες για τις επιδράσεις της επανειλημμένης έκθεσης σε μια χημική ουσία κατά τη διάρκεια όλων των φάσεων του αναπαραγωγικού κύκλου, ανάλογα με τις ανάγκες. Ειδικότερα, η μελέτη παρέχει πληροφορίες για το αναπαραγωγικό σύστημα και για τελικά σημεία ανάπτυξης, αύξησης, επιβίωσης και λειτουργιών των απογόνων έως την 90ή ΜΓΗ.

81. Στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων της μελέτης θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όλες οι διαθέσιμες πληροφορίες για τη χημική ουσία, συμπεριλαμβανομένων των φυσικοχημικών, τοξικοκινητικών και τοξικοδυναμικών ιδιοτήτων της, οι διαθέσιμες πληροφορίες για ουσίες ανάλογης δομής και τα αποτελέσματα μελετών τοξικότητας που έχουν διεξαχθεί στο παρελθόν με την ελεγχόμενη χημική ουσία (π.χ. μελέτες οξείας τοξικότητας, τοξικότητας μετά από επανειλημμένη εφαρμογή, μελέτες μηχανισμών και μελέτες με τις οποίες αξιολογείται αν υπάρχουν σημαντικές ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές μεταξύ των ειδών όσον αφορά τις μεταβολικές ιδιότητες in vivo/in vitro). Εφόσον είναι εφικτό, τα αποτελέσματα της νεκροψίας-νεκροτομής και της ζύγισης των οργάνων θα πρέπει να αξιολογούνται σε συνάρτηση με τις παρατηρήσεις από άλλες μελέτες με επαναλαμβανόμενη δόση. Οι μειώσεις στην ανάπτυξη των απογόνων μπορούν να εξετάζονται σε σχέση με την επίδραση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στη σύσταση του γάλακτος (29).

▼M5

Κοόρτη 2 (αναπτυξιακή νευροτοξικότητα)

82. Τα νευροσυμπεριφορικά και νευροπαθολογικά αποτελέσματα θα πρέπει να ερμηνεύονται σε συνάρτηση με όλα τα ευρήματα, με τη χρήση προσέγγισης που βασίζεται στο βάρος της μαρτυρίας, σε συνδυασμό με την κρίση των ειδικών. Θα πρέπει να συζητούνται τα πρότυπα των σχετικών με τη συμπεριφορά ή τη μορφολογία ευρημάτων, εφόσον υπάρχουν, καθώς και οι ενδείξεις σχέσης δόσης-απόκρισης. Ο χαρακτηρισμός αυτός θα πρέπει να περιλαμβάνει αξιολόγηση της αναπτυξιακής νευροτοξικότητας, συμπεριλαμβανομένων επιδημιολογικών μελετών ή εκθέσεων περιστατικών σε ανθρώπους και πειραματικών μελετών σε ζώα (π.χ. τοξικοκινητικά δεδομένα, πληροφορίες για τη σχέση δομής-δράσης, δεδομένα από άλλες μελέτες τοξικότητας). Η αξιολόγηση των δεδομένων θα πρέπει να περιλαμβάνει συζήτηση τόσο της βιολογικής όσο και της στατιστικής σημαντικότητας, καθώς και τη σχέση, εάν υπάρχει, μεταξύ των παρατηρούμενων νευροπαθολογικών αλλοιώσεων και αλλαγών στη συμπεριφορά. Για καθοδήγηση σχετικά με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων αναπτυξιακής νευροτοξικότητας, βλ. μέθοδο δοκιμών B.53 (35) και Tyl et al., 2008 (31).

Κοόρτη 3 (αναπτυξιακή ανοσοτοξικότητα)

83. Η καταστολή ή η ενίσχυση της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως εκτιμάται μέσω της TDAR (εξαρτώμενη από κύτταρα Τ απόκριση αντισωμάτων), θα πρέπει να αξιολογείται σε συνάρτηση με όλες τις παρατηρήσεις. Η σημαντικότητα του αποτελέσματος της TDAR μπορεί να τεκμηριώνεται και από άλλες επιδράσεις σε ανοσολογικά σχετικούς δείκτες (π.χ. κυτταρικότητα του μυελού των οστών, βάρος και ιστοπαθολογία των λεμφικών ιστών, κατανομή υποσυνόλων των λεμφοκυττάρων). Οι επιδράσεις που διαπιστώνονται μέσω της TDAR ενδέχεται να μην είναι τόσο σημαντικές στην περίπτωση που παρατηρούνται άλλες τοξικές επιδράσεις σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις έκθεσης.

84. Για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων που αφορούν την αναπαραγωγή και τη νευροτοξικότητα θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως βοήθημα το καθοδηγητικό έγγραφο αριθ. 43 του ΟΟΣΑ (26).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Cooper, R.L., J.C. Lamb, S.M. Barlow, K. Bentley, A.M. Brady, N. Doerr, D.L. Eisenbrandt, P.A. Fenner-Crisp, R.N. Hines, L.F.H. Irvine, C.A. Kimmel, H. Koeter, A.A. Li, S.L. Makris, L.P. Sheets, G.J.A. Speijers and K.E. Whitby (2006), «A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment», *Critical Reviews in Toxicology*, 36, 69-98.

(2) Thigpen, J.E., K.D.R. Setchell, K.B. Ahlmark, J. Locklear, T. Spahr, G.F. Leviness, M.F. Goelz, J.K. Haseman, R.R. Newbold, and D.B. Forsythe (1999), «Phytoestrogen Content of Purified Open and Closed Formula Laboratory Animal Diets», *Lab. Anim. Sci.*, 49, 530- 536.

(3) Zoetis, T. and I. Walls (2003), Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research, ILSI Press, Washington, DC.

(4) Moser, V.C., I. Walls and T. Zoetis (2005), «Direct Dosing of Preweaning Rodents in Toxicity Testing and Research: Deliberations of an ILSI RSI Expert Working Group», International Journal of Toxicology, 24, 87-94.

(5) Conolly, R.B., B.D. Beck, and J.I. Goodman (1999), «Stimulating Research to Improve the Scientific Basis of Risk Assessment», *Toxicological Sciences*, 49, 1-4.

(6) Ulbrich, B. and A.K. Palmer (1995), «Detection of Effects on Male Reproduction — a Literature Survey», *Journal of the American College of Toxicologists*, 14, 293-327.

(7) Mangelsdorf, I., J. Buschmann and B. Orthen (2003), «Some Aspects Relating to the Evaluation of the Effects of Chemicals on Male Fertility», *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37, 356-369.

▼**M5**

(8) Sakai, T., M. Takahashi, K. Mitsumori, K. Yasuhara, K. Kawashima, H. Mayahara and Y. Ohno (2000). «Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats — overview of the studies», *Journal of Toxicological Sciences*, 25, 1-21.

(9) Creasy, D.M. (2003), «Evaluation of Testicular Toxicology: A Synopsis and Discussion of the Recommendations Proposed by the Society of Toxicologic Pathology», *Birth Defects Research*, Part B, 68, 408-415.

(10) Goldman, J.M., A.S. Murr, A.R. Buckalew, J.M. Ferrell and R.L. Cooper (2007), «The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies», *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84-97.

(11) Sadleir, R.M.F.S. (1979), «Cycles and Seasons», in C.R. Auston and R.V. Short (eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.

(12) Gallavan, R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds (1999), «Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights», *Reproductive Toxicology,* 13: 383-390.

(13) Korenbrot, C.C., I.T. Huhtaniemi and R.I. Weiner (1977), «Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat», *Biological Reproduction*, 17, 298-303.

(14) Ladics, G.S. (2007), «Use of SRBC Antibody Responses for Immunotoxicity Testing», *Methods*, 41, 9-19.

(15) Gore, E.R., J. Gower, E. Kurali, J.L. Sui, J. Bynum, D. Ennulat and D.J. Herzyk (2004), «Primary Antibody Response to Keyhole Limpet Hemocyanin in Rat as a Model for Immunotoxicity Evaluation», *Toxicology*, 197, 23-35.

(16) Gray, L.E., J. Ostby, J. Ferrell, G. Rehnberg, R. Linder, R. Cooper, J. Goldman, V. Slott and J. Laskey (1989), «A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat», *Fundamental and Applied Toxicology*, 12, 92-108.

(17) Robb, G.W., R.P. Amann and G.J. Killian (1978), «Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats», *Journal of Reproduction and Fertility*, 54, 103-107.

(18) Klinefelter, G.R., L.E. Jr Gray and J.D. Suarez (1991), «The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat». *Reproductive Toxicology*, 5, 39-44.

(19) Seed, J., R.E. Chapin, E.D. Clegg., L.A. Dostal, R.H. Foote, M.E. Hurtt, G.R. Klinefelter, S.L. Makris, S.D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K.A. Treinen, D.N. Veeramachaneni and L.D. Wise (1996), «Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report», *Reproductive Toxicology*, 10, 237- 244.

(20) Chapin, R.E., R.S. Filler, D. Gulati, J.J. Heindel, D.F. Katz, C.A. Mebus, F. Obasaju, S.D. Perreault, S.R. Russell and S. Schrader (1992), «Methods for Assessing Rat Sperm Motility», *Reproductive Toxicology*, 6, 267-273.

(21) Klinefelter, G.R., N.L. Roberts and J.D. Suarez (1992), «Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration», *Journal of Andrology*, 13, 409-421.

(22) Slott, V.L., J.D. Suarez and S.D. Perreault (1991), «Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations», *Reproductive Toxicology*, 5, 449-458.

▼**M5**

(23) Slott, V.L., and S.D. Perreault (1993), «Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer», *Methods in Toxicology, Part A*, Academic, Orlando, Florida. pp. 319-333.

(24) Toth, G.P., J.A. Stober, E.J. Read, H. Zenick and M.K. Smith (1989), «The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations», *Journal of Andrology*, 10, 401-415.

(25) Linder, R.E., L.F. Strader, V.L. Slott and J.D. Suarez (1992), «Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants», *Reproductive Toxicology*, 6, 491-505.

(26) OECD (2008), *Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment*, Series on Testing and Assessment, No. 43, ENV/JM/MONO(2008)16, OECD, Paris.

(27) Working, P.K., M. Hurtt (1987), «Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility», *Journal of Andrology*, 8, 330-337.

(28) Bolin, B., R. Garman, K. Jensen, G. Krinke, B. Stuart, and an ad Hoc Working Group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee (2006), «A 'Best Practices' Approach to Neuropathologic Assessment in Developmental Neurotoxicity Testing — for Today», *Toxicological Pathology*, 34, 296-313.

(29) Stütz, N., B. Bongiovanni, M. Rassetto, A. Ferri, A.M. Evangelista de Duffard, and R. Duffard (2006), «Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid in Rat Milk of Dams Exposed During Lactation and Milk Analysis of their Major Components», *Food Chemicals Toxicology*, 44, 8-16.

(30) Thigpen, JE, K.D.R. Setchell, J.K. Haseman, H.E. Saunders, G.F. Caviness, G.E. Kissling, M.G. Grant and D.B. Forsythe (2007), «Variations in Phytoestrogen Content between Different Mill Dates of the Same Diet Produces Significant Differences in the Time of Vaginal Opening in CD-1 Mice and F344 Rats but not in CD Sprague Dawley Rats», *Environmental health perspectives,* 115(12), 1717-1726.

(31) Tyl, R.W., K. Crofton, A. Moretto, V. Moser, L.P. Sheets and T.J. Sobotka (2008), «Identification and Interpretation of Developmental Neurotoxicity Effects: a Report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Expert Working Group on Neurodevelopmental Endpoints», *Neurotoxicology and Teratology*, 30: 349-381.

(32) OECD (1996), *Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test*, OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 422, OECD, Paris.

(33) Κεφάλαιο B.43 του παρόντος παραρτήματος: Μελέτη νευροτοξικότητας σε τρωκτικά.

(34) OECD (2000), *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations*, Series on Testing and Assessment, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(35) Κεφάλαιο B.53 του παρόντος παραρτήματος: Μελέτη αναπτυξιακής νευροτοξικότητας

(36) Κεφάλαιο B.54 του παρόντος παραρτήματος: Μητροτροφικός βιοπροσδιορισμός σε τρωκτικά: Βραχυπρόθεσμη δοκιμή διαλογής για οιστρογονικές ιδιότητες

(37) Κεφάλαιο B.55 του παρόντος παραρτήματος: Βιοπροσδιορισμός Hershberger σε επίμυες: Βραχυπρόθεσμος προσδιορισμός διαλογής για (αντι)ανδρογονικές ιδιότητες

▼**M5**

(38) OECD (2009), Guidance Document for Histologic Evalution of Endocrine and Reproductive Test in Rodents, Series on Testing and Assessment, No. 106, OECD, Paris.

(39) OECD (2011), Guidance Document on the Current Implementation of Internal Triggers in the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study in the United States and Canada, Series on Testing and Assessment, No. 117, ENV/JM/MONO(2011)21, OECD, Paris.

(40) OECD (2013), Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study, Series on Testing and Assessment, No. 151, OECD, Paris.

▼**M5**

Προσάρτημα 1

Μετρήσεις και παρατηρήσεις που περιλαμβάνονται στη δέσμη παρατηρήσεων λειτουργιών (κούρτη 2Α)

Κλωβός στέγασης & ανοικτός χώρος	Χειραγώγηση	Φυσιολογία
Στάση του σώματος	Ευκολία απομάκρυνσης	Θερμοκρασία
Ακούσιες κλονικές και τονικές συσπάσεις	Ευκολία μεταχείρισης	Σωματικό βάρος
Κλείσιμο των βλεφάρων	Μυϊκός τόνος	Αντίδραση της κόρης του οφθαλμού
Ανόρθωση των τριχών	Αντίδραση σε προσέγγιση	Μέγεθος της κόρης του οφθαλμού
Σιελόρροια	Αντίδραση σε άγγιγμα	
Δακρύρροια	Αντίδραση σε ηχητικό ερέθισμα	
Φώνηση	Αντίδραση σε τσίμπημα της ουράς	
Οπισθοβάδιση	Αντίδραση ανόρθωσης (διορθωτικό αντανακλαστικό)	
Ανωμαλίες βάδισης	Διάσταση του άκρου που χρησιμοποιείται για το πάτημα	
Διέγερση	Ισχύς λαβής πρόσθιων άκρων	
Στερεότυπες κινήσεις	Ισχύς λαβής οπίσθιων άκρων	
Περίεργη συμπεριφορά		
Κηλίδες		
Ανωμαλίες αναπνοής		

▼**M5**

Προσάρτημα 2

ΟΡΙΣΜΟΙ:

Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

▼M5

Β.57. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΕΡΟΕΙΔΟΓΕΝΕΣΗΣ H295R

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή δοκιμών (TG) 456 (2011). Το 1998 ο ΟΟΣΑ ανέλαβε μια δραστηριότητα πρώτης προτεραιότητας με σκοπό την αναθεώρηση των υφιστάμενων και την εκπόνηση νέων κατευθυντήριων γραμμών δοκιμών για τη διαλογή και τις δοκιμές δυνητικών ενδοκρινικών διαταρακτών. Το εννοιολογικό πλαίσιο του ΟΟΣΑ, του 2002, για τις δοκιμές και την αξιολόγηση χημικών ενδοκρινικών διαταρακτών περιλαμβάνει πέντε επίπεδα, καθένα από τα οποία αντιστοιχεί σε διαφορετικό επίπεδο βιολογικής πολυπλοκότητας (1). Ο προσδιορισμός στεροειδογένεσης H295R in vitro (H295R), που περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, χρησιμοποιεί μια ανθρώπινη κυτταρική σειρά από επινεφριδικό καρκίνωμα (κύτταρα NCI-H295R) και αποτελεί 2ου επιπέδου «προσδιορισμό in vitro για την παροχή μηχανιστικών δεδομένων», προοριζόμενο να χρησιμοποιείται για διαλογή και ιεράρχηση. Ο προσδιορισμός αναπτύχθηκε και τυποποιήθηκε ως μέθοδος διαλογής για τις επιδράσεις των χημικών ουσιών στη στεροειδογένεση, ιδίως στην παραγωγή της 17β-οιστραδιόλης (E2) και της τεστοστερόνης (T), στο πλαίσιο πολυσταδιακής διαδικασίας. Ο προσδιορισμός H295R έχει βελτιστοποιηθεί και επικυρωθεί (2) (3) (4) (5).

2. Στόχος του προσδιορισμού στεροειδογένεσης H295R είναι η ανίχνευση χημικών ουσιών που επηρεάζουν την παραγωγή της E2 και της T. Ο εν λόγω προσδιορισμός προορίζεται να χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση ξενοβιοτικών ουσιών που στοχεύουν στα ενδογενή στοιχεία της ενδοκυτταρικής βιοχημικής πορείας που αρχίζει με την αλληλουχία αντιδράσεων από τη χοληστερόλη έως την παραγωγή της E2 και/ή της T. Σκοπός του προσδιορισμού H295R δεν είναι η ταυτοποίηση χημικών ουσιών που επηρεάζουν τη στεροειδογένεση λόγω επιδράσεων στον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων (HPG). Με τον προσδιορισμό αυτό επιδιώκεται μια θετική ή αρνητική απάντηση σχετικά με τη δυνατότητα μιας χημικής ουσίας να επάγει ή να αναστέλλει την παραγωγή της T και της E2. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις ενδέχεται να ληφθούν ποσοτικά αποτελέσματα (βλ. παραγράφους 53 και 54). Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού εκφράζονται ως σχετικές αλλαγές στην παραγωγή ορμονών σε σύγκριση με μάρτυρες με τον διαλύτη (ΜΔ). Ο προσδιορισμός δεν στοχεύει στην παροχή συγκεκριμένων μηχανιστικών πληροφοριών σχετικά με την αλληλεπίδραση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας με το ενδοκρινικό σύστημα. Έχει διεξαχθεί έρευνα με χρήση της κυτταρικής σειράς για τον προσδιορισμό των επιδράσεων σε συγκεκριμένα ένζυμα και ενδιάμεσες ορμόνες, όπως η προγεστερόνη (2).

3. Οι ορισμοί και οι συντομογραφίες που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών παρατίθενται στο προσάρτημα. Λεπτομερές πρωτόκολλο με οδηγίες για τον τρόπο παρασκευής των διαλυμάτων, καλλιέργειας των κυττάρων και εκτέλεσης των διαφόρων πτυχών της δοκιμής είναι διαθέσιμο ως προσάρτημα I-III του εγγράφου «Πολυεργαστηριακή επικύρωση του προσδιορισμού στεροειδογένεσης H295R για την ταυτοποίηση ρυθμιστών της παραγωγής τεστοστερόνης και οιστραδιόλης» του ΟΟΣΑ (4).

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

4. Στη βιοσύνθεση των στεροειδών ορμονών του φύλου συμμετέχουν πέντε διαφορετικά ένζυμα που καταλύουν έξι διαφορετικές αντιδράσεις. Η ενζυμική μετατροπή της χοληστερόλης σε πρεγνενολόνη, η οποία καταλύεται από το ένζυμο διάσπασης της πλευρικής αλυσίδας της χοληστερόλης (CYP11A), που ανήκει στην οικογένεια ενζύμων κυτόχρωμα P450 (CYP), είναι το πρώτο βήμα σε μια σειρά βιοχημικών αντιδράσεων που κορυφώνονται με τη σύνθεση τελικών στεροειδών. Ανάλογα με τη σειρά των επόμενων δύο αντιδράσεων, η πορεία στεροειδογένεσης χωρίζεται σε δύο κλάδους, τη Δ^5-υδροξυστεροειδική και τη Δ^4-κετοστεροειδική πορεία, οι οποίες συγκλίνουν στην παραγωγή ανδροστενεδιόνης (σχήμα 1).

5. Η ανδροστενεδιόνη μετατρέπεται σε τεστοστερόνη (T) από τη 17β-υδροξυστεροειδική αφυδρογονάση (17β-HSD). Η τεστοστερόνη είναι ταυτόχρονα ενδιάμεση και τελική ορμόνη. Στα αρσενικά ζώα, μπορεί να μετατραπεί σε διυδροτεστοστερόνη (DHT) από την 5α-ρεδουκτάση, η οποία απαντά στις κυτταρικές μεμβράνες, στον πυρηνικό φάκελο και στο ενδοπλασματικό δίκτυο των ιστών-στόχων ανδρογονικής δράσης, όπως ο προστάτης και οι σπερματοδόχοι κύστεις. Η DHT είναι σημαντικά ισχυρότερο ανδρογόνο από την T και θεωρείται επίσης τελική ορμόνη· δεν μετράται με τον προσδιορισμό H295R (βλ. παράγραφο 10).

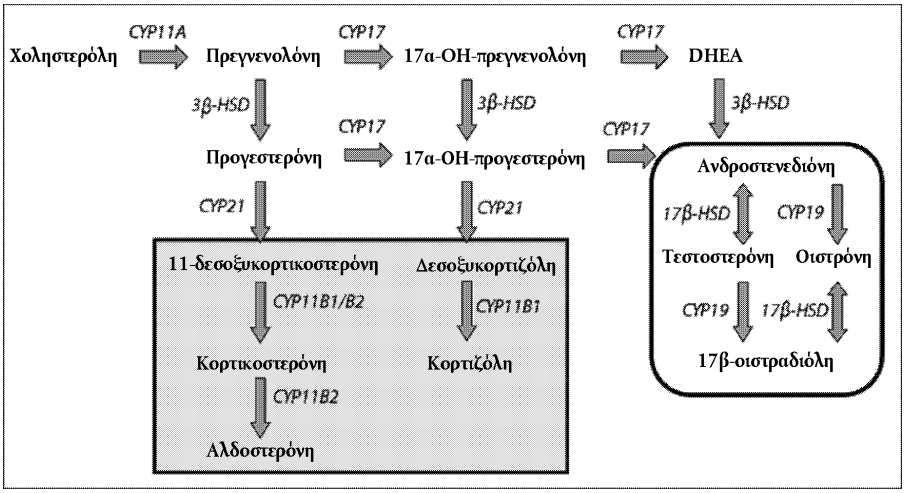
▼**M5**

6. Το ένζυμο της πορείας στεροειδογένεσης που μετατρέπει ανδρογόνες χημικές ουσίες σε οιστρογόνες είναι η αρωματάση (CYP19). Η CYP19 μετατρέπει την Τ σε 17β-οιστραδιόλη (Ε2) και την ανδροστενεδιόνη σε οιστρόνη. Η Ε2 και η Τ θεωρούνται τελικές ορμόνες της πορείας στεροειδογένεσης.

7. Η ειδικότητα της δράσης λυάσης του CYP17 διαφέρει μεταξύ των ειδών ως προς τα ενδιάμεσα υποστρώματα. Στον άνθρωπο, το ένζυμο ευνοεί υποστρώματα της Δ^5-υδροξυστεροειδικής πορείας (πρεγνενολόνη), ενώ τα υποστρώματα της Δ^4-κετοστεροειδικής πορείας (προγεστερόνη) ευνοούνται στον επίμυ (19). Αυτές οι διαφορές στη δράση λυάσης του CYP17 ενδέχεται να εξηγούν ορισμένες ειδοεξαρτώμενες διαφορές στην απόκριση σε χημικές ουσίες που μεταβάλλουν τη στεροειδογένεση in vivo(6). Έχει αποδειχθεί ότι τα κύτταρα H295 αντανακλούν με τη μέγιστη προσέγγιση την έκφραση των ενζύμων των επινεφριδίων και την παραγωγή στεροειδών σε ενήλικους ανθρώπους (20), αλλά είναι γνωστό ότι εκφράζονται στα εν λόγω κύτταρα ένζυμα τόσο της Δ^5-υδροξυστεροειδικής όσο και της Δ^4-κετοστεροειδικής πορείας σύνθεσης ανδρογόνων (7) (11) (13) (15).

Σχήμα 1

Πορεία της στεροειδογένεσης σε κύτταρα H295R



Σημείωση:

Τα ένζυμα εμφαίνονται με πλάγιους χαρακτήρες και οι ορμόνες με έντονους χαρακτήρες, ενώ τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση της σύνθεσης. Το γκρι φόντο δηλώνει πορείες/προϊόντα κορτικοστεροειδών. Οι πορείες/τα προϊόντα στεροειδών του φύλου εμφαίνονται εντός κύκλου. CYP = κυτόχρωμα P450, HSD = υδροξυστεροειδική αφυδρογονάση, DHEA = αφυδροεπιανδροστερόνη.

8. Η ανθρώπινη κυτταρική σειρά H295R από επινεφριδικό καρκίνωμα αποτελεί χρήσιμο μοντέλο in vitro για τη διερεύνηση των επιδράσεων στη σύνθεση των στεροειδών ορμονών (2) (7) (8) (9) (10). Στην κυτταρική σειρά H295R εκφράζονται γονίδια που κωδικοποιούν όλα τα καίριας σημασίας για τη στεροειδογένεση· ένζυμα που αναφέρονται ανωτέρω (11) (15) (σχήμα 1). Πρόκειται για μοναδική ιδιότητα, διότι η έκφραση αυτών των γονιδίων in vivo είναι εξειδικευμένη ανά ιστό και στάδιο της ανάπτυξης και, συνήθως, σε κανέναν ιστό και σε κανένα στάδιο ανάπτυξης δεν εκφράζονται όλα τα γονίδια που συμμετέχουν στη στεροειδογένεση (2). Τα κύτταρα H295R έχουν τα χαρακτηριστικά φυσιολογίας των ζωνικά αδιαφοροποίητων κυττάρων των επινεφριδίων των ανθρώπινων εμβρύων (11). Αποτελούν ένα μοναδικό σύστημαin vitro, καθώς έχουν την ικανότητα να παράγουν όλες τις στεροειδείς ορμόνες που απαντούν στον φλοιό των

▼M5

επινεφριδίων και στις γονάδες των ενηλίκων, επιτρέποντας τον έλεγχο επιδράσεων τόσο στη σύνθεση των κορτικοστεροειδών όσο και στην παραγωγή των στεροειδών ορμονών του φύλου, όπως τα ανδρογόνα και τα οιστρογόνα, παρ' όλο που ο προσδιορισμός έχει επικυρωθεί μόνο για την ανίχνευση Τ και Ε2. Οι αλλαγές που καταγράφονται από το σύστημα δοκιμής με τη μορφή της μεταβολής της παραγωγής Τ και Ε2 μπορεί να είναι αποτέλεσμα πλήθους διαφορετικών αλληλεπιδράσεων των ελεγχόμενων χημικών ουσιών με στεροειδογόνες λειτουργίες που εκφράζονται από τα κύτταρα H295R. Μεταξύ αυτών συγκαταλέγεται η ρύθμιση της έκφρασης, της σύνθεσης ή της λειτουργίας των ενζύμων που συμμετέχουν στην παραγωγή, τον μετασχηματισμό ή την απομάκρυνση των στεροειδών ορμονών (12) (13) (14). Η αναστολή της παραγωγής ορμονών μπορεί να οφείλεται σε άμεση ανταγωνιστική σύνδεση με ένζυμο της πορείας, σε επιπτώσεις σε συμπαράγοντες, όπως το NADPH (φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινοδινουκλεοτίδιο) και το cAMP (κυκλικό αδενοσινομονοφωσφορικό οξύ), και/ή σε αύξηση του μεταβολισμού των στεροειδών ή καταστολή της γονιδιακής έκφρασης ορισμένων ενζύμων της πορείας στεροειδογένεσης. Ενώ η αναστολή μπορεί να είναι συνάρτηση τόσο άμεσων όσο και έμμεσων διεργασιών που συνδέονται με την παραγωγή ορμονών, η επαγωγή είναι συνήθως έμμεσου χαρακτήρα, π.χ. με την επίδραση σε συμπαράγοντες όπως το NADPH και το cAMP (όπως στην περίπτωση της φορσκολίνης), τη μείωση του μεταβολισμού των στεροειδών (13) και/ή την ενισχυτική ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων στεροειδογένεσης.

9. Ο προσδιορισμός H295R παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα:

— επιτρέπει την ανίχνευση αυξήσεων και μειώσεων της παραγωγής Τ και Ε2·

— επιτρέπει την άμεση εκτίμηση των δυνητικών επιπτώσεων μιας χημικής ουσίας στη βιωσιμότητα των κυττάρων/κυτταροτοξικότητα. Αυτό είναι σημαντικό χαρακτηριστικό, καθώς παρέχει τη δυνατότητα διάκρισης μεταξύ των επιδράσεων που οφείλονται στην κυτταροτοξικότητα και εκείνων που οφείλονται στην άμεση αλληλεπίδραση των χημικών ουσιών με τις στεροειδογενετικές πορείες, η οποία δεν είναι δυνατή σε συστήματα καλλιέργειας ιστοτεμαχίων που αποτελούνται από κύτταρα πολλών τύπων με διαφορετικούς βαθμούς ευαισθησίας και διαφορετικές λειτουργίες·

— δεν απαιτεί τη χρήση ζώων·

— η κυτταρική σειρά H295R είναι διαθέσιμη στο εμπόριο.

10. Οι κύριοι περιορισμοί του προσδιορισμού είναι οι εξής:

— Η μεταβολική του ικανότητα είναι άγνωστη και πιθανώς αρκετά περιορισμένη. Επομένως, με τον παρόντα προσδιορισμό είναι πιθανόν να μην εντοπιστούν χημικές ουσίες που πρέπει να ενεργοποιηθούν μέσω του μεταβολισμού.

— Δεδομένου ότι προέρχεται από επινεφριδικό ιστό, η κυτταρική σειρά H295R, διαθέτει τα ένζυμα που μπορούν να παράγουν γλυκοκορτικοειδή και μεταλλοκορτικοειδή, καθώς και τις ορμόνες του φύλου. Επομένως, οι επιδράσεις στην παραγωγή γλυκοκορτικοειδών και μεταλλοκορτικοειδών ενδέχεται να επηρεάζουν τα επίπεδα Τ και Ε2 που παρατηρούνται στον προσδιορισμό.

— Με τον προσδιορισμό δεν μετράται η DHT και, συνεπώς, δεν αναμένεται να ανιχνεύονται χημικές ουσίες που αναστέλλουν την 5α-ρεδουκτάση. Στην περίπτωση αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο προσδιορισμός Hershberger (16).

— Με τον προσδιορισμό H295R δεν ανιχνεύονται χημικές ουσίες που παρεμποδίζουν τη στεροειδογένεση επιδρώντας στον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων (HPG), καθώς η επίδραση αυτή μπορεί να μελετηθεί μόνο σε άθικτα ζώα.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

11. Σκοπός του προσδιορισμού είναι η ανίχνευση χημικών ουσιών που επηρεάζουν την παραγωγή Τ και Ε2. Η Τ είναι επίσης ενδιάμεση ορμόνη στην πορεία παραγωγής της Ε2. Με τον προσδιορισμό είναι δυνατόν να ανιχνευθούν χημικές ουσίες που συνήθως αναστέλλουν ή επάγουν τα ένζυμα της πορείας στεροειδογένεσης.

▼M5

12. Ο προσδιορισμός εκτελείται συνήθως υπό τυπικές συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας σε πλάκες καλλιέργειας των 24 κοιλοτήτων (φρεατίων). Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν πλάκες άλλου μεγέθους για τη διεξαγωγή του προσδιορισμού. Ωστόσο, ο εμβολιασμός των πλακών και οι πειραματικές συνθήκες θα πρέπει να προσαρμόζονται αναλόγως ώστε να εξασφαλίζεται η συμμόρφωση με τα κριτήρια επιδόσεων.

13. Μετά από 24ωρη περίοδο εγκλιματισμού σε πλάκες πολλών κοιλοτήτων, τα κύτταρα εκτίθενται για 48 ώρες σε επτά συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τουλάχιστον εις τριπλούν. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται διαλύτης, και ως θετικοί μάρτυρες ένας γνωστός αναστολέας και ένας γνωστός επαγωγέας της παραγωγής ορμονών σε σταθερή συγκέντρωση. Στο τέλος της περιόδου έκθεσης, απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο από κάθε κοιλότητα. Αμέσως μετά την απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου αναλύεται η βιωσιμότητα των κυττάρων σε κάθε κοιλότητα. Οι συγκεντρώσεις ορμονών στο θρεπτικό μέσο μπορούν να μετρηθούν με τη χρήση διαφόρων μεθόδων, μεταξύ άλλων με τα διαθέσιμα στο εμπόριο σύνολα αντιδραστηρίων (κιτ) ορμονικού προσδιορισμού και/ή με ενόργανες τεχνικές, όπως η υγροχρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC-MS). Τα δεδομένα εκφράζονται ως πολλαπλασιαστική μεταβολή σε σύγκριση με τον μάρτυρα με τον διαλύτη και ως ελάχιστη συγκέντρωση στην οποία παρατηρούνται επιδράσεις (LOEC). Εάν ο προσδιορισμός είναι αρνητικός, η υψηλότερη συγκέντρωση που έχει ελεγχθεί αναφέρεται ως συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρούνται επιδράσεις (NOEC). Τα συμπεράσματα σχετικά με την ικανότητα μιας χημικής ουσίας να επηρεάζει τη στεροειδογένεση θα πρέπει να βασίζονται σε τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες εκτελέσεις της δοκιμής. Η πρώτη εκτέλεση μπορεί να χρησιμεύσει ως μέτρηση καθορισμού εύρους, ακολουθούμενη από ρύθμιση των συγκεντρώσεων για τη δεύτερη και την τρίτη εκτέλεση της δοκιμής, κατά περίπτωση, εάν ανακύψουν προβλήματα διαλυτότητας ή κυτταροτοξικότητας ή εάν η δραστικότητα της χημικής ουσίας μοιάζει να βρίσκεται στο άκρο της κλίμακας συγκεντρώσεων που ελέγχθηκε.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Κυτταρική σειρά

14. Τα κύτταρα NCI-H295R είναι διαθέσιμα στο εμπόριο από τον οργανισμό American Type Culture Collections (ATCC) κατόπιν υπογραφής συμφωνίας για μεταβίβαση υλικού (Material Transfer Agreement/MTA) ([1]).

Εισαγωγή

15. Λόγω του ότι η ικανότητα των κυττάρων να παράγουν Ε2 μεταβάλλεται με την πρόοδο της ηλικίας/τις ανακαλλιέργειες (2), τα κύτταρα θα πρέπει να καλλιεργούνται σύμφωνα με ειδικό πρωτόκολλο πριν χρησιμοποιηθούν και να σημειώνονται το πλήθος των ανακαλλιεργειών μετά την απόψυξη των κυττάρων, καθώς και ο αριθμός ανακαλλιέργειας κατά την κατάψυξη και την αποθήκευση των κυττάρων σε υγρό άζωτο. Ο πρώτος αριθμός δηλώνει τον πραγματικό αριθμό ανακαλλιεργειών των κυττάρων, ενώ ο δεύτερος τον αριθμό της ανακαλλιέργειας από την οποία καταψύχθηκαν και φυλάχθηκαν τα κύτταρα. Παραδείγματος χάριν, κύτταρα που είχαν καταψυχθεί μετά την πέμπτη ανακαλλιέργεια, αποψύχθηκαν και, στη συνέχεια, διαιρέθηκαν τρεις φορές (4 ανακαλλιέργειες, όπου ως ανακαλλιέργεια 1 θεωρούνται τα αποψυχόμενα κύτταρα), μετά την εκ νέου καλλιέργειά τους φέρουν την ετικέτα «ανακαλλιέργεια 4.5». Παράδειγμα συστήματος αρίθμησης παρουσιάζεται στο προσάρτημα Ι της έκθεσης επικύρωσης (4).

16. Χρησιμοποιείται θρεπτικό μέσο παρακαταθήκης ως βάση για το εμπλουτισμένο μέσο και το μέσο κατάψυξης. Το εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο αποτελεί απαραίτητο συστατικό των κυτταροκαλλιεργειών. Το μέσο κατάψυξης είναι ειδικά σχεδιασμένο ώστε να επιτρέπει την κατάψυξη κυττάρων για μακροπρόθεσμη φύλαξη χωρίς επιπτώσεις. Ο ορός Nu-serum (ή συγκρίσιμος ορός με τις ίδιες ιδιότητες, που έχει αποδειχθεί ότι παράγει δεδομένα που πληρούν τις απαιτήσεις επιδόσεων της δοκιμής και ποιοτικού ελέγχου), ο οποίος αποτελεί συστατικό των εμπλουτισμένων θρεπτικών μέσων, θα πρέπει να αναλύεται πριν χρησιμοποιηθεί, ώστε να προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις υποβάθρου Τ και Ε2. Η παρασκευή των διαλυμάτων αυτών περιγράφεται στο προσάρτημα ΙΙ της έκθεσης επικύρωσης (4).

([1]) ATCC CRL-2128, ATCC, Manassas, VA, USA, [http://www.lgcstandards-atcc.org/].

▼M5

17. Μετά την έναρξη καλλιέργειας κυττάρων H295R από μια αρχική παρτίδα του ATCC, τα κύτταρα θα πρέπει να αναπτύσσονται επί πέντε ανακαλλιέργειες (δηλ. να διαιρούνται 4 φορές). Στη συνέχεια, κύτταρα της πέμπτης ανακαλλιέργειας καταψύχονται σε υγρό άζωτο για φύλαξη. Πριν από την κατάψυξή τους, δείγμα κυττάρων της προηγούμενης, τέταρτης ανακαλλιέργειας υποβάλλεται σε δοκιμή σε πλάκα ποιοτικού ελέγχου (βλ. παραγράφους 36 και 37) για να ελεγχθεί αν η βασική παραγωγή ορμονών και η απόκριση στις χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται ως θετικοί μάρτυρες πληρούν τα κριτήρια ποιοτικού ελέγχου του προσδιορισμού που ορίζονται στον πίνακα 5.

18. Τα κύτταρα H295R θα πρέπει να καλλιεργούνται, να καταψύχονται και να φυλάσσονται σε υγρό άζωτο για να διασφαλίζεται ότι υπάρχουν μονίμως κύτταρα της κατάλληλης ανακαλλιέργειας/ηλικίας για καλλιέργεια και χρήση. Ο μέγιστος αριθμός ανακαλλιεργειών μετά την καλλιέργεια νέας ([1]) ή κατεψυγμένης ([2]) παρτίδας κυττάρων που είναι αποδεκτός στον προσδιορισμό H295R δεν υπερβαίνει το 10. Παραδείγματος χάριν, οι αποδεκτοί αριθμοί ανακαλλιεργειών κυττάρων από μια παρτίδα που καταψύχθηκε μετά την 5η ανακαλλιέργεια κυμαίνονται από 4.5 έως 10.5. Στην περίπτωση των κυττάρων που προέρχονται από αυτές τις κατεψυγμένες παρτίδες, θα πρέπει να εφαρμόζεται η διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 19. Τα εν λόγω κύτταρα θα πρέπει να καλλιεργούνται τουλάχιστον τέσσερις (4) φορές ακόμη (ανακαλλιέργεια 4.5) πριν χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή.

Εκκίνηση κυττάρων από το κατεψυγμένο απόθεμα

19. Η διαδικασία εκκίνησης των κυττάρων από το κατεψυγμένο απόθεμα χρησιμοποιείται ότι μια νέα παρτίδα κυττάρων αφαιρείται από το υγρό άζωτο αποθήκευσης για καλλιέργεια και δοκιμή. Η διαδικασία αυτή περιγράφεται λεπτομερώς στο προσάρτημα III της έκθεσης επικύρωσης (4). Τα κύτταρα απομακρύνονται από το υγρό άζωτο, αποψύχονται ταχέως, τοποθετούνται σε εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο σε σωλήνα φυγοκέντρου, φυγοκεντρούνται σε θερμοκρασία δωματίου, σχηματίζεται νέο εναιώρημα των κυττάρων στο εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο και μεταφέρονται σε φιάλη καλλιέργειας. Το θρεπτικό μέσο θα πρέπει να αντικαθίσταται την επόμενη ημέρα. Τα κύτταρα H295R καλλιεργούνται σε επωαστήρα στους 37 °C, σε ατμόσφαιρα με συγκέντρωση CO_2 5 %, και το θρεπτικό μέσο ανανεώνεται 2-3 φορές εβδομαδιαίως. Όταν η συρροή των κυττάρων φθάνει το 85-90 % κατά προσέγγιση, θα πρέπει να διαιρούνται. Η διαίρεση των κυττάρων είναι απαραίτητη για να εξασφαλίζεται η υγεία και η ανάπτυξή τους και να διατηρούνται κύτταρα για την εκτέλεση βιοπροσδιορισμών. Τα κύτταρα εκπλύνονται τρεις φορές με φυσιολογικό ορό που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS, χωρίς ιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+}) και απελευθερώνονται από τη φιάλη καλλιέργειας με την προσθήκη κατάλληλου ενζύμου απόσπασης, π.χ. θρυψίνης, σε PBS (χωρίς ιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+}). Αμέσως μετά την απόσπαση των κυττάρων από τη φιάλη καλλιέργειας, η ενζυμική δράση διακόπτεται με την προσθήκη εμπλουτισμένου θρεπτικού μέσου σε όγκο τριπλάσιο εκείνου που χρησιμοποιείται για την ενζυμική κατεργασία. Τα κύτταρα τοποθετούνται σε σωλήνα φυγοκέντρου, φυγοκεντρούνται σε θερμοκρασία δωματίου, απομακρύνεται το υπερκείμενο υγρό και σχηματίζεται νέο εναιώρημα του συσσωματώματος κυττάρων σε εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο. Κατάλληλη ποσότητα του κυτταρικού διαλύματος τοποθετείται σε νέα φιάλη καλλιέργειας. Η ποσότητα αυτή θα πρέπει να ρυθμίζεται κατά τρόπο ώστε να επιτυγχάνεται συρροή των κυττάρων εντός 5-7 ημερών. Η συνιστώμενη αναλογία ανακαλλιέργειας είναι 1:3 έως 1:4. Η πλάκα θα πρέπει να σημαίνεται επιμελώς. Τα κύτταρα είναι πλέον έτοιμα να χρησιμοποιηθούν στον προσδιορισμό, ενώ τα πλεονάζοντα κύτταρα πρέπει να καταψύχονται σε υγρό άζωτο, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 20.

([1]) Ο όρος «νέα παρτίδα» αναφέρεται σε πρόσφατη παρτίδα κυττάρων που έχει ληφθεί από τον οργανισμό ATCC.

([2]) Ο όρος «κατεψυγμένη παρτίδα» αναφέρεται σε κύτταρα που έχουν προηγουμένως καλλιεργηθεί και καταψυχθεί σε άλλο εργαστήριο εκτός του ATCC.

▼M5

Κατάψυξη κυττάρων H295R (προετοιμασία κυττάρων για φύλαξη σε υγρό άζωτο)

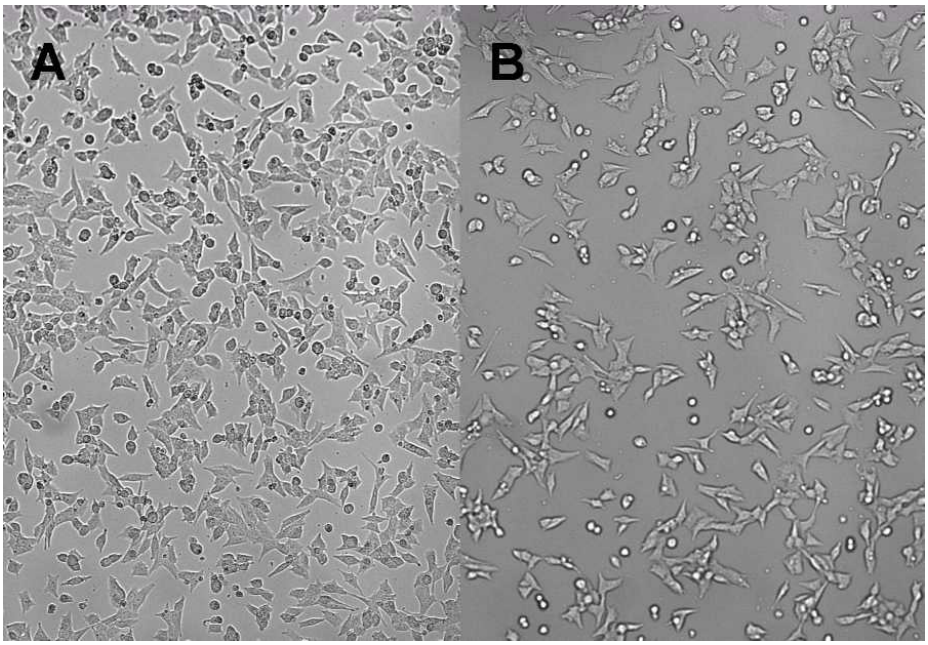
20. Για την προετοιμασία των κυττάρων H295R για κατάψυξη, θα πρέπει να εφαρμόζεται η διαδικασία που περιγράφεται ανωτέρω για τη διαίρεση των κυττάρων έως το στάδιο του σχηματισμού νέου εναιωρήματος του συσσωματώματος κυττάρων στον πυθμένα του σωλήνα φυγοκέντρου. Στο σημείο αυτό, σχηματίζεται νέο εναιώρημα του συσσωματώματος κυττάρων σε θρεπτικό μέσο κατάψυξης. Το διάλυμα μεταγγίζεται σε κρυογονικό φιαλίδιο που φέρει κατάλληλη σήμανση και καταψύχεται στους – 80 °C για 24 ώρες. Στη συνέχεια, το κρυογονικό φιαλίδιο μεταφέρεται σε υγρό άζωτο για φύλαξη. Η διαδικασία αυτή περιγράφεται λεπτομερώς στο προσάρτημα III της έκθεσης επικύρωσης (4).

Καλλιέργεια σε πλάκες και προεπώαση των κυττάρων για δοκιμή

21. Ο απαιτούμενος αριθμός πλακών των 24 κοιλοτήτων, οι οποίες έχουν προετοιμαστεί όπως περιγράφεται στην παράγραφο 19, εξαρτάται από τον αριθμό των χημικών ουσιών που πρόκειται να υποβληθούν στη δοκιμή και από τη συρροή των κυττάρων στα τρυβλία καλλιέργειας. Κατά κανόνα, μια φιάλη καλλιέργειας (75 cm^2) με ποσοστό συρροής κυττάρων 80-90 % παρέχει επαρκή κύτταρα για μία έως 1,5 πλάκα (των 24 κοιλοτήτων) με στοχευόμενη πυκνότητα 200 000 έως 300 000 κυττάρων ανά ml θρεπτικού μέσου, η οποία έχει ως αποτέλεσμα συρροή περίπου 50-60 % στις κοιλότητες μετά από 24 ώρες (σχήμα 2). Πρόκειται συνήθως για τη βέλτιστη πυκνότητα κυττάρων για την παραγωγή ορμονών κατά τον προσδιορισμό. Σε υψηλότερες πυκνότητες, μεταβάλλονται τα πρότυπα παραγωγής T και E2. Πριν διεξαχθεί ο προσδιορισμός για πρώτη φορά, συνιστάται να ελέγχονται διαφορετικές πυκνότητες εμβολιασμού, κυμαινόμενες μεταξύ 200 000 και 300 000 κυττάρων ανά ml, και να επιλέγεται για τα επόμενα πειράματα η πυκνότητα που έχει ως αποτέλεσμα συρροή 50-60 % στις κοιλότητες μετά από 24 ώρες.

Σχήμα 2

Φωτομικρογραφία κυττάρων H295R με πυκνότητα εμβολιασμού 50 % σε πλάκα καλλιέργειας των 24 κοιλοτήτων, μετά από 24 ώρες, στο άκρο (A) και στο κέντρο (B) της κοιλότητας



22. Το θρεπτικό μέσο απομακρύνεται με σιφώνιο από τη φιάλη καλλιέργειας και τα κύτταρα εκπλύνονται 3 φορές με αποστειρωμένο PBS (χωρίς Ca^{2+} και Mg^{2+}). Προστίθεται διάλυμα ενζύμων (σε PBS) για να αποσπαστούν τα κύτταρα από τη φιάλη καλλιέργειας. Μετά από το χρονικό διάστημα που απαιτείται για την απόσπαση των κυττάρων, η ενζυμική δράση διακόπτεται

▼M5

με την προσθήκη εμπλουτισμένου θρεπτικού μέσου σε όγκο τριπλάσιο εκείνου που χρησιμοποιείται για την ενζυμική κατεργασία. Τα κύτταρα τοποθετούνται σε σωλήνα φυγοκέντρου, φυγοκεντρούνται σε θερμοκρασία δωματίου, απομακρύνεται το υπερκείμενο υγρό και σχηματίζεται νέο εναιώρημα του συσσωματώματος κυττάρων σε εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο. Υπολογίζεται η πυκνότητα των κυττάρων με τη χρήση, π.χ., αιμοκυτταρόμετρου ή απαριθμητή κυττάρων. Το κυτταρικό διάλυμα αραιώνεται στην επιθυμητή πυκνότητα καλλιέργειας σε πλάκα και αναμειγνύεται πλήρως ώστε να εξασφαλιστεί ομοιογενής πυκνότητα κυττάρων. Τοποθετείται στις πλάκες 1 ml του κυτταρικού διαλύματος ανά κοιλότητα και σημαίνονται τόσο οι πλάκες, όσο και οι κοιλότητες. Οι εμβολιασμένες πλάκες επωάζονται στους 37 °C, σε ατμόσφαιρα με συγκέντρωση CO_2 5 %, για 24 ώρες, ώστε να προσκολληθούν τα κύτταρα στις κοιλότητες.

ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

23. Είναι εξαιρετικά σημαντικό να τοποθετούνται στις κοιλότητες ακριβείς όγκοι διαλυμάτων και δειγμάτων κατά την κατανομή των δόσεων, διότι οι όγκοι αυτοί καθορίζουν τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται στους υπολογισμούς των αποτελεσμάτων του προσδιορισμού.

24. Πριν από την έναρξη της κυτταροκαλλιέργειας και από κάθε επόμενη δοκιμή, το εργαστήριο θα πρέπει να αποδεικνύει την ευαισθησία του συστήματος μέτρησης ορμονών που χρησιμοποιεί (παράγραφοι 29-31).

25. Εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν ορμονικοί προσδιορισμοί που βασίζονται σε αντισώματα, οι χημικές ουσίες που πρόκειται να ελεγχθούν θα πρέπει να υποβάλλονται σε ανάλυση, πριν από την έναρξη του προσδιορισμού, για να διαπιστωθεί αν μπορούν να παρεμποδίσουν το σύστημα μετρήσεων που χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της Τ και της Ε2, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 32.

26. Ο συνιστώμενος διαλύτης για τον προσδιορισμό είναι το DMSO. Εάν χρησιμοποιείται εναλλακτικός διαλύτης, θα πρέπει να προσδιορίζονται τα ακόλουθα:

— η διαλυτότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, της φορσκολίνης και του prochloraz στον διαλύτη και

— η κυτταροτοξικότητα ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του διαλύτη.

Η μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση του διαλύτη συνιστάται να μην υπερβαίνει την αραίωση 1:10 της ελάχιστης κυτταροτοξικής συγκέντρωσής του.

27. Πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμής για πρώτη φορά, το εργαστήριο θα πρέπει να εκτελεί κατάλληλο πείραμα που καταδεικνύει την ικανότητά του να διατηρεί και να επιτυγχάνει τις κατάλληλες συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας και πειραματικές συνθήκες που απαιτούνται για τη δοκιμή χημικών ουσιών, όπως περιγράφονται στις παραγράφους 33-35.

28. Όταν διεξάγεται δοκιμή με νέα παρτίδα κυττάρων, θα πρέπει να εκτελείται μέτρηση με πλάκα ποιοτικού ελέγχου πριν χρησιμοποιηθεί η νέα παρτίδα, ώστε να αξιολογούνται οι επιδόσεις των κυττάρων, όπως περιγράφεται στις παραγράφους 36 και 37.

Επιδόσεις του συστήματος μέτρησης ορμονών

Ευαισθησία, ορθότητα και ακρίβεια της μεθόδου και διασταυρούμενη δραστικότητα με τη μήτρα του δείγματος

29. Κάθε εργαστήριο μπορεί να χρησιμοποιεί σύστημα μέτρησης ορμονών της επιλογής του για την ανάλυση της παραγωγής Τ και Ε2 από κύτταρα H295R, εφόσον αυτό πληροί κριτήρια επιδόσεων, μεταξύ των οποίων το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ). Οι ονομαστικές τιμές του ορίου αυτού είναι 100 pg/ml για την Τ και 10 pg/ml για την Ε2 και στηρίζονται στα βασικά επίπεδα ορμονών που παρατηρούνται στις μελέτες επικύρωσης. Ωστόσο, ενδέχεται να είναι σκόπιμα υψηλότερα ή χαμηλότερα επίπεδα, ανάλογα με τα βασικά ορμονικά επίπεδα που έχει επιτύχει το εργαστήριο

▼M5

που εκτελεί τη δοκιμή. Πριν από τη διεξαγωγή δοκιμής με πλάκα ποιοτικού ελέγχου και την εκτέλεση των δοκιμών, το εργαστήριο θα πρέπει να καταδεικνύει ότι με τον ορμονικό προσδιορισμό που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί είναι δυνατόν να μετρηθούν συγκεντρώσεις ορμονών σε εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο με επαρκή ορθότητα και ακρίβεια ώστε να πληρούνται τα κριτήρια ποιοτικού ελέγχου που καθορίζονται στους πίνακες 1 και 5, αναλύοντας εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο που έχει εμβολιαστεί με εσωτερικό μάρτυρα ορμονών. Το εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο θα πρέπει να εμβολιάζεται με τρεις τουλάχιστον συγκεντρώσεις κάθε ορμόνης (π.χ. 100, 500 και 2 500 pg/ml για την T και 10, 50 και 250 pg/ml για την E2· εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως χαμηλότερες συγκεντρώσεις εμβολιασμού με T και E2 οι χαμηλότερες δυνατές συγκεντρώσεις βάσει των ορίων ανίχνευσης του επιλεγμένου συστήματος μέτρησης ορμονών) και να αναλύεται. Οι μετρούμενες συγκεντρώσεις ορμονών σε μη εκχυλισμένα δείγματα θα πρέπει να μη διαφέρουν κατά περισσότερο από 30 % από τις ονομαστικές συγκεντρώσεις, ενώ η μεταβλητότητα μεταξύ πολλαπλών μετρήσεων στο ίδιο δείγμα δεν πρέπει να υπερβαίνει το 25 % (βλ. επίσης πίνακα 8 για συμπληρωματικά κριτήρια ποιοτικού ελέγχου). Εάν πληρούνται τα ανωτέρω κριτήρια, θεωρείται ότι ο επιλεγμένος ορμονικός προσδιορισμός είναι επαρκώς ορθός και ακριβής και δεν προκαλεί διασταυρούμενη αντίδραση με τα συστατικά του θρεπτικού μέσου (μήτρα δείγματος) ώστε να αναμένεται σημαντική μεταβολή του αποτελέσματος του προσδιορισμού. Στην περίπτωση αυτή, δεν απαιτείται εκχύλιση των δειγμάτων πριν από τη μέτρηση των ορμονών.

30. Σε περίπτωση που δεν πληρούνται τα κριτήρια ποιοτικού ελέγχου των πινάκων 1 και 8, είναι πιθανόν να πρόκειται για σημαντική επίδραση της μήτρας του δείγματος και θα πρέπει να διεξάγεται πείραμα με εκχυλισμένο εμβολιασμένο θρεπτικό μέσο. Παράδειγμα της διαδικασίας εκχύλισης περιγράφεται στο προσάρτημα II της έκθεσης επικύρωσης (4). Οι συγκεντρώσεις ορμονών θα πρέπει να μετρώνται στα εκχυλισμένα δείγματα εις τριπλούν ([1]). Εάν μπορεί να αποδειχθεί ότι, μετά την εκχύλιση, τα συστατικά του θρεπτικού μέσου δεν παρεμποδίζουν τη μέθοδο ανίχνευσης ορμονών, όπως ορίζεται στα κριτήρια ποιοτικού ελέγχου, όλα τα επόμενα πειράματα θα πρέπει να διεξάγονται με εκχυλισμένα δείγματα. Εάν δεν είναι δυνατή η εκπλήρωση των κριτηρίων ποιοτικού ελέγχου μετά την εκχύλιση, το χρησιμοποιούμενο σύστημα μέτρησης ορμονών δεν είναι κατάλληλο για τον προσδιορισμό στεροειδογένεσης H295R και θα πρέπει να χρησιμοποιείται εναλλακτική μέθοδος ανίχνευσης ορμονών.

Πρότυπη καμπύλη

31. Οι συγκεντρώσεις ορμονών στους μάρτυρες με διαλύτη (ΜΔ) θα πρέπει να βρίσκονται στο ευθύγραμμο τμήμα της πρότυπης καμπύλης και, κατά προτίμηση, κοντά στο κέντρο του, ώστε να εξασφαλίζεται ότι η επαγωγή και η αναστολή της σύνθεσης ορμονών μπορούν να μετρηθούν. Οι αραιώσεις του θρεπτικού μέσου (ή των εκχυλισμάτων) που πρόκειται να μετρηθούν πρέπει να επιλέγονται αναλόγως. Η γραμμική σχέση πρέπει να προσδιορίζεται με κατάλληλη στατιστική προσέγγιση.

Δοκιμή χημικής παρεμπόδισης

32. Εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για τη μέτρηση των ορμονών προσδιορισμοί που βασίζονται σε αντισώματα, όπως ενζυμικοί ανοσοπροσροφητικοί προσδιορισμοί (ELISA) και ραδιοανοσοχημικοί προσδιορισμοί (RIA), κάθε χημική ουσία θα πρέπει να ελέγχεται, πριν από την έναρξη της πραγματικής δοκιμής της, για να διαπιστωθεί αν μπορεί να παρεμποδίσει το σύστημα μέτρησης ορμονών που θα χρησιμοποιηθεί [προσάρτημα III της έκθεσης επικύρωσης (4)], διότι ορισμένες χημικές ουσίες μπορούν να παρεμποδίσουν τις δοκιμές αυτές (17). Εάν προκύψει παρεμπόδιση ≥ 20 % της βασικής παραγωγής T και/ή E2, όπως προσδιορίζεται με ανάλυση των ορμονών, όλες οι αραιώσεις του διαλύματος παρακαταθήκης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας θα πρέπει να υποβάλλονται στη δοκιμή χημικής παρεμπόδισης του ορμονικού προσδιορισμού (που περιγράφεται στο προσάρτημα III της έκθεσης επικύρωσης (4), σημείο 5.0) για τον καθορισμό της δόσης κατωφλίου στην οποία σημειώνεται σημαντική (≥ 20 %) παρεμπόδιση. Εάν η παρεμπόδιση είναι μικρότερη από 30 %, τα αποτελέσματα μπορούν να διορθώνονται ώστε να λαμβάνεται υπόψη. Εάν η παρεμπόδιση υπερβαίνει το 30 %, τα δεδομένα για τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις είναι άκυρα και θα πρέπει

([1]) *Σημείωση:* Εάν απαιτείται εκχύλιση, εκτελούνται τρεις μετρήσεις για κάθε εκχύλισμα. Κάθε δείγμα εκχυλίζεται μόνο μία φορά.

▼M5

να απορρίπτονται. Εάν μια ελεγχόμενη χημική ουσία παρεμποδίζει σημαντικά ένα σύστημα μέτρησης ορμονών σε περισσότερες από μία μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις, θα πρέπει να χρησιμοποιείται διαφορετικό σύστημα. Για να αποφευχθεί η παρεμπόδιση από χημικές προσμείξεις, συνιστάται να εκχυλίζονται οι ορμόνες από το θρεπτικό μέσο με τη χρήση κατάλληλου διαλύτη. Σχετικές μέθοδοι αναφέρονται στην έκθεση επικύρωσης (4).

Πίνακας 1

Κριτήρια επιδόσεων των συστημάτων μέτρησης ορμονών

Παράμετρος	Κριτήριο
Ευαισθησία της μεθόδου μετρήσεων	Όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) T: 100 pg/ml· E2: 10 pg/ml (α)
Απόδοση της εκχύλισης ορμονών (μόνο όταν απαιτείται εκχύλιση)	Τα μέσα ποσοστά ανάκτησης (βάσει μετρήσεων εις τριπλούν) για τις εμβολιαζόμενες ποσότητες ορμονών δεν θα πρέπει να αποκλίνουν κατά ποσοστό άνω του 30 % από την ποσότητα που προστίθεται.
Χημική παρεμπόδιση (μόνο για συστήματα που βασίζονται σε αντισώματα)	Δεν θα πρέπει να σημειώνεται σημαντική διασταυρούμενη δραστικότητα (≥ 30 % της βασικής παραγωγής της αντίστοιχης ορμόνης) με οποιαδήποτε από τις ορμόνες που παράγουν τα κύτταρα (β) (γ).

(α) *Σημείωση:* Τα όρια μέτρησης της μεθόδου στηρίζονται στις τιμές βασικής ορμονικής παραγωγής του πίνακα 5 και εξαρτώνται από τις επιδόσεις. Εάν μπορεί να επιτευχθεί μεγαλύτερη βασική ορμονική παραγωγή, το όριο μπορεί να είναι μεγαλύτερο.

(β) Είναι πιθανή η διασταυρούμενη αντίδραση ορισμένων αντισωμάτων της T και της E2 με την ανδροστενδιόνη και την οιστρόνη, αντιστοίχως, σε υψηλότερο ποσοστό. Στις περιπτώσεις αυτές δεν μπορούν να προσδιοριστούν με ακρίβεια οι επιδράσεις στην 17β-HSD. Ωστόσο, τα σχετικά δεδομένα εξακολουθούν να παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τις επιδράσεις στην παραγωγή οιστρογόνων ή ανδρογόνων γενικά. Στις περιπτώσεις αυτές, τα δεδομένα θα πρέπει να εκφράζονται ως αποκρίσεις ανδρογόνων/οιστρογόνων και όχι ως E2 και T.

(γ) Σε αυτές περιλαμβάνονται οι εξής: χοληστερόλη, πρεγνενολόνη, προγεστερόνη, 11-δεσοξυκορτικοστερόνη, κορτικοστερόνη, αλδοστερόνη, 17α-πρεγνενολόνη,17α-προγεστερόνη, δεσοξυκορτιζόλη, κορτιζόλη, DHEA, ανδροστενεδιόνη, οιστρόνη.

Δοκιμή ελέγχου ικανότητας εργαστηρίων

33. Πριν υποβάλει σε δοκιμή άγνωστες χημικές ουσίες, το εργαστήριο θα πρέπει να καταδεικνύει ότι είναι ικανό να επιτυγχάνει και να διατηρεί τις κατάλληλες συνθήκες κυταροκαλλιέργειας και δοκιμής που απαιτούνται για την επιτυχή διεξαγωγή του προσδιορισμού, εκτελώντας τη δοκιμή ελέγχου ικανότητας εργαστηρίων. Δεδομένου ότι οι επιδόσεις ενός προσδιορισμού συνδέονται άμεσα με το εργαστηριακό προσωπικό που τον διεξάγει, οι διαδικασίες αυτές θα πρέπει να επαναλαμβάνονται εν μέρει σε περίπτωση αλλαγής του προσωπικού του εργαστηρίου.

34. Η παρούσα δοκιμή ελέγχου ικανότητας διεξάγεται υπό τις συνθήκες που αναφέρονται στις παραγράφους 38 έως 40, με την έκθεση κυττάρων σε 7 αυξανόμενες συγκεντρώσεις ισχυρών, μέτριων και ασθενών επαγωγέων και αναστολέων, καθώς και μιας αρνητικής χημικής ουσίας (βλ. πίνακα 2). Συγκεκριμένα, στις χημικές ουσίες που πρέπει να χρησιμοποιούνται στη δοκιμή περιλαμβάνονται ο ισχυρός επαγωγέας φορσκολίνη (αριθ. CAS 66575-29-9), ο ισχυρός αναστολέας prochloraz (αριθ. CAS 67747-09-5), ο μέτριος επαγωγέας ατραζίνη (αριθ. CAS 1912-24-9), ο μέτριος αναστολέας αμινογλουταθιμίδιο (αριθ. CAS 125-84-8), ο ασθενής επαγωγέας

▼M5

(παραγωγή E2) και ασθενής αναστολέας (παραγωγή T) δισφαινόλη A (αριθ. CAS 80-05-7) και η αρνητική χημική ουσία ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (HCG) (αριθ. CAS 9002-61-3), που εμφαίνονται στον πίνακα 2. Εκτελούνται δοκιμές σε χωριστές πλάκες για όλες τις χημικές ουσίες με τη χρήση του σχήματος του πίνακα 6. Σε κάθε καθημερινή εκτέλεση της δοκιμής για τις χημικές ουσίες ελέγχου ικανότητας θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται μια πλάκα ποιοτικού ελέγχου (πίνακας 4, παράγραφοι 36-37).

Πίνακας 2

Χημικές ουσίες ελέγχου ικανότητας και συγκεντρώσεις έκθεσης

Χημική ουσία ελέγχου ικανότητας	Συγκεντρώσεις δοκιμής [μM]
Prochloraz	0 (α), 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10
Φορσκολίνη	0 (α), 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30
Ατραζίνη	0 (α), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Αμινογλουταιθιμίδιο	0 (α), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Δισφαινόλη A	0 (α), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
HCG	0 (α), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100

(α) Μάρτυρας με διαλύτη (DMSO) (0), 1 μl DMSO/κοιλότητα.

Κατά τη δοκιμή ελέγχου ικανότητας εργαστηρίων, τα κύτταρα H295R θα πρέπει να εκτίθενται στις χημικές ουσίες ελέγχου ικανότητας σε πλάκες των 24 κοιλοτήτων. Οι δόσεις εκφράζονται σε μM για όλες τις ελεγχόμενες χημικές ουσίες. Ως διαλύτης για τις δόσεις θα πρέπει να χρησιμοποιείται DMSO σε αναλογία 0,1 % κατ' όγκο ανά κοιλότητα. Καθεμία από τις συγκεντρώσεις δοκιμής θα πρέπει να ελέγχεται σε τρεις κοιλότητες (πίνακας 6). Χρησιμοποιείται χωριστή πλάκα για κάθε χημική ουσία. Σε κάθε καθημερινή εκτέλεση της δοκιμής συμπεριλαμβάνεται μια πλάκα ποιοτικού ελέγχου.

35. Θα πρέπει να διεξάγονται αναλύσεις κυτταρικής βιωσιμότητας και ορμονών, όπως προβλέπεται στις παραγράφους 42 έως 46. Η τιμή κατωφλίου (η ελάχιστη συγκέντρωση στην οποία παρατηρούνται επιδράσεις, LOEC) και η απόφαση ταξινόμησης θα πρέπει να αναφέρονται και να συγκρίνονται με τις τιμές του πίνακα 3. Τα δεδομένα θεωρούνται αποδεκτά, εάν είναι σύμφωνα με την τιμή LOEC και την απόφαση ταξινόμησης που εμφαίνονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3

Τιμές κατωφλίου (LOEC) και αποφάσεις ταξινόμησης για τις χημικές ουσίες ελέγχου ικανότητας

	Αριθ. CAS	LOEC [μM]		Απόφαση ταξινόμησης	
		T	E2	T	E2
Prochloraz	67747-09-5	≤ 0,1	≤ 1,0	+ (α) (αναστολή)	+ (αναστολή)
Φορσκολίνη	66575-29-9	≤ 10	≤ 0,1	+ (επαγωγή)	+ (επαγωγή)
Ατραζίνη	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (επαγωγή)	+ (επαγωγή)
Αμινογλουταιθιμίδιο	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (αναστολή)	+ (αναστολή)

▼M5

	Αριθ. CAS	LOEC [μM]		Απόφαση ταξινόμησης	
		T	E2	T	E2
Δισφαινόλη A	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (αναστολή)	+ (επαγωγή)
HCG	9002-61-3	A/A	A/A	Αρνητική	Αρνητική

(α) +, θετική
A/A: άνευ αντικειμένου, δεδομένου ότι δεν πρέπει να επέρχονται αλλαγές μετά την έκθεση σε μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις αρνητικού μάρτυρα.

Πλάκα ποιοτικού ελέγχου

36. Η πλάκα ποιοτικού ελέγχου χρησιμοποιείται για την εξακρίβωση των επιδόσεων των κυττάρων H295R υπό πρότυπες συνθήκες καλλιέργειας και για τη δημιουργία ιστορικής βάσης δεδομένων που αφορούν τις συγκεντρώσεις ορμονών σε μάρτυρες με διαλύτη, θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες, καθώς και άλλα μέτρα ποιοτικού ελέγχου, με την πάροδο του χρόνου.

— Οι επιδόσεις των κυττάρων H295R θα πρέπει να αξιολογούνται με τη χρήση πλάκας ποιοτικού ελέγχου για κάθε νέα παρτίδα προερχόμενη από τον ATCC ή μετά την πρώτη χρήση ενός αποθέματος κυττάρων που έχει προηγουμένως καταψυχθεί, εκτός εάν έχει διεξαχθεί δοκιμή ελέγχου ικανότητας εργαστηρίων (παράγραφοι 32-34) με τη συγκεκριμένη παρτίδα κυττάρων.

— Η πλάκα ποιοτικού ελέγχου εξασφαλίζει την πλήρη αξιολόγηση των συνθηκών προσδιορισμού (π.χ. βιωσιμότητα κυττάρων, μάρτυρες με διαλύτη, αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες, καθώς και μεταβλητότητα εντός ενός προσδιορισμού και μεταξύ διαφορετικών προσδιορισμών) κατά τις δοκιμές χημικών ουσιών και θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται σε κάθε εκτέλεση της δοκιμής.

37. Η δοκιμή ποιοτικού ελέγχου διεξάγεται σε πλάκα των 24 κοιλοτήτων και σύμφωνα με τις διαδικασίες επώασης, έκθεσης στις δόσεις, βιωσιμότητας των κυττάρων/κυτταροτοξικότητας, εκχύλισης ορμονών και ανάλυσης ορμονών που περιγράφονται στις παραγράφους 38 έως 46 για τις δοκιμές χημικών ουσιών. Η πλάκα ποιοτικού ελέγχου περιέχει τυφλά δείγματα, μάρτυρες με διαλύτη και δύο συγκεντρώσεις ενός γνωστού επαγωγέα (φορσκολίνη, 1 και 10 μM) και ενός γνωστού αναστολέα (prochloraz, 0,1 και 1 μM) της σύνθεσης E2 και T. Επιπλέον, χρησιμοποιείται μεθανόλη (MeOH) σε επιλεγμένες κοιλότητες ως θετικός μάρτυρας για τον προσδιορισμό βιωσιμότητας/κυτταροτοξικότητας. Αναλυτική περιγραφή της διάταξης των πλακών παρέχεται στον πίνακα 4. Τα κριτήρια που πρέπει να πληροί η πλάκα ποιοτικού ελέγχου παρατίθενται στον πίνακα 5. Θα πρέπει να επιτυγχάνεται η ελάχιστη βασική παραγωγή T και E2, τόσο στις κοιλότητες που περιέχουν μάρτυρες με διαλύτη όσο και στις κοιλότητες που περιέχουν τυφλά δείγματα.

Πίνακας 4

Διάταξη πλάκας ποιοτικού ελέγχου για τον έλεγχο των επιδόσεων κυττάρων H295R που δεν έχουν εκτεθεί και κυττάρων που έχουν εκτεθεί σε γνωστούς αναστολείς (PRO = prochloraz) και διεγέρτες (FOR = φορσκολίνη) της παραγωγής E2 και T. Μετά τη λήξη του πειράματος έκθεσης και την απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου, προστίθεται σε όλες τις κοιλότητες MeOH διάλυμα μεθανόλης 70 % για να χρησιμεύει ως θετικός μάρτυρας κυτταροτοξικότητας [βλ. προσδιορισμό κυτταροτοξικότητας στο προσάρτημα III της έκθεσης επικύρωσης (4)]

	1	2	3	4	5	6
A	Τυφλό δείγμα (α)	Τυφλό δείγμα (α)	Τυφλό δείγμα (α)	Τυφλό δείγμα (α) (+ MeOH) (β)	Τυφλό δείγμα (α) (+ MeOH) (β)	Τυφλό δείγμα (α) (+ MeOH) (β)
B	DMSO (γ) 1 μl	DMSO (γ) 1 μl	DMSO (γ) 1 μl	DMSO (γ) 1 μl (+ MeOH) (β)	DMSO (γ) 1 μl (+ MeOH) (β)	DMSO (γ) 1 μl (+ MeOH) (β)

▼**M5**

	1	2	3	4	5	6
Γ	FOR 1 μM	FOR 1 μM	FOR 1 μM	PRO 0,1 μM	PRO 0,1 μM	PRO 0,1 μM
Δ	FOR 10 μM	FOR 10 μM	FOR 10 μM	PRO 1 μM	PRO 1 μM	PRO 1 μM

(α) Στα κύτταρα των κοιλοτήτων τυφλού δείγματος προστίθεται μόνο θρεπτικό μέσο (δηλ. δεν προστίθεται διαλύτης).
(β) Η μεθανόλη (MeOH) προστίθεται **μετά** τη λήξη της έκθεσης και την απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου από τις κοιλότητες αυτές.
(γ) Μάρτυρας με διαλύτη DMSO (1 μl/κοιλότητα).

Πίνακας 5

Κριτήρια επιδόσεων για την πλάκα ποιοτικού ελέγχου

	T	E2
Βασική παραγωγή ορμονών στο μάρτυρα με τον διαλύτη (ΜΔ)	≥ 5 επί το όριο ποσοτικού προσδιορισμού	≥ 2,5 επί το όριο ποσοτικού προσδιορισμού
Επαγωγή (10 μM φορσκολίνης)	≥ 1,5 επί την τιμή του ΜΔ	≥ 7,5 επί την τιμή του ΜΔ
Αναστολή (1 μM prochloraz)	≤ 0,5 επί την τιμή του ΜΔ	≤ 0,5 επί την τιμή του ΜΔ

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΚΘΕΣΗΣ ΣΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

38. Τα προεπωασμένα κύτταρα απομακρύνονται από τον επωαστήρα (παράγραφος 21) και εξετάζονται στο μικροσκόπιο για να εξασφαλιστεί ότι βρίσκονται σε καλή κατάσταση (προσκόλληση, μορφολογία) πριν από την έκθεση στις δόσεις.

39. Τα κύτταρα τοποθετούνται σε θάλαμο βιοασφάλειας και το εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο απομακρύνεται και αντικαθίσταται με νέο (1 ml/κοιλότητα). Ο προτιμώμενος διαλύτης για την παρούσα μέθοδο δοκιμών είναι το DMSO. Ωστόσο, εάν υπάρχουν λόγοι που επιβάλλουν τη χρήση άλλων διαλυτών, θα πρέπει να αναφέρονται. Τα κύτταρα εκτίθενται στην ελεγχόμενη χημική ουσία με την προσθήκη 1 μl κατάλληλου διαλύματος παρακαταθήκης σε DMSO [βλ. προσάρτημα ΙΙ της έκθεσης επικύρωσης (4)] ανά 1 ml εμπλουτισμένου θρεπτικού μέσου (όγκος κοιλότητας). Με τον τρόπο αυτό προκύπτει τελική συγκέντρωση 0,1 % DMSO στις κοιλότητες. Για να εξασφαλιστεί επαρκής ανάμειξη, προτιμάται γενικά η ανάμειξη του κατάλληλου διαλύματος παρακαταθήκης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε DMSO με το εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο για να ληφθεί η επιθυμητή τελική συγκέντρωση για κάθε δόση και η προσθήκη του μείγματος σε κάθε κοιλότητα αμέσως μετά την απομάκρυνση του παλαιού θρεπτικού μέσου. Εάν χρησιμοποιηθεί η επιλογή αυτή, η συγκέντρωση του DMSO (0,1 %) θα πρέπει να παραμείνει σταθερή σε όλες τις κοιλότητες. Οι κοιλότητες που περιέχουν τις δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις εξετάζονται οπτικά με τη βοήθεια στερεομικροσκοπίου για σχηματισμό ιζημάτων ή θολερότητα, που αποτελούν ενδείξεις ατελούς διαλυτοποίησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Εάν παρατηρηθούν τέτοια φαινόμενα (θολερότητα, σχηματισμός ιζήματος), εξετάζονται επίσης οι κοιλότητες που περιέχουν τις αμέσως μικρότερες συγκεντρώσεις (και ούτω καθεξής), οι δε συγκεντρώσεις στις οποίες η ουσία δεν διαλύθηκε πλήρως αποκλείονται από την περαιτέρω αξιολόγηση και ανάλυση. Η πλάκα επαναφέρεται στον επωαστήρα σε θερμοκρασία 37 °C και ατμόσφαιρα με συγκέντρωση CO_2 5 %, όπου παραμένει 48 ώρες. Η διάταξη της πλάκας με την ελεγχόμενη χημική ουσία εμφαίνεται στον πίνακα 6. Τα διαλύματα παρακαταθήκης 1-7 αντιστοιχούν στην τοποθέτηση αυξανόμενων δόσεων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

▼M5

Πίνακας 6

Δοσολογικό σχήμα για την έκθεση κυττάρων H295R σε ελεγχόμενες χημικές ουσίες σε πλάκα των 24 κοιλοτήτων

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	Διάλυμα 4	Διάλυμα 4	Διάλυμα 4
B	Διάλυμα 1	Διάλυμα 1	Διάλυμα 1	Διάλυμα 5	Διάλυμα 5	Διάλυμα 5
Γ	Διάλυμα 2	Διάλυμα 2	Διάλυμα 2	Διάλυμα 6	Διάλυμα 6	Διάλυμα 6
Δ	Διάλυμα 3	Διάλυμα 3	Διάλυμα 3	Διάλυμα 7	Διάλυμα 7	Διάλυμα 7

40. Μετά από 48 ώρες, οι πλάκες έκθεσης απομακρύνονται από τον επωαστήρα και κάθε κοιλότητα εξετάζεται στο μικροσκόπιο για να διαπιστωθεί η κατάσταση των κυττάρων (προσκόλληση, μορφολογία, βαθμός συρροής) και για ενδείξεις κυτταροτοξικότητας. Το θρεπτικό μέσο από κάθε κοιλότητα χωρίζεται σε δύο ίσες ποσότητες (490 μl περίπου), οι οποίες μεταγγίζονται σε δύο χωριστά φιαλίδια που φέρουν κατάλληλη σήμανση (δηλ. η μία από τις δύο γνωστές ποσότητες θα αποτελεί εφεδρικό δείγμα για κάθε κοιλότητα). Για να αποτραπεί η αφυδάτωση των κυττάρων, το θρεπτικό μέσο απομακρύνεται ανά σειρά ή στήλη και αντικαθίσταται με το θρεπτικό μέσο για τον προσδιορισμό κυτταρικής βιωσιμότητας/κυτταροτοξικότητας. Εάν δεν πρόκειται να μετρηθεί αμέσως η κυτταρική βιωσιμότητα/κυτταροτοξικότητα, προστίθενται σε κάθε κοιλότητα 200 μl PBS με ιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+}. Τα θρεπτικά μέσα καταψύχονται στους – 80 °C έως ότου υποβληθούν σε περαιτέρω επεξεργασία για την ανάλυση ορμονών (βλ. παραγράφους 44-46). Παρόλο που η Τ και η Ε2 εντός θρεπτικού μέσου που διατηρείται στους – 80 °C είναι γενικά σταθερές για τουλάχιστον 3 μήνες, η σταθερότητα των ορμονών κατά τη φύλαξη θα πρέπει να τεκμηριώνεται σε κάθε εργαστήριο.

41. Αμέσως μετά την απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου, προσδιορίζεται η κυτταρική βιωσιμότητα/κυτταροτοξικότητα για κάθε πλάκα έκθεσης.

Προσδιορισμός της κυτταρικής βιωσιμότητας

42. Για να διαπιστωθούν οι δυνητικές επιπτώσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στη βιωσιμότητα των κυττάρων μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατ' επιλογή προσδιορισμός κυτταρικής βιωσιμότητας/κυτταροτοξικότητας. Ο προσδιορισμός θα πρέπει να είναι ικανός να παρέχει το πραγματικό ποσοστό βιώσιμων κυττάρων ανά κοιλότητα ή να έχει αποδειχθεί απευθείας συγκρίσιμος με τον προσδιορισμό Live/Dead® (γραμμική συνάρτηση αυτού) [βλ. προσάρτημα ΙΙΙ της έκθεσης επικύρωσης (4)]. Ένας εναλλακτικός προσδιορισμός που έχει αποδειχθεί εξίσου αποτελεσματικός είναι η δοκιμή ΜΤΤ [βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο] (18). Η εκτίμηση της κυτταρικής βιωσιμότητας με τη χρήση των ανωτέρω μεθόδων αποτελεί σχετική μέτρηση που δεν παρουσιάζει απαραιτήτως γραμμικές σχέσεις με τον απόλυτο αριθμό κυττάρων σε μια κοιλότητα. Για τον λόγο αυτό, θα πρέπει παράλληλα να αξιολογείται υποκειμενικά κάθε κοιλότητα από τον αναλυτή με οπτική εξέταση και να λαμβάνονται και να αρχειοθετούνται ψηφιακές φωτογραφίες των κοιλοτήτων που περιέχουν τον ΜΔ και τις δύο μεγαλύτερες μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις, ώστε να είναι δυνατή η μεταγενέστερη εκτίμηση της πραγματικής κυτταρικής πυκνότητας, εάν χρειαστεί. Εάν από την οπτική εξέταση ή τον προσδιορισμό βιωσιμότητας/κυτταροτοξικότητας προκύψει φαινόμενη αύξηση του αριθμού των κυττάρων, θα πρέπει να ελεγχθεί και, εφόσον επαληθευτεί, να αναφερθεί στην έκθεση δοκιμής. Η κυτταρική βιωσιμότητα εκφράζεται σε σχέση με τη μέση απόκριση των ΜΔ, θεωρούμενη ως βιώσιμα κύτταρα σε ποσοστό 100 %, και υπολογίζεται όπως ενδείκνυται για τον χρησιμοποιούμενο προσδιορισμό κυτταρικής βιωσιμότητας/κυτταροτοξικότητας. Για τον προσδιορισμό ΜΤΤ είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί ο ακόλουθος τύπος:

▼M5

% βιώσιμων κυττάρων = (απόκριση στην κοιλότητα – μέση απόκριση στις κοιλότητες στις οποίες προστίθεται MeOH [= 100 % νεκρά κύτταρα]) ÷ (μέση απόκριση στις κοιλότητες με τον ΜΔ — μέση απόκριση στις κοιλότητες στις οποίες προστίθεται MeOH [= 100 % νεκρά κύτταρα])

43. Οι κοιλότητες που παρουσιάζουν βιωσιμότητα μικρότερη από 80 % σε σχέση με τη μέση βιωσιμότητα των ΜΔ (=100 %) δεν θα πρέπει να περιλαμβάνονται στην τελική ανάλυση δεδομένων. Τυχόν αναστολή της στεροειδογένεσης που συνοδεύεται από κυτταροτοξικότητα σχεδόν 20 % θα πρέπει να αξιολογείται με προσοχή, ώστε να είναι βέβαιο ότι δεν οφείλεται στην κυτταροτοξικότητα.

Ανάλυση ορμονών

44. Κάθε εργαστήριο μπορεί να χρησιμοποιεί σύστημα μέτρησης ορμονών της επιλογής του για την ανάλυση της Τ και της Ε2. Οι εφεδρικές γνωστές ποσότητες θρεπτικού μέσου από κάθε ομάδα αγωγής μπορούν να χρησιμοποιούνται για αραιώσεις ώστε να προκύπτουν συγκεντρώσεις εντός του ευθύγραμμου τμήματος της πρότυπης καμπύλης. Όπως σημειώνεται στην παράγραφο 29, πριν από την εκτέλεση δοκιμών ποιοτικού ελέγχου ή χημικών ουσιών, κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καταδεικνύει τη συμμόρφωση του συστήματος μέτρησης ορμονών που χρησιμοποιεί (π.χ. ELISA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS) με τα κριτήρια ποιοτικού ελέγχου, αναλύοντας εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο που έχει εμβολιαστεί με εσωτερικό μάρτυρα ορμονών. Για να εξασφαλιστεί ότι τα συστατικά του συστήματος δοκιμών δεν παρεμποδίζουν τη μέτρηση των ορμονών, ενδέχεται να πρέπει να εκχυλιστούν οι ορμόνες από το θρεπτικό μέσο πριν από τη μέτρησή τους (βλ. παράγραφο 30 για τις προϋποθέσεις υπό τις οποίες απαιτείται ή δεν απαιτείται εκχύλιση). Συνιστάται να ακολουθούνται για την εκχύλιση οι διαδικασίες του προσαρτήματος III της έκθεσης επικύρωσης (4).

45. Εάν χρησιμοποιούνται σύνολα έτοιμων αντιδραστηρίων (κιτ) του εμπορίου για τη μέτρηση της παραγωγής ορμονών, η ανάλυση των ορμονών θα πρέπει να διεξάγεται όπως υποδεικνύεται στα εγχειρίδια χρήσης των κιτ. Οι περισσότεροι κατασκευαστές κιτ προβλέπουν μια συγκεκριμένη διαδικασία ανάλυσης ορμονών. Οι αραιώσεις των δειγμάτων πρέπει να ρυθμίζονται κατά τρόπο ώστε οι αναμενόμενες συγκεντρώσεις ορμονών στους μάρτυρες με τον διαλύτη να βρίσκονται στο κέντρο της γραμμικής περιοχής της πρότυπης καμπύλης κάθε προσδιορισμού [προσάρτημα III της έκθεσης επικύρωσης (4)]. Οι τιμές που βρίσκονται εκτός του ευθύγραμμου τμήματος της πρότυπης καμπύλης θα πρέπει να απορρίπτονται.

46. Οι τελικές συγκεντρώσεις των ορμονών υπολογίζονται ως εξής:

Παράδειγμα:

Εκχύλιση:	450 μl θρεπτικού μέσου
Ανασύσταση σε:	250 μl ρυθμιστικού διαλύματος του προσδιορισμού
Αραίωση στον προσδιορισμό:	1:10 (για να προκύψει δείγμα εντός της γραμμικής περιοχής της πρότυπης καμπύλης)
Συγκέντρωση ορμόνης στον προσδιορισμό:	150 pg/ml (έχει ήδη αναχθεί σε συγκέντρωση ανά ml δείγματος που υποβλήθηκε στον προσδιορισμό)
Ανάκτηση:	89 %
Τελική συγκέντρωση ορμόνης =	(συγκέντρωση ορμονών (ανά ml) ÷ ανάκτηση) (συντελεστής αραίωσης)
Τελική συγκέντρωση ορμόνης =	(150 pg/ml) ÷ (0,89) × (250 μl/450 μl) × 10 = 936,3 pg/ml

▼M5

Επιλογή συγκεντρώσεων δοκιμής

47. Απαιτούνται τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες εκτελέσεις του προσδιορισμού. Εάν δεν υπάρχουν προηγούμενες πληροφορίες, όπως πληροφορίες για τα όρια διαλυτότητας ή την κυτταροτοξικότητα, που μπορούν να χρησιμεύσουν ως βάση για την επιλογή των συγκεντρώσεων δοκιμής, οι συγκεντρώσεις για την πρώτη εκτέλεση της δοκιμής συνιστάται να απέχουν μεταξύ τους κατά δεκαδικό λογάριθμο, με μέγιστη συγκέντρωση τα 10^{-3} M. Εάν η χημική ουσία είναι διαλυτή και δεν είναι κυτταροτοξική σε καμία από τις ελεγχόμενες συγκεντρώσεις και εάν η πρώτη εκτέλεση είναι αρνητική για όλες τις συγκεντρώσεις, το συμπέρασμα πρέπει να επιβεβαιώνεται με μια ακόμα εκτέλεση του προσδιορισμού υπό τις ίδιες συνθήκες (πίνακας 7). Εάν τα αποτελέσματα της πρώτης εκτέλεσης είναι *αμφίσημα* (δηλ. η πολλαπλασιαστική μεταβολή σε σχέση με τον ΜΔ είναι στατιστικά σημαντική μόνο σε μία συγκέντρωση) ή θετικά (δηλ. η πολλαπλασιαστική μεταβολή είναι στατιστικά σημαντική σε δύο ή περισσότερες παρακείμενες συγκεντρώσεις), η δοκιμή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται όπως υποδεικνύεται στον πίνακα 7, με βελτίωση των επιλεγμένων συγκεντρώσεων δοκιμής. Οι συγκεντρώσεις δοκιμής για τη δεύτερη και την τρίτη (κατά περίπτωση) εκτέλεση της δοκιμής θα πρέπει να αναπροσαρμόζονται βάσει των αποτελεσμάτων της πρώτης εκτέλεσης, με ομαδοποίηση των συγκεντρώσεων που προκάλεσαν απόκριση με τη χρήση ημιλογαριθμικών διαστημάτων μεταξύ τους (π.χ. εάν η πρώτη εκτέλεση με συγκεντρώσεις 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100 και 1 000 μM είχε ως αποτέλεσμα επαγωγή στο 1 και στα 10 μM, οι συγκεντρώσεις προς έλεγχο στη δεύτερη εκτέλεση θα πρέπει να είναι 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30 και 100 μM), εκτός εάν πρέπει να χρησιμοποιηθούν χαμηλότερες συγκεντρώσεις για την επίτευξη LOEC. Στην περίπτωση αυτή, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατά τη δεύτερη εκτέλεση τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις κατώτερες της χαμηλότερης συγκέντρωσης που ελέγχθηκε κατά την πρώτη εκτέλεση, με τη χρήση ημιλογαριθμικής κλίμακας. Εάν η δεύτερη εκτέλεση δεν επιβεβαιώσει την πρώτη (δηλ. εάν δεν προκύψει στατιστική σημαντικότητα στην προηγουμένως θετική συγκέντρωση ± 1 αύξηση συγκέντρωσης), απαιτείται τρίτο πείραμα υπό τις αρχικές συνθήκες δοκιμής. Τα αμφίσημα αποτελέσματα της πρώτης εκτέλεσης θεωρούνται αρνητικά εάν η παρατηρούμενη επίδραση δεν επιβεβαιωθεί σε καμία από τις δύο επόμενες εκτελέσεις της δοκιμής. Τα αμφίσημα αποτελέσματα θεωρούνται θετικές αποκρίσεις (επίδραση) όταν η απόκριση μπορεί να επιβεβαιωθεί σε τουλάχιστον μία ακόμη δοκιμή με ± 1 αύξηση συγκέντρωσης (βλ. διαδικασία ερμηνείας των δεδομένων στην παράγραφο 55).

Πίνακας 7

Πίνακας λήψης αποφάσεων για πιθανά σενάρια αποτελεσμάτων

1η εκτέλεση	2η εκτέλεση		3η εκτέλεση		Απόφαση	
Σενάριο	Απόφαση	Σενάριο	Απόφαση	Σενάριο	Θετική	Αρνητική
Αρνητική	Επιβεβαίωση (α)	Αρνητική	Παύση			X
Αρνητική	Επιβεβαίωση (α)	Θετική	Βελτίωση (β)	Αρνητική		X
Αμφίσημη (γ)	Βελτίωση (β)	Αρνητική	Επιβεβαίωση (α)	Αρνητική		X
Αμφίσημη (γ)	Βελτίωση (β)	Αρνητική	Επιβεβαίωση (α)	Θετική	X	
Αμφίσημη (γ)	Βελτίωση (β)	Θετική			X	
Θετική	Βελτίωση (β)	Αρνητική	Επιβεβαίωση (α)	Θετική	X	

▼M5

1η εκτέλεση	2η εκτέλεση		3η εκτέλεση		Απόφαση	
Σενάριο	Απόφαση	Σενάριο	Απόφαση	Σενάριο	Θετική	Αρνητική
Αρνητική	Επιβεβαίωση (α)	Θετική	Βελτίωση (β)	Θετική	X	
Θετική	Βελτίωση (β)	Θετική	Διακοπή		X	

(α) Επιβεβαίωση του αποτελέσματος της προηγούμενης εκτέλεσης με τη χρήση του ίδιου πειραματικού σχεδιασμού.
(β) Επανάληψη του προσδιορισμού με ημιλογαριθμικά διαστήματα μεταξύ των συγκεντρώσεων (ομαδοποίηση των συγκεντρώσεων οι οποίες προκάλεσαν σημαντικές διαφορές κατά το προηγούμενο πείραμα).
(γ) Η πολλαπλασιαστική μεταβολή σε σχέση με τον ΜΔ είναι στατιστικά σημαντική σε μια συγκέντρωση.

Ποιοτικός έλεγχος της πλάκας δοκιμής

48. Πέραν της εκπλήρωσης των κριτηρίων για την πλάκα ποιοτικού ελέγχου, θα πρέπει να πληρούνται και άλλα κριτήρια ποιότητας που αφορούν την αποδεκτή μεταβλητότητα μεταξύ επαναληπτικών κοιλοτήτων και επαναληπτικών πειραμάτων, τη γραμμικότητα και την ευαισθησία των συστημάτων μέτρησης ορμονών, τη μεταβλητότητα μεταξύ επαναληπτικών μετρήσεων ορμονών του ίδιου δείγματος και την ποσοστιαία ανάκτηση εμβολιασμένων ορμονικών δειγμάτων μετά την εκχύλιση του θρεπτικού μέσου (κατά περίπτωση — βλ. παράγραφο 30 σχετικά με τις απαιτήσεις εκχύλισης). Τα κριτήρια αυτά παρατίθενται στον πίνακα 8. Τα δεδομένα θα πρέπει να περικλείονται εντός των αποδεκτών πεδίων τιμών που έχουν καθοριστεί για κάθε παράμετρο για να ληφθούν υπόψη για περαιτέρω αξιολόγηση. Εάν δεν πληρούνται τα κριτήρια αυτά, θα πρέπει να αναφέρεται στο λογιστικό φύλλο ότι δεν πληρούνται τα κριτήρια ποιοτικού ελέγχου για το εξεταζόμενο δείγμα, το οποίο θα πρέπει να υποβάλλεται σε νέα ανάλυση ή να απαλείφεται από το σύνολο δεδομένων.

Πίνακας 8

Αποδεκτά πεδία τιμών και/ή μεταβλητότητα (%) για τις παραμέτρους των πλακών του προσδιορισμού H295R.

LOQ: όριο ποσοτικού προσδιορισμού του συστήματος μέτρησης ορμονών. CV: συντελεστής μεταβλητότητας. ΜΔ: μάρτυρας με διαλύτη. DPM: διασπάσεις ανά λεπτό

	Σύγκριση	T	E2
Βασική παραγωγή ορμονών στους ΜΔ	Πολλαπλάσια του LOQ	≥ 5πλάσια	≥ 2,5πλάσια
Πειράματα έκθεσης — CV εντός της πλάκας για τους ΜΔ (επαναληπτικές κοιλότητες)	Απόλυτες συγκεντρώσεις	≤ 30 %	≤ 30 %
Πειράματα έκθεσης — CV μεταξύ των πλακών για τους ΜΔ (επαναληπτικά πειράματα)	Πολλαπλασιαστική μεταβολή	≤ 30 %	≤ 30 %
Σύστημα μέτρησης ορμονών — Ευαισθησία	Ανιχνεύσιμος υποπολλαπλασιασμός σε σχέση με τους ΜΔ	≥ 5πλάσια	≥ 2,5πλάσια
Σύστημα μέτρησης ορμονών — CV επαναληπτικών μετρήσεων για τους ΜΔ (α)	Απόλυτες συγκεντρώσεις	≤ 25 %	≤ 25 %
Εκχύλιση θρεπτικού μέσου — Ανάκτηση εσωτερικού προτύπου 3H (κατά περίπτωση)	DPM	≥ 65 % της ονομαστικής τιμής	

(α) Αναφέρεται σε επαναληπτικές μετρήσεις του ίδιου δείγματος.

▼M5

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Ανάλυση δεδομένων

49. Για την αξιολόγηση της σχετικής αύξησης/μείωσης της παραγωγής ορμονών υπό την επίδραση χημικής ουσίας, τα αποτελέσματα θα πρέπει να κανονικοποιούνται στη μέση τιμή κάθε πλάκας δοκιμής για τους ΜΔ και να εκφράζονται ως μεταβολή σε σχέση με τους ΜΔ κάθε πλάκας δοκιμής. Όλα τα δεδομένα πρέπει να εκφράζονται ως μέση τιμή ± 1 τυπική απόκλιση (SD).

50. Στην ανάλυση δεδομένων θα πρέπει να περιλαμβάνονται μόνο ορμονικά δεδομένα από κοιλότητες με κυτταροτοξικότητα μικρότερη από 20 %. Οι σχετικές μεταβολές υπολογίζονται ως εξής:

Σχετική μεταβολή = (συγκέντρωση ορμόνης σε κάθε κοιλότητα) ÷ (μέση συγκέντρωση ορμόνης στις κοιλότητες των μαρτύρων με διαλύτη).

51. Εάν από την οπτική εξέταση της κοιλότητας ή από τον προσδιορισμό βιωσιμότητας/κυτταροτοξικότητας που περιγράφεται στην παράγραφο 42 προκύψει φαινόμενη αύξηση του αριθμού των κυττάρων, θα πρέπει να ελεγχθεί και, εφόσον επαληθευτεί, να αναφερθεί στην έκθεση δοκιμής.

52. Πριν από τη διεξαγωγή στατιστικών αναλύσεων, θα πρέπει να αξιολογούνται οι παραδοχές όσον αφορά την κανονικότητα και την ομοιογένεια διασποράς. Η κανονικότητα θα πρέπει να αξιολογείται με τη χρήση πρότυπων διαγραμμάτων πιθανότητας ή άλλης κατάλληλης στατιστικής μεθόδου (π.χ. δοκιμασία Shapiro-Wilk). Εάν η κατανομή των δεδομένων (πολλαπλασιαστικές μεταβολές) δεν είναι κανονική, θα πρέπει να επιχειρείται μετασχηματισμός των δεδομένων ώστε να προσεγγίζουν την κανονική κατανομή. Εάν η κατανομή των δεδομένων είναι κανονική ή κατά προσέγγιση κανονική, οι διαφορές μεταξύ των ομάδων συγκέντρωσης της χημικής ουσίας και των ΜΔ θα πρέπει να αναλύονται με παραμετρική δοκιμασία (π.χ. δοκιμασία Dunnett), όπου η *συγκέντρωση* είναι η ανεξάρτητη μεταβλητή και η *απόκριση* (πολλαπλασιαστική μεταβολή) η εξαρτημένη. Εάν η κατανομή των δεδομένων δεν είναι κανονική, θα πρέπει να χρησιμοποιείται κατάλληλη μη παραμετρική δοκιμασία (π.χ. δοκιμασίες Kruskal-Wallis, Steel's Many-one rank test). Οι διαφορές θεωρούνται σημαντικές όταν $p \leq 0,05$. Οι στατιστικές αξιολογήσεις βασίζονται σε μέσες τιμές για κάθε κοιλότητα που αντιπροσωπεύουν ανεξάρτητα επαναληπτικά σημεία δεδομένων. Προβλέπεται ότι, λόγω των μεγάλων διαστημάτων μεταξύ των δόσεων κατά την πρώτη εκτέλεση της δοκιμής (λογαριθμική κλίμακα), σε πολλές περιπτώσεις δεν θα είναι δυνατή η περιγραφή σαφών σχέσεων συγκέντρωσης-απόκρισης, όπου οι δύο μεγαλύτερες δόσεις θα βρίσκονται στο ευθύγραμμο τμήμα της σιγμοειδούς καμπύλης. Ως εκ τούτου, για τα σύνολα δεδομένων από την πρώτη εκτέλεση ή για οποιοδήποτε άλλο σύνολο δεδομένων σε ανάλογη περίπτωση (π.χ. όταν δεν είναι δυνατόν να εκτιμηθεί η μέγιστη αποτελεσματικότητα), χρησιμοποιούνται στατιστικές τεχνικές σταθερής μεταβλητής τύπου I, όπως περιγράφεται ανωτέρω.

53. Εάν στο ευθύγραμμο τμήμα της καμπύλης βρίσκονται περισσότερα από δύο σημεία δεδομένων και είναι δυνατόν να υπολογιστούν τιμές μέγιστης αποτελεσματικότητας -όπως αναμένεται για ορισμένες από τις δεύτερες εκτελέσεις με τη χρήση ημιλογαριθμικών διαστημάτων μεταξύ των συγκεντρώσεων έκθεσης-, θα πρέπει να χρησιμοποιείται το υπόδειγμα probit ή logit ή άλλο κατάλληλο υπόδειγμα παλινδρόμησης για τον υπολογισμό των αποτελεσματικών συγκεντρώσεων (π.χ. EC50 και EC20).

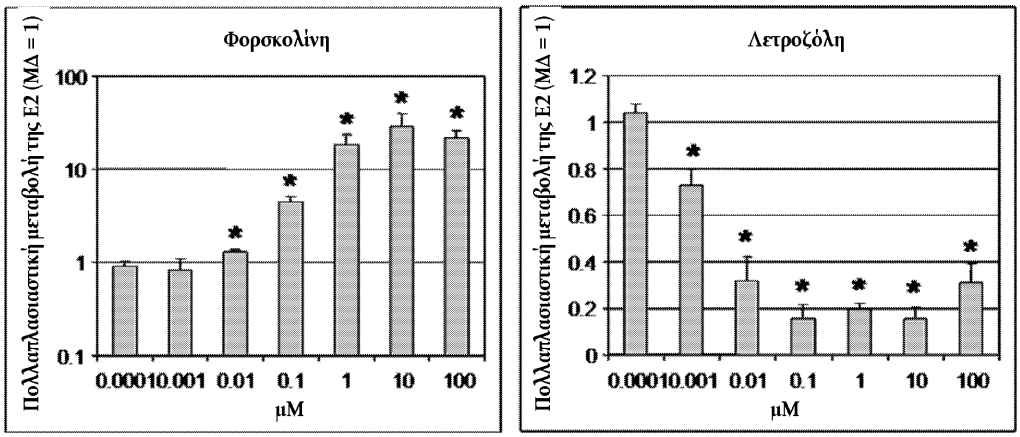
54. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να παρουσιάζονται σε μορφή γραφήματος (ραβδογράμματα που παριστούν τη μέση τιμή ± 1 SD) και πίνακα (LOEC/NOEC, κατεύθυνση της επίδρασης και ισχύς της μέγιστης απόκρισης που αποτελεί μέρος του τμήματος δόσης-απόκρισης των δεδομένων) (βλ. παράδειγμα στο σχήμα 3). Η αξιολόγηση των δεδομένων θεωρείται έγκυρη μόνο εάν έχει βασιστεί τουλάχιστον σε δύο ανεξάρτητες δοκιμές. Ένα πείραμα ή μια εκτέλεση δοκιμής θεωρείται ανεξάρτητο εάν έχει διεξαχθεί σε διαφορετική ημερομηνία και με τη χρήση νέου συνόλου διαλυμάτων και μαρτύρων. Η κλίμακα συγκεντρώσεων που χρησιμοποιείται στη δεύτερη και στην τρίτη εκτέλεση (εάν είναι απαραίτητη) της δοκιμής μπορεί να προσαρμόζεται βάσει των αποτελεσμάτων της πρώτης εκτέλεσης, ώστε να καθορίζεται ακριβέστερα η κλίμακα δόσης-απόκρισης που περιέχει την τιμή LOEC (βλ. παράγραφο 47).

▼M5

Σχήμα 3

Παράδειγμα παρουσίασης και αξιολόγησης δεδομένων που έχουν ληφθεί κατά τη διεξαγωγή του προσδιορισμού H295R, σε μορφή γραφήματος και πίνακα.

Οι αστερίσκοι δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές από τον μάρτυρα με τον διαλύτη ($p<0,05$). LOEC: η ελάχιστη συγκέντρωση στην οποία παρατηρούνται επιδράσεις. Μέγιστη μεταβολή: μέγιστη ισχύς της απόκρισης που παρατηρείται σε οποιαδήποτε συγκέντρωση σε σχέση με τη μέση απόκριση του μάρτυρα με τον διαλύτη (=1)



Χημική ουσία	LOEC	Μέγιστη μεταβολή
Φορσκολίνη	0,01	0,15πλασιασμός
Λετροζόλη	0,001	29πλασιασμός

Διαδικασία ερμηνείας των δεδομένων

55. Μια ελεγχόμενη χημική ουσία θεωρείται θετική εάν η πολλαπλασιαστική επαγωγή διαφέρει στατιστικά ($p \leq 0,05$) από τον μάρτυρα με τον διαλύτη σε δύο παρακείμενες συγκεντρώσεις και τουλάχιστον σε δύο ανεξάρτητες εκτελέσεις της δοκιμής (πίνακας 7). Μια ελεγχόμενη χημική ουσία θεωρείται αρνητική μετά από δύο ανεξάρτητες εκτελέσεις με αρνητικά αποτελέσματα ή μετά από τρείς εκτελέσεις, εκ των οποίων δύο με αρνητικά αποτελέσματα και μία με αμφίσημα ή θετικά. Εάν τα δεδομένα που έχουν προκύψει από τρία ανεξάρτητα πειράματα δεν πληρούν τα κριτήρια λήψης απόφασης του πίνακα 7, τα πειραματικά αποτελέσματα δεν είναι δυνατόν να ερμηνευτούν. Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται σε συγκεντρώσεις οι οποίες υπερβαίνουν τα όρια διαλυτότητας ή είναι κυτταροτοξικές δεν θα πρέπει να περιλαμβάνονται στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Έκθεση δοκιμής

56. Η έκθεση της δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Εγκαταστάσεις δοκιμών

— όνομα και τοποθεσία των εγκαταστάσεων·

— διευθυντής και λοιπό προσωπικό της μελέτης και οι αρμοδιότητές τους στη μελέτη·

— ημερομηνίες έναρξης και λήξης της μελέτης·

▼**M5**

Ελεγχόμενη χημική ουσία, αντιδραστήρια και μάρτυρες

— ταυτότητα (ονομασία/αριθμός CAS, κατά περίπτωση), προέλευση, αριθμός παρτίδας, καθαρότητα, προμηθευτής και χαρακτηρισμός της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, των αντιδραστηρίων και των μαρτύρων·

— φυσική μορφή και σημαντικές φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας·

— συνθήκες αποθήκευσης και μέθοδος και συχνότητα παρασκευής των δειγμάτων ελεγχόμενων χημικών ουσιών, των αντιδραστηρίων και των μαρτύρων·

— σταθερότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

Κύτταρα

— προέλευση και τύπος των κυττάρων·

— αριθμός ανακαλλιεργειών (αναγνωριστικό κυτταρικής ανακαλλιέργειας) των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν στη δοκιμή·

— περιγραφή των διαδικασιών διατήρησης των κυτταροκαλλιεργειών·

Απαιτήσεις πριν από τη δοκιμή (κατά περίπτωση)

— περιγραφή και αποτελέσματα της δοκιμής χημικής παρεμπόδισης του ορμονικού προσδιορισμού·

— περιγραφή και αποτελέσματα των μετρήσεων της απόδοσης της εκχύλισης ορμονών·

— πρότυπες καμπύλες και καμπύλες βαθμονόμησης για όλους τους αναλυτικούς προσδιορισμούς προς διεξαγωγή·

— όρια ανίχνευσης για τους επιλεγμένους αναλυτικούς προσδιορισμούς.

Συνθήκες δοκιμής

— σύνθεση των θρεπτικών μέσων·

— συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας·

— πυκνότητα κυττάρων (εκτιμώμενες ή μετρούμενες συγκεντρώσεις κυττάρων μετά από 24 και 48 ώρες)·

— διαλυτότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας (όριο διαλυτότητας, εάν έχει προσδιοριστεί)·

— χρόνος και συνθήκες επώασης·

Αποτελέσματα της δοκιμής

— ανεπεξέργαστα δεδομένα ανά κοιλότητα για τους μάρτυρες και τις ελεγχόμενες χημικές ουσίες – κάθε επαναληπτική μέτρηση υπό τη μορφή των αρχικών δεδομένων που παρέχει το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της παραγωγής ορμονών (π.χ. απορρόφηση, μονάδες φθορισμού, διασπάσεις ανά λεπτό κ.λπ.)·

— επικύρωση της κανονικότητας των δεδομένων ή επεξήγηση του μετασχηματισμού τους·

— μέσες τιμές απόκρισης ± 1 SD ανά μετρηθείσα κοιλότητα·

— δεδομένα κυτταροτοξικότητας (συγκεντρώσεις δοκιμής που προκάλεσαν κυτταροτοξικότητα)·

— επιβεβαίωση της ικανοποίησης των απαιτήσεων ποιοτικού ελέγχου·

▼**M5**

— σχετική μεταβολή σε σύγκριση με τον μάρτυρα με τον διαλύτη, διορθωμένη ως προς την κυτταροτοξικότητα·

— ραβδόγραμμα που παρουσιάζει τη σχετική (πολλαπλασιαστική) μεταβολή σε κάθε συγκέντρωση, την τυπική απόκλιση και τη στατιστική σημαντικότητα, όπως αναφέρεται στις παραγράφους 49-54.

Ερμηνεία των δεδομένων

— Εφαρμογή της διαδικασίας ερμηνείας των δεδομένων στα αποτελέσματα και συζήτηση των ευρημάτων

Συζήτηση

— Προκύπτουν από τη μελέτη ενδείξεις σχετικά με την πιθανότητα να έχουν επηρεαστεί τα δεδομένα για την T/E2 από έμμεσες επιδράσεις στην πορεία σύνθεσης γλυκοκορτικοειδών και μεταλλοκορτικοειδών;

Συμπεράσματα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2002), OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals, in Appendix 2 to Chapter B.54 of this Annex

(2) Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Jones, P.D., Wu, R. and Giesy, J.P. (2006), Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production, *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* 217, 114-124.

(3) Hecker, M., Hollert, H., Cooper, R., Vinggaard, A.-M., Akahori, Y., Murphy, M., Nellemann, C., Higley, E., Newsted, J., Wu, R., Lam, P., Laskey, J., Buckalew, A., Grund, S., Nakai, M., Timm, G., and Giesy, J. P. (2007), The OECD validation program of the H295R steroidgenesis assay for the identification of in vitro inhibitors or inducers of testosterone and estradiol production, Phase 2: inter laboratory pre-validation studies. *Env. Sci. Pollut. Res*., 14, 23–30.

(4) OECD (2010), *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production*, OECD Series of Testing and Assessment No. 132, ENV/JM/MONO(2010)31, Paris. Διαθέσιμη στη διεύθυνση [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]

(5) OECD (2010), *Peer Review Report of the H295R Cell-Based Assay for Steroidogenesis,* OECD Series of Testing and Assessment No. 133, ENV/JM/MONO(2010)32, Paris. Διαθέσιμη στη διεύθυνση: [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]

(6) Battelle (2005), Detailed Review Paper on Steroidogenesis. Διαθέσιμη στη διεύθυνση: [http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvs/steroidogenesis_drp_final_3_29_05.pdf]

(7) Hilscherova, K., Jones, P. D., Gracia, T., Newsted, J. L., Zhang, X., Sanderson, J. T., Yu, R. M. K., Wu, R. S. S. and Giesy, J. P. (2004), Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR, *Toxicol. Sci.,* 81, 78-89.

(8) Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. and Van den Berg, M. (2002), Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* 182, 44-54.

(9) Breen, M.S., Breen, M., Terasaki, N., Yamazaki, M. and Conolly, R.B. (2010), Computational model of steroidogenesis in human H295R cells to predict biochemical response to endocrine-active chemicals: Model development for metyrapone, *Environ. Health Perspect.,* 118: 265-272.

▼**M5**

(10) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Assessment of chemical effects on aromatase activity using the H295R cell line, *Environ. Sci. Poll. Res.,* 17:1137-1148.

(11) Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A. and La Rocca, R. V. (1990), Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses Multiple pathways of steroid biosynthesis, *Cancer Res.,* 50, 5488-5496.

(12) He, Y.H., Wiseman, S.B., Zhang, X.W., Hecker, M., Jones, P.D., El-Din, M.G., Martin, J.W. and Giesy, J.P. (2010), Ozonation attenuates the steroidogenic disruptive effects of sediment free oil sands process water in the H295R cell line, *Chemosphere,* 80:578-584.

(13) Zhang, X.W., Yu, R.M.K., Jones, P.D., Lam, G.K.W., Newsted, J.L., Gracia, T., Hecker, M., Hilscherova, K., Sanderson, J.T., Wu, R.S.S. and Giesy, J.P. (2005), Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line, *Environ. Sci. Technol.,* 39:2777-2785.

(14) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Differential assessment of chemical effects on aromatase activity, and E2 and T production using the H295R cell line, *Environ. Sci. Pol. Res.,* 17:1137-1148.

(15) Rainey, W. E., Bird, I. M., Sawetawan, C., Hanley, N. A., Mccarthy, J. L., Mcgee, E. A., Wester, R. and Mason, J. I. (1993), Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids, *J. Clin. Endocrinol. Metab.,* 77, 731-737.

(16) Κεφάλαιο B.55 του παρόντος παραρτήματος: Βιοπροσδιορισμός Hershberger σε επίμυες: Βραχυπρόθεσμος προσδιορισμός διαλογής για (αντι)ανδρογονικές ιδιότητες.

(17) Shapiro, R., and Page, L.B. (1976), Interference by 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) in angiotensin I radioimmunoassay, *J. Lab. Clin. Med.,* 2, 222-231.

(18) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.,* 65, 55-63.

(19) Brock, B.J., Waterman, M.R. (1999). Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species, Biochemistry. 38:1598-1606.

(20) Oskarsson, A., Ulleras, E., Plant, K., Hinson, J. Goldfarb, P.S., (2006), Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane in vitro, J. Appl. Toxicol., 26:484-492.

▼**M5**

Προσάρτημα

ΟΡΙΣΜΟΙ:

Συρροή: τα περιθώρια κάλυψης ή εξάπλωσης των κυττάρων στην επιφάνεια ή τη μάζα του μέσου καλλιέργειας.

Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα.

CV: συντελεστής μεταβλητότητας, ο οποίος ορίζεται ως ο λόγος της τυπικής απόκλισης μιας κατανομής προς την αριθμητική μέση τιμή της.

CYP: μονοξυγονάσες του κυτοχρώματος P450, ήτοι μια οικογένεια γονιδίων και τα παραγόμενα από αυτά ένζυμα που συμμετέχουν στην κατάλυση μεγάλης ποικιλίας βιοχημικών αντιδράσεων, συμπεριλαμβανομένων της σύνθεσης και του μεταβολισμού στεροειδών ορμονών.

DPM: διασπάσεις ανά λεπτό· είναι ο αριθμός των ατόμων σε μια δεδομένη ποσότητα ραδιενεργού υλικού που ανιχνεύεται ότι έχουν διασπαστεί σε ένα λεπτό.

E2: 17β-οιστραδιόλη, το σημαντικότερο οιστρογόνο στα συστήματα θηλαστικών.

Κύτταρα H295R: ανθρώπινα κύτταρα επινεφριδικού καρκινώματος, που έχουν τα χαρακτηριστικά φυσιολογίας των ζωνικά αδιαφοροποίητων κυττάρων των επινεφριδίων ανθρώπινων εμβρύων και εκφράζουν το σύνολο των ενζύμων της πορείας στεροειδογένεσης. Είναι διαθέσιμα από τον οργανισμό ATCC.

Θρεπτικό μέσο κατάψυξης: χρησιμοποιείται για την κατάψυξη και τη φύλαξη κατεψυγμένων κυττάρων. Αποτελείται από το θρεπτικό μέσο παρακαταθήκης στο οποίο προστίθενται ορός BD NuSerum και διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO).

Γραμμική περιοχή: η περιοχή της πρότυπης καμπύλης σε σύστημα μέτρησης ορμονών στην οποία τα αποτελέσματα είναι ανάλογα της συγκέντρωσης του αναλύτη στο δείγμα.

LOQ: Limit of Quantification/όριο ποσοτικού περιορισμού· είναι η μικρότερη ποσότητα μιας χημικής ουσίας που μπορεί να διακριθεί από την απουσία αυτής της χημικής ουσίας (τιμή τυφλού δείγματος) εντός του δηλούμενου διαστήματος εμπιστοσύνης. Για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου, η τιμή LOQ ορίζεται συνήθως από τον κατασκευαστή των συστημάτων δοκιμών, εάν δεν προσδιορίζεται διαφορετικά.

LOEC: η ελάχιστη συγκέντρωση στην οποία παρατηρούνται επιδράσεις, ήτοι το κατώτατο επίπεδο συγκέντρωσης στο οποίο η απόκριση του προσδιορισμού διαφέρει στατιστικά από την απόκριση του μάρτυρα με τον διαλύτη.

NOEC: η συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρούνται επιδράσεις, ήτοι η μέγιστη συγκέντρωση που ελέγχθηκε σε προσδιορισμό από τον οποίο δεν προέκυψε θετική απόκριση.

Ανακαλλιέργεια: ο αριθμός των διαιρέσεων των κυττάρων μετά την έναρξη μιας καλλιέργειας από κατεψυγμένο απόθεμα. Η πρώτη καλλιέργεια κυττάρων από το κατεψυγμένο απόθεμα λαμβάνει τον αριθμό ένα (1). Τα κύτταρα που έχουν διαιρεθεί μία φορά ονομάζονται 2η ανακαλλιέργεια και ούτω καθεξής.

PBS: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων του Dulbecco.

Ποιοτικός έλεγχος: τα μέτρα που απαιτούνται για την εξασφάλιση έγκυρων δεδομένων.

Πλάκα ποιοτικού ελέγχου: πλάκα 24 κοιλοτήτων που περιέχει δύο συγκεντρώσεις του θετικού και του αρνητικού μάρτυρα για την παρακολούθηση των επιδόσεων μιας νέας παρτίδας κυττάρων ή για την παροχή θετικών μαρτύρων για τον προσδιορισμό, όταν υποβάλλονται σε δοκιμή χημικές ουσίες.

Εκτέλεση: ανεξάρτητο πείραμα που χαρακτηρίζεται από νέο σύνολο διαλυμάτων και μαρτύρων.

▼**M5**

Θρεπτικό μέσο παρακαταθήκης: η βάση για την παρασκευή άλλων αντιδραστηρίων. Αποτελείται από μείγμα του τροποποιημένου κατά Dulbecco θρεπτικού μέσου του Eagle και του μείγματος θρεπτικών ουσιών F-12 του Ham (DMEM/F12), σε αναλογία 1:1 σε ρυθμιστικό διάλυμα HEPES 15 mM, χωρίς ερυθρό της φαινόλης ούτε όξινο ανθρακικό νάτριο. Το όξινο ανθρακικό νάτριο προστίθεται ως ρυθμιστικό διάλυμα· βλ. προσάρτημα II της έκθεσης επικύρωσης (4).

Εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο: αποτελείται από θρεπτικό μέσο παρακαταθήκης στο οποίο προστίθενται ορός BD Nu-Serum και μείγμα ITS+ premium· βλ. προσάρτημα II της έκθεσης επικύρωσης (4).

Στεροειδογένεση: η πορεία σύνθεσης των διαφόρων στεροειδών ορμονών από χοληστερόλη. Ορισμένα ενδιάμεσα προϊόντα της πορείας σύνθεσης στεροειδών, όπως η προγεστερόνη και η τεστοστερόνη, είναι σημαντικές ορμόνες από μόνες τους αλλά λειτουργούν και ως πρόδρομοι ορμονών που παράγονται σε μεταγενέστερο στάδιο της συνθετικής πορείας.

T: τεστοστερόνη, ένα από τα δύο σημαντικότερα ανδρογόνα στα συστήματα θηλαστικών.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Πλάκα δοκιμής: η πλάκα στην οποία κύτταρα H295R εκτίθενται σε ελεγχόμενες χημικές ουσίες. Οι πλάκες δοκιμής περιέχουν τον μάρτυρα με τον διαλύτη και τις ελεγχόμενες χημικές ουσίες σε επτά επίπεδα συγκέντρωσης εις τριπλούν.

Θρυψίνη 1X: αραιωμένο διάλυμα του ενζύμου θρυψίνη, μιας σερινοπρωτεάσης του παγκρέατος, που χρησιμοποιείται για την αποκόλληση των κυττάρων από πλάκες κυτταροκαλλιέργειας· βλ. προσάρτημα III της έκθεσης επικύρωσης (4).

▼M5

B.58. **ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΓΕΝΝΗΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΤΡΩΚΤΙΚΑ**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή δοκιμών (TG) 488 (2013). Υπάρχουν μέθοδοι της ΕΕ για ευρύ φάσμα προσδιορισμών μετάλλαξης in vitro με τους οποίους είναι δυνατόν να ανιχνευθούν χρωμοσωματικές και/ή γονιδιακές μεταλλάξεις. Ωστόσο, με τις διαθέσιμες μεθόδους δοκιμών για τελικά σημείαin vivo(δηλ. χρωμοσωματικές ανωμαλίες και απρογραμμάτιστη σύνθεση DNA), δεν μετρώνται οι γονιδιακές μεταλλάξεις. Οι προσδιορισμοί μετάλλαξης σε διαγονιδιακά τρωκτικά (ΔΓΤ) καλύπτουν την ανάγκη για πρακτικές και ευρέως διαθέσιμες δοκιμές γονιδιακών μεταλλάξεων in vivo.

2. Οι προσδιορισμοί μετάλλαξης σε ΔΓΤ έχουν αναθεωρηθεί εκτενώς (24) (33). Στους προσδιορισμούς αυτούς χρησιμοποιούνται διαγονιδιακοί επίμυες και ποντικούς που φέρουν πολλαπλά αντίγραφα ενσωματωμένων στο χρωμόσωμα αναπαραγόμενων φορέων που είναι πλασμίδια ή φάγοι. Τα διαγονίδια περιέχουν γονίδια αναφοράς για την ανίχνευση διαφόρων ειδών μεταλλάξεων που επάγονται in vivo από τις ελεγχόμενες χημικές ουσίες.

3. Οι μεταλλάξεις που εμφανίζονται σε τρωκτικά βαθμολογούνται με ανάκτηση του διαγονιδίου και ανάλυση του φαινότυπου του γονιδίου αναφοράς σε βακτηριακό ξενιστή από τον οποίο λείπει το γονίδιο αναφοράς. Με τους προσδιορισμούς γονιδιακής μετάλλαξης σε ΔΓΤ μετρώνται οι μεταλλάξεις που επάγονται σε γενετικώς ουδέτερα γονίδια, τα οποία ανακτώνται σχεδόν από οποιονδήποτε ιστό του τρωκτικού. Συνεπώς, οι προσδιορισμοί αυτοί παρακάμπτουν πολλούς από τους υφιστάμενους περιορισμούς που συνδέονται με τη μελέτη της γονιδιακής μετάλλαξης in vivo σε ενδογενή γονίδια (π.χ. περιορισμένοι ιστοί κατάλληλοι για ανάλυση, αρνητική/θετική επιλογή έναντι των μεταλλάξεων).

4. Το βάρος της μαρτυρίας υποδηλώνει ότι τα διαγονίδια αντιδρούν στις μεταλλαξιογόνες ουσίες κατά τρόπο παρόμοιο με τα ενδογενή γονίδια, ιδίως όσον αφορά την ανίχνευση υποκαταστάσεων ζευγών βάσεων, μεταλλάξεων αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης και μικρών ελλείψεων και παρεμβολών (24).

5. Στο πλαίσιο των διεθνών ημερίδων για τις δοκιμές γονιδιοτοξικότητας (IWGT) εγκρίθηκε η χρήση προσδιορισμών γονιδιακής μετάλλαξης σε ΔΓΤ για την ανίχνευση γονιδιακών μεταλλάξεων in vivo και διατυπώθηκαν συστάσεις σχετικά με πρωτόκολλο για την εφαρμογή τους (15) (29). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών βασίζεται σε αυτές τις συστάσεις. Περαιτέρω ανάλυση υπέρ της χρήσης του εν λόγω πρωτοκόλλου περιλαμβάνεται στη βιβλιογραφική παραπομπή (16).

6. Αναμένεται ότι στο μέλλον ενδέχεται να καταστεί δυνατός ο συνδυασμός του προσδιορισμού γονιδιακής μετάλλαξης σε ΔΓΤ με μελέτη τοξικότητας με επαναλαμβανόμενη δόση (κεφάλαιο Β.7 του παρόντος παραρτήματος). Ωστόσο, απαιτούνται δεδομένα για να εξασφαλιστεί ότι η ευαισθησία των προσδιορισμών γονιδιακής μετάλλαξης σε ΔΓΤ δεν επηρεάζεται από το συντομότερο, μονοήμερο χρονικό διάστημα μεταξύ του τέλους της περιόδου χορήγησης και του χρόνου δειγματοληψίας, το οποίο χρησιμοποιείται στην τοξικολογική μελέτη με επαναλαμβανόμενη δόση, έναντι του τριήμερου που χρησιμοποιείται στους προσδιορισμούς γονιδιακής μετάλλαξης σε ΔΓΤ. Απαιτούνται επίσης δεδομένα για να καταδειχθεί ότι η απόδοση της δοκιμής επαναλαμβανόμενης δόσης δεν επηρεάζεται δυσμενώς από τη χρήση συγκεκριμένου στελέχους διαγονιδιακών τρωκτικών αντί των παραδοσιακών στελεχών τρωκτικών. Όταν θα είναι διαθέσιμα τα δεδομένα αυτά, η παρούσα μέθοδος δοκιμών θα επικαιροποιηθεί.

7. Οι ορισμοί των βασικών όρων παρατίθενται στο προσάρτημα.

▼M5

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

8. Οι προσδιορισμοί γονιδιακής μετάλλαξης σε ΔΓΤ για τους οποίους υπάρχουν επαρκή δεδομένα που τεκμηριώνουν τη χρήση τους στην παρούσα μέθοδο δοκιμών είναι οι εξής: προσδιορισμοί σε ποντικούς που φέρουν βακτηριοφάγους με γονίδιο *lacZ* (μοντέλο Muta™Mouse), σε ποντικούς που φέρουν πλασμίδια με γονίδιο *lacZ*, σε ποντικούς και επίμυες *gpt* delta (γονίδια *gpt* και Spi⁻) και σε ποντικούς και επίμυες με γονίδιο *lacI* (μοντέλο Big Blue®), εκτελούμενοι υπό πρότυπες συνθήκες. Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο προσδιορισμός θετικής επιλογής ως προς το γονίδιο *cII* για την αξιολόγηση των μεταλλάξεων στα μοντέλα Big Blue® και Muta™Mouse. Η μεταλλαξιογένεση στα μοντέλα ΔΓΤ αξιολογείται κατά κανόνα ως συχνότητα μεταλλάξεων. Ωστόσο, εάν απαιτείται, μπορούν να προκύψουν πρόσθετες πληροφορίες από μοριακή ανάλυση των μεταλλάξεων (βλ. παράγραφο 24).

9. Οι ανωτέρω δοκιμές γονιδιακής μετάλλαξης in vivo σε τρωκτικά είναι ιδιαιτέρως σημαντικές για την εκτίμηση του κινδύνου μεταλλαξιογένεσης, καθώς οι αποκρίσεις κατά τους προσδιορισμούς εξαρτώνται από τον μεταβολισμό in vivo, τη φαρμακοκινητική, τις διαδικασίες επιδιόρθωσης του DNA και από τη διαβλαβική σύνθεση DNA (Translesion DNA Synthesis/ επιδιορθωτικός μηχανισμός TLS), παρόλο που αυτά ενδέχεται να διαφέρουν μεταξύ ζωικών ειδών, ιστών και τύπων βλάβης του DNA. Ο προσδιορισμός γονιδιακών μεταλλάξεων in vivo είναι χρήσιμος για την περαιτέρω διερεύνηση μεταλλαξιογόνων επιδράσεων που ανιχνεύονται με σύστημα in vitro και για την αξιοποίηση των αποτελεσμάτων δοκιμών στις οποίες χρησιμοποιούνται άλλα τελικά σημεία in vivo(24). Η γονιδιακή μετάλλαξη, πέραν της αιτιώδους σχέσης της με την επαγωγή καρκίνου, αποτελεί σημαντικό τελικό σημείο για την πρόγνωση άλλων ασθενειών πλην του καρκίνου που βασίζονται σε μετάλλαξη σε σωματικούς ιστούς (12) (13), καθώς και ασθενειών που μεταδίδονται μέσω των γεννητικών κυττάρων.

10. Εάν υπάρχουν στοιχεία που αποδεικνύουν ότι η ελεγχόμενη χημική ουσία ή αντίστοιχος μεταβολίτης δεν φτάνει σε κανέναν από τους ιστούς που ενδιαφέρουν, δεν είναι σκόπιμος ο προσδιορισμός γονιδιακής μετάλλαξης σε ΔΓΤ.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

11. Στους προσδιορισμούς που περιγράφονται στην παράγραφο 8, το γονίδιο-στόχος προέρχεται από βακτηρίδιο ή βακτηριοφάγο και το μέσο ανάκτησης από το γονιδιωματικό DNA των τρωκτικών είναι η ενσωμάτωση του διαγονιδίου σε αναπαραγόμενο φορέα, ο οποίος είναι βακτηριοφάγος λ ή πλασμίδιο. Η διαδικασία περιλαμβάνει εκχύλιση του γονιδιωματικού DNA από τον ιστό των τρωκτικών που ενδιαφέρει, in vitro επεξεργασία του γονιδιωματικού DNA (δηλ. πακετάρισμα των φορέων λ ή συνένωση και ηλεκτροπόρωση των πλασμιδίων για την ανάκτηση του αναπαραγόμενου φορέων) και, στη συνέχεια, ανίχνευση μεταλλάξεων σε βακτηριακούς ξενιστές υπό κατάλληλες συνθήκες. Στους προσδιορισμούς χρησιμοποιούνται ουδέτερα διαγονίδια που είναι εύκολα ανακτήσιμα από τους περισσότερους ιστούς.

12. Το βασικό πείραμα γονιδιακής μετάλλαξης σε ΔΓΤ περιλαμβάνει αγωγή των τρωκτικών με χημική ουσία για ένα ορισμένο χρονικό διάστημα. Οι χημικές ουσίες μπορούν να χορηγηθούν μέσω οποιασδήποτε κατάλληλης οδού, συμπεριλαμβανομένης της εμφύτευσης (π.χ. δοκιμή με ιατροτεχνολογικό προϊόν). Το συνολικό χρονικό διάστημα κατά το οποίο χορηγούνται δόσεις σε ένα ζώο καλείται περίοδος χορήγησης. Μετά τη χορήγηση ακολουθεί συνήθως ένα χρονικό διάστημα, πριν από τη θανάτωση, στη διάρκεια του οποίου δεν χορηγείται η χημική ουσία και οι βλάβες του DNA που δεν έχουν επιδιορθωθεί μετατρέπονται σε σταθερές μεταλλάξεις. Στη βιβλιογραφία, το συγκεκριμένο διάστημα αναφέρεται ποικιλοτρόπως, ως χρόνος εκδήλωσης, χρόνος σταθεροποίησης ή χρόνος έκφρασης, ενώ το τέλος του είναι ο χρόνος δειγματοληψίας (15) (29). Μετά τη θανάτωση του ζώου, το γονιδιωματικό DNA απομονώνεται από τον ή τους ιστούς που ενδιαφέρουν και καθαρίζεται.

▼M5

13. Τα δεδομένα από πολλαπλά πακεταρίσματα/συνενώσεις για μεμονωμένους ιστούς ανά ζώο συνήθως συναθροίζονται και η συχνότητα μεταλλάξεων αξιολογείται γενικά με τη χρήση συνολικά 10^5 έως 10^7 μονάδων σχηματισμού πλάκας ή σχηματισμού αποικίας. Όταν χρησιμοποιούνται μέθοδοι θετικής επιλογής, προσδιορίζεται ο συνολικός αριθμός μονάδων σχηματισμού πλάκας με χωριστό σύνολο μη επιλεκτικών πλακών.

14. Έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι θετικής επιλογής για τη διευκόλυνση της ανίχνευσης μεταλλάξεων του γονιδίου *gpt* [επίμυες και ποντικοί *gpt* δέλτα, φαινότυπος *gpt*– (20) (22) (28)] και του γονιδίου lacZ [μοντέλο ποντικών Muta™Mouse ή ποντικοί που φέρουν πλασμίδιο με το γονίδιο *lacZ* (3) (10) (11) (30)], ενώ οι μεταλλάξεις του γονιδίου *lacI* σε ζώα του μοντέλου Big Blue® ανιχνεύονται με μη επιλεκτική μέθοδο, με την οποία τα μεταλλάγματα εντοπίζονται μέσω της δημιουργίας έγχρωμων (μπλε) πλακών. Μεθοδολογία θετικής επιλογής εφαρμόζεται επίσης για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων που εμφανίζονται στο γονίδιο *cII* του αναπαραγόμενου φορέα λ βακτηριοφάγου [ποντικοί ή επίμυες Big Blue® και ποντικοί Muta™Mouse (17)], καθώς και μεταλλάξεων έλλειψης στα γονίδια λ *red* και *gam* [επιλογή Spi^- σε ποντικούς και επίμυες *gpt* δέλτα (21) (22) (28)]. Η συχνότητα μεταλλάξεων υπολογίζεται με διαίρεση του αριθμού των πλακών/πλασμιδίων που περιέχουν μεταλλάξεις στο διαγονίδιο δια του συνολικού αριθμού των πλακών/πλασμιδίων που ανακτώνται από το ίδιο δείγμα DNA. Στις μελέτες γονιδιακής μετάλλαξης σε ΔΓΤ, η αναφερόμενη στις εκθέσεις παράμετρος είναι η συχνότητα μεταλλάξεων. Επιπλέον, η συχνότητα μεταλλάξεων μπορεί να προσδιοριστεί ως κλάσμα κυττάρων που φέρουν ανεξάρτητες μεταλλάξεις. Ο υπολογισμός αυτός πρέπει να διορθώνεται ως προς την κλωνική επέκταση, με προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των ανακτώμενων μεταλλαγμάτων (24).

15. Οι μεταλλάξεις που βαθμολογούνται στους προσδιορισμούς σημειακών μεταλλάξεων των γονιδίων *lacI, lacZ, cII* και *gpt* είναι κυρίως μεταλλάξεις υποκατάστασης ζευγών βάσεων, μεταλλάξεις αλλαγής του πλαισίου ανάγνωσης και μικρές παρεμβολές/ελλείψεις. Το σχετικό ποσοστό αυτών των ειδών μετάλλαξης μεταξύ των αυτόματων μεταλλάξεων είναι παρόμοιο με το ποσοστό που παρατηρείται στο ενδογενές γονίδιο *Hprt*. Οι μεγάλες ελλείψεις ανιχνεύονται μόνο τους προσδιορισμούς επιλογής του Spi^- και πλασμιδίων με το γονίδιο *lacZ* (24). Οι μεταλλάξεις που ενδιαφέρουν είναι όσες εμφανίζονται in vivo σε ποντικούς ή επίμυες. Οι μεταλλάξειςin vitro και ex vivo που ενδέχεται να εμφανιστούν κατά την ανάκτηση, την αντιγραφή ή την επιδιόρθωση φάγων/πλασμιδίων είναι σχετικά σπάνιες και, σε ορισμένα συστήματα, μπορούν να προσδιοριστούν ειδικά ή να αποκλειστούν από το σύστημα βακτηριακού ξενιστή/θετικής επιλογής.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Προετοιμασία

Επιλογή ζωικού είδους

16. Υπάρχουν σήμερα διάφορα μοντέλα ανίχνευσης γονιδιακών μεταλλάξεων σε διαγονιδιακούς ποντικούς, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρύτερα από όσο τα μοντέλα με διαγονιδιακούς επίμυες. Εάν ο επίμυς αποτελεί σαφώς καταλληλότερο μοντέλο σε σύγκριση με τον ποντικό (π.χ. κατά τη διερεύνηση του μηχανισμού καρκινογένεσης στην περίπτωση όγκου που εμφανίζεται μόνο σε επίμυες ή για τη συσχέτιση με μελέτη τοξικότητας σε επίμυες ή εάν είναι γνωστό ότι ο μεταβολισμός των επιμύων είναι πιο αντιπροσωπευτικός του ανθρώπινου μεταβολισμού), θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης μοντέλων με διαγονιδιακούς επίμυες.

Συνθήκες στέγασης και διατροφής

17. Η θερμοκρασία του θαλάμου πειραματόζωων θα πρέπει, υπό ιδανικές συνθήκες, να είναι 22 °C (± 3 °C). Αν και η σχετική υγρασία θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου, εν τούτοις στόχος θα πρέπει να είναι η διατήρηση σχετικής υγρασίας 50-60 %. Ο φωτισμός θα πρέπει να είναι τεχνητός με ημερήσια φωτοπερίοδο 12 ωρών. Για τη διατροφή μπορούν να χρησιμοποιούνται συνήθη εργαστηριακά σιτηρέσια, με

▼M5

απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού. Όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με την τροφή, η ανάγκη επαρκούς πρόσμειξης της ουσίας είναι δυνατόν να επηρεάσει την επιλογή σιτηρεσίου. Τα ζώα θα πρέπει να στεγάζονται σε μικρές ομάδες (όχι περισσότερα από πέντε) του ίδιου φύλου, εφόσον δεν αναμένεται επιθετική συμπεριφορά. Εάν αιτιολογείται επιστημονικά, τα ζώα μπορούν να στεγάζονται ατομικά.

Προετοιμασία των ζώων

18. Υγιή, νεαρά, σεξουαλικώς ώριμα ενήλικα ζώα (ηλικίας 8-12 εβδομάδων κατά την έναρξη της αγωγής) κατανέμονται τυχαία στις ομάδες αγωγής και μαρτύρων. Τα ζώα λαμβάνουν αποκλειστικό αναγνωριστικό και εγκλιματίζονται στις εργαστηριακές συνθήκες για πέντε τουλάχιστον ημέρες. Η διάταξη των κλωβών θα πρέπει να ελαχιστοποιεί την πιθανότητα επιδράσεων οφειλόμενων στη θέση τους. Στην αρχή της μελέτης, οι διαφορές βάρους μεταξύ των ζώων θα πρέπει να είναι ελάχιστες και να μην υπερβαίνουν το ± 20 % του μέσου βάρους κάθε φύλου.

Παρασκευή των δόσεων

19. Οι στερεές ελεγχόμενες χημικές ουσίες θα πρέπει να διαλύονται ή να εναιωρούνται σε κατάλληλους διαλύτες ή φορείς ή να αναμειγνύονται με την τροφή ή το πόσιμο νερό, πριν χορηγηθούν στα ζώα. Οι υγρές ελεγχόμενες χημικές ουσίες μπορούν να χορηγούνται ως έχουν ή να αραιώνονται πριν από τη χορήγηση. Σε περίπτωση έκθεσης μέσω της εισπνοής, οι ελεγχόμενες χημικές ουσίες μπορούν να χορηγούνται ως αέριο, ατμοί ή στερεό/υγρό αερόλυμα, ανάλογα με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσφατα παρασκευάσματα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, εκτός εάν η φύλαξη των παρασκευασμάτων είναι αποδεκτή βάσει των δεδομένων που αφορούν τη σταθερότητα της ουσίας.

Συνθήκες δοκιμής

Διαλύτης/φορέας

20. Ο διαλύτης/φορέας θα πρέπει να μην έχει τοξικές επιδράσεις στους χρησιμοποιούμενους όγκους δόσεων, ούτε να υπάρχουν υπόνοιες για πιθανή χημική αντίδρασή του με την ελεγχόμενη χημική ουσία. Εάν ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης/φορέας δεν είναι ευρέως γνωστός, η χρήση του θα πρέπει να τεκμηριώνεται με δεδομένα αναφοράς από τα οποία προκύπτει ότι είναι συμβατός. Συνιστάται να εξετάζεται πρώτα η χρήση υδατικού διαλύτη/φορέα, εφόσον είναι δυνατόν.

Θετικοί μάρτυρες

21. Θα πρέπει κανονικά να χρησιμοποιούνται ζώα ως συντρέχοντες θετικοί μάρτυρες. Ωστόσο, τα εργαστήρια που έχουν αποδείξει την ικανότητά τους (βλ. παράγραφο 23) και εφαρμόζουν τους συγκεκριμένους προσδιορισμούς ως συνήθη πρακτική μπορούν να συμπεριλαμβάνουν σε κάθε μελέτη, για την επιβεβαίωση της επιτυχίας της μεθόδου, DNA από ζώα που έχουν υποβληθεί στο παρελθόν σε αγωγή με θετική ουσία. Το εν λόγω DNA από προηγούμενα πειράματα πρέπει να έχει ληφθεί από τα ίδια είδη και ιστούς που ενδιαφέρουν και να έχει φυλαχθεί καταλλήλως (βλ. παράγραφο 36). Όταν χρησιμοποιούνται συντρέχοντες θετικοί μάρτυρες, οι θετικές ουσίες δεν είναι απαραίτητο να χορηγούνται από την ίδια οδό όπως η ελεγχόμενη χημική ουσία. Ωστόσο, πρέπει να είναι γνωστό ότι προκαλούν μεταλλάξεις σε έναν ή περισσότερους ιστούς που ενδιαφέρουν την ελεγχόμενη χημική ουσία. Οι δόσεις των χημικών ουσιών που αποτελούν θετικούς μάρτυρες θα πρέπει να επιλέγονται κατά τρόπο ώστε να έχουν ασθενείς ή μέτριες επιδράσεις μέσω των οποίων αξιολογούνται με ορθή κρίση οι επιδόσεις και η ευαισθησία του προσδιορισμού. Παραδείγματα χημικών ουσιών που αποτελούν θετικούς μάρτυρες και ορισμένοι από τους ιστούς-στόχους τους περιλαμβάνονται στον πίνακα 1.

▼M5

Πίνακας 1

Παραδείγματα χημικών ουσιών που αποτελούν θετικούς μάρτυρες και ορισμένοι από τους ιστούς-στόχους τους

Χημική ουσία που λειτουργεί ως θετικός μάρτυρας και αριθμός CAS	Ονομασία EINECS και αριθμός EINECS	Χαρακτηριστικά	Ιστός-στόχος της μετάλλαξης	
			Επίμυς	Ποντικός
N-αιθυλο-N-νιτρωδουρία [αριθ. CAS 759-73-9]	N-αιθυλο-N-νιτρωδουρία [212-072-2]	Μεταλλαξιογόνος ουσία με άμεση δράση	Ήπαρ, πνεύμονες	Μυελός των οστών, κόλον, επιθήλιο του κόλου, έντερο, ήπαρ, πνεύμονες, σπλήνας, νεφροί, θυλακικά κύτταρα των ωοθηκών, αρσενικά γεννητικά κύτταρα
Καρβαμιδικός αιθυλεστέρας (ουρεθάνη) [αριθ. CAS 51-79-6]	Ουρεθάνη [200-123-1]	Μεταλλαξιογόνος ουσία, απαιτεί μεταβολισμό αλλά έχει μόνο ασθενείς επιδράσεις		Μυελός των οστών, προστόμαχος, λεπτό έντερο, ήπαρ, πνεύμονες, σπλήνας
2,4-διαμινοτολουόλιο [αριθ. CAS 95-80-7]	4-μεθυλο-m-φαινυλενοδιαμίνη [202-453-1]	Μεταλλαξιογόνος ουσία, απαιτεί μεταβολισμό, είναι επίσης θετική στον προσδιορισμό Spi^-	Ήπαρ	Ήπαρ
Βενζο[a]πυρένιο [αριθ. CAS 50-32-8]	Βενζο[d,e,f]χρυσένιο [200-028-5]	Μεταλλαξιογόνος ουσία, απαιτεί μεταβολισμό	Ήπαρ, επίπλοα	Μυελός των οστών, μαστοί, κόλον, προστόμαχος, αδενικό τμήμα στομάχου, καρδιά, ήπαρ, πνεύμονες, αρσενικά γεννητικά κύτταρα

Αρνητικοί μάρτυρες

22. Για κάθε χρόνο δειγματοληψίας θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται και αρνητικοί μάρτυρες, στους οποίους χορηγείται μόνο ο διαλύτης ή ο φορέας και οι οποίοι, κατά τα άλλα, υφίστανται την ίδια μεταχείριση όπως οι ομάδες αγωγής. Εάν δεν υπάρχουν ιστορικά ή δημοσιευμένα δεδομένα για μάρτυρες από τα οποία προκύπτει ότι ο επιλεγμένος διαλύτης/φορέας δεν επάγει επιβλαβείς ή μεταλλαξιογόνες επιδράσεις, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται επίσης, για κάθε χρόνο δειγματοληψίας, μάρτυρες που δεν υποβάλλονται σε αγωγή ώστε να διαπιστώνεται η δυνατότητα αποδοχής των μαρτύρων με τον φορέα.

Έλεγχος ικανότητας εργαστηρίων

23. Η ικανότητα εκτέλεσης των παρόντων προσδιορισμών θα πρέπει να τεκμηριώνεται με απόδειξη της ικανότητας αναπαραγωγής των αναμενόμενων αποτελεσμάτων από δημοσιευμένα δεδομένα (24) που αφορούν: 1) τις συχνότητες μεταλλάξεων με χημικές ουσίες που αποτελούν θετικούς μάρτυρες (συμπεριλαμβανομένων ασθενών αποκρίσεων), όπως οι ουσίες του πίνακα 1, με μη μεταλλαξιογόνες ουσίες και με μάρτυρες με τον φορέα και 2) την ανάκτηση διαγονιδίων από γονιδιωματικό DNA (π.χ. απόδοση πακεταρίσματος).

Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των μεταλλαγμάτων

24. Στην περίπτωση των εφαρμογών στο πλαίσιο ρυθμίσεων, δεν απαιτείται προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στο DNA των μεταλλαγμάτων, ιδίως όταν λαμβάνεται σαφές θετικό ή αρνητικό αποτέλεσμα. Ωστόσο, τα δεδομένα για την αλληλουχία ενδέχεται να είναι χρήσιμα όταν παρατηρούνται μεγάλες αποκλίσεις μεταξύ των ατόμων. Στις περιπτώσεις αυτές, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο προσδιορισμός της αλληλουχίας για να

▼M5

αποκλειστεί η πιθανότητα jackpot ή κλωνικών συμβάντων, με τον προσδιορισμό του ποσοστού μοναδικών μεταλλαγμάτων από συγκεκριμένο ιστό. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας περίπου 10 μεταλλαγμάτων ανά ιστό και ανά ζώο προβλέπεται ότι θα επαρκεί, προκειμένου να κριθεί απλώς αν τα κλωνικά μεταλλάγματα συνεισφέρουν στη συχνότητα μεταλλάξεων. Ενδέχεται να χρειάζεται προσδιορισμός της αλληλουχίας έως και 25 μεταλλαγμάτων για τη μαθηματική διόρθωση της συχνότητας μεταλλάξεων ώστε να ληφθεί υπόψη η κλωνικότητα. Το ενδεχόμενο προσδιορισμού της αλληλουχίας των μεταλλαγμάτων μπορεί επίσης να εξετάζεται όταν διαπιστώνονται μικρές αυξήσεις της συχνότητας μεταλλάξεων (δηλ. ελάχιστη υπέρβαση των τιμών των μαρτύρων που δεν υποβάλλονται σε αγωγή). Οι διαφορές όσον αφορά το φάσμα μεταλλαγμένων αποικιών μεταξύ των ζώων που έχουν υποβληθεί σε αγωγή και εκείνων που δεν έχουν είναι δυνατόν να στηρίζουν την υπόθεση μεταλλαξιογόνου επίδρασης (29). Τα φάσματα μεταλλάξεων μπορεί να είναι χρήσιμα και για τη διατύπωση μηχανιστικών υποθέσεων. Όταν πρόκειται να συμπεριληφθεί προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στο πρωτόκολλο της μελέτης, θα πρέπει να λαμβάνεται ιδιαίτερη μέριμνα κατά τον σχεδιασμό της, ιδίως όσον αφορά τον αριθμό των μεταλλαγμάτων ανά δείγμα, η αλληλουχία των οποίων θα προσδιορίζεται, ώστε να επιτυγχάνεται επαρκής ισχύς ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο στατιστικό μοντέλο (βλ. παράγραφο 43).

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αριθμός και φύλο των ζώων

25. Ο αριθμός ζώων ανά ομάδα θα πρέπει να προκαθορίζεται ώστε να επαρκεί για την επίτευξη της στατιστικής ισχύος που είναι απαραίτητη για την ανίχνευση τουλάχιστον του διπλασιασμού της συχνότητας μεταλλάξεων. Οι ομάδες αποτελούνται τουλάχιστον από πέντε ζώα. Εάν όμως η στατιστική ισχύς είναι ανεπαρκής, ο αριθμός των ζώων θα πρέπει να αυξάνεται όσο χρειάζεται. Κατά κανόνα, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται αρσενικά ζώα. Σε ορισμένες περιπτώσεις ενδέχεται να δικαιολογείται η χρήση μόνο θηλυκών ζώων, λόγου χάριν κατά τον έλεγχο φαρμάκων που προορίζονται ειδικά για τις γυναίκες ή κατά τη διερεύνηση του μεταβολισμού στον οργανισμό των γυναικών. Εάν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των φύλων όσον αφορά την τοξικότητα ή τον μεταβολισμό, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ζώα και των δύο φύλων.

Περίοδος χορήγησης

26. Με βάση παρατηρήσεις ότι οι μεταλλάξεις συσσωρεύονται με κάθε αγωγή, είναι απαραίτητο να εφαρμόζεται ένα σχήμα επαναλαμβανόμενων δόσεων με καθημερινή χορήγηση δόσεων για 28 ημέρες. Το σχήμα αυτό θεωρείται γενικά αποδεκτό, τόσο για την επαρκή συσσώρευση των μεταλλάξεων που προκαλούνται από ασθενή μεταλλαξιογόνα, όσο και για την παροχή επαρκούς χρόνου έκθεσης ώστε να ανιχνεύονται μεταλλάξεις σε όργανα των οποίων τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται με αργούς ρυθμούς. Για ορισμένες αξιολογήσεις ενδέχεται να είναι κατάλληλα εναλλακτικά δοσολογικά σχήματα, τα οποία θα πρέπει να αιτιολογούνται επιστημονικά στο πρωτόκολλο. Η διάρκεια της αγωγής δεν θα πρέπει να είναι μικρότερη από τον χρόνο που απαιτείται για την πλήρη επαγωγή όλων των σχετικών μεταβολικών ενζύμων, ενώ συντομότερες περίοδοι αγωγής μπορεί να απαιτούν τη χρήση πολλών χρόνων δειγματοληψίας, κατάλληλων για όργανα με διαφορετικούς ρυθμούς πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Σε κάθε περίπτωση, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται όλες οι διαθέσιμες πληροφορίες (π.χ. για τη γενική τοξικότητα ή τον μεταβολισμό και τη φαρμακοκινητική) κατά την αιτιολόγηση ενός πρωτοκόλλου, ιδίως εάν προβλέπονται αποκλίσεις από τις ανωτέρω τυπικές συστάσεις. Οι περίοδοι αγωγής που υπερβαίνουν τις 8 εβδομάδες, παρόλο που ενδεχομένως αυξάνουν την ευαισθησία, θα πρέπει να επεξηγούνται σαφώς και να αιτιολογούνται, δεδομένου ότι είναι δυνατόν να προκαλέσουν φαινόμενη αύξηση της συχνότητας μεταλλάξεων μέσω κλωνικής επέκτασης (29).

Επίπεδα δόσης

27. Τα επίπεδα δόσεων θα πρέπει να βασίζονται στα αποτελέσματα μελέτης καθορισμού εύρους δόσεων, κατά την οποία μετράται η γενική τοξικότητα και η οποία έχει διεξαχθεί μέσω της ίδιας οδού έκθεσης, ή στα αποτελέσματα προγενέστερων μελετών υποξείας τοξικότητας. Για τον καθορισμό του εύρους δόσεων μπορούν να χρησιμοποιούνται μη διαγονιδιακά ζώα του ίδιου στελέχους τρωκτικών. Προκειμένου να ληφθούν πληροφορίες για τη

▼M5

σχέση δόσης-απόκρισης, μια ολοκληρωμένη μελέτη θα πρέπει να περιλαμβάνει στην κυρίως δοκιμή μια ομάδα αρνητικών μαρτύρων (βλ. παράγραφο 22) και τουλάχιστον τρία επίπεδα δόσης με κατάλληλα διαστήματα μεταξύ τους, εκτός από τις περιπτώσεις στις οποία χρησιμοποιείται οριακή δόση (βλ. παράγραφο 28). Η ανώτατη δόση θα πρέπει να ισούται με τη μέγιστη ανεκτή δόση (ΜΑΔ). Η ΜΑΔ ορίζεται ως η δόση που προκαλεί σημεία τοξικότητας τέτοια ώστε να αναμένεται ότι υψηλότερα επίπεδα δόσης, με βάση το ίδιο δοσολογικό σχήμα, θα επιφέρουν τον θάνατο. Χημικές ουσίες με ειδική βιολογική δράση σε χαμηλές, μη τοξικές δόσεις (όπως οι ορμόνες και τα μιτογόνα), καθώς και χημικές ουσίες που παρουσιάζουν κορεσμό των τοξικοκινητικών ιδιοτήτων, μπορεί να αποτελούν εξαιρέσεις των κριτηρίων καθορισμού των δόσεων και θα πρέπει να αξιολογούνται κατά περίπτωση. Τα χρησιμοποιούμενα επίπεδα δόσης θα πρέπει να καλύπτουν την κλίμακα από τη μέγιστη μέχρι την ελάχιστη ή μηδενική τοξικότητα.

Οριακή δοκιμή

28. Εάν έχει καταδειχθεί από πειράματα καθορισμού εύρους δόσεων ή από υφιστάμενα δεδομένα για συγγενή στελέχη τρωκτικών ότι ένα δοσολογικό σχήμα που περιλαμβάνει τουλάχιστον την οριακή δόση (βλ. κατωτέρω) δεν έχει ως αποτέλεσμα παρατηρήσιμες τοξικές επιδράσεις και εάν, βάσει δεδομένων για χημικές ουσίες ανάλογης δομής, δεν αναμένεται γονιδιοτοξικότητα, ενδέχεται να μην κριθεί απαραίτητη η πλήρης μελέτη με τρία επίπεδα δόσης. Η οριακή δόση για περίοδο χορήγησης 28 ημερών (δηλ. 28 ημερήσιες δόσεις) είναι 1 000 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα, ενώ για περιόδους χορήγησης 14 ή λιγότερων ημερών, είναι 2 000 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα (οι δοσολογίες που διαφέρουν από τη χορήγηση 28 ημερήσιων δόσεων θα πρέπει να αιτιολογούνται επιστημονικά στο πρωτόκολλο — βλ. παράγραφο 26).

Χορήγηση των δόσεων

29. Η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται συνήθως από το στόμα με τη χρήση στομαχικού καθετήρα ή κατάλληλης διασωλήνωσης. Γενικά, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά τον σχεδιασμό του προσδιορισμού η προβλεπόμενη οδός έκθεσης του ανθρώπου. Ενδέχεται επομένως να είναι αποδεκτές και άλλες οδοί έκθεσης (π.χ. μέσω του πόσιμου νερού, υποδόρια ή ενδοφλέβια ένεση, τοπική εφαρμογή, μέσω της εισπνοής, ενδοτραχειακή χορήγηση, μέσω της τροφής ή εμφύτευση), εφόσον μπορούν να αιτιολογηθούν. Η ενδοπεριτοναϊκή ένεση δεν συνιστάται, επειδή δεν αποτελεί οδό συναφή από άποψη φυσιολογίας με την έκθεση του ανθρώπου. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί με στομαχικό καθετήρα ή ένεση κάθε φορά εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου και θα πρέπει να μην υπερβαίνει τα 2 ml/100 g σωματικού βάρους. Η χρήση μεγαλύτερου όγκου θα πρέπει να αιτιολογείται. Με εξαίρεση τις ερεθιστικές ή διαβρωτικές χημικές ουσίες, των οποίων οι επιδράσεις κανονικά επιδεινώνονται από τις υψηλότερες συγκεντρώσεις, η μεταβλητότητα του όγκου δοκιμής θα πρέπει να ελαχιστοποιείται με ρύθμιση της συγκέντρωσης, ώστε να εξασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλα τα επίπεδα δόσης.

Χρόνος δειγματοληψίας

Σωματικά κύτταρα

30. Ο χρόνος δειγματοληψίας αποτελεί κρίσιμης σημασίας μεταβλητή, διότι καθορίζεται από το χρονικό διάστημα που απαιτείται για τη σταθεροποίηση των μεταλλάξεων. Το διάστημα αυτό είναι συγκεκριμένο για κάθε ιστό και φαίνεται να συνδέεται με τον χρόνο ανανέωσης του πληθυσμού των κυττάρων, καθώς ο μυελός των οστών και το έντερο αντιδρούν με ταχείς ρυθμούς, ενώ το ήπαρ με πολύ βραδύτερους. Κατάλληλη συμβιβαστική λύση για τη μέτρηση των συχνοτήτων μεταλλάξεων σε ιστούς των οποίων τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται με ταχείς και με βραδείς ρυθμούς είναι η αγωγή με 28 διαδοχικές ημερήσιες δόσεις (όπως υποδεικνύεται στην παράγραφο 26) και η λήψη δειγμάτων τρεις ημέρες μετά την τελευταία δόση. Παρόλα αυτά, η μέγιστη συχνότητα μεταλλάξεων είναι πιθανόν να μην εκδηλωθεί σε ιστούς με βραδύ ρυθμό πολλαπλασιασμού υπό αυτές τις συνθήκες. Εάν οι ιστοί με βραδύ ρυθμό πολλαπλασιασμού έχουν ιδιαίτερη σημασία, μπορεί να είναι σκόπιμο να μετατεθεί ο χρόνος δειγματοληψίας 28 ημέρες μετά την περίοδο χορήγησης των 28 ημερών (16) (29). Στις περιπτώσεις αυτές, ο μεταγενέστερος χρόνος δειγματοληψίας αντικαθιστά το τριήμερο διάστημα έως τη δειγματοληψία και απαιτείται επιστημονική αιτιολόγηση της επιλογής αυτής.

▼M5

Γεννητικά κύτταρα

31. Οι προσδιορισμοί σε ΔΓΤ είναι ιδιαιτέρως κατάλληλοι για τη μελέτη της επαγωγής γονιδιακής μετάλλαξης σε αρσενικά γεννητικά κύτταρα (7) (8) (27) με σαφώς καθορισμένους χρόνους και κινητική της σπερματογένεσης. Οι μικροί αριθμοί ωαρίων που είναι διαθέσιμα για ανάλυση, ακόμα και μετά από υπερωορρηξία, και το γεγονός ότι δεν συντίθεται DNA στο ωοκύτταρο αποκλείουν τον προσδιορισμό της μετάλλαξης θηλυκών γεννητικών κυττάρων με τη χρήση προσδιορισμών σε διαγονιδιακά ζώα (31).

32. Οι χρόνοι δειγματοληψίας για τα αρσενικά γεννητικά κύτταρα θα πρέπει να επιλέγονται κατά τρόπο ώστε, αφενός να λαμβάνονται δείγματα από όλους τους τύπους κυττάρων που εκτίθενται καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης των γεννητικών κυττάρων και, αφετέρου, να εκτίθεται επαρκώς το στάδιο που αποτελεί τον στόχο της δειγματοληψίας. Ο χρόνος που χρειάζεται για να εξελιχθούν τα γεννητικά κύτταρα από σπερμογονιακά βλαστοκύτταρα σε ώριμο σπέρμα που φτάνει στον σπερματικό πόρο/στην ουρά της επιδιδυμίδας είναι περίπου 49 ημέρες για τους ποντικούς (36) και περίπου 70 ημέρες για τους επίμυες (34) (35). Μετά από έκθεση 28 ημερών και παρέλευση τριήμερου διαστήματος έως τη δειγματοληψία, το συσσωρευμένο σπέρμα που συλλέγεται από τον σπερματικό πόρο/την ουρά της επιδιδυμίδας (7) (8) αντιπροσωπεύει έναν πληθυσμό κυττάρων που έχει εκτεθεί κατά τη διάρκεια περίπου του δεύτερου μισού της σπερματογένεσης, το οποίο περιλαμβάνει τη μειωτική και τη μεταμειωτική περίοδο, όχι όμως την περίοδο των σπερμογονιακών βλαστοκυττάρων. Για να ληφθεί από τον σπερματικό πόρο/την ουρά της επιδιδυμίδας κατάλληλο δείγμα κυττάρων που ήταν σπερμογονιακά βλαστοκύτταρα κατά τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης, απαιτείται ένας επιπλέον χρόνος δειγματοληψίας τουλάχιστον 7 εβδομάδες (ποντικοί) ή 10 εβδομάδες (επίμυες) μετά το τέλος της αγωγής.

33. Τα κύτταρα που εξωθούνται από τα σπερματοφόρα σωληνάρια μετά την εφαρμογή σχήματος δειγματοληψίας 28 + 3 ημερών αποτελούνται από έναν μεικτό πληθυσμό, εμπλουτισμένο από όλα τα στάδια των αναπτυσσόμενων γεννητικών κυττάρων (7) (8). Η δειγματοληψία αυτών των κυττάρων για την ανίχνευση γονιδιακών μεταλλάξεων δεν παρέχει τόσο επακριβή αξιολόγηση των σταδίων στα οποία επάγονται οι μεταλλάξεις των γεννητικών κυττάρων όσο αυτή που μπορεί να επιτευχθεί με τη δειγματοληψία σπερματοζωαρίων από τον σπερματικό πόρο/την ουρά της επιδιδυμίδας (δεδομένου ότι τα δείγματα που λαμβάνονται από τα σωληνάρια περιέχουν διάφορους τύπους γεννητικών κυττάρων και αυτός ο κυτταρικός πληθυσμός θα είναι μολυσμένος σε κάποιο βαθμό από σωματικά κύτταρα). Ωστόσο, η δειγματοληψία κυττάρων από τα σπερματοφόρα σωληνάρια, επιπλέον των σπερματοζωαρίων από τον σπερματικό πόρο/την ουρά της επιδιδυμίδας, μόνο με ένα σχήμα δειγματοληψίας 28 + 3 ημερών καλύπτει ως ένα βαθμό τα κύτταρα που εκτίθενται κατά τη διάρκεια της πλειονότητας των σταδίων ανάπτυξης των γεννητικών κυττάρων και ενδέχεται να είναι χρήσιμη για την ανίχνευση ορισμένων μεταλλαξιογόνων των γεννητικών κυττάρων.

Παρατηρήσεις

34. Θα πρέπει να διεξάγονται γενικές κλινικές παρατηρήσεις τουλάχιστον μια φορά ημερησίως, κατά προτίμηση την ίδια ώρα κάθε ημέρα και λαμβανομένου υπόψη του χρόνου κορύφωσης των αναμενόμενων επιδράσεων μετά τη χορήγηση της δόσης. Η κατάσταση της υγείας των ζώων θα πρέπει να καταγράφεται. Όλα τα ζώα θα πρέπει να εξετάζονται τουλάχιστον δύο φορές ημερησίως για νοσηρότητα και θνησιμότητα και να ζυγίζονται τουλάχιστον εβδομαδιαίως και κατά τον χρόνο θανάτωσης. Η κατανάλωση τροφής θα πρέπει να μετράται τουλάχιστον εβδομαδιαίως. Εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με το πόσιμο νερό, θα πρέπει να μετράται η κατανάλωσή του σε κάθε αλλαγή νερού και, τουλάχιστον, εβδομαδιαίως. Τα ζώα που εμφανίζουν μη θανάσιμους δείκτες υπερβολικής τοξικότητας θα πρέπει να υποβάλλονται σε ευθανασία πριν από την ολοκλήρωση της περιόδου δοκιμής (23).

▼M5

Συλλογή ιστών

35. Θα πρέπει να καθορίζεται με σαφήνεια το σκεπτικό συλλογής ιστών. Δεδομένου ότι η επαγωγή μεταλλάξεων μπορεί να μελετηθεί σχεδόν σε οποιονδήποτε ιστό, η επιλογή των ιστών που θα συλλεχθούν θα πρέπει να βασίζεται στον λόγο διεξαγωγής της μελέτης και στα υφιστάμενα δεδομένα μεταλλαξιογένεσης, καρκινογένεσης ή τοξικότητας για την υπό διερεύνηση χημική ουσία. Σημαντικοί παράγοντες που θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη είναι, μεταξύ άλλων, η οδός χορήγησης (βάσει των πιθανών οδών έκθεσης του ανθρώπου), η προβλεπόμενη κατανομή στους ιστούς και ο πιθανός μηχανισμός δράσης. Εάν δεν υπάρχουν πληροφορίες τεκμηρίωσης, θα πρέπει να συλλέγονται διάφοροι σωματικοί που ενδιαφέρουν, αντιπροσωπευτικοί των ιστών με ταχύ και βραδύ ρυθμό πολλαπλασιασμού, καθώς και των ιστών των θέσεων επαφής. Επιπλέον, θα πρέπει να συλλέγονται και να φυλάσσονται σπερματοζωάρια από τον σπερματικό πόρο/την ουρά της επιδιδυμίδας και αναπτυσσόμενα γεννητικά κύτταρα από τα σπερματοφόρα σωληνάρια (όπως περιγράφεται στις παραγράφους 32 και 33), για το ενδεχόμενο να απαιτηθεί στο μέλλον ανάλυση της μεταλλαξιογένεσης στα γεννητικά κύτταρα. Θα πρέπει να μετράται το βάρος των οργάνων και, στην περίπτωση των μεγαλύτερων οργάνων, να συλλέγεται η ίδια περιοχή τους από όλα τα ζώα.

Φύλαξη ιστών και DNA

36. Οι ιστοί (ή ομοιογενοποιημένοι ιστοί) θα πρέπει να φυλάσσονται στους – 70 °C ή σε χαμηλότερη θερμοκρασία και να χρησιμοποιούνται για απομόνωση του DNA εντός 5 ετών. Το απομονωμένο DNA θα πρέπει να φυλάσσεται υπό ψύξη στους 4 °C σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και, ως βέλτιστη πρακτική, να χρησιμοποιείται για ανάλυση μεταλλάξεων εντός 1 έτους.

Επιλογή ιστών για ανάλυση μεταλλαγμάτων

37. Η επιλογή των ιστών θα πρέπει να βασίζεται σε κριτήρια όπως 1) η οδός χορήγησης ή η θέση πρώτης επαφής (π.χ. αδενικό τμήμα του στομάχου, σε περίπτωση χορήγησης από το στόμα, πνεύμονες, προκειμένου για χορήγηση μέσω της εισπνοής, ή επιδερμίδα, σε περίπτωση τοπικής εφαρμογής) και 2) οι φαρμακοκινητικές παράμετροι που έχουν παρατηρηθεί σε μελέτες γενικής τοξικότητας και έχουν δείξει διάθεση, κατακράτηση ή συσσώρευση σε ιστούς ή έχουν υποδείξει όργανα-στόχους της τοξικότητας. Εάν η μελέτη διεξάγεται ως συνέχεια σε μελέτες καρκινογένεσης, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι ιστοί-στόχοι της καρκινογένεσης. Η επιλογή ιστών για ανάλυση θα πρέπει να μεγιστοποιεί την ανίχνευση χημικών ουσιών οι οποίες αποτελούν μεταλλαξιογόνα με άμεση δράση in vitro, μεταβολίζονται με ταχύ ρυθμό, είναι ιδιαιτέρως δραστικές ή απορροφώνται ελάχιστα ή των οποίων ο ιστός-στόχος καθορίζεται από την οδό χορήγησης (6).

38. Εάν δεν υπάρχουν πληροφορίες τεκμηρίωσης και λαμβανομένης υπόψη της θέσης επαφής που καθορίζεται από την οδό χορήγησης, θα πρέπει να αξιολογείται η μεταλλαξιογένεση στο ήπαρ και τουλάχιστον σε έναν ταχέως διαιρούμενο ιστό (π.χ. αδενικό τμήμα του στομάχου, μυελός των οστών). Μολονότι, ως επί το πλείστον, οι ανωτέρω απαιτήσεις πληρούνται με την ανάλυση δύο προσεκτικά επιλεγμένων ιστών, σε ορισμένες περιπτώσεις ενδέχεται να χρειαστούν τρεις ή περισσότεροι ιστοί. Εάν υπάρχουν λόγοι ιδιαίτερης ανησυχίας για τις επιδράσεις στα γεννητικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των θετικών αποκρίσεων σε σωματικά κύτταρα, θα πρέπει να εξετάζονται γεννητικοί ιστοί για μεταλλάξεις.

Μέθοδοι μετρήσεων

39. Υπάρχουν τυπικές εργαστηριακές ή δημοσιευμένες μέθοδοι ανίχνευσης μεταλλαγμάτων για τα συνιστώμενα διαγονιδιακά μοντέλα: λ βακτηριοφάγοι και πλασμίδια με το γονίδιο *lacZ* (30), ποντικοί με το γονίδιο *lacI* (2) (18), ποντικοί *gpt* delta (22), επίμυες *gpt* delta (28) και επιλογή ως προς το γονίδιο *cII* (17). Οι τροποποιήσεις των μεθόδων αυτών θα πρέπει να δικαιολογούνται και να τεκμηριώνονται καταλλήλως. Τα δεδομένα από πολλαπλά πακεταρίσματα μπορούν να συναθροίζονται και να χρησιμοποιούνται για την επίτευξη επαρκούς αριθμού πλακών ή αποικιών. Ωστόσο, η ανάγκη μεγάλου αριθμού αντιδράσεων πακεταρίσματος για την επίτευξη του κατάλληλου αριθμού πλακών μπορεί να αποτελεί ένδειξη κακής ποιότητας του

▼M5

DNA. Στις περιπτώσεις αυτές, τα δεδομένα θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με επιφύλαξη, επειδή ενδέχεται να είναι αναξιόπιστα. Ο βέλτιστος συνολικός αριθμός πλακών ή αποικιών ανά δείγμα DNA διέπεται από τη στατιστική πιθανότητα ανίχνευσης επαρκών αριθμών μεταλλαγμάτων με δεδομένη συχνότητα αυτόματων μεταλλάξεων. Γενικά, εάν η συχνότητα αυτόματων μεταλλάξεων είναι της τάξης του 3×10^{-5}, απαιτούνται τουλάχιστον 125 000 έως 300 000 πλάκες (15). Για τον προσδιορισμό *lacI* με μοντέλο Big Blue®, είναι σημαντικό να καταδεικνύεται ότι μπορεί να ανιχνευθεί το πλήρες φάσμα των μεταλλαγμένων χρωματικών φαινοτύπων, με την προσθήκη κατάλληλων συντρεχόντων χρωματικών μαρτύρων σε κάθε πλάκα καλλιέργειας. Οι ιστοί και τα δείγματα που προκύπτουν (στοιχεία) θα πρέπει να υποβάλλονται σε επεξεργασία και ανάλυση βάσει σχεδιασμού κατά συστάδες, ο οποίος προβλέπει την ταυτόχρονη επεξεργασία στοιχείων από την ομάδα μαρτύρων με τον φορέα/διαλύτη, την ομάδα θετικών μαρτύρων (εάν χρησιμοποιείται) ή το DNA που αποτελεί θετικό μάρτυρα (κατά περίπτωση) και από κάθε ομάδα αγωγής.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

40. Θα πρέπει να παρουσιάζονται σε μορφή πίνακα τα δεδομένα για κάθε ζώο. Η πειραματική μονάδα είναι το ζώο. Η έκθεση θα πρέπει να περιλαμβάνει τον συνολικό αριθμό μονάδων σχηματισμού πλάκας (pfu) ή μονάδων σχηματισμού αποικίας (cfu), τον αριθμό των μεταλλαγμάτων και τη συχνότητα μεταλλάξεων σε κάθε ιστό κάθε ζώου. Σε περίπτωση πολλαπλών αντιδράσεων πακεταρίσματος/διάσωσης, θα πρέπει να αναφέρεται ο αριθμός αντιδράσεων ανά δείγμα DNA. Παρόλο που θα πρέπει να διατηρούνται τα δεδομένα για κάθε επιμέρους αντίδραση, πρέπει να αναφέρεται μόνο ο συνολικός αριθμός pfu ή cfu. Θα πρέπει να αναφέρονται δεδομένα για την τοξικότητα και τα κλινικά σημεία σύμφωνα με την παράγραφο 34. Τα αποτελέσματα προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας θα πρέπει να παρουσιάζονται για κάθε μετάλλαγμα που αναλύθηκε, συνοδευόμενα από τους υπολογισμούς της προκύπτουσας συχνότητας μεταλλάξεων για κάθε ζώο και ιστό.

Στατιστική αξιολόγηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

41. Υπάρχουν διάφορα κριτήρια προσδιορισμού ενός θετικού αποτελέσματος, όπως η σχετιζόμενη με τη δόση αύξηση της συχνότητας μεταλλάξεων ή η σαφής αύξηση της συχνότητας μεταλλάξεων σε μια μόνο ομάδα δόσης σε σύγκριση με την ομάδα μαρτύρων με διαλύτη/φορέα. Προκειμένου να συγκεντρωθούν επαρκή δεδομένα για ανάλυση της σχέσης δόσης-απόκρισης, θα πρέπει να αναλύονται τουλάχιστον τρεις ομάδες στις οποίες χορηγήθηκαν δόσεις. Παρόλο που πρωταρχικό μέλημα θα πρέπει να είναι η βιολογική σημασία των αποτελεσμάτων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατάλληλες στατιστικές μέθοδοι ως βοήθημα για την αξιολόγησή τους (4) (14) (15) (25) (26). Η πειραματική μονάδα στις χρησιμοποιούμενες στατιστικές δοκιμασίες θα πρέπει να είναι το ζώο.

42. Εάν τα αποτελέσματα για την ελεγχόμενη χημική ουσία δεν πληρούν τα ανωτέρω κριτήρια σε κανέναν ιστό, η ουσία θεωρείται μη μεταλλαξιογόνος στον παρόντα προσδιορισμό. Για να κριθεί η βιολογική σημασία των αρνητικών αποτελεσμάτων, θα πρέπει να επιβεβαιώνεται η έκθεση του ιστού.

43. Όσον αφορά τις αναλύσεις προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA, υπάρχουν στατιστικές προσεγγίσεις που υποβοηθούν την ερμηνεία των αποτελεσμάτων (1) (5) (9) (19).

44. Αν εξεταστεί το κατά πόσον οι παρατηρούμενες τιμές περικλείονται στο ιστορικό πεδίο τιμών για τους μάρτυρες, είναι δυνατόν να προκύψουν κατευθύνσεις για την αξιολόγηση της βιολογικής σημαντικότητας της απόκρισης (32).

▼M5

Έκθεση δοκιμής

45. Η έκθεση της δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη χημική ουσία:

— ταυτότητα και αριθμός CAS, εάν είναι γνωστός·

— προέλευση, αριθμός παρτίδας, εάν είναι διαθέσιμος·

— φυσική μορφή και καθαρότητα·

— φυσικοχημικές ιδιότητες που έχουν σημασία για τη διεξαγωγή της μελέτης·

— σταθερότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, εάν είναι γνωστή.

Διαλύτης/φορέας:

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα·

— διαλυτότητα και σταθερότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στον διαλύτη/φορέα, εάν είναι γνωστές·

— παρασκευάσματα για χορήγηση μέσω της τροφής, του πόσιμου νερού ή της εισπνοής·

— αναλυτικοί προσδιορισμοί στα παρασκευάσματα (π.χ. σταθερότητα, ομοιογένεια, ονομαστικές συγκεντρώσεις).

Πειραματόζωα:

— είδος/στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε και αιτιολόγηση της επιλογής του·

— αριθμός, ηλικία και φύλο των ζώων·

— προέλευση, συνθήκες στέγασης, διατροφή, κ.λπ.·

— ατομικό βάρος των ζώων κατά την έναρξη της δοκιμής, συμπεριλαμβανομένων του εύρους τιμών, της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης για κάθε ομάδα.

Συνθήκες δοκιμής:

— δεδομένα για τους θετικούς και τους αρνητικούς (φορέας/διαλύτης) μάρτυρες·

— δεδομένα από τη μελέτη καθορισμού εύρους·

— αιτιολόγηση της επιλογής των επιπέδων δόσης·

— λεπτομέρειες για το παρασκεύασμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας·

— λεπτομέρειες για τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας·

— αιτιολόγηση της επιλογής της οδού χορήγησης·

— μέθοδοι μέτρησης της τοξικότητας στα ζώα, συμπεριλαμβανομένων, εάν είναι διαθέσιμες, ιστοπαθολογικών ή αιματολογικών αναλύσεων και της συχνότητας με την οποία πραγματοποιήθηκαν παρατηρήσεις ή μετρήθηκε το σωματικό βάρος των ζώων·

— μέθοδοι με τις οποίες εξακριβώθηκε ότι η ελεγχόμενη χημική ουσία έφτασε στον ιστό-στόχο ή εισήλθε στη συστηματική (μεγάλη) κυκλοφορία του αίματος, εάν τα αποτελέσματα του προσδιορισμού ήταν αρνητικά·

▼M5

— πραγματική δόση (mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα), υπολογιζόμενη από τη συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο σιτηρέσιο/στο πόσιμο νερό (ppm) και την κατανάλωση, εφόσον έχει υπολογιστεί·

— λεπτομέρειες σχετικά με την ποιότητα της τροφής και του νερού·

— λεπτομερής περιγραφή των σχημάτων αγωγής και δειγματοληψίας και αιτιολόγηση των επιλογών·

— μέθοδος ευθανασίας·

— διαδικασίες απομόνωσης και διατήρησης των ιστών·

— μέθοδοι απομόνωσης του γονιδιωματικού DNA των τρωκτικών, διάσωσης του διαγονιδίου από το γονιδιωματικό DNA και μεταφοράς του διαγονιδιωματικού DNA σε βακτηριακό ξενιστή·

— προέλευση και αριθμοί παρτίδας όλων των κυττάρων, των συνόλων έτοιμων αντιδραστηρίων (κιτ) και των αντιδραστηρίων (κατά περίπτωση)·

— μέθοδοι αρίθμησης των μεταλλαγμάτων·

— μέθοδοι μοριακής ανάλυσης των μεταλλαγμάτων και χρήση για τη διόρθωση ως προς την κλωνικότητα και/ή τον υπολογισμό των συχνοτήτων μεταλλάξεων, κατά περίπτωση.

Αποτελέσματα:

— κατάσταση των ζώων πριν από την περίοδο δοκιμής και καθ' όλη τη διάρκειά της, συμπεριλαμβανομένων των σημείων τοξικότητας·

— βάρος σώματος και οργάνων κατά τη θανάτωση·

— για κάθε ιστό/ζώο, αριθμός μεταλλαγμάτων, αριθμός πλακών ή αποικιών που αξιολογήθηκαν, συχνότητα μεταλλάξεων·

— για κάθε ομάδα ιστών/ζώων, αριθμός αντιδράσεων πακεταρίσματος ανά δείγμα DNA, συνολικός αριθμός μεταλλαγμάτων, μέση συχνότητα μεταλλάξεων, τυπική απόκλιση·

— σχέση δόσης-απόκρισης, κατά το δυνατόν·

— για κάθε ιστό/ζώο, αριθμός ανεξάρτητων μεταλλαγμάτων και μέση συχνότητα μεταλλάξεων, εφόσον διενεργήθηκε μοριακή ανάλυση των μεταλλάξεων·

— δεδομένα για συντρέχοντες και ιστορικούς αρνητικούς μάρτυρες, με πεδία τιμών, μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις·

— δεδομένα για συντρέχοντες θετικούς μάρτυρες (ή για DNA ως μη συντρέχοντα θετικό μάρτυρα)·

— αναλυτικοί προσδιορισμοί, εάν είναι διαθέσιμοι (π.χ. συγκεντρώσεις DNA που χρησιμοποιήθηκαν στο πακετάρισμα, δεδομένα προσδιορισμού της αλληλουχίας DNA)·

— στατιστικές αναλύσεις και εφαρμοσθείσες μέθοδοι.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Συμπέρασμα

▼**M5**

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) *Adams,* W.T. and T.R. *Skopek* (1987), «Statistical *Test* for the Comparison of Samples from Mutational Spectra», *J. Mol. Biol*., 194: 391-396.

(2) Bielas, J.H. (2002), «A more Efficient Big Blue® Protocol Improves Transgene Rescue and Accuracy in an Adduct and Mutation Measurement», *Mutation Res.*, 518: 107–112.

(3) Boerrigter, M.E., M.E. Dollé, H.-J. Martus, J.A. Gossen and J. Vijg (1995), «Plasmid-based Transgenic Mouse Model for Studying *in vivo* Mutations» *Nature*, 377(6550): 657–659

(4) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1995), «Statistical Design and Analysis of Mutation Studies in Transgenic Mice», *Environ. Mol. Mutagen*, 25(3): 246–255.

(5) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1996), «Mutational Spectra in Transgenic Animal Research: Data Analysis and Study Design Based upon the Mutant or Mutation Frequency», *Environ. Mol. Mutagen,* 28: 405–413.

(6) Dean, S.W., T.M. Brooks, B. Burlinson, J. Mirsalis, B. Myhr, L. Recio and V. Thybaud (1999), «Transgenic Mouse Mutation Assay Systems can Play an important Role in Regulatory Mutagenicity Testing *in vivo* for the Detection of Site-of-contact Mutagens», *Mutagenesis*, 14(1): 141–151.

(7) Douglas, G.R., J. Jiao, J.D. Gingerich, J.A. Gossen and L.M. Soper (1995), «Temporal and Molecular Characteristics of Mutations Induced by Ethylnitrosourea in Germ Cells Isolated from Seminiferous Tubules and in Spermatozoa of *lacZ* Transgenic Mice», *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7485-7489.

(8) Douglas, G.R., J.D. Gingerich, L.M. Soper and J. Jiao (1997), «Toward an Understanding of the Use of Transgenic Mice for the Detection of Gene Mutations in Germ Cells», *Mutation Res.*, 388(2-3): 197-212.

(9) Dunson, D.B. and K.R. Tindall (2000), «Bayesian Analysis of Mutational Spectra», *Genetics*, 156: 1411–1418.

(10) Gossen, J.A., W.J. de Leeuw, C.H. Tan, E.C. Zwarthoff, F. Berends, P.H. Lohman, D.L. Knook and J. Vijg (1989), «Efficient Rescue of Integrated Shuttle Vectors from Transgenic Mice: a Model for Studying Mutations *in vivo», Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 86(20): 7971–7975.

(11) Gossen, J.A. and J. Vijg (1993), «A Selective System for lacZ-Phage using a Galactose-sensitive *E. coli* Host», *Biotechniques*, 14(3): 326, 330.

(12) Erikson, R.P. (2003), «Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer», *Mutation Res.*, 543: 125-136.

(13) Erikson, R.P. (2010), «Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer: an Update», *Mutation Res.*, **705: 96-106**.

(14) Fung, K.Y., G.R. Douglas and D. Krewski (1998), «Statistical Analysis of *lacZ* Mutant Frequency Data from Muta™Mouse Mutagenicity Assays», *Mutagenesis*, 13(3): 249–255.

(15) Heddle, J.A., S. Dean, T. Nohmi, M. Boerrigter, D. Casciano, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.C. Mirsalis, H.-J Martus, T.R. Skopek, V. Thybaud, K.R.Tindall and N. Yajima (2000), «In vivo Transgenic Mutation Assays», *Environ. Mol. Mutagen*., 35: 253-259.

(16) Heddle, J.A., H.-J. Martus and G.R. Douglas (2003), «Treatment and Sampling Protocols for Transgenic Mutation Assays», *Environ. Mol. Mutagen.*, 41: 1-6.

▼**M5**

(17) Jakubczak, J.L., G. Merlino, J.E. French, W.J. Muller, B. Paul, S. Adhya and S. Garges (1996), «Analysis of Genetic Instability during Mammary Tumor Progression using a novel Selection-based Assay for *in vivo* Mutations in a Bacteriophage λ Transgene Target», *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(17): 9073–9078.

(18) Kohler, S.W., G.S. Provost, P.L. Kretz, A. Fieck, J.A. Sorge and J.M. Short (1990), «The Use of Transgenic Mice for Short-term, in vivo Mutagenicity Testing», Genet. Anal. Tech. Appl., 7(8): 212–218.

(19) Lewis P.D., B. Manshian, M.N. Routledge, G.B. Scott and P.A. Burns (2008), «Comparison of Induced and Cancer-associated Mutational Spectra using Multivariate Data Analysis», Carcinogenesis, 29(4): 772-778.

(20) Nohmi, T., M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda and T. Sofuni (1996), «A new Transgenic Mouse Mutagenesis Test System using Spi^- and 6-thioguanine Selections», Environ. Mol. Mutagen., 28(4): 465–470.

(21) Nohmi, T., M. Suzuki, K. Masumura, M. Yamada, K. Matsui, O. Ueda, H. Suzuki, M. Katoh, H. Ikeda and T. Sofuni (1999), «Spi^- Selection: an Efficient Method to Detect γ-ray-induced Deletions in Transgenic Mice», *Environ. Mol. Mutagen*., 34(1): 9–15.

(22) Nohmi, T., T. Suzuki and K.I. Masumura (2000), «Recent Advances in the Protocols of Transgenic Mouse Mutation Assays», *Mutation Res.*, 455(1–2): 191–215.

(23) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, N°19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(24) OECD (2009), Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, N° 103, ENV/JM/MONO(2009)7, OECD, Paris.

(25) Piegorsch, W.W., B.H. Margolin, M.D. Shelby, A. Johnson, J.E. French, R.W. Tennant and K.R. Tindall (1995), «Study Design and Sample Sizes for a lacI Transgenic Mouse Mutation Assay», Environ. Mol. Mutagen., 25(3): 231–245.

(26) Piegorsch, W.W., A.C. Lockhart, G.J. Carr, B.H. Margolin, T. Brooks, … G.R. Douglas, U.M. Liegibel, T. Suzuki, V. Thybaud, J.H. van Delft and N.J. Gorelick (1997), «Sources of Variability in Data from a Positive Selection lacZ Transgenic Mouse Mutation Assay: an Interlaboratory Study», Mutation. Res., 388(2–3): 249–289.

(27) Singer, T.M., I.B. Lambert, A. Williams, G.R. Douglas and C.L. Yauk (2006), «Detection of Induced Male Germline Mutation: Correlations and Comparisons between Traditional Germline Mutation Assays, Transgenic Rodent Assays and Expanded Simple Tandem Repeat Instability Assays», Mutation. Res., 598: 164-193.

(28) Toyoda-Hokaiwado, N., T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi (2010), «Integration of in vivo Genotoxicity and Short-term Carcinogenicity Assays using F344 gpt delta Transgenic Rats: in vivo Mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene Structural Isomers», Toxicol. Sci., 114(1): 71-78.

(29) Thybaud, V., S. Dean, T. Nohmi, J. de Boer, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.A. Heddle, R.H. Heflich, I. Lambert, H.-J. Martus, J.C. Mirsalis, T. Suzuki and N. Yajima (2003), «*In vivo* Transgenic Mutation Assays», *Mutation Res*., 540: 141-151.

(30) Vijg, J. and G.R. Douglas (1996), «Bacteriophage λ and Plasmid *lacZ* Transgenic Mice for studying Mutations *in vivo*» in: G. Pfeifer (ed.), *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, Part II,* Plenum Press, New York, NY, USA, pp. 391–410.

▼**M5**

(31) Yauk, C.L., J.D. Gingerich, L. Soper, A. MacMahon, W.G. Foster and G.R. Douglas (2005), «A *lacZ* Transgenic Mouse Assay for the Detection of Mutations in Follicular Granulosa Cells», *Mutation Res*., 578(1-2): 117-123.

(32) Hayashi, M., K. Dearfield, P. Kasper, D. Lovell, H.-J. Martus, V. Thybaud (2011), «Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data», Mutation Res., doi:10.1016/j.mrgentox.2010.09.007.

(33) OECD (2011), *Retrospective Performance Assessment of OECD Test Guideline on Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays*, Series on Testing and Assessment, N° 145, ENV/JM/MONO(2011)20, OECD, Paris.

(34) Clermont, Y. (1972), «Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal». Physiol. Rev. 52: 198-236.

(35) Robaire, B., Hinton, B.T., and Oregbin-Crist, M.-C. (2006), «The Epididymis», in Neil, J.D., Pfaff, D.W., Chalis, J.R.G., de Kretser, D.M., Richards, J.S., and P. M, Wassarman (eds.), Physiology of Reproduction, Elsevier, the Netherlands, pp. 1071-1148.

(36) Russell, L.B. (2004), «Effects of male germ-cell stage on the frequency, nature, and spectrum of induced specific-locus mutations in the mouse», Genetica, 122: 25–36.

▼M5

Προσάρτημα

ΟΡΙΣΜΟΙ

Περίοδος χορήγησης: η συνολική περίοδος κατά την οποία χορηγούνται δόσεις σε ένα ζώο.

Υποκατάσταση ζεύγους βάσεων: ένα είδος μετάλλαξης που προκαλεί την αντικατάσταση μιας μεμονωμένης βάσης νουκλεοτιδίων DNA από άλλη βάση νουκλεοτιδίων DNA.

Καψίδιο: το πρωτεϊνικό περίβλημα ιικού σωματιδίου.

Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Κλωνική επέκταση: η παραγωγή πολλών κυττάρων από ένα και μόνο (μεταλλαγμένο) κύτταρο.

Μονάδα σχηματισμού αποικιών (cfu): μέτρο των αριθμών βιώσιμων βακτηρίων.

Συγκαταμερές: ένα μακρύ συνεχές βιομόριο που αποτελείται από πολλαπλά πανομοιότυπα αντίγραφα συνδεδεμένα εν σειρά.

Θέση cos: τμήμα μονόκλωνου DNA, αποτελούμενο από 12 νουκλεοτίδια, που υπάρχει και στα δύο άκρα του δίκλωνου γονιδιώματος του βακτηριοφάγου λ.

Έλλειψη: μετάλλαξη που συνίσταται στην απώλεια ενός ή περισσότερων (διαδοχικών) νουκλεοτιδίων από το γονιδίωμα.

Ηλεκτροπόρωση: η εφαρμογή ηλεκτρικών παλμών για την αύξηση της διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών.

Ενδογενές γονίδιο: φυσικό γονίδιο του γονιδιώματος.

Εξωδιωνυμική μεταβλητότητα (extrabinomial variation): μεταβλητότητα των επαναλαμβανόμενων εκτιμήσεων ενός ποσοστού πληθυσμού μεγαλύτερη από εκείνη που θα αναμενόταν εάν η κατανομή του πληθυσμού ήταν διωνυμική.

Μετάλλαξη αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης: γενετική μετάλλαξη προκαλούμενη από παρεμβολές ή ελλείψεις ενός αριθμού νουκλεοτιδίων που δεν διαιρείται ακριβώς δια του τρία, σε αλληλουχία DNA που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη/ένα πεπτίδιο.

Παρεμβολή: η προσθήκη ενός ή περισσότερων ζευγών βάσεων νουκλεοτιδίων σε αλληλουχία DNA.

Jackpot: μεγάλος αριθμός μεταλλαγμάτων που έχουν προκύψει μέσω κλωνικής επέκτασης από μια και μόνο μετάλλαξη.

Μεγάλες ελλείψεις: ελλείψεις περισσότερων από αρκετές χιλιάδες βάσεις του DNA (οι οποίες ανιχνεύονται αποτελεσματικά με τους προσδιορισμούς επιλογής Spi — και πλασμιδίων lacZ).

Συνένωση: η ομοιοπολική σύνδεση δύο άκρων μορίων DNA με τη χρήση DNA λιγάσης.

Μιτογόνο: χημική ουσία που διεγείρει ένα κύτταρο με αποτέλεσμα να αρχίσει αυτό να διαιρείται, ενεργοποιώντας τη μίτωση (ήτοι, την κυτταρική διαίρεση).

Ουδέτερο γονίδιο: γονίδιο που δεν επηρεάζεται από θετικές ή αρνητικές επιλεκτικές πιέσεις.

Πακετάρισμα (συσπείρωση): η σύνθεση μολυσματικών σωματιδίων φάγων από ένα παρασκεύασμα πρωτεϊνών καψιδίου και ουράς φάγου και ένα συγκαταμερές μορίων DNA φάγου. Χρησιμοποιείται συνήθως για το πακετάρισμα κλωνοποιημένου σε φορέα λ DNA (χωριζόμενου από θέσεις cos) σε μολυσματικά σωματίδια λ.

Απόδοση πακεταρίσματος: η απόδοση με την οποία οι πακεταρισμένοι βακτηριοφάγοι ανακτώνται στα βακτήρια-ξενιστές.

▼**M5**

Μονάδα σχηματισμού πλάκας (pfu): μέτρο του αριθμού των βιώσιμων βακτηριοφάγων.

Σημειακή μετάλλαξη: γενικός όρος που χρησιμοποιείται για μεταλλάξεις οι οποίες προσβάλλουν μόνο μια μικρή αλληλουχία DNA, συμπεριλαμβανομένων μικρών παρεμβολών, ελλείψεων και υποκαταστάσεων ζευγών βάσεων.

Θετική επιλογή: μέθοδος που επιτρέπει την επιβίωση μόνο των μεταλλαγμάτων.

Γονίδιο αναφοράς: μεταλλαγμένο γονίδιο του οποίου το προϊόν είναι εύκολα ανιχνεύσιμο.

Χρόνος δειγματοληψίας: το τέλος της χρονικής περιόδου, πριν από τη θανάτωση, κατά την οποία δεν χορηγείται η χημική ουσία και οι μη επιδιορθωμένες βλάβες του DNA σταθεροποιούνται σε σταθερές μεταλλάξεις.

Αναπαραγόμενος φορέας: φορέας κατασκευασμένος έτσι ώστε να μπορεί να πολλαπλασιάζεται σε δύο διαφορετικά είδη ξενιστή· αντιστοίχως, το DNA που παρεμβάλλεται σε έναν αναπαραγόμενο φορέα μπορεί να υποβληθεί σε δοκιμή ή χειρισμούς σε δύο διαφορετικά είδη κυττάρων ή δύο διαφορετικούς οργανισμούς.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Διαγονιδιακός: που ανήκει σε οργανισμό, σχετίζεται με οργανισμό ή είναι οργανισμός του οποίου το γονιδίωμα έχει τροποποιηθεί με τη μεταφορά ενός ή περισσότερων γονιδίων από άλλα είδη.».

▼M7

Β.59. ΔΕΡΜΑΤΙΚΉ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΊΗΣΗ IN CHEMICO: ΆΜΕΣΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΌΣ ΠΕΠΤΙΔΙΚΉΣ ΔΡΑΣΤΙΚΌΤΗΤΑΣ (DPRA)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 442C του ΟΟΣΑ (2015). Ευαισθητοποιητική του δέρματος είναι μια ουσία που, όταν έρχεται επαφή με το δέρμα, προκαλεί αλλεργική αντίδραση, όπως ορίζεται στο Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα των Ηνωμένων Εθνών για την Ταξινόμηση και Επισήμανση των Χημικών Ουσιών (Globally Harmonized System/GHS των Ηνωμένων Εθνών) (1) και στον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 της Ευρωπαϊκής Ένωσης για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων (Classification, Labelling and Packaging/CLP) ([1]). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών παρέχει μια διαδικασία άμεσου προσδιορισμού της πεπτιδικής δραστικότητας in chemico (Direct Peptide Reactivity Assay/DPRA), προοριζόμενη να χρησιμοποιείται για την υποστήριξη της διάκρισης ανάμεσα σε ευαισθητοποιητικές και μη ευαισθητοποιητικές του δέρματος ουσίες σύμφωνα με το GHS των Ηνωμένων Εθνών και τον κανονισμό CLP.

Υπάρχει γενική συμφωνία για τα βασικά υποκείμενα βιολογικά συμβάντα στη δερματική ευαισθητοποίηση. Οι υπάρχουσες γνώσεις σχετικά με τους χημικούς και βιολογικούς μηχανισμούς που συνδέονται με τη δερματική ευαισθητοποίηση έχουν συνοψιστεί με τη μορφή μιας πορείας δυσμενούς έκβασης (Adverse Outcome Pathway/AOP) (2) — από το μοριακό εναρκτήριο συμβάν στα ενδιάμεσα συμβάντα και μέσω αυτών στη δυσμενή επίδραση, δηλ. την αλλεργική δερματίτιδα εξ επαφής στον άνθρωπο και την υπερευαισθησία εξ επαφής στα τρωκτικά. Στην AOP δερματικής ευαισθητοποίησης, το μοριακό εναρκτήριο συμβάν είναι η ομοιοπολική δέσμευση ηλεκτρονιόφιλων ουσιών σε πυρηνόφιλα κέντρα των πρωτεϊνών του δέρματος.

Η αξιολόγηση της δερματικής ευαισθητοποίησης περιλαμβάνει συνήθως τη χρήση πειραματόζωων. Στις κλασικές μεθόδους που βασίζονται σε ινδικά χοιρίδια, όπως η δοκιμή Magnusson Kligman με μεγιστοποίηση σε ινδικά χοιρίδια και η δοκιμή Buehler [μέθοδος δοκιμών Β.6 (3)], μελετώνται τόσο το στάδιο επαγωγής όσο και το στάδιο πρόκλησης δερματικής ευαισθητοποίησης. Μια δοκιμή σε ποντικούς, συγκεκριμένα η δοκιμασία επιχώριων λεμφαδένων [LLNA, μέθοδος δοκιμών Β.42 (4)] και οι δύο τροποποιήσεις της που δεν απαιτούν ραδιενέργεια, LLNA: DA [μέθοδος δοκιμών Β.50 (5)] και LLNA: BrdU-ELISA [μέθοδος δοκιμών Β.51 (6)], οι οποίες αξιολογούν αποκλειστικά την επαγωγική απόκριση, έχει επίσης κριθεί αποδεκτή, δεδομένου ότι προσφέρει ένα πλεονέκτημα έναντι των δοκιμών σε ινδικά χοιρίδια όσον αφορά την καλή μεταχείριση των ζώων, καθώς και αντικειμενική μέτρηση του επαγωγικού σταδίου της δερματικής ευαισθητοποίησης.

Πιο πρόσφατα, μέθοδοι δοκιμών μηχανιστικής βάσης in chemico και in vitro θεωρήθηκαν επιστημονικά έγκυρες για την αξιολόγηση του κινδύνου ευαισθητοποίησης του δέρματος από χημικές ουσίες. Ωστόσο, λόγω της περιορισμένης κάλυψης από πλευράς μηχανισμών AOP με καθεμία από τις διαθέσιμες μεθόδους δοκιμών χωρίς χρήση ζώων, θα χρειαστούν συνδυασμοί μεθόδων στις οποίες δεν χρησιμοποιούνται ζώα (in silico, in chemico, in vitro) στο πλαίσιο ολοκληρωμένων προσεγγίσεων για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση (Integrated Approaches to Testing and Assessment/IATA), ώστε να καταστεί δυνατή η πλήρης υποκατάσταση των δοκιμών σε ζώα, που χρησιμοποιούνται επί του παρόντος (2) (7).

Η DPRA προτείνεται για την εξέταση του μοριακού εναρκτήριου συμβάντος της AOP δερματικής ευαισθητοποίησης, δηλ. της πρωτεϊνικής δραστικότητας, με ποσοτικό προσδιορισμό της δραστικότητας των υπό δοκιμή χημικών ουσιών πάνω σε μοντέλα συνθετικών πεπτιδίων που περιέχουν είτε λυσίνη ή κυστεΐνη (8). Στη συνέχεια, οι τιμές εκατοστιαίας ελάττωσης των κυστεϊνούχων και λυσινούχων πεπτιδίων χρησιμοποιούνται για την κατάταξη των ουσιών σε μία από τέσσερις τάξεις δραστικότητας για την υποστήριξη της διάκρισης μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος ουσιών (9).

([1]) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων, την τροποποίηση και την κατάργηση των οδηγιών 67/548/ΕΟΚ και 1999/45/ΕΚ και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006, ΕΕ L 353 της 31.12.2008, σ. 1.

▼M7

Η DPRA αξιολογήθηκε πρώτα με μελέτη επικύρωσης υπό την αιγίδα του Εργαστηρίου Αναφοράς της Ευρωπαϊκής Ένωσης για Εναλλακτικές Μεθόδους αντί των Δοκιμών σε Ζώα (EURL ECVAM) και, στη συνέχεια, με ανεξάρτητη αξιολόγηση από ομότιμους κριτές, την οποία διενήργησε η επιστημονική συμβουλευτική επιτροπή (ESAC) του EURL ECVAM, και κρίθηκε επιστημονικά έγκυρη (10) προς χρήση στο πλαίσιο μιας προσέγγισης ΙΑΤΑ για την υποστήριξη της διάκρισης μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος ουσιών με σκοπό την ταξινόμηση ως προς τον κίνδυνο και την επισήμανση. Παραδείγματα σχετικά με τη χρήση δεδομένων DPRA σε συνδυασμό με άλλα στοιχεία έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία (11) (12) (13) (14).

Οι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ, ΕΦΑΡΜΟΣΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Ο συσχετισμός της πρωτεϊνικής δραστικότητας με το δυναμικό δερματικής ευαισθητοποίησης έχει αποδειχθεί επαρκώς (15) (16) (17). Ωστόσο, δεδομένου ότι η δέσμευση πρωτεϊνών αποτελεί μόνον ένα από τα βασικά συμβάντα, έστω και αν πρόκειται για το μοριακό εναρκτήριο συμβάν της AOP δερματικής ευαισθητοποίησης, τα σχετικά με την πρωτεϊνική δραστικότητα στοιχεία που συγκεντρώνονται με μεθόδους με και χωρίς δοκιμές μπορεί να μην επαρκούν από μόνα τους για τη συναγωγή συμπεράσματος σχετικά με την απουσία δυναμικού δερματικής ευαισθητοποίησης από χημικές ουσίες. Ως εκ τούτου, τα δεδομένα που συγκεντρώνονται με την παρούσα μέθοδο δοκιμών θα πρέπει να εντάσσονται στο πλαίσιο ολοκληρωμένων προσεγγίσεων, όπως οι ΙΑΤΑ, συνδυαζόμενα με άλλες συμπληρωματικές πληροφορίες, π.χ. αυτές που προκύπτουν από αναλύσεις in vitro με τις οποίες εξετάζονται άλλα βασικά συμβάντα της AOP δερματικής ευαισθητοποίησης, καθώς και από μεθόδους χωρίς δοκιμές, συμπεριλαμβανομένων των συγκριτικών προσεγγίσεων (read-across) με στοιχεία για ουσίες ανάλογης χημικής δομής.

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών μπορεί να χρησιμοποιείται, σε συνδυασμό με άλλες συμπληρωματικές πληροφορίες, για την υποστήριξη της διάκρισης μεταξύ ευαισθητοποιητικών (δηλ. κατηγορίας 1 του GHS των Ηνωμένων Εθνών/κανονισμού CLP) και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος ουσιών στο πλαίσιο μιας προσέγγισης ΙΑΤΑ. Δεν μπορεί να χρησιμοποιείται αυτοτελώς για τη λεπτομερέστερη κατάταξη ευαισθητοποιητικών του δέρματος ουσιών στις υποκατηγορίες 1Α και 1Β κατά GHS/CLP, ούτε για την πρόβλεψη της ευαισθητοποιητικής ισχύος προκειμένου να ληφθούν αποφάσεις εκτίμησης της ασφάλειας. Ωστόσο, ανάλογα με το κανονιστικό πλαίσιο, ένα θετικό αποτέλεσμα στην DPRA μπορεί να χρησιμοποιηθεί αυτοτελώς για την κατάταξη χημικών ουσιών στην κατηγορία 1 κατά GHS/CLP.

Η μέθοδος δοκιμών DPRA μπορεί αποδεδειγμένα να μεταφερθεί σε εργαστήρια με εμπειρία στην υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Ο βαθμός αναπαραγωγιμότητας των προβλέψεων που αναμένεται να παρέχει η μέθοδος δοκιμών είναι της τάξης του 85 % ενδοεργαστηριακά και 80 % διεργαστηριακά (10). Από τα αποτελέσματα της μελέτης επικύρωσης (18) και δημοσιευμένων μελετών (19) συνάγεται συνολικά ότι, σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της LLNA, η ορθότητα της DPRA όσον αφορά τη διάκριση μεταξύ ευαισθητοποιητικών (δηλ. κατηγορίας 1 κατά GHS/CLP) και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος ουσιών είναι 80 % (N = 157), με ευαισθησία 80 % (88/109) και ειδικότητα 77 % (37/48). Η DPRA είναι πιθανότερο να υποτιμήσει την πρόβλεψη για χημικές ουσίες με χαμηλή έως μέτρια ισχύ δερματικής ευαισθητοποίησης (δηλ. υποκατηγορίας 1Β κατά GHS/CLP) έναντι χημικών ουσιών που εμφανίζουν υψηλή ισχύ δερματικής ευαισθητοποίησης (δηλ. υποκατηγορίας 1Α κατά GHS/CLP) (18) (19). Ωστόσο, οι τιμές ορθότητας που παρέχονται εδώ για την DPRA ως αυτοτελή μέθοδο δοκιμών είναι απλώς ενδεικτικές, δεδομένου ότι η μέθοδος δοκιμών θα πρέπει να εξετάζεται σε συνδυασμό με άλλες πηγές πληροφοριών στο πλαίσιο ΙΑΤΑ και σύμφωνα με τις διατάξεις της παραγράφου 9 ανωτέρω. Επιπλέον, κατά την αξιολόγηση των μεθόδων δοκιμών δερματικής ευαισθητοποίησης χωρίς χρήση ζώων, θα πρέπει να μη λησμονείται ότι η δοκιμασία LLNA, καθώς και άλλες δοκιμές σε ζώα, ενδέχεται να μην αντικατοπτρίζουν πλήρως την κατάσταση στο είδος που ενδιαφέρει, δηλ. στον άνθρωπο. Με βάση το σύνολο των διαθέσιμων δεδομένων, η DPRA είναι εφαρμόσιμη σε υπό δοκιμή χημικές ουσίες που καλύπτουν ποικιλία οργανικών δραστικών ομάδων, μηχανισμών αντίδρασης, επιπέδων ισχύος δερματικής ευαισθητοποίησης (όπως προσδιορίζονται με μελέτες in vivo) και φυσικοχημικών ιδιοτήτων (8) (9) (10) (19). Συνολικά, τα στοιχεία αυτά δείχνουν τη χρησιμότητα της DPRA ως εργαλείου που συμβάλλει στον προσδιορισμό των κινδύνων δερματικής ευαισθητοποίησης.

▼M7

Ο όρος «υπό δοκιμή χημική ουσία» χρησιμοποιείται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών για να δηλώσει την ύλη που υποβάλλεται στη δοκιμή και δεν σχετίζεται με την εφαρμοσιμότητα της DPRA σε δοκιμές ουσιών και/ή μειγμάτων. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν έχει εφαρμογή στις δοκιμές ενώσεων μετάλλων, δεδομένου ότι είναι γνωστό ότι αυτές αντιδρούν με πρωτεΐνες με μηχανισμούς διαφορετικούς από την ομοιοπολική σύνδεση. Η υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να είναι διαλυτή σε κατάλληλο διαλύτη, σε τελική συγκέντρωση 100 mM (βλ. παράγραφο 18). Ωστόσο, μπορούν να δοκιμαστούν και χημικές ουσίες που δεν είναι διαλυτές σε αυτή τη συγκέντρωση, με τη χρήση χαμηλότερων συγκεντρώσεων. Στην περίπτωση αυτή, ένα θετικό αποτέλεσμα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την υποστήριξη του χαρακτηρισμού της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ως ευαισθητοποιητικής του δέρματος, ενώ ένα αρνητικό αποτέλεσμα δεν θα πρέπει να οδηγεί σε οριστικό συμπέρασμα περί απουσίας δραστικότητας. Τα διαθέσιμα στοιχεία σχετικά με την εφαρμοσιμότητα της DPRA σε μείγματα γνωστής σύνθεσης είναι επί του παρόντος περιορισμένα (18) (19). Ωστόσο, η DPRA θεωρείται τεχνικά εφαρμόσιμη στον έλεγχο πολυσυστατικών ουσιών και μειγμάτων γνωστής σύνθεσης (βλ. παράγραφο 18). Πριν από την εφαρμογή της παρούσας μεθόδου δοκιμών σε μείγμα για τη συγκέντρωση δεδομένων για ρυθμιστικούς σκοπούς, θα πρέπει να εξετάζεται αν — και, εάν ναι, για ποιον λόγο — μπορεί να αποδώσει επαρκή αποτελέσματα για τον επιδιωκόμενο σκοπό. Οι εκτιμήσεις αυτές δεν είναι αναγκαίες όταν οι κανονιστικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τον έλεγχο του μείγματος. Το ισχύον μοντέλο πρόβλεψης δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πολύπλοκα μείγματα άγνωστης σύνθεσης ούτε για ουσίες άγνωστης ή μεταβλητής σύνθεσης, πολύπλοκα προϊόντα αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά (δηλαδή ουσίες UVCB), λόγω της καθορισμένης γραμμομοριακής αναλογίας μεταξύ της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και του πεπτιδίου. Για τον σκοπό αυτό, θα χρειαστεί να αναπτυχθεί νέο μοντέλο πρόβλεψης με βάση μια βαρυμετρική προσέγγιση. Εάν υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι η μέθοδος δοκιμών δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε άλλες ειδικές κατηγορίες χημικών ουσιών, η μέθοδος δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τις συγκεκριμένες κατηγορίες.

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι μέθοδος in chemico που δεν περιλαμβάνει μεταβολικό σύστημα. Οι χημικές ουσίες που χρειάζονται ενζυμική βιοενεργοποίηση για να εκδηλώσουν το δυναμικό δερματικής ευαισθητοποίησής τους (μεταβολικά προαπτένια) δεν μπορούν να ανιχνευθούν με τη μέθοδο δοκιμών. Έχει αναφερθεί ότι με τη μέθοδο δοκιμών ανιχνεύονται σωστά, σε ορισμένες περιπτώσεις, χημικές ουσίες που γίνονται ευαισθητοποιητικές μετά από αβιοτικό μετασχηματισμό (αβιοτικά προαπτένια) (18). Υπό το πρίσμα των ανωτέρω, τα αρνητικά αποτελέσματα που προκύπτουν με τη μέθοδο δοκιμών θα πρέπει να ερμηνεύονται στο πλαίσιο των αναφερόμενων περιορισμών και σε συνάρτηση με άλλες πηγές πληροφοριών στο πλαίσιο ΙΑΤΑ. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν συνδέονται με ομοιοπολικό δεσμό με το πεπτίδιο αλλά προάγουν την οξείδωσή του (διμερισμός κυστεΐνης) μπορούν να οδηγήσουν σε ενδεχόμενη υπερεκτίμηση της ελάττωσης του πεπτιδίου, με αποτέλεσμα πιθανές ψευδοθετικές προβλέψεις και/ή κατάταξη σε ανώτερη τάξη δραστικότητας (βλ. παραγράφους 29 και 30).

Όπως περιγράφεται, η DPRA υποστηρίζει τη διάκριση μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος ουσιών. Ωστόσο, μπορεί ενδεχομένως να συμβάλει στην εκτίμηση της ευαισθητοποιητικής ισχύος (11), όταν χρησιμοποιείται σε ολοκληρωμένες προσεγγίσεις, όπως οι ΙΑΤΑ. Απαιτούνται πάντως περισσότερες εργασίες, κατά προτίμηση με βάση δεδομένα για τον άνθρωπο, για να διαπιστωθεί ο τρόπος με τον οποίο τα αποτελέσματα της DPRA θα μπορούσαν ενδεχομένως να τροφοδοτήσουν την εκτίμηση της ευαισθητοποιητικής ισχύος.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η DPRA είναι μέθοδος in chemico με την οποία προσδιορίζεται ποσοτικά η εναπομένουσα συγκέντρωση κυστεϊνούχου ή λυσινούχου πεπτιδίου μετά από 24ωρη επώαση με την υπό δοκιμή χημική ουσία στους 25 ± 2,5 °C. Τα συνθετικά πεπτίδια περιέχουν φαινυλαλανίνη που υποβοηθά την ανίχνευση. Η σχετική συγκέντρωση πεπτιδίου μετράται με υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), με βαθμιδωτή έκλουση και ανίχνευση υπεριώδους ακτινοβολίας σε μήκος κύματος 220 nm. Στη συνέχεια οι τιμές εκατοστιαίας ελάττωσης του κυστεϊνούχου ή λυσινούχου πεπτιδίου υπολογίζονται και χρησιμοποιούνται σε μοντέλο πρόβλεψης (βλ. παράγραφο 29), το οποίο επιτρέπει την κατάταξη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε μία από τις τέσσερις τάξεις δραστικότητας που χρησιμοποιούνται για την υποστήριξη της διάκρισης μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος ουσιών.

▼M7

Πριν χρησιμοποιήσουν στην καθημερινή πρακτική τη μέθοδο που περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα, χρησιμοποιώντας τις δέκα ουσίες ελέγχου ικανότητας που απαριθμούνται στο προσάρτημα 2.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών βασίζεται στο πρωτόκολλο DPRA DB-ALM αριθ. 154 (20), το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη επικύρωσης που συντόνισε το EURL ECVAM. Συνιστάται να χρησιμοποιείται αυτό το πρωτόκολλο κατά την εφαρμογή και χρήση της μεθόδου στο εργαστήριο. Στις επόμενες παραγράφους περιγράφονται τα βασικά στοιχεία και διαδικασίες για την DPRA. Εάν χρησιμοποιείται εναλλακτική πειραματική διάταξη HPLC, θα πρέπει να αποδεικνύεται η ισοδυναμία της με την επικυρωμένη διάταξη που περιγράφεται στο πρωτόκολλο DB-ALM (π.χ. με δοκιμές των ουσιών ελέγχου ικανότητας που απαριθμούνται στο προσάρτημα 2).

Παρασκευή των κυστεϊνούχων ή λυσινούχων πεπτιδίων

Θα πρέπει να παρασκευάζονται πρόσφατα διαλύματα παρακαταθήκης συνθετικών πεπτιδίων που περιέχουν κυστεΐνη (Ac-RFAA**C**AA-COOH) και λυσίνη (Ac-RFAA**K**AA-COOH) καθαρότητας άνω του 85 % και, κατά προτίμηση, της τάξης του 90-95 %, ακριβώς πριν από την επώασή τους με την υπό δοκιμή χημική ουσία. Η τελική συγκέντρωση του κυστεϊνούχου πεπτιδίου θα πρέπει να είναι 0,667 mM σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων με pH 7,5, ενώ η τελική συγκέντρωση του λυσινούχου πεπτιδίου θα πρέπει να είναι 0,667 mM σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου με pH 10,2. Η ακολουθία μετρήσεων HPLC θα πρέπει να ρυθμίζεται κατά τρόπο ώστε ο χρόνος ανάλυσης με HPLC να μην ξεπερνά τις 30 ώρες. Με την πειραματική διάταξη HPLC που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη επικύρωσης και περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, μπορούν να διεκπεραιωθούν σε μία σειρά μετρήσεων (έναν «γύρο») HPLC έως και 26 δείγματα ανάλυσης (που περιλαμβάνουν την υπό δοκιμή χημική ουσία, τον θετικό μάρτυρα και κατάλληλο αριθμό μαρτύρων με διαλύτη, ανάλογα με τον αριθμό των διαφορετικών διαλυτών που χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή, με μέτρηση κάθε δείγματος εις τριπλούν). Σε όλα τα πολλαπλά δείγματα (επαναλήψεις) που αναλύονται σε κάθε μέτρηση θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τα ίδια ακριβώς διαλύματα παρακαταθήκης κυστεϊνούχου και λυσινούχου πεπτιδίου. Πριν από τη χρήση κάθε παρτίδας πεπτιδίου, συνιστάται να επαληθεύεται η ενδεδειγμένη διαλυτότητά της.

Προετοιμασία της υπό δοκιμή χημικής ουσίας

Πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμής θα πρέπει να αξιολογείται η διαλυτότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε κατάλληλο διαλύτη, με τη διαδικασία διαλυτοποίησης που περιγράφεται στο πρωτόκολλο DPRA DB-ALM (20). Κατάλληλος διαλύτης είναι εκείνος στον οποίο η υπό δοκιμή χημική ουσία διαλύεται πλήρως. Δεδομένου ότι στην DPRA η υπό δοκιμή χημική ουσία επωάζεται σε μεγάλη περίσσεια είτε με το κυστεϊνούχο ή με το λυσινούχο πεπτίδιο, η οπτική εξέταση του σχηματισμού διαυγούς διαλύματος θεωρείται επαρκής για την επιβεβαίωση της πλήρους διάλυσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (και όλων των συστατικών της, σε περίπτωση δοκιμής με πολυσυστατική ουσία ή μείγμα). Κατάλληλοι διαλύτες είναι οι εξής: ακετονιτρίλιο, νερό, μείγμα νερού-ακετονιτριλίου σε αναλογία 1:1, ισοπροπανόλη, ακετόνη και μείγμα ακετόνης-ακετονιτριλίου σε αναλογία 1:1. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι διαλύτες, εφόσον δεν επηρεάζουν τη σταθερότητα του πεπτιδίου, η οποία παρακολουθείται με τους μάρτυρες αναφοράς Γ (δηλ. δείγματα αποτελούμενα μόνο από το πεπτίδιο, διαλυμένο σε κατάλληλο διαλύτη· βλ. προσάρτημα 3). Ως έσχατη λύση, εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν διαλύεται σε κανέναν από τους διαλύτες αυτούς, θα πρέπει να επιχειρείται η διάλυσή της σε 300 μL DMSO, ακολουθούμενη από αραίωση του προκύπτοντος διαλύματος με 2700 μL ακετονιτριλίου· εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν διαλύεται σε αυτό το μείγμα, θα πρέπει να επιχειρείται η διάλυση της ίδιας ποσότητας της ουσίας σε 1 500 μL DMSO, ακολουθούμενη από αραίωση του προκύπτοντος διαλύματος με 1 500 μL ακετονιτριλίου. Η υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να έχει προζυγιστεί σε γυάλινα φιαλίδια και να διαλύεται ακριβώς πριν από τη δοκιμή σε κατάλληλο διαλύτη για την παρασκευή διαλύματος 100 mM. Στην περίπτωση των μειγμάτων και των πολυσυστατικών ουσιών γνωστής σύνθεσης, θα πρέπει να προσδιορίζονται μια ενιαία καθαρότητα από το άθροισμα των αναλογιών των συστατικών τους (εκτός του νερού) και ένα ενιαίο φαινόμενο μοριακό βάρος, με συνεκτίμηση του μοριακού βάρους κάθε συστατικού του μείγματος (εκτός του νερού) και της αναλογίας του. Η καθαρότητα και το φαινόμενο μοριακό βάρος που προκύπτουν θα πρέπει στη συνέχεια

▼M7

να χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό του βάρους της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που χρειάζεται για την παρασκευή διαλύματος 100 mM. Για τα πολυμερή για τα οποία δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστεί κυρίαρχο (δεσπόζον) μοριακό βάρος, μπορεί να ληφθεί υπόψη για την παρασκευή διαλύματος 100 mM το μοριακό βάρος του μονομερούς (ή το φαινόμενο μοριακό βάρος των διαφόρων μονομερών που αποτελούν το πολυμερές. Ωστόσο, κατά τη διεξαγωγή δοκιμών με μείγματα, πολυσυστατικές ουσίες ή πολυμερή γνωστής σύνθεσης, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο υποβολής και της αμιγούς ουσίας στη δοκιμή. Προκειμένου για υγρά, θα πρέπει να ελέγχεται η αμιγής χημική ουσία ως έχει, χωρίς προηγούμενη αραίωση, με επώαση με το κυστεϊνούχο και το λυσινούχο πεπτίδιο σε γραμμομοριακή αναλογία 1:10 και 1:50 αντίστοιχα. Προκειμένου για στερεά, η υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να διαλύεται μέχρι τη μέγιστη διαλυτή συγκέντρωσή της στον διαλύτη που χρησιμοποιείται και για την παρασκευή του διαλύματος φαινόμενης συγκέντρωσης 100 mM. Στη συνέχεια θα πρέπει να υποβάλλεται σε δοκιμή χωρίς άλλη αραίωση, με επώαση με το κυστεϊνούχο και το λυσινούχο πεπτίδιο σε γραμμομοριακή αναλογία 1:10 και 1:50 αντίστοιχα. Η συμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων (δραστική ή μη δραστική ουσία) για το διάλυμα φαινόμενης συγκέντρωσης 100 mM και την αμιγή χημική ουσία θα πρέπει κανονικά να επιτρέπει τη συναγωγή οριστικού συμπεράσματος σχετικά με το αποτέλεσμα.

Παρασκευή του θετικού μάρτυρα, των μαρτύρων αναφοράς και των μαρτύρων συνέκλουσης

Ως θετικός μάρτυρας θα πρέπει να χρησιμοποιείται κινναμωμική αλδεΰδη (αριθ. CAS 104-55-2, καθαρότητας κατάλληλης για τρόφιμα ≥ 95 %), σε διάλυμα συγκέντρωσης 100 mM σε ακετονιτρίλιο. Επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται και άλλοι κατάλληλοι θετικοί μάρτυρες, που να παρέχουν κατά προτίμηση τιμές ελάττωσης στο μέσο του εύρους τιμών, εάν υπάρχουν ιστορικά δεδομένα από τα οποία προκύπτουν συγκρίσιμα κριτήρια αποδοχής των μετρήσεων. Επιπλέον, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται στην ακολουθία μετρήσεων HPLC μάρτυρες αναφοράς (δηλ. δείγματα που περιέχουν μόνο το πεπτίδιο διαλυμένο σε κατάλληλο διαλύτη), οι οποίοι χρησιμοποιούνται για να επαληθεύεται η καταλληλότητα του συστήματος HPLC πριν από την ανάλυση (μάρτυρες αναφοράς Α), η σταθερότητα των μαρτύρων αναφοράς με την πάροδο του χρόνου (μάρτυρες αναφοράς Β), καθώς και ότι ο διαλύτης που χρησιμοποιείται για τη διάλυση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας δεν επηρεάζει την εκατοστιαία ελάττωση του πεπτιδίου (μάρτυρες αναφοράς Γ) (βλ. προσάρτημα 3). Ο κατάλληλος μάρτυρας αναφοράς για κάθε χημική ουσία χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της εκατοστιαίας ελάττωσης του πεπτιδίου για την εν λόγω χημική ουσία (βλ. παράγραφο 26). Επιπλέον, για καθεμία από τις αναλυόμενες χημικές ουσίες, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται στην ακολουθία μετρήσεων ένας μάρτυρας συνέκλουσης, αποτελούμενος μόνο από την υπό δοκιμή χημική ουσία, με σκοπό την ανίχνευση πιθανής συνέκλουσής της με το λυσινούχο ή το κυστεϊνούχο πεπτίδιο.

Επώαση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας με τα διαλύματα κυστεϊνούχου και λυσινούχου πεπτιδίου

Τα διαλύματα κυστεϊνούχου και λυσινούχου πεπτιδίου θα πρέπει να επωάζονται σε γυάλινα φιαλίδια αυτόματου δειγματολήπτη με την υπό δοκιμή χημική ουσία σε αναλογία 1:10 και 1:50 αντίστοιχα. Εάν παρατηρηθεί ίζημα αμέσως μετά την προσθήκη του διαλύματος της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο διάλυμα πεπτιδίου, λόγω χαμηλής υδατοδιαλυτότητας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, δεν μπορεί να υπάρχει βεβαιότητα σχετικά με την ποσότητα της ουσίας που παραμένει στο διάλυμα για να αντιδράσει με το πεπτίδιο. Ως εκ τούτου, στην περίπτωση αυτή, μόνο τυχόν θετικό αποτέλεσμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί, ενώ ένα αρνητικό αποτέλεσμα είναι αβέβαιο και θα πρέπει να ερμηνεύεται με τη δέουσα προσοχή (βλ. επίσης παράγραφο 11 για τις δοκιμές με χημικές ουσίες που δεν είναι διαλυτές σε συγκέντρωση έως 100 mM). Το διάλυμα αντίδρασης θα πρέπει να αφήνεται στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία 25 ± 2,5 °C για 24 ± 2 ώρες, πριν από την εκτέλεση της ανάλυσης με HPLC. Κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να αναλύεται εις τριπλούν και για τα δύο πεπτίδια. Τα δείγματα πρέπει να εξετάζονται οπτικά πριν από την ανάλυση με HPLC. Εάν παρατηρηθεί ίζημα ή διαχωρισμός φάσεων, τα δείγματα μπορούν να φυγοκεντρηθούν προληπτικά σε χαμηλή ταχύτητα (100-400 g) για την ώθηση του ιζήματος προς τον πυθμένα του φιαλιδίου, δεδομένου ότι μεγάλες ποσότητες ιζήματος ενδέχεται να αποφράξουν τις σωληνώσεις ή τις στήλες της HPLC. Εάν παρατηρηθεί ίζημα ή διαχωρισμός φάσεων μετά την περίοδο επώασης, ενδέχεται να υποτιμηθεί η ελάττωση του πεπτιδίου και, σε περίπτωση αρνητικού αποτελέσματος, δεν είναι δυνατόν να συναχθεί με επαρκή εμπιστοσύνη συμπέρασμα περί απουσίας δραστικότητας.

▼M7

Ετοιμασία της πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης της HPLC

Απαιτείται πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης, τόσο για το κυστεϊνούχο όσο και για το λυσινούχο πεπτίδιο. Θα πρέπει να παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα πεπτιδίων σε διάλυμα ακετονιτριλίου 20 % ή 25 % σε ρυθμιστικό διάλυμα, με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων (pH 7,5) για το κυστεϊνούχο πεπτίδιο και ρυθμιστικού διαλύματος οξικού αμμωνίου (pH 10,2) για το λυσινούχο. Με πρότυπα διαλύματα από διαδοχικές αραιώσεις του πεπτιδικού διαλύματος παρακαταθήκης (0,667 mM), θα πρέπει να παρασκευάζονται 6 διαλύματα βαθμονόμησης που να καλύπτουν το εύρος τιμών 0,534 έως 0,0167 mM. Στην πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης θα πρέπει επίσης να συμπεριλαμβάνεται ένα τυφλό δείγμα του ρυθμιστικού διαλύματος αραίωσης. Για να θεωρηθούν κατάλληλες, οι καμπύλες βαθμονόμησης θα πρέπει να έχουν $r^2 > 0,99$.

Προετοιμασία και ανάλυση HPLC

Πριν από τη διεξαγωγή της ανάλυσης, θα πρέπει να επαληθεύεται η καταλληλότητα του συστήματος HPLC. Η ελάττωση του πεπτιδίου παρακολουθείται με HPLC, συζευγμένη με ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας (ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων ή ανιχνευτή απορρόφησης σταθερού μήκους κύματος με σήμα στα 220 nm). Εγκαθίσταται η κατάλληλη στήλη στο σύστημα HPLC. Στην πειραματική διάταξη HPLC που περιγράφεται στο επικυρωμένο πρωτόκολλο χρησιμοποιείται ως προτιμώμενη στήλη η Zorbax SB-C-18 2,1 mm × 100 mm × 3,5 μm. Με την εν λόγω στήλη HPLC αντίστροφης φάσης, ολόκληρο το σύστημα θα πρέπει να εξισορροπείται σε θερμοκρασία 30 °C με 50 % φάση A (0,1 % κ.ό. τριφθορροοξικού οξέος σε νερό) και 50 % φάση B (0,085 % κ.ό. τριφθορροοξικού οξέος σε ακετονιτρίλιο) για 2 ώρες τουλάχιστον πριν από τη μέτρηση. Η ανάλυση HPLC θα πρέπει να εκτελείται με παροχή 0,35 ml/min και γραμμική βαθμίδωση του ακετονιτριλίου από 10 % σε 25 % εντός 10 λεπτών, ακολουθούμενη από ταχεία αύξησή του σε 90 % για την απομάκρυνση άλλων υλών. Θα πρέπει να εγχέονται ίσοι όγκοι από κάθε πρότυπο, δείγμα και μάρτυρα. Η στήλη θα πρέπει να εξισορροπείται εκ νέου στις αρχικές συνθήκες για 7 λεπτά μεταξύ των εγχύσεων. Εάν χρησιμοποιείται διαφορετική στήλη HPLC αντίστροφης φάσης, οι παράμετροι της πειραματικής διάταξης που περιγράφονται ανωτέρω μπορεί να χρειαστεί να προσαρμοστούν, ώστε να διασφαλιστεί η ενδεδειγμένη έκλουση και ολοκλήρωση του κυστεϊνούχου και του λυσινούχου πεπτιδίου, συμπεριλαμβανομένου του όγκου έγχυσης, που μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το σύστημα που χρησιμοποιείται (συνήθως είναι της τάξεως των 3-10 μl). Εάν χρησιμοποιείται εναλλακτική πειραματική διάταξη HPLC, είναι σημαντικό να καταδεικνύεται η ισοδυναμία της με την επικυρωμένη διάταξη που περιγράφεται ανωτέρω (π.χ. με δοκιμές των ουσιών ελέγχου ικανότητας που απαριθμούνται στο προσάρτημα 2). Παρακολουθείται η απορρόφηση στα 220 nm. Εάν χρησιμοποιείται ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων, θα πρέπει επίσης να καταγράφεται η απορρόφηση στα 258 nm. Σημειωτέον ότι ορισμένες παρτίδες ακετονιτριλίου μπορεί να έχουν αρνητική επίπτωση στη σταθερότητα του πεπτιδίου, η οποία πρέπει να εκτιμάται όταν χρησιμοποιείται μια νέα παρτίδα. Ο λόγος του εμβαδού της κορυφής απορρόφησης στα 220 nm προς το εμβαδόν της κορυφής απορρόφησης στα 258 nm μπορεί να χρησιμοποιείται ως δείκτης συνέκλουσης. Για κάθε δείγμα, ικανοποιητική ένδειξη της απουσίας συνέκλουσης αποτελεί ένας λόγος εμβαδών εντός του εύρους 90 % < μέσος ([1]) λόγος εμβαδών στα δείγματα-μάρτυρες < 100 %.

Ενδέχεται να υπάρχουν υπό δοκιμή χημικές ουσίες που μπορούν να ενισχύσουν την οξείδωση του κυστεϊνούχου πεπτιδίου. Είναι δυνατή η οπτική παρακολούθηση της κορυφής που αντιστοιχεί στη διμερισμένη κυστεΐνη. Εάν φαίνεται να έχει συντελεστεί διμερισμός, αυτό θα πρέπει να σημειώνεται, δεδομένου ότι ενδέχεται να υπερεκτιμηθεί η εκατοστιαία ελάττωση του πεπτιδίου, με συνέπεια ψευδοθετικές προβλέψεις και/ή την κατάταξη σε ανώτερη τάξη δραστικότητας (βλ. παραγράφους 29 και 30).

Η ανάλυση με HPLC μπορεί να διεξαχθεί συγχρόνως για το κυστεϊνούχο και το λυσινούχο πεπτίδιο (εάν είναι διαθέσιμα δύο συστήματα HPLC) ή σε διαφορετικές ημέρες. Εάν η ανάλυση διεξάγεται σε διαφορετικές ημέρες, θα πρέπει να παρασκευάζονται πρόσφατα διαλύματα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και για τις δύο δοκιμές κάθε ημέρας. Η ανάλυση θα πρέπει να προγραμματίζεται κατά τρόπο ώστε να διασφαλίζεται ότι η έγχυση του πρώτου δείγματος αρχίζει 22 έως 26 ώρες μετά την ανάμειξη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας με το πεπτιδικό διάλυμα. Η ακολουθία μετρήσεων HPLC θα πρέπει να ρυθμίζεται κατά τρόπο

([1]) Σε ολόκληρο το κείμενο, ως «μέσος» ή «μέση τιμή» νοείται ο αριθμητικός μέσος.

▼M7

ώστε ο χρόνος ανάλυσης με HPLC να μην ξεπερνά τις 30 ώρες. Με την πειραματική διάταξη HPLC που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη επικύρωσης και περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, μπορούν να διεκπεραιωθούν σε μία μόνο σειρά μετρήσεων («γύρο») HPLC έως και 26 δείγματα ανάλυσης (βλ. επίσης παράγραφο 17). Παράδειγμα αναλυτικής ακολουθίας HPLC παρέχει το προσάρτημα 3.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αξιολόγηση των δεδομένων

Η συγκέντρωση κυστεϊνούχου ή λυσινούχου πεπτιδίου προσδιορίζεται φωτομετρικά σε μήκος κύματος 220 nm για κάθε δείγμα, με μέτρηση του εμβαδού των κατάλληλων κορυφών (εμβαδόν κάτω από την καμπύλη) και υπολογισμό της συγκέντρωσης του πεπτιδίου με τη βοήθεια της γραμμικής καμπύλης βαθμονόμησης που προκύπτει από τα πρότυπα.

Η εκατοστιαία ελάττωση του πεπτιδίου προσδιορίζεται για κάθε δείγμα με μέτρηση του εμβαδού κορυφής και διαίρεσή του διά του μέσου εμβαδού των κορυφών που αντιστοιχούν στους σχετικούς μάρτυρες αναφοράς Γ (βλ. προσάρτημα 3) σύμφωνα με τον κατωτέρω τύπο.

$$\textit{εκατοστιαία ελάττωση πεπτιδίου} = \left[1 - \left(\frac{\textit{εμβαδόν κορυφής πεπτιδίου στην έγχυση επανάληψης}}{\textit{μέσο εμβαδόν κορυφής πεπτιδίου στους μάρτυρες αναφοράς Γ}}\right)\right] \times 100$$

Κριτήρια αποδοχής

Για να θεωρηθεί έγκυρη μια σειρά μετρήσεων, θα πρέπει να πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια:

α) η πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης θα πρέπει να έχει $r^2 > 0,99$.

β) η μέση τιμή εκατοστιαίας ελάττωσης πεπτιδίου στις τρεις επαναλήψεις με τον θετικό μάρτυρα κινναμωμική αλδεΰδη θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 60,8 % και 100 % για το κυστεϊνούχο πεπτίδιο και μεταξύ 40,2 % και 69,0 % για το λυσινούχο, ενώ η μέγιστη τυπική απόκλιση (SD) στις επαναλήψεις με τους θετικούς μάρτυρες θα πρέπει να είναι < 14,9 % για την εκατοστιαία ελάττωση της κυστεΐνης και < 11,6 % για την εκατοστιαία ελάττωση της λυσίνης, και

γ) η μέση συγκέντρωση πεπτιδίου στους μάρτυρες αναφοράς Α θα πρέπει να είναι 0,50 ± 0,05 mM και ο συντελεστής μεταβλητότητας (CV) των εμβαδών των πεπτιδικών κορυφών για τους εννέα μάρτυρες αναφοράς Β και Γ σε ακετονιτρίλιο θα πρέπει να είναι < 15,0 %.

Εάν δεν πληρούνται ένα ή περισσότερα από τα κριτήρια αυτά, η σειρά μετρήσεων θα πρέπει να επαναλαμβάνεται.

Για να θεωρηθούν έγκυρα τα αποτελέσματα για την υπό δοκιμή χημική ουσία, θα πρέπει να πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια:

α) η μέγιστη τυπική απόκλιση στις επαναλήψεις με την υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να είναι < 14,9 % για την εκατοστιαία ελάττωση της κυστεΐνης και < 11,6 % για την εκατοστιαία ελάττωση της λυσίνης,

β) η μέση συγκέντρωση πεπτιδίου στους τρεις μάρτυρες αναφοράς Γ στον κατάλληλο διαλύτη θα πρέπει να είναι 0,50 ± 0,05 mm. Εάν δεν πληρούνται τα κριτήρια αυτά, θα πρέπει να απορρίπτονται τα δεδομένα και να επαναλαμβάνεται η σειρά μετρήσεων για τη συγκεκριμένη υπό δοκιμή χημική ουσία.

Μοντέλο πρόβλεψης

Υπολογίζεται για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία η μέση τιμή εκατοστιαίας ελάττωσης της κυστεΐνης και εκατοστιαίας ελάττωσης της λυσίνης. Κατά τον υπολογισμό της μέσης τιμής, τυχόν αρνητική ελάττωση λαμβάνεται ως μηδενική. Με τη βοήθεια του μοντέλου πρόβλεψης κυστεΐνης 1:10/λυσίνης 1:50, που εμφαίνεται στον πίνακα 1, η τιμή κατωφλίου μέσης ελάττωσης πεπτιδίου 6,38 % θα πρέπει να χρησιμοποιείται για την υποστήριξη της διάκρισης μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος ουσιών στο πλαίσιο ΙΑΤΑ. Η εφαρμογή του μοντέλου πρόβλεψης για την κατάταξη των υπό δοκιμή χημικών ουσιών σε τάξη δραστικότητας (δηλ. χαμηλή, μέτρια και υψηλή δραστικότητα) ενδέχεται να αποδειχθεί χρήσιμη για την τροφοδότηση εκτιμήσεων της ευαισθητοποιητικής ισχύος στο πλαίσιο ΙΑΤΑ.

▼M7

Πίνακας 1

Μοντέλο πρόβλεψης κυστεΐνης 1:10/λυσίνης 1:50 (1)

Μέση % ελάττωση της κυστεΐνης και της λυσίνης	Τάξη δραστικότητας	Πρόβλεψη βάσει DPRA (2)
0 % ≤ μέση % ελάττωση ≤ 6,38 %	Μηδενική ή ελάχιστη δραστικότητα	Αρνητική
6,38 % < μέση % ελάττωση ≤ 22,62 %	Χαμηλή δραστικότητα	Θετική
22,62 % < μέση % ελάττωση ≤ 42,47 %	Μέτρια δραστικότητα	
42,47 % < μέση % ελάττωση ≤ 100 %	Υψηλή δραστικότητα	

(1) Οι αριθμοί παραπέμπουν σε στατιστικά παραγόμενες τιμές κατωφλίου και δεν σχετίζονται με την ακρίβεια της μέτρησης.
(2) Οι προβλέψεις βάσει DPRA θα πρέπει να συνεκτιμώνται στο πλαίσιο ΙΑΤΑ και σύμφωνα με τις διατάξεις των παραγράφων 9 και 12.

Ενδέχεται να υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες η υπό δοκιμή χημική ουσία (η ίδια ή ένα ή περισσότερα από τα συστατικά πολυσυστατικής ουσίας ή μείγματος) παρουσιάζει σημαντική απορρόφηση στα 220 nm και τον ίδιο χρόνο κατακράτησης με εκείνον του πεπτιδίου (συνέκλουση). Το πρόβλημα της συνέκλουσης μπορεί να επιλυθεί με ελαφρά προσαρμογή της πειραματικής διάταξης HPLC με σκοπό τον περαιτέρω διαχωρισμό του χρόνου έκλουσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και του πεπτιδίου. Εάν στην προσπάθεια εξάλειψης της συνέκλουσης χρησιμοποιείται εναλλακτική πειραματική διάταξη HPLC, θα πρέπει να καταδεικνύεται η ισοδυναμία της με την επικυρωμένη διάταξη (π.χ. με δοκιμές των ουσιών ελέγχου ικανότητας που απαριθμούνται στο προσάρτημα 2). Όταν εμφανίζεται συνέκλουση, δεν είναι δυνατή η ολοκλήρωση της κορυφής του πεπτιδίου και δεν μπορεί να υπολογιστεί η εκατοστιαία ελάττωσή του. Σε περίπτωση συνέκλουσης τέτοιων υπό δοκιμή χημικών ουσιών τόσο με το κυστεϊνούχο πεπτίδιο όσο και με το λυσινούχο, η ανάλυση θα πρέπει να αναφέρεται ως «αβέβαιη». Στις περιπτώσεις συνέκλουσης μόνο με το λυσινούχο πεπτίδιο, μπορεί να χρησιμοποιείται το προγνωστικό μοντέλο κυστεΐνης 1:10 που αναφέρεται στον πίνακα.

Πίνακας 2

Προγνωστικό μοντέλο κυστεΐνης 1:10 (1)

% Ελάττωση της κυστεΐνης (Cys)	Τάξη δραστικότητας	Πρόβλεψη βάσει DPRA (2)
0 % ≤ % ελάττωση Cys ≤ 13,89 %	Μηδενική ή ελάχιστη δραστικότητα	Αρνητική
13,89 % ≤ % ελάττωση Cys ≤ 23,09 %	Χαμηλή δραστικότητα	Θετική
23,09 % ≤ % ελάττωση Cys ≤ 98,24 %	Μέτρια δραστικότητα	
98,24 % ≤ % ελάττωση Cys ≤ 100 %	Υψηλή δραστικότητα	

(1) Οι αριθμοί παραπέμπουν σε στατιστικά παραγόμενες τιμές κατωφλίου και δεν σχετίζονται με την ακρίβεια της μέτρησης.
(2) Οι προβλέψεις βάσει DPRA θα πρέπει να συνεκτιμώνται στο πλαίσιο ΙΑΤΑ και σύμφωνα με τις διατάξεις των παραγράφων 9 και 12.

Ενδέχεται να υπάρχουν και άλλες περιπτώσεις στις οποίες η αλληλεπικάλυψη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και του πεπτιδίου ως προς τον χρόνο κατακράτησης είναι ατελής. Στις περιπτώσεις αυτές μπορούν να υπολογιστούν τιμές εκατοστιαίας ελάττωσης πεπτιδίου και να χρησιμοποιηθούν στο μοντέλο πρόβλεψης κυστεΐνης 1:10/λυσίνης 1:50, ωστόσο η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν είναι δυνατόν να καταταχθεί με ακρίβεια σε τάξη δραστικότητας.

▼M7

Όταν το αποτέλεσμα είναι αδιαμφισβήτητο, θα πρέπει κανονικά να αρκεί για την υπό δοκιμή χημική ουσία μία μόνο ανάλυση με HPLC, τόσο για το κυστεϊνούχο πεπτίδιο όσο και για το λυσινούχο. Ωστόσο, στις περιπτώσεις όπου τα αποτελέσματα προσεγγίζουν την τιμή κατωφλίου που χρησιμοποιείται για τη διάκριση μεταξύ θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων (δηλ. οριακά αποτελέσματα), ενδέχεται να απαιτούνται πρόσθετες δοκιμές. Όταν η μέση εκατοστιαία ελάττωση κυμαίνεται από 3 % έως 10 %, προκειμένου για το μοντέλο πρόβλεψης κυστεΐνης 1:10/λυσίνης 1:50, ή η εκατοστιαία ελάττωση της κυστεΐνης κυμαίνεται από 9 % έως 17 %, προκειμένου για το μοντέλο πρόβλεψης κυστεΐνης 1:10, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο εκτέλεσης δεύτερης μέτρησης, ακόμη και τρίτης, σε περίπτωση ασυμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο πρώτων μετρήσεων.

Έκθεση δοκιμής

Στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή ουσία

— Μονοσυστατική ουσία

  — Ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία·

  — Φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα, μοριακό βάρος και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, εφόσον είναι διαθέσιμα·

  — Καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.·

  — Κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση)·

  — Ελεγχθείσα(-ες) συγκέντρωση(-εις)·

  — Συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα.

— Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγμα:

  — Χαρακτηρισμός, στο μέτρο του δυνατού, π.χ. χημική ταυτότητα (βλ. ανωτέρω), καθαρότητα, ποσότητα και σημαντικές φυσικοχημικές ιδιότητες (βλ. ανωτέρω) των συστατικών, εφόσον είναι διαθέσιμα·

  — Φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, εφόσον είναι διαθέσιμα·

  — Μοριακό βάρος ή φαινόμενο μοριακό βάρος στην περίπτωση των μειγμάτων/πολυμερών γνωστής σύνθεσης ή άλλες πληροφορίες που έχουν σημασία για τη διεξαγωγή της μελέτης·

  — Κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση)·

  — Ελεγχθείσα(-ες) συγκέντρωση(-εις)·

  — Συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα.

Μάρτυρες

— Θετικός μάρτυρας

  — Ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία·

  — Φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα, μοριακό βάρος και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, εφόσον είναι διαθέσιμα·

  — Καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.·

▼M7

— Κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση)·

— Ελεγχθείσα(-ες) συγκέντρωση(-εις)·

— Συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα·

— Παραπομπή σε ιστορικά αποτελέσματα θετικών μαρτύρων που καταδεικνύουν την εφαρμογή κατάλληλων κριτηρίων αποδοχής των μετρήσεων, εάν ισχύει.

— Διαλύτης/φορέας:

— Διαλύτης/φορέας που χρησιμοποιήθηκε και η αναλογία των συστατικών του, εάν ισχύει·

— Ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία·

— Καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμίξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.·

— Φυσική εμφάνιση, μοριακό βάρος, καθώς και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, σε περίπτωση χρήσης άλλων διαλυτών/φορέων εκτός εκείνων που αναφέρονται στη μέθοδο δοκιμών και εφόσον είναι διαθέσιμα·

— Συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα·

— Αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία·

— Για το ακετονιτρίλιο, αποτελέσματα του ελέγχου επιπτώσεων στη σταθερότητα των πεπτιδίων.

Παρασκευή των πεπτιδίων, του θετικού μάρτυρα και της υπό δοκιμή χημικής ουσίας

— Χαρακτηρισμός των διαλυμάτων πεπτιδίων (προμηθευτής, παρτίδα, ακριβές βάρος, όγκος που προστίθεται για το διάλυμα παρακαταθήκης)·

— Χαρακτηρισμός του διαλύματος θετικού μάρτυρα (ακριβές βάρος της ουσίας-θετικού μάρτυρα, όγκος που προστίθεται για το διάλυμα δοκιμής)·

— Χαρακτηρισμός των διαλυμάτων υπό δοκιμή χημικής ουσίας (ακριβές βάρος της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, όγκος που προστίθεται για το διάλυμα δοκιμής).

Διάταξη του οργάνου HPLC και ανάλυση με HPLC

— Τύπος του οργάνου, της στήλης και της προστήλης, του ανιχνευτή και του αυτόματου δειγματολήπτη HPLC·

— Παράμετροι που έχουν σημασία για την ανάλυση με HPLC, όπως θερμοκρασία στήλης, όγκοι έγχυσης, παροχή και βαθμίδωση.

Καταλληλότητα του συστήματος

— Εμβαδόν πεπτιδικής κορυφής σε μήκος κύματος 220 nm για κάθε επανάληψη με το πρότυπο και τον μάρτυρα αναφοράς Α·

— Γραφική παράσταση της γραμμικής καμπύλης βαθμονόμησης και αναφορά του συντελεστή r^2·

— Συγκέντρωση πεπτιδίου σε κάθε επανάληψη με τον μάρτυρα αναφοράς Α·

— Μέση συγκέντρωση πεπτιδίου (σε mM) στους τρεις μάρτυρες αναφοράς Α, SD και CV·

— Συγκέντρωση πεπτιδίου στους μάρτυρες αναφοράς Α και Γ.

▼M7

Αναλυτική ακολουθία

— Για τους μάρτυρες αναφοράς:

  — Εμβαδόν πεπτιδικής κορυφής σε μήκος κύματος 220 nm για κάθε επανάληψη με τους μάρτυρες αναφοράς Β και Γ·

  — Μέσο εμβαδόν πεπτιδικής κορυφής στα 220 nm των εννέα μαρτύρων αναφοράς Β και Γ σε ακετονιτρίλιο, SD και CV (για τη σταθερότητα των μαρτύρων αναφοράς κατά τον χρόνο ανάλυσης)·

  — Για κάθε χρησιμοποιούμενο διαλύτη, μέσο εμβαδόν πεπτιδικής κορυφής σε μήκος κύματος 220 nm των τριών κατάλληλων μαρτύρων αναφοράς Γ (για τον υπολογισμό της εκατοστιαίας ελάττωσης του πεπτιδίου)·

  — Για κάθε χρησιμοποιούμενο διαλύτη, συγκέντρωση πεπτιδίου (σε mM) στους τρεις κατάλληλους μάρτυρες αναφοράς Γ·

  — Για κάθε χρησιμοποιούμενο διαλύτη, μέση συγκέντρωση πεπτιδίου (σε mM) στους τρεις κατάλληλους μάρτυρες αναφοράς Γ, SD και CV.

— Για τον θετικό μάρτυρα:

  — Εμβαδόν πεπτιδικής κορυφής σε μήκος κύματος 220 nm για κάθε επανάληψη·

  — Εκατοστιαία ελάττωση πεπτιδίου για κάθε επανάληψη·

  — Μέση εκατοστιαία ελάττωση πεπτιδίου στις τρεις επαναλήψεις, SD και CV.

— Για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία:

  — Εμφάνιση ιζήματος στο μείγμα αντίδρασης στο τέλος του χρόνου επώασης, εάν παρατηρήθηκε. Αναδιαλυτοποίηση ή φυγοκέντρηση του ιζήματος.

  — Παρουσία συνέκλουσης·

  — Περιγραφή τυχόν άλλων σχετικών παρατηρήσεων, κατά περίπτωση·

  — Εμβαδόν πεπτιδικής κορυφής σε μήκος κύματος 220 nm για κάθε επανάληψη·

  — Εκατοστιαία ελάττωση πεπτιδίου για κάθε επανάληψη·

  — Μέση εκατοστιαία ελάττωση πεπτιδίου στις τρεις επαναλήψεις, SD και CV·

  — Μέσες τιμές εκατοστιαίας ελάττωσης της κυστεΐνης και εκατοστιαίας ελάττωσης της λυσίνης·

  — Μοντέλο πρόβλεψης που χρησιμοποιήθηκε και πρόβλεψη βάσει DPRA.

Δοκιμές ικανότητας (επάρκειας)

— Εφόσον ισχύει, διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε για να αποδειχθεί η ικανότητα του εργαστηρίου να εφαρμόζει τη μέθοδο δοκιμών (π.χ. με δοκιμές ουσιών ελέγχου ικανότητας) ή για να καταδειχθούν οι διαχρονικά αναπαραγώγιμες επιδόσεις της μεθόδου δοκιμών.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

— Συζήτηση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν με τη μέθοδο δοκιμών DPRA·

— Συζήτηση των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών στο πλαίσιο IATA, εάν υπάρχουν άλλες σχετικές πληροφορίες.

Συμπέρασμα

▼M7

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Διατίθεται στη διαδικτυακή διεύθυνση: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168, OECD, Paris.

(3) Κεφάλαιο Β.6 του παρόντος παραρτήματος: Ευαισθητοποίηση δέρματος:

(4) Κεφάλαιο Β.42 του παρόντος παραρτήματος: Τοπική δοκιμασία λεμφαδένων

(5) Κεφάλαιο Β.50 του παρόντος παραρτήματος: Ευαισθητοποίηση του δέρματος. Τοπική δοκιμασία λεμφαδένων DA.

(6) Κεφάλαιο Β.51 του παρόντος παραρτήματος: Ευαισθητοποίηση του δέρματος. Τοπική δοκιμασία λεμφαδένων BrdU-ELISA

(7) Adler *et al.* (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85:367-485.

(8) Gerberick *et al.* (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. Toxicological Sciences 81:332-343.

(9) Gerberick *et al.* (2007). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. Toxicological Sciences 97:417-427.

(10) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for skin sensitisation testing. Διατίθεται στη διαδικτυακή διεύθυνση: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra

(11) Jaworska *et al.* (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. Journal of Applied Toxicology, published online, 14 May 2013, DOI: 10.1002/jat.2869.

(12) Bauch *et al*. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potential. Regulatory Toxicology and Pharmacology 63: 489-504.

(13) Nukada *et al.* (2013). Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. Toxicology *in vitro* 27:609 618.

(14) Ball *et al* (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. Regulatory Toxicology and Pharmacology 60:389-400.

(15) Landsteiner and Jacobs (1936). Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. Journal of Experimental Medicine 64:625-639.

(16) Dupuis and Benezra (1982). Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. New York & Basel: Marcel Dekker Inc.

(17) Lepoittevin *et al.* (1998). Allergic contact dermatitis: the molecular basis. Springer, Berlin.

(18) EC EURL ECVAM (2012). Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report 74pp. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra

▼**M7**

(19) Natsch *et al.* (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology, published online, 9 April 2013, DOI:10.1002/jat.2868.

(20) DB-ALM (INVITTOX) Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing 17pp. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

(21) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment, No. 34. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.

(22) FDA (Food and Drug Administration (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 22pp. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070107.pdf—138

(23) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

▼M7

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ορθότητα: η εγγύτητα της συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί κριτήριο επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών και μια από τις πτυχές της «καταλληλότητας». Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς την «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας μεθόδου δοκιμών (21).

AOP (Adverse Outcome Pathway/πορεία δυσμενούς έκβασης): αλληλουχία συμβάντων, από τη χημική δομή της χημικής ουσίας ή των ομοειδών χημικών ουσιών που αποτελούν στόχο μέχρι την υπό μελέτη έκβαση in vivo, μέσω του μοριακού εναρκτήριου συμβάντος (2).

Καμπύλη βαθμονόμησης: η σχέση μεταξύ της πειραματικής τιμής απόκρισης και της αναλυτικής συγκέντρωσης μιας γνωστής ουσίας (καλούμενη επίσης *πρότυπη καμπύλη*).

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Συντελεστής μεταβλητότητας: μέτρο της μεταβλητότητας, που υπολογίζεται για μια ομάδα δεδομένων επανάληψης με διαίρεση της τυπικής απόκλισης διά της μέσης τιμής. Είναι δυνατόν να πολλαπλασιαστεί επί 100 για να εκφραστεί ως ποσοστό.

Κίνδυνος: εγγενής ιδιότητα ενός παράγοντα ή μιας κατάστασης που μπορεί να έχει δυσμενείς επιδράσεις όταν οργανισμός, σύστημα ή (υπο)πληθυσμός εκτεθεί στον συγκεκριμένο παράγοντα.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment/Ολοκληρωμένη προσέγγιση για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση): δομημένη προσέγγιση που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του κινδύνου (δυναμικό), τον χαρακτηρισμό του κινδύνου (ισχύς) και/ή την εκτίμηση της ασφάλειας (δυναμικό/ισχύς και έκθεση) μιας χημικής ουσίας ή ομάδας χημικών ουσιών, στην οποία ενσωματώνονται και σταθμίζονται στρατηγικά όλα τα σχετικά δεδομένα, με σκοπό την τροφοδότηση ρυθμιστικών αποφάσεων σχετικά με τον δυνητικό κίνδυνο και/ή την επικινδυνότητα και/ή την ανάγκη για περαιτέρω στοχευμένες και, ως εκ τούτου, ελάχιστες δοκιμές.

Μοριακό εναρκτήριο συμβάν: η επαγόμενη από χημική ουσία διατάραξη ενός βιολογικού συστήματος σε μοριακό επίπεδο, που αναγνωρίζεται ως η αφετηρία της πορείας δυσμενούς έκβασης.

Μείγμα: μείγμα ή διάλυμα, αποτελούμενο από δύο ή περισσότερες ουσίες που δεν αντιδρούν μέσα σε αυτό (1).

Μονοσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας ένα κύριο συστατικό περιέχεται σε ποσοστό τουλάχιστον 80 % (κ.β.).

Πολυσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας περισσότερα από ένα κύρια συστατικά περιέχονται σε συγκέντρωση ≥ 10 % (κ.β.) και < 80 % (κ.β.). Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα μεταποιητικών διεργασιών. Η διαφορά μεταξύ μείγματος και πολυσυστατικής ουσίας είναι ότι το μείγμα λαμβάνεται με ανάμειξη δύο ή περισσότερων ουσιών, χωρίς χημική αντίδραση. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα χημικών αντιδράσεων.

Θετικός μάρτυρας: επανάληψη που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και υποβάλλεται σε μεταχείριση με ουσία που είναι γνωστό ότι επάγει θετική απόκριση. Για να διασφαλίζεται η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας της απόκρισης του θετικού μάρτυρα σε συνάρτηση με τον χρόνο, το μέγεθος της θετικής απόκρισης δεν θα πρέπει να είναι υπερβολικό.

Μάρτυρας αναφοράς: δείγμα που δεν υποβάλλεται σε μεταχείριση και περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής, συμπεριλαμβανομένου του διαλύτη ή του φορέα. Το δείγμα αυτό υφίσταται τις ίδιες διαδικασίες όπως τα δείγματα που υποβάλλονται σε μεταχείριση με την υπό δοκιμή ουσία και άλλα δείγματα-μάρτυρες, με σκοπό τον καθορισμό της βασικής απόκρισης των δειγμάτων που υποβάλλονται σε μεταχείριση με την υπό δοκιμή ουσία, διαλυμένη στον ίδιο

▼M7

διαλύτη ή φορέα. Όταν το εν λόγω δείγμα υποβάλλεται σε δοκιμή με παράλληλο αρνητικό μάρτυρα, καταδεικνύει επίσης αν ο διαλύτης ή ο φορέας αλληλεπιδρά με το σύστημα δοκιμής.

Καταλληλότητα: περιγραφή της σχέσης της δοκιμής με την υπό μελέτη επίδραση και του κατά πόσον αυτή έχει σημασία και είναι χρήσιμη για συγκεκριμένο σκοπό. Πρόκειται για τον βαθμό στον οποίο η δοκιμή μετρά ή προβλέπει σωστά τη βιολογική επίδραση υπό μελέτη. Η καταλληλότητα εμπεριέχει συνεκτίμηση της ορθότητας (συμφωνίας) της μεθόδου δοκιμών (21).

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια μέθοδος δοκιμών μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, καθώς και της ενδοεργαστηριακής επαναληψιμότητας (21).

Αναπαραγωγιμότητα: η συμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τη διεξαγωγή δοκιμών με την ίδια χημική ουσία και με τη χρήση του ίδιου πρωτοκόλλου δοκιμών (βλ. αξιοπιστία) (21).

Ευαισθησία: το ποσοστό του συνόλου των θετικών/δραστικών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των μεθόδων δοκιμών (21).

Ειδικότητα: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών/αδρανών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των μεθόδων δοκιμών (21).

Ουσία: τα χημικά στοιχεία και οι ενώσεις τους σε φυσική κατάσταση ή όπως λαμβάνονται με οποιαδήποτε παραγωγική διεργασία, στα οποία συμπεριλαμβάνονται όλα τα πρόσθετα που απαιτούνται για να διατηρείται η σταθερότητα του προϊόντος, καθώς και τυχόν προσμείξεις που προκύπτουν από τη χρησιμοποιούμενη διεργασία, αλλά από τα οποία εξαιρούνται οι διαλύτες που είναι δυνατόν να διαχωριστούν χωρίς να επηρεαστεί η σταθερότητα της ουσίας ούτε να μεταβληθεί η σύνθεσή της (1).

Καταλληλότητα του συστήματος: προσδιορισμός των επιδόσεων των οργάνων (π.χ. ευαισθησία) με ανάλυση προτύπου αναφοράς πριν από τη μέτρηση της αναλυτικής παρτίδας (22).

Υπό δοκιμή χημική ουσία: Ο όρος «υπό δοκιμή χημική ουσία» χρησιμοποιείται για να δηλώσει αυτό που υποβάλλεται σε δοκιμή.

Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Προϊόντων των Ηνωμένων Εθνών (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) (GHS των Ηνωμένων Εθνών): σύστημα που προτείνει την ταξινόμηση των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) με βάση τυποποιημένα είδη και βαθμούς φυσικών κινδύνων και κινδύνων για την υγεία και το περιβάλλον και καλύπτει τα αντίστοιχα επικοινωνιακά στοιχεία, όπως εικονογράμματα, προειδοποιητικές λέξεις, δηλώσεις επικινδυνότητας, δηλώσεις προφύλαξης και δελτία δεδομένων ασφαλείας, για τη μετάδοση πληροφοριών σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις των εν λόγω προϊόντων με σκοπό την προστασία των ανθρώπων (εργοδοτών, εργαζομένων, μεταφορέων, καταναλωτών και διασωστών) και του περιβάλλοντος (1).

UVCB: ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, πολύπλοκα προϊόντα αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά.

Έγκυρη μέθοδος δοκιμών: μέθοδος δοκιμών που θεωρείται επαρκούς καταλληλότητας και αξιοπιστίας για συγκεκριμένο σκοπό και βασίζεται σε επιστημονικά τεκμηριωμένες αρχές. Οι μέθοδοι δοκιμών δεν είναι ποτέ έγκυρες με την απόλυτη σημασία του όρου, αλλά μόνο σε σχέση με καθορισμένο σκοπό (21).

▼M7

Προσάρτημα 2

ΟΥΣΙΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

Δερματική ευαισθητοποίηση in chemico: Άμεση ανάλυση πεπτιδικής δραστικότητας (DPRA)

Πριν χρησιμοποιήσουν στην καθημερινή πρακτική την παρούσα μέθοδο δοκιμών, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα επιτυγχάνοντας σωστά την αναμενόμενη πρόβλεψη βάσει της DPRA για τις 10 συνιστώμενες στον πίνακα 1 ουσίες ελέγχου ικανότητας, καθώς και τιμές ελάττωσης της κυστεΐνης και της λυσίνης εντός του αντίστοιχου εύρους τιμών αναφοράς για 8 από τις 10 ουσίες ελέγχου ικανότητας ανά πεπτίδιο. Οι εν λόγω ουσίες ελέγχου ικανότητας επιλέχθηκαν ως αντιπροσωπευτικές του φάσματος αποκρίσεων όσον αφορά τους κινδύνους δερματικής ευαισθητοποίησης. Άλλα κριτήρια επιλογής ήταν το ότι είναι διαθέσιμες στο εμπόριο, ότι υπάρχουν υψηλής ποιότητας δεδομένα αναφοράς in vivo, καθώς και υψηλής ποιότητας δεδομένα in vitro που προέκυψαν από DPRA, όπως επίσης το ότι χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη επικύρωσης που συντόνισε το EURL ECVAM για να καταδειχθεί η επιτυχής εφαρμογή της μεθόδου δοκιμών στα εργαστήρια που συμμετείχαν στη μελέτη.

Πίνακας 1

Συνιστώμενες ουσίες ελέγχου ικανότητας για την απόδειξη τεχνικής ικανότητας όσον αφορά την άμεση ανάλυση πεπτιδικής δραστικότητας

Ουσίες ελέγχου ικανότητας	Αριθμός CAS	Φυσική κατάσταση	Πρόβλεψη in vivo [1]	Πρόβλεψη βάσει DPRA [2]	Εύρος τιμών [3] % ελάττωσης του κυστεϊνούχου πεπτιδίου	Εύρος τιμών [3] % ελάττωσης του λυσινούχου πεπτιδίου
2,4-Δινιτροχλωροβενζόλιο	97-00-7	Στερεό	Ευαισθητοποιητικό (εξαιρετικά ισχυρό)	Θετική	90-100	15-45
Οξαζολόνη	15646-46-5	Στερεό	Ευαισθητοποιητικό (εξαιρετικά ισχυρό)	Θετική	60-80	10-55
Φορμαλδεΰδη	50-00-0	Υγρό	Ευαισθητοποιητικό (ισχυρό)	Θετική	30-60	0-24
Βενζυλιδενακετόνη	122-57-6	Στερεό	Ευαισθητοποιητικό (μετρίως ισχυρό)	Θετική	80-100	0-7
Φαρνεσάλη	19317-11-4	Υγρό	Ευαισθητοποιητικό (ασθενές ισχυρό)	Θετική	15-55	0-25
2,3-Βουτανοδιόνη	431-03-8	Υγρό	Ευαισθητοποιητικό (ασθενές)	Θετική	60-100	10-45
1-Βουτανόλη	71-36-3	Υγρό	Μη ευαισθητοποιητικό	Αρνητική	0-7	0-5,5
6-Μεθυλοκουμαρίνη	92-48-8	Στερεό	Μη ευαισθητοποιητικό	Αρνητική	0-7	0-5,5
Γαλακτικό οξύ	50-21-5	Υγρό	Μη ευαισθητοποιητικό	Αρνητική	0-7	0-5,5
4-Μεθοξυακετοφαινόνη	100-06-1	Στερεό	Μη ευαισθητοποιητικό	Αρνητική	0-7	0-5,5

([1]) Οι προβλέψεις για τον κίνδυνο (και την ισχύ) in vivo βασίζονται σε δεδομένα από LLNA (19). Η ευαισθητοποιητική ισχύς in vivo συνάγεται με την εφαρμογή των κριτηρίων που έχει προτείνει το ECETOC (23).

([2]) Η πρόβλεψη βάσει DPRA θα πρέπει να συνεκτιμάται στο πλαίσιο IATA και σύμφωνα με τις διατάξεις των παραγράφων 9 και 11.

([3]) Πεδία τιμών προσδιορισμένα με βάση τουλάχιστον 10 τιμές ελάττωσης που προέκυψαν από 6 ανεξάρτητα εργαστήρια.

▼M7

Προσάρτημα 3

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΑΚΟΛΟΥΘΙΑΣ

Πρότυπα βαθμονόμησης και μάρτυρες αναφοράς	Πρότυπο 1 Πρότυπο 2 Πρότυπο 3 Πρότυπο 4 Πρότυπο 5 Πρότυπο 6 Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης Μάρτυρας αναφοράς Α, επαν. 1 Μάρτυρας αναφοράς Α, επαν. 2 Μάρτυρας αναφοράς Α, επαν. 3
Συνέκλουση μαρτύρων	Μάρτυρας συνέκλουσης 1 για την υπό δοκιμή χημική ουσία 1 Μάρτυρας συνέκλουσης 2 για την υπό δοκιμή χημική ουσία 2
Μάρτυρες αναφοράς	Μάρτυρας αναφοράς Β, επαν. 1 Μάρτυρας αναφοράς Β, επαν. 2 Μάρτυρας αναφοράς Β, επαν. 3
Πρώτη σειρά επαναλήψεων	Μάρτυρας αναφοράς Γ, επαν. 1 Κινναμωμική αλδεΰδη, επαν. 1 Δείγμα 1, επαν. 1 Δείγμα 2, επαν. 1
Δεύτερη σειρά επαναλήψεων	Μάρτυρας αναφοράς Γ, επαν. 2 Κινναμωμική αλδεΰδη, επαν. 2 Δείγμα 1, επαν. 2 Δείγμα 2, επαν. 2
Τρίτη σειρά επαναλήψεων	Μάρτυρας αναφοράς Γ, επαν. 3 Κινναμωμική αλδεΰδη, επαν. 3 Δείγμα 1, επαν. 3 Δείγμα 2, επαν. 3
Μάρτυρες αναφοράς	Μάρτυρας αναφοράς Β, επαν. 4 Μάρτυρας αναφοράς Β, επαν. 5 Μάρτυρας αναφοράς Β, επαν. 6

Στην αναλυτική ακολουθία θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται τρεις σειρές μαρτύρων αναφοράς (δηλ. δείγματα αποτελούμενα μόνο από το πεπτίδιο, διαλυμένο σε κατάλληλο διαλύτη):
Μάρτυρας αναφοράς Α: χρησιμοποιείται για την επαλήθευση της καταλληλότητας του συστήματος HPLC.
Μάρτυρας αναφοράς Β: συμπεριλαμβάνεται στην αρχή και στο τέλος της αναλυτικής ακολουθίας για την επαλήθευση της σταθερότητας των μαρτύρων αναφοράς κατά τον χρόνο της ανάλυσης.
Μάρτυρας αναφοράς Γ: συμπεριλαμβάνεται στην αναλυτική ακολουθία για να επαληθεύεται ότι ο διαλύτης που χρησιμοποιείται για τη διάλυση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας δεν επηρεάζει την εκατοστιαία ελάττωση των πεπτιδίων.

▼M7

Β.60. ΔΕΡΜΑΤΙΚΉ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΊΗΣΗ IN VITRO: ΜΈΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ARE-NRF2/ΛΟΥΣΙΦΕΡΆΣΗΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 442D του ΟΟΣΑ (2015). Ευαισθητοποιητική του δέρματος είναι μια ουσία που, όταν έρχεται επαφή με το δέρμα, προκαλεί αλλεργική αντίδραση, όπως ορίζεται στο Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα των Ηνωμένων Εθνών για την Ταξινόμηση και Επισήμανση των Χημικών Ουσιών (Globally Harmonized System/GHS των Ηνωμένων Εθνών) (1) και στον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 της Ευρωπαϊκής Ένωσης για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων (Classification, Labelling and Packaging/CLP) ([1]). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών παρέχει μια διαδικασία in vitro (προσδιορισμός ARE-Nrf2/λουσιφεράσης), προοριζόμενη να χρησιμοποιείται για την υποστήριξη της διάκρισης ανάμεσα σε ευαισθητοποιητικές και μη ευαισθητοποιητικές του δέρματος ουσίες σύμφωνα με το GHS των Ηνωμένων Εθνών (1) και τον κανονισμό CLP.

Υπάρχει γενική συμφωνία για τα βασικά υποκείμενα βιολογικά συμβάντα στη δερματική ευαισθητοποίηση. Οι υπάρχουσες γνώσεις σχετικά με τους χημικούς και βιολογικούς μηχανισμούς που συνδέονται με τη δερματική ευαισθητοποίηση έχουν συνοψιστεί με τη μορφή μιας πορείας δυσμενούς έκβασης (Adverse Outcome Pathway/AOP) (2) — από το μοριακό εναρκτήριο συμβάν στα ενδιάμεσα συμβάντα και μέσω αυτών στη δυσμενή επίδραση, δηλ. την αλλεργική δερματίτιδα εξ επαφής στον άνθρωπο και την υπερευαισθησία εξ επαφής στα τρωκτικά (2) (3). Το μοριακό εναρκτήριο συμβάν είναι η ομοιοπολική δέσμευση ηλεκτρονιόφιλων ουσιών σε πυρηνόφιλα κέντρα των πρωτεϊνών του δέρματος. Το δεύτερο βασικό συμβάν στην εν λόγω AOP επέρχεται στα κερατινοκύτταρα και περιλαμβάνει φλεγμονώδεις αποκρίσεις, καθώς και την έκφραση γονιδίων που συνδέεται με συγκεκριμένες πορείες κυτταρικής σηματοδότησης, όπως εκείνες που εξαρτώνται από το στοιχείο απόκρισης στα αντιοξειδωτικά/ηλεκτρονιόφιλα (Antioxidant Response Element/ARE). Το τρίτο βασικό συμβάν είναι η ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων, που συνήθως αξιολογείται με βάση την έκφραση ειδικών δεικτών της κυτταρικής επιφάνειας, χημειοκινών και κυτταροκινών. Το τέταρτο βασικό συμβάν είναι ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων Τ, που αξιολογείται έμμεσα με τη δοκιμασία επιχώριων λεμφαδένων σε ποντικό (4).

Η αξιολόγηση της δερματικής ευαισθητοποίησης περιλαμβάνει συνήθως τη χρήση πειραματόζωων. Στις κλασικές μεθόδους που βασίζονται σε ινδικά χοιρίδια, όπως η δοκιμή Magnusson Kligman με μεγιστοποίηση σε ινδικά χοιρίδια και η δοκιμή Buehler [μέθοδος δοκιμών Β.6 (3)], μελετώνται τόσο το στάδιο επαγωγής όσο και το στάδιο πρόκλησης δερματικής ευαισθητοποίησης. Μια δοκιμή σε ποντικούς, συγκεκριμένα η δοκιμασία επιχώριων λεμφαδένων [LLNA, μέθοδος δοκιμών Β.42 (4)] και οι δύο τροποποιήσεις της που δεν απαιτούν ραδιενέργεια — LLNA: DA [μέθοδος δοκιμών Β.50 (6)] και LLNA: BrdU-ELISA [μέθοδος δοκιμών Β. 51 (7)], οι οποίες αξιολογούν αποκλειστικά την επαγωγική απόκριση, έχει επίσης κριθεί αποδεκτή, δεδομένου ότι προσφέρει πλεονεκτήματα έναντι των δοκιμών σε ινδικά χοιρίδια, όσον αφορά τόσο την καλή μεταχείριση των ζώων όσο και την αντικειμενική μέτρηση του επαγωγικού σταδίου της δερματικής ευαισθητοποίησης.

Πιο πρόσφατα, μέθοδοι δοκιμών μηχανιστικής βάσης in chemico και in vitro θεωρήθηκαν επιστημονικά έγκυρες για την αξιολόγηση του κινδύνου ευαισθητοποίησης του δέρματος από χημικές ουσίες. Ωστόσο, λόγω της περιορισμένης κάλυψης από πλευράς μηχανισμών AOP με καθεμία από τις διαθέσιμες μεθόδους δοκιμών χωρίς χρήση ζώων, θα χρειαστούν συνδυασμοί μεθόδων στις οποίες δεν χρησιμοποιούνται ζώα (in silico, in chemico, in vitro) στο πλαίσιο ολοκληρωμένων προσεγγίσεων για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση (Integrated Approaches to Testing and Assessment/IATA), ώστε να καταστεί δυνατή η πλήρης υποκατάσταση των δοκιμών σε ζώα, που χρησιμοποιούνται επί του παρόντος (2) (3).

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών (προσδιορισμός ARE-Nrf2/λουσιφεράσης) προτείνεται για την εξέταση του δεύτερου βασικού συμβάντος που επεξηγείται στην παράγραφο 2. Έχει αναφερθεί ότι οι ευαισθητοποιητικές του δέρματος ουσίες επάγουν γονίδια που ρυθμίζονται από το στοιχείο απόκρισης στα αντιοξειδωτικά (ARE) (8) (9). Μικρές ηλεκτρονιόφιλες ουσίες, όπως οι ευαισθητοποιητικές του

([1]) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων, την τροποποίηση και την κατάργηση των οδηγιών 67/548/ΕΟΚ και 1999/45/ΕΚ και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006, ΕΕ L 353 της 31.12.2008, σ. 1.

▼M7

δέρματος, μπορούν να επιδράσουν στην πρωτεΐνη-αισθητήρα Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1 / σχετιζόμενη με την πρωτεΐνη Ech πρωτεΐνη τύπου Kelch 1), π.χ. με ομοιοπολική τροποποίηση του κυστεϊνικού καταλοίπου της, με αποτέλεσμα την απόσπασή της από τον μεταγραφικό παράγοντα Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 / παράγοντας 2 σχετικός με τον πυρηνικό παράγοντα ερυθροειδών κυττάρων 2). Ο αποσπασμένος Nrf2 μπορεί έπειτα να ενεργοποιήσει γονίδια που εξαρτώνται από το στοιχείο ARE, όπως εκείνα που κωδικοποιούν τα ένζυμα της φάσης ΙΙ της αποτοξίνωσης (8) (10) (11).

Επί του παρόντος, ο μόνος προσδιορισμός ARE-Nrf2/λουσιφεράσης in vitro που καλύπτεται από την παρούσα μέθοδο δοκιμών είναι η ανάλυση KeratinoSens™, για την οποία έχουν ολοκληρωθεί μελέτες επικύρωσης (9) (12) (13), ακολουθούμενες από ανεξάρτητη αξιολόγηση από ομότιμους κριτές, την οποία διενήργησε το Εργαστήριο Αναφοράς της Ευρωπαϊκής Ένωσης για Εναλλακτικές Μεθόδους αντί των Δοκιμών σε Ζώα (EURL ECVAM) (14). Η ανάλυση KeratinoSens™ κρίθηκε επιστημονικά έγκυρη προς χρήση στο πλαίσιο μιας προσέγγισης ΙΑΤΑ για την υποστήριξη της διάκρισης μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος ουσιών με σκοπό την ταξινόμηση ως προς τον κίνδυνο και την επισήμανση (14). Τα εργαστήρια που επιθυμούν να εφαρμόσουν τη μέθοδο δοκιμών μπορούν να αποκτήσουν την ανασυνδυασμένη κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται στην ανάλυση KeratinoSens™ συνάπτοντας συμφωνία παραχώρησης άδειας με τον φορέα ανάπτυξης της μεθόδου (15).

Οι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ, ΕΦΑΡΜΟΣΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Δεδομένου ότι με την ενεργοποίηση της πορείας Keap1-Nrf2-ARE εξετάζεται μόνο το δεύτερο βασικό συμβάν της ΑΟΡ δερματικής ευαισθητοποίησης, τα στοιχεία από μεθόδους δοκιμών που βασίζονται στην ενεργοποίηση αυτής της πορείας είναι απίθανο να επαρκούν, εάν χρησιμοποιούνται αυτοτελώς για τη συναγωγή συμπεράσματος σχετικά με το δερματικό ευαισθητοποιητικό δυναμικό των χημικών ουσιών. Ως εκ τούτου, τα δεδομένα που συγκεντρώνονται με την παρούσα μέθοδο δοκιμών θα πρέπει να εντάσσονται στο πλαίσιο ολοκληρωμένων προσεγγίσεων, όπως οι ΙΑΤΑ, συνδυαζόμενα με άλλες συμπληρωματικές πληροφορίες, π.χ. αυτές που προκύπτουν από προσδιορισμούς in vitro με τους οποίους εξετάζονται άλλα βασικά συμβάντα της ΑΟΡ δερματικής ευαισθητοποίησης, καθώς και από μεθόδους χωρίς δοκιμές, συμπεριλαμβανομένων των συγκριτικών προσεγγίσεων (read-across) με πληροφορίες για ουσίες ανάλογης χημικής δομής. Παραδείγματα σχετικά με τον τρόπο χρήσης της μεθόδου δοκιμών ARE-Nrf2/λουσιφεράσης σε συνδυασμό με άλλες πληροφορίες έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία (13) (16) (17) (18) (19).

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών μπορεί να χρησιμοποιείται για την υποστήριξη της διάκρισης μεταξύ ευαισθητοποιητικών (δηλ. κατηγορίας 1 του GHS των Ηνωμένων Εθνών/κανονισμού CLP) και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος ουσιών στο πλαίσιο μιας προσέγγισης ΙΑΤΑ. Δεν μπορεί να χρησιμοποιείται αυτοτελώς για τη λεπτομερέστερη κατάταξη ευαισθητοποιητικών του δέρματος ουσιών στις υποκατηγορίες 1Α και 1Β κατά GHS/CLP, ούτε για την πρόβλεψη της ευαισθητοποιητικής ισχύος προκειμένου να ληφθούν αποφάσεις εκτίμησης της ασφάλειας. Ωστόσο, ανάλογα με το κανονιστικό πλαίσιο, ένα θετικό αποτέλεσμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί αυτοτελώς για την κατάταξη χημικών ουσιών στην κατηγορία 1 κατά GHS/CLP.

Με βάση το σύνολο δεδομένων από τη μελέτη επικύρωσης και εσωτερικές δοκιμές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανεξάρτητη αξιολόγηση της μεθόδου δοκιμών από ομότιμους κριτές, η ανάλυση KeratinoSens™ μπορεί αποδεδειγμένα να μεταφερθεί σε εργαστήρια με εμπειρία στις κυτταροκαλλιέργειες. Ο βαθμός αναπαραγωγιμότητας των προβλέψεων που αναμένεται να παρέχει η μέθοδος δοκιμών είναι της τάξης του 85 % ενδοεργαστηριακά και διεργαστηριακά (14). Η ορθότητα (77 % - 155/201), η ευαισθησία (78 % - 71/91) και η ειδικότητα (76 % - 84/110) της ανάλυσης KeratinoSens™ για τη διάκριση μεταξύ ευαισθητοποιητικών (δηλ. κατηγορίας 1 κατά GHS/CLP) και μη ευαισθητοποιητικών ουσιών, σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της LLNA, υπολογίστηκαν με συνεκτίμηση όλων των δεδομένων που υποβλήθηκαν στο EURL ECVAM για αξιολόγηση και για την εξέταση της μεθόδου δοκιμών από ομότιμους κριτές. Αυτά τα αριθμητικά στοιχεία είναι παρόμοια με εκείνα που δημοσιεύθηκαν πρόσφατα και τα οποία βασίζονται σε εσωτερικές δοκιμές με περίπου

▼M7

145 ουσίες (ακρίβεια 77 %, ευαισθησία 79 %, ειδικότητα 72 %) (13). Η ανάλυση KeratinoSens™ είναι πιθανότερο να υποτιμήσει την πρόβλεψη για χημικές ουσίες με χαμηλή έως μέτρια ισχύ δερματικής ευαισθητοποίησης (δηλ. υποκατηγορίας 1B κατά GHS/CLP) έναντι χημικών ουσιών που εμφανίζουν υψηλή ισχύ δερματικής ευαισθητοποίησης (δηλ. υποκατηγορίας 1A κατά GHS/CLP) (13) (14). Συνολικά, τα στοιχεία αυτά δείχνουν τη χρησιμότητα της ανάλυσης KeratinoSens™ ως εργαλείου που συμβάλλει στον προσδιορισμό των κινδύνων δερματικής ευαισθητοποίησης. Ωστόσο, οι τιμές ορθότητας που παρέχονται εδώ για την ανάλυση KeratinoSens™ ως αυτοτελή μέθοδο δοκιμών είναι απλώς ενδεικτικές, δεδομένου ότι η μέθοδος δοκιμών θα πρέπει να εξετάζεται σε συνδυασμό με άλλες πηγές πληροφοριών στο πλαίσιο ΙΑΤΑ και σύμφωνα με τις διατάξεις της παραγράφου 9 ανωτέρω. Επιπλέον, κατά την αξιολόγηση των μεθόδων δοκιμών δερματικής ευαισθητοποίησης χωρίς χρήση ζώων, θα πρέπει να μη λησμονείται ότι η δοκιμασία LLNA, καθώς και άλλες δοκιμές σε ζώα, ενδέχεται να μην αντικατοπτρίζουν πλήρως την κατάσταση στο είδος που ενδιαφέρει, δηλ. στον άνθρωπο.

Ο όρος «υπό δοκιμή χημική ουσία» χρησιμοποιείται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών για να δηλώσει την ύλη που υποβάλλεται σε δοκιμή και δεν σχετίζεται με την εφαρμοσιμότητα της μεθόδου δοκιμών ARE-Nrf2/λουσιφεράσης στον έλεγχο ουσιών και/ή μειγμάτων. Με βάση τα διαθέσιμα επί του παρόντος δεδομένα, η ανάλυση KeratinoSens™ είναι εφαρμόσιμη σε υπό δοκιμή χημικές ουσίες που καλύπτουν ποικιλία οργανικών δραστικών ομάδων, μηχανισμών αντίδρασης, επιπέδων ισχύος δερματικής ευαισθητοποίησης (όπως προσδιορίζονται με μελέτες in vivo) και φυσικοχημικών ιδιοτήτων (9) (12) (13) (14). Ελέγχθηκαν κυρίως μονοσυστατικές ουσίες, αν και υπάρχει περιορισμένος όγκος δεδομένων και για τον έλεγχο μειγμάτων (20). Η μέθοδος δοκιμών είναι πάντως τεχνικά εφαρμόσιμη στον έλεγχο πολυσυστατικών ουσιών και μειγμάτων. Ωστόσο, πριν από την εφαρμογή της παρούσας μεθόδου δοκιμών σε μείγμα για την παραγωγή δεδομένων για ρυθμιστικό σκοπό, θα πρέπει να εξετάζεται αν — και, εάν ναι, για ποιον λόγο — μπορεί να αποδώσει επαρκή αποτελέσματα για τον επιδιωκόμενο σκοπό. Οι εκτιμήσεις αυτές δεν είναι αναγκαίες όταν οι κανονιστικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τον έλεγχο του μείγματος. Επιπλέον, κατά τον έλεγχο πολυσυστατικών ουσιών ή μειγμάτων, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η πιθανή παρεμπόδιση των παρατηρούμενων αποκρίσεων από κυτταροτοξικά συστατικά. Η μέθοδος δοκιμών έχει εφαρμογή σε υπό δοκιμή χημικές ουσίες που είναι διαλυτές ή σχηματίζουν σταθερή διασπορά (δηλ. κολλοειδές ή διασπορά στην οποία η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν καθιζάνει ούτε διαχωρίζεται από τον διαλύτη σε διαφορετικές φάσεις) σε νερό ή σε DMSO (συμπεριλαμβανομένων όλων των συστατικών της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην περίπτωση των πολυσυστατικών ουσιών ή μειγμάτων). Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν πληρούν αυτές τις προϋποθέσεις στην υψηλότερη απαιτούμενη τελική συγκέντρωση των 2 000 μM (πρβλ. παράγραφο 22), παραμένει η δυνατότητα δοκιμής σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Στην περίπτωση αυτή, τα αποτελέσματα που πληρούν τα κριτήρια θετικότητας της παραγράφου 39 μπορούν και πάλι να χρησιμοποιηθούν για την υποστήριξη του χαρακτηρισμού της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ως ευαισθητοποιητικής του δέρματος, ενώ τα αρνητικά αποτελέσματα σε συγκεντρώσεις < 1 000 μM θα πρέπει να θεωρούνται αβέβαια (βλ. μοντέλο πρόβλεψης στην παράγραφο 39). Γενικά, έχουν ελεγχθεί με επιτυχία ουσίες με logP έως 5, ενώ οι εξαιρετικά υδρόφοβες ουσίες με logP άνω του 7 βρίσκονται εκτός του γνωστού ορίου εφαρμοσιμότητας της μεθόδου δοκιμών (14). Για ουσίες με logP μεταξύ 5 και 7, υπάρχουν μόνο περιορισμένες πληροφορίες.

Τα αρνητικά αποτελέσματα θα πρέπει να ερμηνεύονται με επιφύλαξη, δεδομένου ότι ουσίες που αντιδρούν αποκλειστικά με τα κατάλοιπα λυσίνης ενδέχεται να βρεθούν αρνητικές με τη μέθοδο δοκιμών. Επιπλέον, λόγω της περιορισμένης μεταβολικής ικανότητας της χρησιμοποιούμενης κυτταρικής σειράς (21) και λόγω των πειραματικών συνθηκών, τα μεταβολικά προαπτένια (δηλ. οι χημικές ουσίες που απαιτούν ενζυμική ενεργοποίηση, π.χ. μέσω των ενζύμων P450) και τα αβιοτικά προαπτένια (δηλ. οι χημικές ουσίες που ενεργοποιούνται με αυτοοξείδωση), και ιδίως όσα χαρακτηρίζονται από χαμηλή ταχύτητα οξείδωσης, μπορεί επίσης να δώσουν αρνητικά αποτελέσματα. Αντίθετα, υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν δρουν ως ευαισθητοποιητικές, πλην όμως αποτελούν χημικούς παράγοντες καταπόνησης (στρες), μπορεί να οδηγήσουν σε ψευδοθετικά αποτελέσματα (14). Επιπλέον, δεν είναι πάντα δυνατή η αξιόπιστη αξιολόγηση των υπό δοκιμή χημικών ουσιών υψηλής κυτταροτοξικότητας. Τέλος, υπό δοκιμή χημικές ουσίες που παρεμποδίζουν το ένζυμο λουσιφεράση μπορούν να δημιουργήσουν σύγχυση με τη δραστικότητά του στις αναλύσεις που χρησιμοποιούν κύτταρα, προκαλώντας είτε φαινομενική αναστολή ή αυξημένη φωταύγεια (22). Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι συγκεντρώσεις φυτοοιστρογόνων ανώτερες του 1 μM παρεμπόδιζαν τα σήματα φωταύγειας σε άλλους προσδιορισμούς με

▼M7

γονίδιο αναφοράς (reporter) το γονίδιο της λουσιφεράσης, λόγω υπερενεργοποίησης του γονιδίου αναφοράς (23). Κατά συνέπεια, θα πρέπει να εξετάζεται με προσοχή η έκφραση της λουσιφεράσης σε υψηλές συγκεντρώσεις φυτοοιστρογόνων ή παρόμοιων χημικών ουσιών, για τις οποίες υπάρχουν υπόνοιες ότι προκαλούν υπερενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης ανάλογη με εκείνη που οφείλεται στα φυτοοιστρογόνα (23). Εάν υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι η μέθοδος δοκιμών δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε άλλες ειδικές κατηγορίες χημικών ουσιών, η μέθοδος δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τις συγκεκριμένες κατηγορίες.

Εκτός από την υποστήριξη της διάκρισης μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών ουσιών, η ανάλυση KeratinoSens™ παρέχει επίσης πληροφορίες για τη σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης που θα μπορούσαν ενδεχομένως να συμβάλουν στην εκτίμηση της ευαισθητοποιητικής ισχύος, όταν χρησιμοποιούνται σε ολοκληρωμένες προσεγγίσεις, όπως οι IATA (19). Απαιτούνται ωστόσο περισσότερες εργασίες, κατά προτίμηση με βάση αξιόπιστα δεδομένα για τον άνθρωπο, για να διαπιστωθεί ο τρόπος με τον οποίο τα αποτελέσματα της ανάλυσης KeratinoSens™ μπορούν να συμβάλουν στην εκτίμηση της ευαισθητοποιητικής ισχύος και στην κατάταξη ευαισθητοποιητικών ουσιών σε υποκατηγορίες κατά GHS/CLP.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Στη μέθοδο δοκιμών ARE-Nrf2/λουσιφεράσης χρησιμοποιείται μια αθανατοποιημένη προσκολλώμενη κυτταρική σειρά που προέρχεται από ανθρώπινα κερατινοκύτταρα HaCaT, σταθερά διαμολυσμένα με επιλέξιμο πλασμίδιο. Η κυτταρική σειρά περιέχει το γονίδιο της λουσιφεράσης υπό τον μεταγραφικό έλεγχο ενός ιδιοστατικού υποκινητή, συγχωνευμένου με στοιχείο ARE από γονίδιο που είναι γνωστό ότι υπερεκφράζεται υπό την επίδραση ουσιών ευαισθητοποιητικών με την επαφή (25) (26). Το σήμα της λουσιφεράσης εκφράζει την ενεργοποίηση, από τις ευαισθητοποιητικές ουσίες, γονιδίων εξαρτώμενων από τον ενδογενή παράγοντα Nrf2 και έχει αποδειχθεί ότι το σήμα αυτό στην ανασυνδυασμένη κυτταρική σειρά εξαρτάται από τον Nrf2 (27). Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατόν να μετρηθεί ποσοτικά (με ανίχνευση της φωταύγειας) η επαγωγή του γονιδίου της λουσιφεράσης, με τη χρήση καθιερωμένων φωτογόνων υποστρωμάτων λουσιφεράσης ως δείκτη της δραστικότητας του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 στα κύτταρα μετά από έκθεση σε ηλεκτρονιόφιλες ουσίες.

Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες θεωρούνται θετικές στην ανάλυση KeratinoSens™ εάν προκαλούν στατιστικά σημαντική επαγωγή δραστικότητας λουσιφεράσης, η οποία υπερβαίνει μια δεδομένη τιμή κατωφλίου (δηλ. > 1,5 φορές ή αύξηση κατά 50 %), σε συγκέντρωση χαμηλότερη από μια καθορισμένη τιμή που δεν επηρεάζει σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων [δηλ. σε συγκέντρωση κάτω των 1 000 μM και στην οποία η κυτταρική βιωσιμότητα υπερβαίνει το 70 % (9) (12)]. Για τον σκοπό αυτό, προσδιορίζεται η μέγιστη πολλαπλάσια επαγωγή δραστικότητας λουσιφεράσης (I_{max}) σε σχέση με (αρνητικό) μάρτυρα με διαλύτη. Επιπλέον, δεδομένου ότι τα κύτταρα εκτίθενται σε σειρά συγκεντρώσεων των υπό δοκιμή χημικών ουσιών, η αναγκαία συγκέντρωση για στατιστικά σημαντική επαγωγή δραστικότητας λουσιφεράσης που να υπερβαίνει την τιμή κατωφλίου (δηλ. η τιμή $EC_{1,5}$) θα πρέπει να υπολογίζεται με παρεμβολή από την καμπύλη δόσης-απόκρισης (για τους υπολογισμούς, βλ. παράγραφο 32). Τέλος, θα πρέπει να εκτελούνται παράλληλες μετρήσεις κυτταροτοξικότητας για να εκτιμάται αν τα επίπεδα επαγωγής δραστικότητας λουσιφεράσης εμφανίζονται σε υποκυτταροτοξικές συγκεντρώσεις.

Πριν εντάξουν στην καθημερινή πρακτική τον προσδιορισμό ARE-Nrf2/λουσιφεράσης σύμφωνα με την παρούσα μέθοδο δοκιμών, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα, χρησιμοποιώντας τις δέκα ουσίες ελέγχου ικανότητας που απαριθμούνται στο προσάρτημα 2.

Διατίθενται πρότυπα επιδόσεων (28) για να διευκολυνθεί η επικύρωση νέων ή τροποποιημένων μεθόδων δοκιμών ARE-Nrf2/λουσιφεράσης in vitro, ανάλογων με την ανάλυση KeratinoSens™, και να καταστεί δυνατή η έγκαιρη τροποποίηση της παρούσας μεθόδου δοκιμών ώστε να συμπεριληφθούν και αυτές. Η αμοιβαία αποδοχή δεδομένων (Mutual Acceptance of Data/MAD) βάσει της συμφωνίας του ΟΟΣΑ είναι διασφαλισμένη μόνο για μεθόδους δοκιμών που έχουν επικυρωθεί σύμφωνα με τα πρότυπα επιδόσεων, εφόσον αυτές έχουν κριθεί από τον ΟΟΣΑ και έχουν περιληφθεί στην αντίστοιχη κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών.

▼M7

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Επί του παρόντος, η μόνη τεχνική που καλύπτεται από την παρούσα μέθοδο δοκιμών είναι η επιστημονικά έγκυρη ανάλυση KeratinoSens™ (9) (12) (13) (14). Οι τυποποιημένες διαδικασίες λειτουργίας για την ανάλυση KeratinoSens™ είναι διαθέσιμες και θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατά την εφαρμογή και τη χρήση της μεθόδου δοκιμών στο εργαστήριο (15). Τα εργαστήρια που επιθυμούν να εφαρμόσουν τη μέθοδο δοκιμών μπορούν να αποκτήσουν την ανασυνδυασμένη κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται στην ανάλυση KeratinoSens™ συνάπτοντας συμφωνία παραχώρησης άδειας με τον φορέα ανάπτυξης της μεθόδου. Στις επόμενες παραγράφους περιγράφονται τα βασικά στοιχεία και διαδικασίες της μεθόδου δοκιμών ARE-Nrf2/λουσιφεράσης.

Παρασκευή των καλλιεργειών κερατινοκυττάρων

Θα πρέπει να χρησιμοποιείται διαγονιδιακή κυτταρική σειρά με σταθερή ένθεση του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο του στοιχείου ARE (π.χ. η κυτταρική σειρά KeratinoSens™). Μετά την παραλαβή, τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται (π.χ. 2 έως 4 ανακαλλιέργειες) και φυλάσσονται στην κατάψυξη ως ομοιογενές απόθεμα. Κύτταρα από αυτό το αρχικό απόθεμα μπορούν να πολλαπλασιαστούν έως τον μέγιστο αριθμό ανακαλλιεργειών (δηλ. 25 στην περίπτωση της KeratinoSens™) και χρησιμοποιούνται έπειτα στις δοκιμές ρουτίνας, με χρήση του κατάλληλου θρεπτικού μέσου διατήρησης (DMEM που περιέχει ορό και γενετικίνη στην περίπτωση της KeratinoSens™).

Για τη δοκιμή θα πρέπει τα κύτταρα να παρουσιάζουν συρροή 80-90 % και να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να διασφαλίζεται ότι δεν φθάνουν ποτέ σε πλήρη συρροή. Μία ημέρα πριν από τη δοκιμή, τα κύτταρα συλλέγονται και διανέμονται σε πλάκες 96 μικροκοιλοτήτων (10 000 κύτταρα/μικροκοιλότητα στην περίπτωση της KeratinoSens™). Θα πρέπει να καταβάλλεται προσοχή για την αποφυγή της καθίζησης κυττάρων κατά τον εμβολιασμό, ώστε να εξασφαλίζεται ομοιογενής κατανομή του αριθμού κυττάρων μεταξύ των μικροκοιλοτήτων. Σε αντίθετη περίπτωση, το στάδιο αυτό μπορεί να οδηγήσει σε υψηλή μεταβλητότητα μεταξύ των μικροκοιλοτήτων. Σε κάθε επανάληψη, χρησιμοποιούνται τρία πανομοιότυπα δείγματα για τις μετρήσεις της δραστικότητας λουσιφεράσης και ένα παράλληλο πανομοιότυπο δείγμα για τον ποσοτικό προσδιορισμό της βιωσιμότητας των κυττάρων.

Προετοιμασία των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων

Η προετοιμασία των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων γίνεται την ημέρα της δοκιμής. Για την ανάλυση KeratinoSens™, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες διαλύονται σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) μέχρι να επιτευχθεί η επιθυμητή τελική συγκέντρωση (π.χ. 200 mM). Τα διαλύματα σε DMSO μπορούν να θεωρηθούν αυτοαποστειρούμενα, οπότε δεν χρειάζεται αποστειρωτική διήθηση. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν είναι διαλυτές σε DMSO διαλύονται σε αποστειρωμένο νερό ή θρεπτικό μέσο καλλιέργειας και τα διαλύματα αποστειρώνονται, π.χ. με διήθηση. Σε περίπτωση υπό δοκιμή χημικής ουσίας χωρίς καθορισμένο μοριακό βάρος (MB), παρασκευάζεται διάλυμα παρακαταθήκης με προκαθορισμένη συγκέντρωση (40 mg/mL ή 4 % κ.β. στην ανάλυση KeratinoSens™). Εάν χρησιμοποιούνται άλλοι διαλύτες πλην του DMSO, του νερού ή του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας, πρέπει να παρέχεται επαρκής επιστημονική αιτιολόγηση.

Από τα διαλύματα παρακαταθήκης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε DMSO παρασκευάζεται σειρά αραιώσεων με DMSO ώστε να προκύψουν 12 κύριες συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (από 0,098 έως 200 mM στην ανάλυση KeratinoSens™). Όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι αδιάλυτη σε DMSO, οι αραιώσεις για να προκύψουν οι κύριες συγκεντρώσεις γίνονται με στείρο νερό ή στείρο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας. Ανεξάρτητα από τον χρησιμοποιούμενο διαλύτη, οι κύριες συγκεντρώσεις αραιώνονται έπειτα σε αναλογία 1:25 με θρεπτικό υλικό καλλιέργειας που περιέχει ορό και, τέλος, χρησιμοποιούνται για τη μεταχείριση μετά από μία ακόμη αραίωση 1:4, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας να κυμαίνεται από 0,98 έως 2 000 μM στην ανάλυση KeratinoSens™. Επιτρέπεται η χρήση εναλλακτικών συγκεντρώσεων, εφόσον αιτιολογείται (π.χ. σε περίπτωση κυτταροτοξικότητας ή χαμηλής διαλυτότητας).

Ο αρνητικός μάρτυρας (με διαλύτη) που χρησιμοποιείται στην ανάλυση KeratinoSens™ είναι το DMSO (αριθ. CAS 67-68-5, καθαρότητα, ≥ 99 %), για το οποίο διατίθενται έξι μικροκοιλότητες ανά πλάκα. Υφίσταται την ίδια αραίωση με εκείνη που περιγράφεται στην παράγραφο 22 για τις κύριες συγκεντρώσεις,

▼M7

έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση αρνητικού μάρτυρα (με διαλύτη) να είναι 1 %, που είναι γνωστό ότι δεν επηρεάζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων και αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του DMSO στην υπό δοκιμή χημική ουσία και στον θετικό μάρτυρα. Όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι αδιάλυτη σε DMSO και για τις αραιώσεις έχει χρησιμοποιηθεί νερό, τα επίπεδα DMSO στο τελικό διάλυμα δοκιμής σε όλες τις μικροκοιλότητες θα πρέπει να ρυθμίζονται σε 1 %, όπως και για τις άλλες υπό δοκιμή χημικές ουσίες και τους μάρτυρες.

Ο θετικός μάρτυρας που χρησιμοποιείται στην ανάλυση KeratinoSens™ είναι η κινναμωμική αλδεΰδη (αριθ. CAS 14371-10-9, ≥ 98 % καθαρότητα), της οποίας παρασκευάζεται σειρά 5 κύριων συγκεντρώσεων από 0,4 έως 6,4 mM σε DMSO (από διάλυμα παρακαταθήκης 6,4 mM) που αραιώνονται όπως περιγράφεται στην παράγραφο 22 για τις κύριες συγκεντρώσεις, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του θετικού μάρτυρα να κυμαίνεται από 4 έως 64 μM. Επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται και άλλοι κατάλληλοι θετικοί μάρτυρες, που να παρέχουν κατά προτίμηση τιμές $EC_{1,5}$ στο μέσο της κλίμακας, εάν υπάρχουν ιστορικά δεδομένα από τα οποία προκύπτουν συγκρίσιμα κριτήρια αποδοχής των μετρήσεων.

Εφαρμογή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων

Για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία και θετικό μάρτυρα, χρειάζεται ένα πείραμα για να προκύψει πρόβλεψη (θετική ή αρνητική), το οποίο συνίσταται σε δύο τουλάχιστον ανεξάρτητες σειρές επαναλήψεων, η καθεμία εις τριπλούν (δηλ. n = 6). Σε περίπτωση ασυμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο ανεξάρτητων σειρών επαναλήψεων, θα πρέπει να εκτελείται τρίτη σειρά επαναλήψεων εις τριπλούν (δηλ. n = 9). Κάθε ανεξάρτητη σειρά επαναλήψεων πραγματοποιείται διαφορετική ημέρα με πρόσφατο διάλυμα παρακαταθήκης των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και κύτταρα που έχουν συλλεγεί ανεξάρτητα. Τα κύτταρα μπορούν ωστόσο να προέρχονται από την ίδια ανακαλλιέργεια.

Μετά τον εμβολιασμό, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 20, τα κύτταρα καλλιεργούνται για 24 ώρες στις πλάκες μικροτιτλοδότησης των 96 μικροκοιλοτήτων. Στη συνέχεια, αφαιρείται το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας και αντικαθίσταται με νέο (150 μl θρεπτικού μέσου καλλιέργειας με ορό αλλά χωρίς γενετικίνη στην περίπτωση της KeratinoSens™), στο οποίο προστίθενται 50 μl των αραιωμένων σε αναλογία 1:25 υπό δοκιμή χημικών ουσιών και μαρτύρων. Τουλάχιστον μία μικροκοιλότητα ανά πλάκα θα πρέπει να αφήνεται κενή (χωρίς κύτταρα και μεταχείριση), ώστε να μετρηθούν οι τιμές υποβάθρου.

Οι πλάκες που έχουν υποβληθεί σε μεταχείριση επωάζονται έπειτα για 48 ώρες περίπου στους 37 ± 1 °C παρουσία 5 % CO_2 στην ανάλυση KeratinoSens™. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για την αποφυγή της εξάτμισης των πτητικών υπό δοκιμή χημικών ουσιών, καθώς και της διασταυρούμενης μόλυνσης των μικροκοιλοτήτων από τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες, π.χ. με κάλυψη των πλακών με μεμβράνη πριν από την επώαση με τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες.

Μετρήσεις της δραστικότητας λουσιφεράσης

Τρεις παράγοντες είναι καθοριστικής σημασίας για να εξασφαλιστούν οι ενδεδειγμένες αναγνώσεις ενδείξεων φωταύγειας:

— η επιλογή ευαίσθητου λουμινόμετρου,

— η χρήση σχήματος πλάκας με επαρκές ύψος για την αποφυγή της διασταυρούμενης μόλυνσης από φως· και

— η χρήση υποστρώματος λουσιφεράσης με επαρκή φωτεινή απόδοση ώστε να εξασφαλίζονται επαρκής ευαισθησία και χαμηλή μεταβλητότητα.

Πριν από τη δοκιμή, θα πρέπει να εφαρμόζεται η πειραματική διάταξη ελέγχου που περιγράφεται στο προσάρτημα 3, ώστε να εξασφαλίζεται ότι συντρέχουν οι εν λόγω τρεις παράγοντες.

Μετά τη 48ωρη έκθεση στην υπό δοκιμή χημική ουσία και στους μάρτυρες στην ανάλυση KeratinoSens™, τα κύτταρα εκπλένονται με φυσιολογικό ορό σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS) και προστίθεται σε κάθε μικροκοιλότητα το σχετικό ρυθμιστικό διάλυμα λύσης για την ανάγνωση των ενδείξεων φωταύγειας, το οποίο παραμένει για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

▼M7

Οι πλάκες με το κυτταρόλυμα τοποθετούνται έπειτα στο λουμινόμετρο για την ανάγνωση των ενδείξεων, η οποία στην ανάλυση KeratinoSens™ προγραμματίζεται ως εξής: i) προσθήκη του υποστρώματος λουσιφεράσης σε κάθε μικροκοιλότητα (ήτοι 50 μl), ii) αναμονή για 1 δευτερόλεπτο και iii) ολοκλήρωση της δραστικότητας λουσιφεράσης για 2 δευτερόλεπτα. Σε περίπτωση που χρησιμοποιούνται εναλλακτικές ρυθμίσεις, π.χ. ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο μοντέλο λουμινόμετρου, θα πρέπει να αιτιολογούνται. Επιπλέον, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί υπόστρωμα φωτοβολίας, υπό την προϋπόθεση ότι έχει ολοκληρωθεί με επιτυχία το πείραμα ποιοτικού ελέγχου που περιγράφεται στο προσάρτημα 3.

Εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας

Για τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας των κυττάρων στην ανάλυση KeratinoSens™, το θρεπτικό μέσο αντικαθίσταται μετά τη 48ωρη έκθεση με νέο θρεπτικό μέσο που περιέχει MTT [βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο, βρωμιούχο τετραζόλιο-κυανό του θειαζολυλίου· αριθ. CAS 298-93-1] και τα κύτταρα επωάζονται επί 4 ώρες στους 37 °C παρουσία 5 % CO_2. Το θρεπτικό μέσο με MTT απομακρύνεται και τα κύτταρα λύονται (π.χ. με την προσθήκη διαλύματος 10 % SDS σε κάθε κοιλότητα) καθ' όλη τη διάρκεια της νύκτας. Μετά από ανακίνηση μετριέται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 600 nm με φωτόμετρο.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αξιολόγηση των δεδομένων

Υπολογίζονται οι ακόλουθες παράμετροι στην ανάλυση KeratinoSens™:

— η μέγιστη μέση πολλαπλάσια επαγωγή δραστικότητας λουσιφεράσης (I_{max}) που παρατηρείται σε οποιαδήποτε συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και του θετικού μάρτυρα·

— η τιμή $EC_{1,5}$ που αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση στην οποία η επαγωγή δραστικότητας λουσιφεράσης υπερβαίνει την τιμή κατωφλίου 1,5x (δηλ. δραστικότητα λουσιφεράσης ενισχυμένη κατά 50 %)· και

— οι τιμές συγκέντρωσης IC_{50} και IC_{30} που αντιστοιχούν σε μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας κατά 50 % και 30 %.

— Η πολλαπλάσια επαγωγή δραστικότητας λουσιφεράσης υπολογίζεται από την εξίσωση 1 και η συνολική μέγιστη πολλαπλάσια επαγωγή (I_{max}) ως ο μέσος όρος των επιμέρους επαναλήψεων.

Εξίσωση 1:

$$\textit{πολλαπλάσια επαγωγή} = \frac{(L_{\textit{δείγμα}} - L_{\textit{τυφλό}})}{(L_{\textit{διαλύτης}} - L_{\textit{τυφλό}})}$$

όπου

$L_{δείγμα}$ η ανάγνωση της ένδειξης φωταύγειας στη μικροκοιλότητα που περιέχει την υπό δοκιμή χημική ουσία

$L_{τυφλό}$ η ανάγνωση της ένδειξης φωταύγειας στη μικροκοιλότητα του τυφλού πειράματος, που δεν περιέχει κύτταρα ούτε έχει υποβληθεί σε μεταχείριση

$L_{διαλύτης}$ η μέση ανάγνωση της ένδειξης φωταύγειας στις μικροκοιλότητες που περιέχουν κύτταρα και (αρνητικό) μάρτυρα με διαλύτη

Η $EC_{1,5}$ υπολογίζεται με γραμμική παρεμβολή σύμφωνα με την εξίσωση 2 και η συνολική $EC_{1,5}$ είναι ο γεωμετρικός μέσος των επιμέρους επαναλήψεων.

Εξίσωση 2:

$$EC1{,}5 = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1{,}5 - I_a}{I_b - I_a}\right) + C_a$$

▼M7

όπου

C_a η χαμηλότερη συγκέντρωση, σε μM, που επιφέρει > 1,5πλάσια επαγωγή

C_b η υψηλότερη συγκέντρωση, σε μM, που επιφέρει < 1,5πλάσια επαγωγή

I_a η πολλαπλάσια επαγωγή που μετράται στη χαμηλότερη συγκέντρωση η οποία επιφέρει > 1,5πλάσια επαγωγή (μέση τιμή των τριών μικροκοιλοτήτων επανάληψης)

I_b η πολλαπλάσια επαγωγή που μετράται στην υψηλότερη συγκέντρωση η οποία επιφέρει < 1,5πλάσια επαγωγή (μέση τιμή των τριών μικροκοιλοτήτων επανάληψης)Η βιωσιμότητα υπολογίζεται από την εξίσωση 3:

Εξίσωση 3:

$$\textit{βιωσιμότητα} = \frac{(V_{\textit{δείγμα}} - V_{\textit{τυφλό}})}{V_{\textit{διαλύτης}} - V_{\textit{τυφλό}}} \times 100$$

όπου

$V_{\text{δείγμα}}$ η ανάγνωση της ένδειξης φωταύγειας στη μικροκοιλότητα που περιέχει την υπό δοκιμή χημική ουσία

$V_{\text{τυφλό}}$ η ανάγνωση της ένδειξης απορρόφησης στη μικροκοιλότητα του τυφλού πειράματος, που δεν περιέχει κύτταρα ούτε έχει υποβληθεί σε μεταχείριση, κατά τη δοκιμή με MTT

$V_{\text{διαλύτης}}$ η μέση ανάγνωση της ένδειξης απορρόφησης στις μικροκοιλότητες που περιέχουν κύτταρα και (αρνητικό) μάρτυρα με διαλύτη κατά τη δοκιμή με MTT

Οι τιμές IC_{50} και IC_{30} υπολογίζονται με γραμμική παρεμβολή σύμφωνα με την εξίσωση 4 και οι συνολικές τιμές IC_{50} και IC_{30} είναι ο γεωμετρικός μέσος των επιμέρους επαναλήψεων.

Εξίσωση 4:

$$IC_x = (C_b - C_a) \times \left(\frac{(100 - x) - V_a}{V_b - V_a}\right) + C_a$$

όπου

X η % μείωση της βιωσιμότητας στη συγκέντρωση που πρόκειται να υπολογιστεί (50 για την IC_{50} και 30 για την IC_{30})

C_a η χαμηλότερη συγκέντρωση, σε μM, που αντιστοιχεί σε μείωση της βιωσιμότητας κατά > x %

C_b η υψηλότερη συγκέντρωση, σε μM, που αντιστοιχεί σε μείωση της βιωσιμότητας κατά < x %

V_a η % βιωσιμότητα στη χαμηλότερη συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε μείωση της βιωσιμότητας κατά > x %

V_b η % βιωσιμότητα στην υψηλότερη συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε μείωση της βιωσιμότητας κατά < x %

Για κάθε συγκέντρωση που εμφανίζει > 1,5πλάσια επαγωγή δραστικότητας λουσιφεράσης, υπολογίζεται η στατιστική σημαντικότητα (π.χ. με αμφίπλευρο έλεγχο t του Student), με σύγκριση των τιμών φωταύγειας για τα τρία δείγματα επανάληψης με τις τιμές φωταύγειας στις μικροκοιλότητες που περιέχουν τον (αρνητικό) μάρτυρα με διαλύτη, για να διαπιστωθεί αν η επαγωγή δραστικότητας λουσιφεράσης είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$). Η χαμηλότερη συγκέντρωση που επιφέρει > 1,5πλάσια επαγωγή δραστικότητας λουσιφεράσης είναι η τιμή που καθορίζει την τιμή $EC_{1,5}$. Σε κάθε περίπτωση, ελέγχεται αν η τιμή αυτή είναι χαμηλότερη από την τιμή IC_{30}, γεγονός που υποδηλώνει μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας μικρότερη από 30 % στη συγκέντρωση που καθορίζει την $EC_{1,5}$.

▼M7

Συνιστάται να ελέγχονται οπτικά τα δεδομένα με τη βοήθεια γραφικών παραστάσεων. Εάν δεν παρατηρείται σαφής καμπύλη δόσης-απόκρισης ή η προκύπτουσα καμπύλη δόσης-απόκρισης είναι διφασική (δηλ. τέμνει δύο φορές την τιμή κατωφλίου 1,5x), το πείραμα θα πρέπει να επαναλαμβάνεται για να εξακριβώνεται κατά πόσον πρόκειται για ειδική συμπεριφορά της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ή για τεχνητό πειραματικό αποτέλεσμα. Σε περίπτωση που η διφασική απόκριση είναι αναπαραγώγιμη σε ανεξάρτητο πείραμα, θα πρέπει να αναφέρεται η χαμηλότερη τιμή $EC_{1,5}$ (η συγκέντρωση στην οποία η καμπύλη τέμνει για πρώτη φορά την τιμή κατωφλίου 1,5x).

Στις σπάνιες περιπτώσεις όπου παρατηρείται στατιστικά μη σημαντική επαγωγή πάνω από την 1,5πλάσια, ακολουθούμενη από στατιστικά σημαντική επαγωγή σε υψηλότερη συγκέντρωση, τα αποτελέσματα από τη συγκεκριμένη επανάληψη θεωρούνται έγκυρα και θετικά μόνο εάν η στατιστικά σημαντική επαγωγή που υπερβαίνει την τιμή κατωφλίου 1,5x έχει προκύψει σε μη κυτταροτοξική συγκέντρωση.

Τέλος, για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες που επιφέρουν 1,5πλάσια ή και μεγαλύτερη επαγωγή ήδη στην κατώτατη συγκέντρωση δοκιμής των 0,98 μM, η τιμή $EC_{1,5}$ καθορίζεται σε < 0,98 με βάση οπτική εξέταση της καμπύλης δόσης-απόκρισης.

Κριτήρια αποδοχής

Όταν χρησιμοποιείται η ανάλυση KeratinoSens™ θα πρέπει να πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια αποδοχής. Πρώτον, η επαγωγή δραστικότητας λουσιφεράσης που επιτυγχάνεται με τον θετικό μάρτυρα κινναμωμική αλδεΰδη θα πρέπει να υπερβαίνει με στατιστικά σημαντική διαφορά την τιμή κατωφλίου 1,5x (π.χ. με έλεγχο t) σε μία τουλάχιστον από τις δοκιμασθείσες συγκεντρώσεις (4 έως 64 μM).

Δεύτερον, η τιμή $EC_{1,5}$ θα πρέπει να βρίσκεται εντός ορίου δύο τυπικών αποκλίσεων από την ιστορική μέση τιμή της εγκατάστασης δοκιμών (π.χ. μεταξύ 7 μM και 30 μM με βάση το σύνολο δεδομένων από την επικύρωση), η οποία θα πρέπει να επικαιροποιείται τακτικά. Επιπλέον, η μέση επαγωγή στις τρεις επαναλήψεις για την κινναμωμική αλδεΰδη σε συγκέντρωση 64 μM θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 2 και 8. Εάν δεν πληρούται το τελευταίο αυτό κριτήριο, η σχέση δόσης-απόκρισης για την κινναμωμική αλδεΰδη θα πρέπει να ελέγχεται προσεκτικά και οι δοκιμές μπορούν να γίνονται δεκτές μόνον εάν υπάρχει σαφής σχέση δόσης-απόκρισης με αύξηση της επαγωγής δραστικότητας λουσιφεράσης όταν αυξάνονται οι συγκεντρώσεις του θετικού μάρτυρα.

Τέλος, ο μέσος συντελεστής μεταβλητότητας των ενδείξεων φωταύγειας για τον αρνητικό μάρτυρα (με διαλύτη), το DMSO, θα πρέπει να είναι μικρότερος από 20 % σε κάθε σειρά επαναλήψεων, που συνίσταται σε δοκιμή 6 μικροκοιλοτήτων εις τριπλούν. Εάν η μεταβλητότητα είναι μεγαλύτερη, τα αποτελέσματα θα πρέπει να απορρίπτονται.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων και μοντέλο πρόβλεψης

Οι προβλέψεις KeratinoSens™ θεωρούνται θετικές εάν πληρούνται οι ακόλουθες 4 προϋποθέσεις στις 2 από 2 ή στις ίδιες 2 από 3 σειρές επαναλήψεων, διαφορετικά θεωρούνται αρνητικές (εικόνα 1):

1. η I_{max} είναι μεγαλύτερη από (>) 1,5x και παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τον (αρνητικό) μάρτυρα με διαλύτη (όπως προσδιορίζεται με αμφίπλευρο ασύζευκτο έλεγχο t του Student)·

2. η κυτταρική βιωσιμότητα είναι μεγαλύτερη από (>) 70 % στη χαμηλότερη συγκέντρωση που επιφέρει πάνω από 1,5πλάσια επαγωγή δραστικότητας λουσιφεράσης (δηλ. στη συγκέντρωση που καθορίζει την τιμή $EC_{1,5}$)·

3. η τιμή $EC_{1,5}$ είναι μικρότερη από (<) 1 000 μM (ή < 200 μg/ml για υπό δοκιμή χημικές ουσίες χωρίς καθορισμένο ΜΒ)·

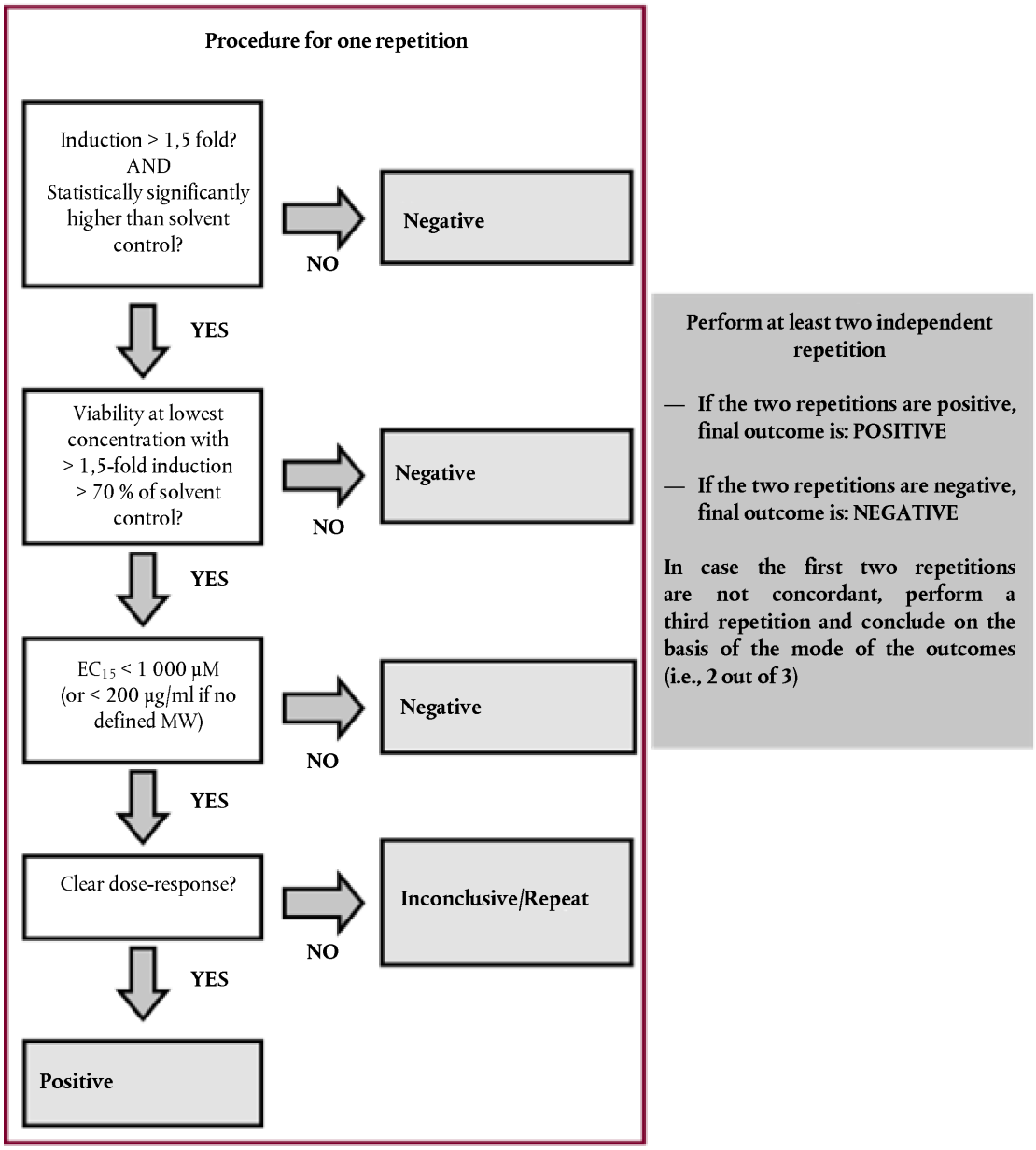
4. παρατηρείται εμφανής συνολική σχέση δόσης-απόκρισης για την επαγωγή λουσιφεράσης (ή διφασική απόκριση, όπως αναφέρεται στην παράγραφο 33).

▼M7

Εάν σε δεδομένη σειρά επαναλήψεων πληρούνται και οι τρεις πρώτες προϋποθέσεις, αλλά δεν παρατηρείται σαφής σχέση δόσης-απόκρισης για την επαγωγή λουσιφεράσης, το αποτέλεσμα της εν λόγω σειράς επαναλήψεων θα πρέπει να θεωρείται αβέβαιο και μπορεί να απαιτούνται περαιτέρω δοκιμές (σχήμα 1). Επιπλέον, ένα αρνητικό αποτέλεσμα με συγκεντρώσεις < 1 000 μM (ή < 200 μg/ml για υπό δοκιμή χημικές ουσίες χωρίς καθορισμένο MB) θα πρέπει επίσης να θεωρείται αβέβαιο (βλ. παράγραφο 11).

Σχήμα 1

Μοντέλο πρόβλεψης που χρησιμοποιείται στην ανάλυση KeratinoSens™. Οι προβλέψεις KeratinoSens™ θα πρέπει να εξετάζονται στο πλαίσιο ΙΑΤΑ και σύμφωνα με τις διατάξεις των παραγράφων 9 και 11.



Σε σπάνιες περιπτώσεις, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που επάγουν δραστικότητα λουσιφεράσης σε επίπεδα τα οποία προσεγγίζουν πολύ τα κυτταροτοξικά μπορεί σε ορισμένες σειρές επαναλήψεων να βρεθούν θετικές σε μη κυτταροτοξικά επίπεδα (δηλ. η συγκέντρωση που καθορίζει την $EC_{1,5}$ είναι μικρότερη από την IC_{30}), σε άλλες όμως σειρές επαναλήψεων να βρεθούν θετικές μόνο σε κυτταροτοξικά επίπεδα (δηλ. η συγκέντρωση που καθορίζει την $EC_{1,5}$ είναι μεγαλύτερη από την IC_{30}). Οι εν λόγω υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει

▼M7

να υποβάλλονται σε νέα δοκιμή με λεπτομερέστερη ανάλυση της σχέσης δόσης-απόκρισης, κατά την οποία να χρησιμοποιείται μικρότερος συντελεστής αραίωσης [π.χ. αραίωση 1:1,33 ή Ö2 (= 1,41) μεταξύ των μικροκοιλοτήτων], για να διαπιστωθεί αν επήλθε επαγωγή σε κυτταροτοξικά ή μη κυτταροτοξικά επίπεδα (9).

Έκθεση δοκιμής

Στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή ουσία

— Μονοσυστατική ουσία

  — Ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία·

  — Φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα, διαλυτότητα σε DMSO, μοριακό βάρος και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, εφόσον είναι διαθέσιμα·

  — Καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.·

  — Κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση)·

  — Ελεγχθείσα(-ες) συγκέντρωση(-εις)·

  — Συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα.

— Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγμα:

  — Χαρακτηρισμός, στο μέτρο του δυνατού, π.χ. χημική ταυτότητα (βλ. ανωτέρω), καθαρότητα, ποσότητα και σημαντικές φυσικοχημικές ιδιότητες (βλ. ανωτέρω) των συστατικών, εφόσον είναι διαθέσιμα·

  — Φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα, διαλυτότητα σε DMSO και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, εφόσον είναι διαθέσιμα·

  — Μοριακό βάρος ή φαινόμενο μοριακό βάρος στην περίπτωση των μειγμάτων/πολυμερών γνωστής σύνθεσης ή άλλες πληροφορίες που έχουν σημασία για τη διεξαγωγή της μελέτης·

  — Κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση)·

  — Ελεγχθείσα(-ες) συγκέντρωση(-εις)·

  — Συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα.

Μάρτυρες

— Θετικός μάρτυρας

  — Ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία·

  — Φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα, διαλυτότητα σε DMSO, μοριακό βάρος και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, στο μέτρο του δυνατού και ανάλογα με την περίπτωση·

  — Καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.·

  — Κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση)·

  — Ελεγχθείσα(-ες) συγκέντρωση(-εις)·

  — Συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα·

▼M7

— Παραπομπή σε ιστορικά αποτελέσματα θετικών μαρτύρων που καταδεικνύουν την εφαρμογή κατάλληλων κριτηρίων αποδοχής των μετρήσεων, εάν ισχύει.

— Αρνητικός μάρτυρας (με φορέα)

— Ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία·

— Καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.·

— Φυσική εμφάνιση, μοριακό βάρος, καθώς και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες σε περίπτωση χρήσης άλλων αρνητικών μαρτύρων/φορέων εκτός εκείνων που αναφέρονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών και εφόσον είναι διαθέσιμα·

— Συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα·

— Αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία.

Συνθήκες εφαρμογής της μεθόδου δοκιμών

— Όνομα και διεύθυνση του χορηγού, της εγκατάστασης δοκιμών και του διευθυντή της μελέτης·

— Περιγραφή της χρησιμοποιούμενης μεθόδου δοκιμών·

— Κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε, συνθήκες φύλαξης και πηγή της (π.χ. εγκατάσταση προέλευσης)·

— Αριθμός ανακαλλιεργειών και βαθμός συρροής των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν για τη δοκιμή·

— Μέθοδος καταμέτρησης κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό πριν από τη δοκιμή και τα μέτρα που εφαρμόστηκαν για να εξασφαλιστεί ομοιογενής κατανομή του αριθμού κυττάρων (πρβλ. παράγραφο 20)·

— Χρησιμοποιούμενο λουμινόμετρο (π.χ. μοντέλο), με τις ρυθμίσεις του οργάνου, χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα λουσιφεράσης και απόδειξη της ενδεδειγμένης ποιότητας των μετρήσεων φωταύγειας με βάση τη δοκιμή ποιοτικού ελέγχου που περιγράφεται στο προσάρτημα 3·

— Διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε για την απόδειξη της τεχνικής ικανότητας του εργαστηρίου όσον αφορά την εφαρμογή της μεθόδου δοκιμών (π.χ. με δοκιμές των ουσιών ελέγχου ικανότητας) ή για την απόδειξη της διαχρονικής αναπαραγωγιμότητας των επιδόσεων της μεθόδου.

Διαδικασία δοκιμής

— Αριθμός επαναλήψεων και σειρών επαναλήψεων που χρησιμοποιήθηκαν·

— Συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, διαδικασία εφαρμογής και χρόνος έκθεσης που χρησιμοποιήθηκαν (εάν διαφέρει από τον συνιστώμενο)·

— Περιγραφή των χρησιμοποιούμενων κριτηρίων αξιολόγησης και λήψης αποφάσεων·

— Περιγραφή των χρησιμοποιούμενων κριτηρίων αποδοχής της μελέτης·

— Περιγραφή τυχόν τροποποιήσεων της διαδικασίας δοκιμής.

Αποτελέσματα

— Πίνακας με τις τιμές I_{max}, $EC_{1,5}$ και βιωσιμότητας κυττάρων (δηλ. IC_{50}, IC_{30}) που προέκυψαν για την υπό δοκιμή χημική ουσία και τον θετικό μάρτυρα σε κάθε σειρά επαναλήψεων, καθώς και τις μέσες τιμές (I_{max}: μέσος όρος· τιμές $EC_{1,5}$ και βιωσιμότητας: γεωμετρικός μέσος) και SD που υπολογίστηκαν με τα δεδομένα από όλες τις σειρές επαναλήψεων και ένδειξη της κατάταξης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σύμφωνα με το μοντέλο πρόβλεψης·

▼M7

— Συντελεστής μεταβλητότητας των ενδείξεων φωταύγειας για τον αρνητικό μάρτυρα σε κάθε πείραμα·

— Γραφική παράσταση των καμπυλών δόσης-απόκρισης για την επαγωγή δραστικότητας λουσιφεράσης και τη βιωσιμότητα των κυττάρων·

— Περιγραφή κάθε άλλης σχετικής παρατήρησης, κατά περίπτωση.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

— Συζήτηση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης KeratinoSens™.

— Εξέταση των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών στο πλαίσιο της IATA, εάν υπάρχουν σχετικές πληροφορίες.

Συμπέρασμα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Διατίθεται στη διαδικτυακή διεύθυνση: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Paris.

(3) Adler S., Basketter D., Creton S., Pelkonen O., van Benthem J., Zuang V., Andersen K.E., Angers-Loustau A., Aptula A., Bal-Price A., Benfenati E., Bernauer U., Bessems J., Bois F.Y., Boobis A., Brandon E., Bremer S., Broschard T., Casati S., Coecke S., Corvi R., Cronin M., Daston G., Dekant W., Felter S., Grignard E., Gundert-Remy U., Heinonen T., Kimber I., Kleinjans J., Komulainen H., Kreiling R., Kreysa J., Leite S.B., Loizou G., Maxwell G., Mazzatorta P., Munn S., Pfuhler S., Phrakonkham P., Piersma A., Poth A., Prieto P., Repetto G., Rogiers V., Schoeters G., Schwarz M., Serafimova R., Tähti H., Testai E., van Delft J., van Loveren H., Vinken M., Worth A., Zaldivar J.M. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85, 367-485.

(4) Κεφάλαιο B.42 του παρόντος παραρτήματος: Ευαισθητοποίηση δέρματος Τοπική δοκιμασία λεμφαδένων

(5) Κεφάλαιο B.6 του παρόντος παραρτήματος: Ευαισθητοποίηση δέρματος:

(6) Κεφάλαιο B.50 του παρόντος παραρτήματος: Ευαισθητοποίηση δέρματος Τοπική δοκιμασία λεμφαδένων: DA.

(7) Κεφάλαιο B.51 του παρόντος παραρτήματος: Ευαισθητοποίηση δέρματος Τοπική δοκιμασία λεμφαδένων: BrdU-ELISA.

(8) Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. Toxicological Sciences 113, 284-292.

(9) Emter R., Ellis G., Natsch A. (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. Toxicology and Applied Pharmacology 245, 281-290.

(10) Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. Chem. Res. Toxicol. 18, 1779-1791.

▼M7

(11) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. Redox Biol. 1(1), 45-49.

(12) Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers *in vitro*: results of a ring-study in five laboratories. Toxicol. *In Vitro* 25, 733-744.

(13) Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology, 33, 1337-1352.

(14) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing, 42 pp. Available at: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.

(15) DB-ALM (INVITTOX) (2013) Protocol 155: KeratinoSens™, 17 pp. διαθέσιμο στη διεύθυνση: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index

(16) Natsch A., Emter R., Ellis G. (2009). Filling the concept with data: integrating data from different *in vitro* and *in silico* assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. Toxicol. Sci. 107, 106-121.

(17) Ball N., Cagen S., Carrillo J.C., Certa H., Eigler D., Emter R., Faulhammer F., Garcia C., Graham C., Haux C., Kolle S.N., Kreiling R., Natsch A., Mehling A. (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. Regul. Toxicol. Pharmacol. 60, 389-400.

(18) Bauch C., Kolle S.N., Ramirez T., Eltze T., Fabian E., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. Regul. Toxicol. Pharmacol. 63, 489-504.

(19) Jaworska J., Dancik Y., Kern P., Gerberick F., Natsch A. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. J Appl Toxicol. 33, 1353-1364.

(20) Andres E., Sa-Rocha V.M., Barrichello C., Haupt T., Ellis G., Natsch A. (2013). The sensitivity of the KeratinoSens™ assay to evaluate plant extracts: A pilot study. Toxicology *In Vitro* 27, 1220-1225.

(21) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch. Toxicol. 87, 1683-1969.

(22) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. Chemistry and Biology 17, 646-657.

(23) OECD (2012). BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 457. OECD, Paris.

(24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

(25) Gildea L.A., Ryan C.A., Foertsch L.M., Kennedy J.M., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2006). Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. J. Invest. Dermatol., 126, 1813-1822.

▼**M7**

(26) Ryan C.A., Gildea L.A., Hulette B.C., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2004). Gene expressing changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. Toxicol. Lett. 150, 301-316.

(27) Emter R., van der Veen J.W., Adamson G., Ezendam J., van Loveren H., Natsch A. (2013). Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. Toxicol. *in vitro* 27, 2225-2232.

(28) OECD (2015). Performance Standards for assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment N0 213, OECD, Paris.

(29) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No.34. OECD, Paris, France.

(30) NAFTA (North American Free Trade Agreement) (2012). Technical Working Group on Pesticides — (Quantitative) Structure Activity Relationship ((Q)SAR) Guidance Document. 186 pp. http://www.epa.gov/oppfead1/international/naftatwg/guidance/qsar-guidance.pdf

▼M7

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ορθότητα: η εγγύτητα της συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί κριτήριο επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών και μια από τις πτυχές της «καταλληλότητας». Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς την «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας μεθόδου δοκιμών (29).

AOP (Adverse Outcome Pathway/πορεία δυσμενούς έκβασης): αλληλουχία συμβάντων, από τη χημική δομή της χημικής ουσίας ή των ομοειδών χημικών ουσιών που αποτελούν στόχο μέχρι την υπό μελέτη έκβαση in vivo, μέσω του μοριακού εναρκτήριου συμβάντος (2).

ARE: στοιχείο απόκρισης στα αντιοξειδωτικά, από τα αρχικά των λέξεων Antioxidant Response Element (καλούμενο επίσης EpRE, electrophile response element/στοιχείο απόκρισης στα ηλεκτρονιόφιλα). Πρόκειται για ένα στοιχείο απόκρισης που εντοπίζεται στην περιοχή του ανάντη ευρισκόμενου υποκινητή πολλών κυτταροπροστατευτικών γονιδίων και γονιδίων φάσης ΙΙ. Όταν ενεργοποιείται από τον παράγοντα Nfr2, διαμεσολαβεί για τη μεταγραφική επαγωγή αυτών των γονιδίων.

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Συντελεστής μεταβλητότητας: μέτρο της μεταβλητότητας, που υπολογίζεται για μια ομάδα δεδομένων επανάληψης με διαίρεση της τυπικής απόκλισης διά της μέσης τιμής. Είναι δυνατόν να πολλαπλασιαστεί επί 100 για να εκφραστεί ως ποσοστό.

$EC_{1,5}$: η συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε 1,5πλάσια επαγωγή λουσιφεράσης και υπολογίζεται μέσω παρεμβολής.

IC_{30}: η συγκέντρωση που επιφέρει μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας κατά 30 %.

IC_{50}: η συγκέντρωση που επιφέρει μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας κατά 50 %.

Κίνδυνος: εγγενής ιδιότητα ενός παράγοντα ή μιας κατάστασης που μπορεί να έχει δυσμενείς επιδράσεις όταν οργανισμός, σύστημα ή (υπο)πληθυσμός εκτεθεί στον συγκεκριμένο παράγοντα.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment/Ολοκληρωμένη προσέγγιση για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση): δομημένη προσέγγιση που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του κινδύνου (δυναμικό), τον χαρακτηρισμό του κινδύνου (ισχύς) και/ή την εκτίμηση της ασφάλειας (δυναμικό/ισχύς και έκθεση) μιας χημικής ουσίας ή ομάδας χημικών ουσιών, στην οποία ενσωματώνονται και σταθμίζονται στρατηγικά όλα τα σχετικά δεδομένα, με σκοπό την τροφοδότηση ρυθμιστικών αποφάσεων σχετικά με τον δυνητικό κίνδυνο και/ή την επικινδυνότητα και/ή την ανάγκη για περαιτέρω στοχευμένες και, ως εκ τούτου, ελάχιστες δοκιμές.

I_{max}: ο μέγιστος συντελεστής επαγωγής δραστικότητας λουσιφεράσης σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (με διαλύτη), μετρούμενος σε οποιαδήποτε συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1 (σχετιζόμενη με την πρωτεΐνη Ech πρωτεΐνη τύπου Kelch 1). Πρόκειται για πρωτεΐνη-αισθητήρα που μπορεί να ρυθμίζει τη δραστικότητα του παράγοντα Nrf2. Υπό συνθήκες χωρίς επαγωγή, η πρωτεΐνη-αισθητήρας Keap1 σηματοδοτεί την ουβικινίνωση και την πρωτεολυτική αποδόμηση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 στο πρωτεόσωμα. Η ομοιοπολική τροποποίηση των δραστικών κυστεϊνικών καταλοίπων της πρωτεΐνης Keap1 από μικρά μόρια μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την απόσπαση του παράγοντα Nrf2 από την Keap1 (8) (10) (11)

▼M7

Μείγμα: μείγμα ή διάλυμα, αποτελούμενο από δύο ή περισσότερες ουσίες που δεν αντιδρούν μέσα σε αυτό (1).

Μονοσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας ένα κύριο συστατικό περιέχεται σε ποσοστό τουλάχιστον 80 % (κ.β.).

Πολυσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας περισσότερα από ένα κύρια συστατικά περιέχονται σε συγκέντρωση ≥ 10 % (κ.β.) και < 80 % (κ.β.). Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα μεταποιητικών διεργασιών. Η διαφορά μεταξύ μείγματος και πολυσυστατικής ουσίας είναι ότι το μείγμα λαμβάνεται με ανάμειξη δύο ή περισσότερων ουσιών, χωρίς χημική αντίδραση. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα χημικών αντιδράσεων.

Nrf2: Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (παράγοντας 2 όμοιος με τον πυρηνικό παράγοντα ερυθροειδών κυττάρων 2). Πρόκειται για μεταγραφικό παράγοντα που συμμετέχει στην πορεία απόκρισης στα αντιοξειδωτικά. Όταν ο Nrf2 δεν είναι ουβικιτινωμένος, συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα και μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου συνδυάζεται με το στοιχείο ARE στην περιοχή του ανάντη ευρισκόμενου υποκινητή πολλών κυτταροπροστατευτικών γονιδίων, εκκινώντας τη μεταγραφή τους (8) (10) (11).

Θετικός μάρτυρας: επανάληψη που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και υποβάλλεται σε μεταχείριση με ουσία που είναι γνωστό ότι επάγει θετική απόκριση. Για να διασφαλίζεται η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας της απόκρισης του θετικού μάρτυρα σε συνάρτηση με τον χρόνο, το μέγεθος της θετικής απόκρισης δεν θα πρέπει να είναι υπερβολικό.

Καταλληλότητα: περιγραφή της σχέσης της δοκιμής με την υπό μελέτη επίδραση και του κατά πόσον αυτή έχει σημασία και είναι χρήσιμη για συγκεκριμένο σκοπό. Πρόκειται για τον βαθμό στον οποίο η δοκιμή μετρά ή προβλέπει σωστά τη βιολογική επίδραση υπό μελέτη. Η καταλληλότητα εμπεριέχει συνεκτίμηση της ορθότητας (συμφωνίας) της μεθόδου δοκιμών (29).

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια μέθοδος δοκιμών μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, καθώς και της ενδοεργαστηριακής επαναληψιμότητας (29).

Αναπαραγωγιμότητα: η συμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τη διεξαγωγή δοκιμών με την ίδια χημική ουσία και με τη χρήση του ίδιου πρωτοκόλλου δοκιμών (βλ. αξιοπιστία) (29).

Ευαισθησία: το ποσοστό του συνόλου των θετικών/δραστικών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των μεθόδων δοκιμών (29).

Μάρτυρας με διαλύτη/φορέα: επανάληψη που περιέχει όλα τα στοιχεία του δοκιμαστικού συστήματος, εξαιρουμένης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, αλλά συμπεριλαμβανομένου του χρησιμοποιούμενου διαλύτη. Χρησιμοποιείται για τον καθορισμό της βασικής απόκρισης των δειγμάτων που υποβάλλονται σε μεταχείριση με την υπό δοκιμή ουσία, διαλυμένη στον ίδιο διαλύτη.

Ειδικότητα: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών/αδρανών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των μεθόδων δοκιμών (29).

Ουσία: τα χημικά στοιχεία και οι ενώσεις τους σε φυσική κατάσταση ή όπως λαμβάνονται με οποιαδήποτε παραγωγική διεργασία, στα οποία συμπεριλαμβάνονται όλα τα πρόσθετα που απαιτούνται για να διατηρείται η σταθερότητα του προϊόντος, καθώς και τυχόν προσμείξεις που προκύπτουν από τη χρησιμοποιούμενη διεργασία, αλλά από τα οποία εξαιρούνται οι διαλύτες που είναι δυνατόν να διαχωριστούν χωρίς να επηρεαστεί η σταθερότητα της ουσίας ούτε να μεταβληθεί η σύνθεσή της (1).

Υπό δοκιμή χημική ουσία: Ο όρος «υπό δοκιμή χημική ουσία» χρησιμοποιείται για να δηλώσει αυτό που υποβάλλεται σε δοκιμή.

▼**M7**

Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Προϊόντων των Ηνωμένων Εθνών (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) (GHS των Ηνωμένων Εθνών): σύστημα που προτείνει την ταξινόμηση των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) με βάση τυποποιημένα είδη και βαθμούς φυσικών κινδύνων και κινδύνων για την υγεία και το περιβάλλον και καλύπτει τα αντίστοιχα επικοινωνιακά στοιχεία, όπως εικονογράμματα, προειδοποιητικές λέξεις, δηλώσεις επικινδυνότητας, δηλώσεις προφύλαξης και δελτία δεδομένων ασφαλείας, για τη μετάδοση πληροφοριών σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις των εν λόγω προϊόντων με σκοπό την προστασία των ανθρώπων (εργοδοτών, εργαζομένων, μεταφορέων, καταναλωτών και διασωστών) και του περιβάλλοντος (1).

UVCB: ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, πολύπλοκα προϊόντα αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά.

Έγκυρη μέθοδος δοκιμών: μέθοδος δοκιμών που θεωρείται επαρκούς καταλληλότητας και αξιοπιστίας για συγκεκριμένο σκοπό και βασίζεται σε επιστημονικά τεκμηριωμένες αρχές. Οι μέθοδοι δοκιμών δεν είναι ποτέ έγκυρες με την απόλυτη σημασία του όρου, αλλά μόνο σε σχέση με καθορισμένο σκοπό (29).

▼M7

Προσάρτημα 2

ΟΥΣΙΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

Δερματική ευαισθητοποίηση in vitro: Μέθοδος δοκιμών ARE-Nrf2/λουσιφεράσης

Πριν εντάξουν στην καθημερινή πρακτική την παρούσα μέθοδο δοκιμών, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα επιτυγχάνοντας σωστά την αναμενόμενη πρόβλεψη βάσει της ανάλυσης KeratinoSens™ για τις 10 συνιστώμενες στον πίνακα 1 ουσίες ελέγχου ικανότητας, καθώς και τιμές $EC_{1,5}$ και IC_{50} εντός του αντίστοιχου εύρους τιμών αναφοράς για 8 τουλάχιστον από τις 10 ουσίες ελέγχου ικανότητας. Οι εν λόγω ουσίες ελέγχου ικανότητας επιλέχθηκαν ως αντιπροσωπευτικές του φάσματος αποκρίσεων όσον αφορά τους κινδύνους δερματικής ευαισθητοποίησης. Άλλα κριτήρια επιλογής ήταν το ότι είναι διαθέσιμες στο εμπόριο, ότι υπάρχουν υψηλής ποιότητας δεδομένα αναφοράς in vivo, καθώς και υψηλής ποιότητας δεδομένα in vitro που προέκυψαν από την ανάλυση KeratinoSens™.

Πίνακας 1

Συνιστώμενες ουσίες για την απόδειξη τεχνικής ικανότητας όσον αφορά την ανάλυση KeratinoSens™

Ουσίες ελέγχου ικανότητας	Αριθμός CAS	Φυσική μορφή	Ταξινόμηση In Vivo (1)	Πρόβλεψη βάσει της Keratino-Sens™ (2)	Εύρος τιμών αναφοράς $EC_{1,5}$ (μM) (3)	Εύρος τιμών αναφοράς IC_{50} (μM) (3)
Ισοπροπανόλη	67-63-0	Υγρό	Μη ευαισθητοποιητικό	Αρνητική	> 1 000	> 1 000
Σαλικυλικό οξύ	69-72-7	Στερεό	Μη ευαισθητοποιητικό	Αρνητική	> 1 000	> 1 000
Γαλακτικό οξύ	50-21-5	Υγρό	Μη ευαισθητοποιητικό	Αρνητική	> 1 000	> 1 000
Γλυκερόλη	56-81-5	Υγρό	Μη ευαισθητοποιητικό	Αρνητική	> 1 000	> 1 000
Κινναμωμυλική αλκοόλη	104-54-1	Στερεό	Ευαισθητοποιητικό (ασθενές)	Θετική	25 - 175	> 1 000
Διμεθακρυλικός εστέρας της αιθυλενογλυκόλης	97-90-5	Υγρό	Ευαισθητοποιητικό (ασθενές)	Θετική	5 - 125	> 500
2-Μερκαπτοβενζοθειαζόλιο	149-30-4	Στερεό	Ευαισθητοποιητικό (μετρίως)	Θετική	25 - 250	> 500
Μεθυλοδιβρωμογλουταρονιτρίλιο	35691-65-7	Στερεό	Ευαισθητοποιητικό (ισχυρό)	Θετική	< 20	20 - 100
Θειική 4-μεθυλαμινοφαινόλη	55-55-0	Στερεό	Ευαισθητοποιητικό (ισχυρό)	Θετική	< 12.5	20 - 200
2,4-Δινιτροχλωροβενζόλιο	97-00-7	Στερεό	Ευαισθητοποιητικό (εξαιρετικά)	Θετική	< 12.5	5 - 20

(1) Η πρόβλεψη in vivo για τον κίνδυνο (και την ισχύ) βασίζεται σε δεδομένα από LLNA (13). Η ισχύς in vivo συνάγεται με την εφαρμογή των κριτηρίων που έχει προτείνει το ECETOC (24).

(2) Οι προβλέψεις βάσει ανάλυσης KeratinoSens™ θα πρέπει να εξετάζονται στο πλαίσιο ΙΑΤΑ και σύμφωνα με τις διατάξεις των παραγράφων 9 και 11 της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

(3) Βάσει των ιστορικώς παρατηρούμενων τιμών (12).

▼M7

Προσάρτημα 3

ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ ΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ

Βασικό πείραμα για την εξασφάλιση βέλτιστων μετρήσεων φωταύγειας κατά την ανάλυση KeratinoSens™

Οι ακόλουθες τρεις παράμετροι είναι κρίσιμης σημασίας για να διασφαλιστεί η επίτευξη αξιόπιστων αποτελεσμάτων με το λουμινόμετρο:

— επαρκής ευαισθησία που εξασφαλίζει σταθερό σήμα υποβάθρου στις μικροκοιλότητες με τους μάρτυρες·

— απουσία βαθμίδωσης κατά μήκος της πλάκας λόγω μακρών χρόνων ανάγνωσης· και

— απουσία μόλυνσης των παρακείμενων μικροκοιλοτήτων από φως προερχόμενο από μικροκοιλότητες υψηλής δραστικότητας.

Πριν από τη δοκιμή συνιστάται να εξασφαλίζεται ότι οι μετρήσεις φωταύγειας είναι οι ενδεδειγμένες, με τον έλεγχο μιας πλάκας με τη διάταξη που περιγράφεται κατωτέρω (ανάλυση εις τριπλούν).

Διάταξη πλάκας για το πρώτο πείραμα εξάσκησης

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
Γ	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
Δ	**EGDMA 0,98**	**EGDMA 1,95**	**EGDMA 3,9**	**EGDMA 7,8**	**EGDMA 15,6**	**EGDMA 31,25**	**EGDMA 62,5**	**EGDMA 125**	**EGDMA 250**	**EGDMA 500**	**EGDMA 1000**	**EGDMA 2000**
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
ΣΤ	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
Z	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	**CA 4**	**CA 8**	**CA 16**	**CA 32**	**CA 64**	**Τυφλό**

EGDMA = διμεθακρυλικός εστέρας της αιθυλενογλυκόλης (αριθ. CAS: 97-90-5), ισχυρή επαγωγική χημική ουσία

CA = κινναμωμική αλδεΰδη, θετική ουσία αναφοράς (αριθ. CAS: 104-55-2)

Η ανάλυση ποιοτικού ελέγχου θα πρέπει να καταδεικνύει:

— σαφή σχέση δόσης-απόκρισης στη σειρά Δ, με I_{max} > 20πλάσιο της τιμής υποβάθρου (στις περισσότερες περιπτώσεις επιτυγχάνονται τιμές I_{max} μεταξύ 100 και 300)·

— απουσία σχέσης δόσης-απόκρισης στις σειρές Γ και Ε (καμία τιμή επαγωγής άνω του 1,5 — στην ιδανική περίπτωση, άνω του 1,3), οφειλόμενης σε πιθανή μόλυνση από φως, ιδίως δίπλα σε μικροκοιλότητες υψηλής δραστικότητας στη σειρά της EGDMA·

— απουσία στατιστικά σημαντικής διαφοράς μεταξύ των σειρών Α, Β, Γ, Ε, ΣΤ και Z (δηλ. απουσία βαθμίδωσης κατά μήκος της πλάκας)· και

— μεταβλητότητα κάτω του 20 % (δηλ. σταθερό σήμα υποβάθρου) σε οποιαδήποτε από τις σειρές Α, Β, Γ, Ε, ΣΤ και Z, καθώς και στις μικροκοιλότητες με DMSO της σειράς Η).

▼M7

B.61. ΜΈΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΏΝ ΔΙΑΡΡΟΗΣ ΦΛΟΥΟΡΕΣΚΕΪΝΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΌ ΔΙΑΒΡΩΤΙΚΏΝ ΚΑΙ ΙΣΧΥΡΏΝ ΕΡΕΘΙΣΤΙΚΏΝ ΤΩΝ ΟΦΘΑΛΜΏΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 460 του ΟΟΣΑ (2012). Η μέθοδος δοκιμών διαρροής φλουορεσκεΐνης (FL) αποτελεί μέθοδο δοκιμών in vitro που μπορεί να χρησιμοποιείται, υπό ορισμένες περιστάσεις και με ειδικούς περιορισμούς, για την ταξινόμηση χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) ως διαβρωτικών και ισχυρών ερεθιστικών των οφθαλμών, όπως ορίζονται στο Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Προϊόντων (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals/GHS) των Ηνωμένων Εθνών (κατηγορία 1), στον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων (Classification, Labelling and Packaging/CLP) ([1]) (κατηγορία 1) και από την Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος (Environmental Protection Agency/EPA) των ΗΠΑ (κατηγορία I) (1) (2). Για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου δοκιμών, ως ισχυρά οφθαλμικά ερεθιστικά ορίζονται οι χημικές ουσίες που, μετά τη χορήγησή τους, προκαλούν βλάβη στους οφθαλμικούς ιστούς η οποία δεν είναι αναστρέψιμη εντός 21 ημερών ή έχει ως αποτέλεσμα σοβαρή μείωση της όρασης, ενώ ως διαβρωτικά των οφθαλμών νοούνται οι χημικές ουσίες που προκαλούν μη αναστρέψιμη βλάβη στους οφθαλμικούς ιστούς. Οι εν λόγω χημικές ουσίες ταξινομούνται ως κατηγορίας 1 του GHS των Ηνωμένων Εθνών, κατηγορίας 1 του κανονισμού CLP της ΕΕ ή κατηγορίας I της EPA των ΗΠΑ.

Μολονότι η μέθοδος δοκιμών FL δεν θεωρείται έγκυρη ως πλήρες υποκατάστατο της οφθαλμικής δοκιμής in vivo σε κουνέλια, συνιστάται να χρησιμοποιείται στο πλαίσιο κλιμακωτής στρατηγικής δοκιμών για ταξινόμηση και επισήμανση, που επιβάλλεται από κανονιστικές ρυθμίσεις. Ως εκ τούτου, η μέθοδος δοκιμών FL συνιστάται ως αρχικό στάδιο στο πλαίσιο καθοδικής προσέγγισης (top-down) για τον προσδιορισμό διαβρωτικών/ισχυρών ερεθιστικών των οφθαλμών, ειδικά για περιορισμένα είδη χημικών προϊόντων (δηλ. υδατοδιαλυτές ουσίες και μείγματα) (3) (4).

Επί του παρόντος είναι γενικά αποδεκτό ότι, στο προβλέψιμο μέλλον, καμία μεμονωμένη δοκιμασία οφθαλμικού ερεθισμού in vitro δεν θα μπορεί να αντικαταστήσει την οφθαλμική δοκιμή in vivo [μέθοδος δοκιμών B.5 (5)] στην πρόβλεψη σε ολόκληρο το φάσμα ερεθιστικότητας από τις διαφορετικές τάξεις χημικών ουσιών. Εντούτοις, στοχευμένοι συνδυασμοί διαφόρων εναλλακτικών μεθόδων δοκιμών στο πλαίσιο (κλιμακωτής) στρατηγικής δοκιμών θα μπορούσαν ενδεχομένως να αντικαταστήσουν την οφθαλμική δοκιμή in vivo (4). Η καθοδική προσέγγιση (4) έχει σχεδιαστεί για να χρησιμοποιείται όταν, βάσει των διαθέσιμων πληροφοριών, μια χημική ουσία αναμένεται να έχει υψηλό δυναμικό ερεθιστικότητας.

Με βάση το μοντέλο πρόβλεψης που περιγράφεται λεπτομερώς στην παράγραφο 35, με τη μέθοδο δοκιμών FL είναι δυνατόν να προσδιοριστούν χημικές ουσίες που εμπίπτουν σε περιορισμένο πεδίο εφαρμογής ως διαβρωτικά/ισχυρά ερεθιστικά των οφθαλμών (κατηγορία 1 του GHS των Ηνωμένων Εθνών· κατηγορίας 1 του CLP της ΕΕ· κατηγορία I της EPA των ΗΠΑ), χωρίς περαιτέρω δοκιμές. Το ίδιο τεκμαίρεται για τα μείγματα, παρόλο που δεν χρησιμοποιήθηκαν μείγματα κατά την επικύρωση. Ως εκ τούτου, η μέθοδος δοκιμής FL μπορεί να χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ερεθιστικότητας και/ή διαβρωτικότητας χημικών ουσιών για τους οφθαλμούς, κατόπιν εφαρμογής της στρατηγικής διαδοχικών δοκιμών που προβλέπεται στη μέθοδο δοκιμών B.5 (5). Ωστόσο, οι χημικές ουσίες που, βάσει της μεθόδου δοκιμών FL, δεν προβλέπεται να είναι διαβρωτικά ή ισχυρά ερεθιστικά των οφθαλμών είναι αναγκαίο να ελέγχονται με μία ή περισσότερες πρόσθετες μεθόδους δοκιμών (in vitro και/ή in vivo), ικανές να προσδιορίσουν ορθά i) τις χημικές ουσίες που είναι in vitro ψευδώς αρνητικά διαβρωτικά/ισχυρά ερεθιστικά των οφθαλμών βάσει της μεθόδου FL (κατηγορία 1 του GHS των Ηνωμένων Εθνών· κατηγορίας 1 του CLP της ΕΕ· κατηγορία I της EPA των ΗΠΑ)· ii) τις χημικές ουσίες που δεν ταξινομούνται ως προς τη διάβρωση/τον ερεθισμό των οφθαλμών («καμία κατηγορία» του GHS των Ηνωμένων Εθνών· «καμία κατηγορία» του κανονισμού CLP της ΕΕ· κατηγορία IV

([1]) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων, την τροποποίηση και την κατάργηση των οδηγιών 67/548/ΕΟΚ και 1999/45/ΕΚ και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006, ΕΕ L 353 της 31.12.2008, σ. 1.

▼M7

της ΕΡΑ των ΗΠΑ)· και/ή iii) τις χημικές ουσίες που είναι μέτρια/ήπια ερεθιστικά των οφθαλμών (κατηγορίες 2A και 2B του GHS των Ηνωμένων Εθνών· κατηγορία 2 του CLP της ΕΕ· κατηγορίες II και III της ΕΡΑ των ΗΠΑ).

Σκοπός της παρούσας μεθόδου δοκιμών είναι η περιγραφή των διαδικασιών που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της δυνητικής διαβρωτικότητας ή ισχυρής ερεθιστικότητας των υπό δοκιμή χημικών ουσιών για τους οφθαλμούς, όπως αυτή μετράται από την ικανότητά τους να προκαλούν βλάβη σε αδιαπέραστη συνεχή (confluent) μονοστιβάδα επιθηλιακών κυττάρων. Η ακεραιότητα ως προς τη διεπιθηλιακή διαπερατότητα αποτελεί κύρια λειτουργία ενός επιθηλίου, όπως αυτό που συναντάται στον επιπεφυκότα και τον κερατοειδή. Η διεπιθηλιακή διαπερατότητα καθορίζεται από διάφορους στενοσυνδέσμους (tight junctions). Έχει αποδειχθεί ότι η αύξηση της διαπερατότητας του κερατοειδικού επιθηλίου in vivo συσχετίζεται με τον βαθμό της φλεγμονής και της επιφανειακής βλάβης που παρατηρούνται κατά την εξέλιξη του ερεθισμού των οφθαλμών.

Στη μέθοδο δοκιμών FL, οι τοξικές επιδράσεις μετά από σύντομης διάρκειας έκθεση στην υπό δοκιμή χημική ουσία μετρώνται με την αύξηση της διαπερατότητας, στη νατριούχο φλουορεσκεΐνη, της μονοστιβάδας επιθηλιακών κυττάρων νεφρού σκύλου Madin-Darby (Madin-Darby Canine Kidney/MDCK), τα οποία καλλιεργούνται σε διαπερατά ενθέματα. Η ποσότητα φλουορεσκεΐνης που διαρρέει είναι ανάλογη προς την επαγόμενη από τη χημική ουσία βλάβη στους στενοσυνδέσμους, στα δεσμοσώματα και στις κυτταρικές μεμβράνες και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση του δυναμικού οφθαλμικής τοξικότητας των υπό δοκιμή χημικών ουσιών. Στο προσάρτημα 1 παρατίθεται διάγραμμα κυττάρων MDCK καλλιεργημένων σε μεμβράνη ενθέματος για τη μέθοδο δοκιμών FL.

Οι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 2.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών βασίζεται στο πρωτόκολλο INVITTOX αριθ. 71 (6), το οποίο αξιολογήθηκε με διεθνή μελέτη επικύρωσης που εκπονήθηκε από το Ευρωπαϊκό Κέντρο για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (ECVAM), σε συνεργασία με τη Διυπηρεσιακή Συντονιστική Επιτροπή για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (ICCVAM) των ΗΠΑ και το Ιαπωνικό Κέντρο για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (JaCVAM).

Όπως κατέδειξε η μελέτη επικύρωσης, η μέθοδος δοκιμών FL δεν συνιστάται για τον προσδιορισμό χημικών ουσιών που θα πρέπει να ταξινομούνται ως ήπια/μέτρια ερεθιστικά ή διαβρωτικά ούτε χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) που δεν θα πρέπει να ταξινομούνται ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό (δηλ. κατηγορία 2A/2B, «καμία κατηγορία» του GHS. κατηγορία 2, «καμία κατηγορία» του κανονισμού CLP της ΕΕ· κατηγορίες II/III/IV της ΕΡΑ των ΗΠΑ) (3) (7).

Η μέθοδος δοκιμών εφαρμόζεται μόνο σε υδατοδιαλυτά χημικά προϊόντα (ουσίες και μείγματα). Το δυναμικό σοβαρού οφθαλμικού ερεθισμού των χημικών ουσιών που είναι υδατοδιαλυτές και/ή των οποίων η τοξική επίδραση δεν επηρεάζεται από την αραίωση προβλέπεται γενικά με ακρίβεια με τη χρήση της μεθόδου δοκιμών FL (7). Για να χαρακτηριστεί μια χημική ουσία υδατοδιαλυτή σε πειραματικές συνθήκες, θα πρέπει να είναι διαλυτή σε στείρο ισορροπημένο αλατούχο διάλυμα Hanks (Hanks' Balanced Salt Solution/HBSS), που περιέχει ασβέστιο (σε συγκέντρωση 1,0-1,8 mM) και δεν περιέχει ερυθρό της φαινόλης, σε συγκέντρωση ≥ 250 mg/ml (μία δόση πάνω από την τιμή αποκοπής των 100 mg/ml). Εάν, ωστόσο, η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι διαλυτή σε συγκέντρωση χαμηλότερη από 100 mg/ml, στην οποία όμως ήδη επάγει FL 20 % (δηλ. FL_{20} < 100 mg/ml), μπορεί να χαρακτηριστεί ουσία της κατηγορίας 1 του GHS ή κατηγορίας I της ΕΡΑ.

Οι περιορισμοί που προσδιορίστηκαν για την παρούσα μέθοδο δοκιμών συνίστανται στην εξαίρεση των ισχυρών οξέων και βάσεων, των μονιμοποιητικών των κυττάρων και των εξαιρετικά πτητικών χημικών ουσιών από το πεδίο εφαρμογής. Οι συγκεκριμένες χημικές ουσίες δρουν με μηχανισμούς που δεν μετρώνται με τη μέθοδο δοκιμών FL, π.χ. εκτεταμένη πήξη, σαπωνοποίηση ή ειδικές χημικές αντιδράσεις. Άλλοι περιορισμοί που προσδιορίστηκαν για την παρούσα μέθοδο βασίζονται στα αποτελέσματα που αφορούν την ικανότητα πρόβλεψης της μεθόδου σε περιπτώσεις έγχρωμων ή παχύρρευστων υπό δοκιμή χημικών ουσιών (7). Αναφέρεται ότι και τα δύο αυτά είδη χημικών ουσιών είναι δύσκολο να απομακρυνθούν από τη μονοστιβάδα μετά τη σύντομη περίοδο έκθεσης και προτείνεται

▼M7

να βελτιωθεί η ικανότητα πρόβλεψης της μεθόδου δοκιμών με την αύξηση του αριθμού των εφαρμοζόμενων σταδίων έκπλυσης.. Τα στερεά χημικά προϊόντα σε εναιώρημα σε υγρό έχουν την τάση να καθιζάνουν, γεγονός που δυσχεραίνει τον προσδιορισμό της τελικής συγκέντρωσης στα κύτταρα. Όταν εξαιρούνται από τη βάση δεδομένων οι ουσίες των συγκεκριμένων χημικών και φυσικών τάξεων, βελτιώνεται σημαντικά η ορθότητα της μεθόδου FL στα συστήματα ταξινόμησης της ΕΕ, της EPA και των Ηνωμένων Εθνών (GHS) (7).

Με βάση τον σκοπό της παρούσας μεθόδου δοκιμών (που είναι ο προσδιορισμός μόνο διαβρωτικών/ισχυρών ερεθιστικών των οφθαλμών), τα ποσοστά ψευδοαρνητικής έκβασης (βλ. παράγραφο 13) δεν είναι κρίσιμης σημασίας, δεδομένου ότι τέτοιες χημικές ουσίες θα υποβληθούν ακολούθως σε άλλες, επαρκώς επικυρωμένες δοκιμές in vitro ή σε κουνέλια, ανάλογα με τις κανονιστικές απαιτήσεις, με τη χρήση στρατηγικής διαδοχικών δοκιμών με βάση ανάλυση βάρους της απόδειξης (5) (βλ. επίσης παραγράφους 3 και 4).

Άλλοι περιορισμοί που προσδιορίστηκαν για τη μέθοδο δοκιμών FL βασίζονται στα ποσοστά ψευδοαρνητικής και ψευδοθετικής έκβασης. Όταν η μέθοδος δοκιμών FL χρησιμοποιείται ως αρχικό στάδιο στο πλαίσιο καθοδικής προσέγγισης για τον προσδιορισμό υδατοδιαλυτών διαβρωτικών/ισχυρών ερεθιστικών για τους οφθαλμούς ουσιών και μειγμάτων (κατηγορία 1 του GHS των Ηνωμένων Εθνών· κατηγορία 1 του CLP της ΕΕ· κατηγορία I της EPA των ΗΠΑ), το ποσοστό ψευδοθετικής έκβασης κυμαίνεται από 7 % (7/103· GHS των Ηνωμένων Εθνών και CLP της ΕΕ) έως 9 % (9/99· EPA των ΗΠΑ) και το ποσοστό ψευδοαρνητικής έκβασης από 54 % (15/28· EPA των ΗΠΑ) έως 56 % (27/48· GHS των Ηνωμένων Εθνών και CLP της ΕΕ) σε σύγκριση με τα αποτελέσματα δοκιμών in vivo. Οι χημικές κατηγορίες που παρουσιάζουν ψευδοθετικά και/ή ψευδοαρνητικά αποτελέσματα στη μέθοδο δοκιμών FL δεν ορίζονται εδώ.

Ορισμένοι τεχνικοί περιορισμοί αφορούν ειδικά την κυτταροκαλλιέργεια MDCK. Οι στενοσύνδεσμοι που εμποδίζουν τη διέλευση της χρωστικής νατριούχου φλουορεσκεΐνης μέσω της μονοστιβάδας υποβαθμίζονται όλο και περισσότερο όσο αυξάνεται ο αριθμός ανακαλλιεργειών των κυττάρων. Ο ατελής σχηματισμός στενοσυνδέσμων έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της FL στους μάρτυρες που δεν υποβάλλονται σε μεταχείριση. Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να καθορίζεται η μέγιστη επιτρεπτή διαρροή στους μάρτυρες που δεν υποβάλλονται σε μεταχείριση (βλ. παράγραφο 38: διαρροή 0 %). Όπως συμβαίνει με όλους τους προσδιορισμούς in vitro, υπάρχει πιθανότητα μετασχηματισμού των κυττάρων με την πάροδο του χρόνου και, ως εκ τούτου, είναι ζωτικής σημασίας να δηλώνεται ένα πεδίο αριθμών ανακαλλιεργειών για τις δοκιμές.

Το τρέχον πεδίο εφαρμογής θα μπορούσε να επεκταθεί σε ορισμένες περιπτώσεις, αλλά μόνο μετά από ανάλυση διευρυμένου συνόλου δεδομένων για μελετηθείσες υπό δοκιμή χημικές ουσίες, τα οποία θα έχουν κατά προτίμηση αποκτηθεί μέσω δοκιμών (3). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών θα επικαιροποιείται αναλόγως, μετά από εξέταση των νέων πληροφοριών και δεδομένων.

Τα εργαστήρια που διεξάγουν για πρώτη φορά την παρούσα δοκιμή πρέπει να χρησιμοποιούν τις χημικές ουσίες ελέγχου ικανότητας που προβλέπονται στο προσάρτημα 3. Τα εργαστήρια μπορούν να χρησιμοποιούν αυτές τις χημικές ουσίες για να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα εφαρμογής της μεθόδου δοκιμών FL, πριν από την υποβολή δεδομένων που έχουν προκύψει από αυτήν για την ταξινόμηση του κινδύνου στο πλαίσιο κανονιστικών ρυθμίσεων.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η μέθοδος δοκιμών FL είναι δοκιμή in vitro που βασίζεται στην κυτταροτοξικότητα και την κυτταρική λειτουργία και διεξάγεται σε συνεχή μονοστιβάδα κυλινδρικών επιθηλιακών κυττάρων MDCK CB997, τα οποία καλλιεργούνται σε ημιπερατά ενθέματα και μοντελοποιούν την εκτός πολλαπλασιασμού κατάσταση του κερατοειδικού επιθηλίου in vivo. Η κυτταρική σειρά MDCK είναι καθιερωμένη και σχηματίζει στενοσυνδέσμους και δεσμοσώματα παρόμοια με εκείνα που συναντώνται στην κορυφαία όψη των επιθηλίων του κερατοειδούς και του επιπεφυκότα. Οι στενοσύνδεσμοι και τα δεσμοσώματα αποτρέπουν in vivo τη διείσδυση διαλυμένων ουσιών και ξένων σωμάτων στο κερατοειδικό επιθήλιο. Η απώλεια διεπιθηλιακής αδιαπερατότητας, λόγω βλάβης των στενοσυνδέσμων και των δεσμοσωμάτων, είναι ένα από τα πρώτα συμβάντα στον επαγόμενο από χημική ουσία ερεθισμό των οφθαλμών.

▼M7

Η υπό δοκιμή χημική ουσία εφαρμόζεται στη συνεχή στιβάδα κυττάρων που καλλιεργούνται στην κορυφαία όψη του ενθέματος. Χρησιμοποιείται συνήθως σύντομη έκθεση 1 λεπτού, που αντιστοιχεί στη φυσιολογική ταχύτητα κάθαρσης κατά την έκθεση του ανθρώπου. Ένα πλεονέκτημα της σύντομης διάρκειας έκθεσης είναι η δυνατότητα υποβολής των υδατικής βάσης ουσιών και μειγμάτων στη δοκιμή ως έχουν, εάν είναι εύκολο να απομακρυνθούν μετά την περίοδο έκθεσης. Αυτό επιτρέπει πιο άμεσες συγκρίσεις των αποτελεσμάτων με τις χημικές επιδράσεις στον άνθρωπο. Στη συνέχεια απομακρύνεται η υπό δοκιμή χημική ουσία και προστίθεται στην κορυφαία όψη της μονοστιβάδας η μη τοξική και ισχυρά φθορίζουσα χρωστική νατριούχος φλουορεσκεΐνη για 30 λεπτά. Η βλάβη που προκαλεί η υπό δοκιμή χημική ουσία στους στενοσυνδέσμους προσδιορίζεται με βάση την ποσότητα φλουορεσκεΐνης που διαρρέει την κυτταρική στιβάδα εντός καθορισμένου χρονικού διαστήματος.

Η ποσότητα της χρωστικής νατριούχου φλουορεσκεΐνης που διέρχεται από τη μονοστιβάδα και τη μεμβράνη του ενθέματος για να καταλήξει σε καθορισμένο όγκο διαλύματος που περιέχεται στη μικροκοιλότητα (και στο οποίο διαρρέει η χρωστική) προσδιορίζεται με φασματοφθορισμομετρική μέτρηση της συγκέντρωσης της φλουορεσκεΐνης στη μικροκοιλότητα. Η έκταση της διαρροής φλουορεσκεΐνης (FL) υπολογίζεται από τις ενδείξεις έντασης φθορισμού (FI) που λαμβάνονται για δύο μάρτυρες χειρισμού: ένα τυφλό δείγμα και έναν μάρτυρα μέγιστης διαρροής. Το ποσοστό διαρροής και, κατ' επέκταση, η έκταση της βλάβης των στενοσυνδέσμων εκφράζεται σε σχέση με τους εν λόγω μάρτυρες, για κάθε καθορισμένη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Στη συνέχεια υπολογίζεται η τιμή FL_{20} (δηλ. η συγκέντρωση που προκαλεί FL 20 % σε σχέση με την τιμή που έχει καταγραφεί για τη συνεχή μονοστιβάδα χωρίς μεταχείριση και τα ενθέματα χωρίς κύτταρα. Η τιμή FL_{20} (mg/ml) χρησιμοποιείται στο μοντέλο πρόβλεψης για τον προσδιορισμό των διαβρωτικών και ισχυρών ερεθιστικών των οφθαλμών (βλ. παράγραφο 35).

Η αποκατάσταση αποτελεί σημαντικό μέρος των τοξικολογικών χαρακτηριστικών των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και αξιολογείται επίσης στη δοκιμή οφθαλμικού ερεθισμού in vivo. Προκαταρκτικές αναλύσεις έδειξαν ότι τα δεδομένα αποκατάστασης (έως 72 ώρες μετά την έκθεση στη χημική ουσία) θα μπορούσαν ενδεχομένως να ενισχύσουν την προβλεπτική ικανότητα του πρωτοκόλλου INVITTOX αριθ. 71, αλλά χρειάζεται περαιτέρω αξιολόγηση, για την οποία θα ήταν χρήσιμα πρόσθετα δεδομένα, που να έχουν κατά προτίμηση αποκτηθεί μέσω περαιτέρω δοκιμών (6). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών θα επικαιροποιείται αναλόγως, μετά από εξέταση των νέων πληροφοριών και δεδομένων.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Παρασκευή της κυτταρικής μονοστιβάδας

Η μονοστιβάδα κυττάρων MDCK CB997 παρασκευάζεται με τη χρήση κυττάρων με βαθμό συρροής κάτω του μέγιστου, τα οποία καλλιεργούνται σε φιάλες κυτταροκαλλιέργειας σε θρεπτικό μέσο DMEM/Nutrient Mix F 12 [πυκνό διάλυμα 1x με L-γλουταμίνη, HEPES 15 mM, ασβέστιο (σε συγκέντρωση 1,0-1,8 mM) και 10 % αδρανοποιημένου με θέρμανση FCS/FBS]. Είναι σημαντικό να περιέχουν όλα τα θρεπτικά μέσα/διαλύματα που χρησιμοποιούνται καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής FL ασβέστιο σε συγκέντρωση μεταξύ 1,0 mM (111 mg/l) και 1,8 mM (200 mg/l), ώστε να διασφαλίζονται ο σχηματισμός και η ακεραιότητα των στενοσυνδέσμων. Ο αριθμός των ανακαλλιεργειών θα πρέπει να ελέγχεται, ώστε να εξασφαλίζεται ομοιογενής και αναπαραγώγιμος σχηματισμός στενοσυνδέσμων. Ο αριθμός ανακαλλιεργειών θα πρέπει κατά προτίμηση να κυμαίνεται μεταξύ 3 και 30 από την απόψυξη των κυττάρων, διότι τα κύτταρα αυτού του εύρους έχουν παρόμοια λειτουργικότητα, γεγονός που υποβοηθεί την αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων της δοκιμής.

Πριν από την εφαρμογή της μεθόδου δοκιμών FL, τα κύτταρα αποσπώνται από τη φιάλη με θρυψινισμό, φυγοκεντρούνται και κατάλληλη ποσότητα αυτών εμβολιάζεται στα ενθέματα, τα οποία τοποθετούνται σε πλάκες 24 μικροκοιλοτήτων (βλ. προσάρτημα 1). Για τον εμβολιασμό των κυττάρων θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ενθέματα διαμέτρου 12 mm με μεμβράνη από μείγμα εστέρων της κυτταρίνης, πάχους 80-150 μm και μεγέθους πόρων 0,45 μm. Στη μελέτη επικύρωσης χρησιμοποιήθηκαν ενθέματα Millicell-HA των 12 mm. Οι ιδιότητες του τύπου ενθέματος και μεμβράνης είναι σημαντικές, καθώς ενδέχεται να επηρεάζουν την ανάπτυξη των κυττάρων και τον σχηματισμό χημικών δεσμών. Οι χημικές ουσίες ορισμένων ειδών ενδέχεται να δεσμευτούν στη μεμβράνη του ενθέματος Millicell-HA, με αποτέλεσμα να επηρεαστεί η ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Εάν χρησιμοποιούνται άλλες μεμβράνες, θα πρέπει να αποδεικνύεται η ισοδυναμία τους με τη χρήση χημικών ουσιών ελέγχου ικανότητας (βλ. προσάρτημα 3).

▼M7

Ο σχηματισμός χημικών δεσμών με τη μεμβράνη του ενθέματος είναι συνηθέστερος στην περίπτωση των κατιοντικών χημικών ουσιών, όπως το χλωριούχο βενζαλκόνιο, οι οποίες έλκονται προς τη φορτισμένη μεμβράνη (7). Οι εν λόγω δεσμοί είναι δυνατόν να αυξήσουν τον χρόνο έκθεσης στη χημική ουσία, με συνέπεια την υπερεκτίμηση του τοξικού δυναμικού της, αλλά μπορούν επίσης να μειώσουν με φυσικό τρόπο τη διαρροή φλουορεσκεΐνης από το ένθεμα, λόγω δέσμευσης της χρωστικής από την κατιοντική χημική ουσία που έχει συνδεθεί με τη μεμβράνη του ενθέματος, με αποτέλεσμα την υποεκτίμηση του τοξικού δυναμικού της. Το φαινόμενο αυτό παρακολουθείται εύκολα, με έκθεση μόνο της μεμβράνης στην υψηλότερη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και, στη συνέχεια, με προσθήκη της χρωστικής νατριούχου φλουορεσκεΐνης στην κανονική συγκέντρωση για τον συνήθη χρόνο (μάρτυρας χωρίς κύτταρα). Σε περίπτωση δέσμευσης της χρωστικής, η μεμβράνη του ενθέματος χρωματίζεται κίτρινη μετά την πλήρη έκπλυση του δοκιμίου. Συνεπώς, η γνώση των δεσμευτικών ιδιοτήτων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας είναι ουσιαστικής σημασίας για την ερμηνεία της επίδρασής της στα κύτταρα.

Με τον εμβολιασμό των κυττάρων στα ενθέματα θα πρέπει να σχηματίζεται συνεχής μονοστιβάδα κατά τον χρόνο της έκθεσης στη χημική ουσία. Θα πρέπει να προστίθενται $1,6 \times 10^5$ κύτταρα ανά ένθεμα (400 μl κυτταρικού αιωρήματος με πυκνότητα 4×10^2 κύτταρα/ml). Υπό τις συνθήκες αυτές, λαμβάνεται συνήθως συνεχής μονοστιβάδα μετά από 96 ώρες καλλιέργειας. Τα ενθέματα θα πρέπει να εξετάζονται οπτικά πριν από τον εμβολιασμό, ώστε να είναι βέβαιο ότι τυχόν βλάβες που θα καταγραφούν κατά τον οπτικό έλεγχο που περιγράφεται στην παράγραφο 30 οφείλονται στους χειρισμούς.

Οι κυτταροκαλλιέργειες MDCK θα πρέπει να φυλάσσονται σε επωαστήρες, σε ατμόσφαιρα με ύγρανση, 5 % ± 1 % CO_2 και θερμοκρασία 37 ± 1 °C. Τα κύτταρα θα πρέπει να μην έχουν μολυνθεί από βακτηρίδια, ιούς, μυκόπλασμα ή μύκητες.

Εφαρμογή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των ουσιών-μαρτύρων

Για κάθε σειρά μετρήσεων («γύρο») θα πρέπει να παρασκευάζεται νέο διάλυμα παρακαταθήκης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και να χρησιμοποιείται εντός 30 λεπτών από την παρασκευή του. Τα διαλύματα των υπό δοκιμή χημικών ουσιών θα πρέπει να παρασκευάζονται με HBSS χωρίς ερυθρό της φαινόλης, που περιέχει ασβέστιο (σε συγκέντρωση 1,0-1,8 mM), ώστε να αποφεύγεται η δέσμευση πρωτεϊνών του ορού. Η διαλυτότητα της χημικής ουσίας στο HBSS, σε συγκέντρωση 250 mg/ml, θα πρέπει να αξιολογείται πριν από τη δοκιμή. Εάν στη συγκέντρωση αυτή η χημική ουσία σχηματίζει σταθερό εναιώρημα ή γαλάκτωμα (δηλ. διατηρεί την ομοιογένειά της και δεν καθιζάνει ούτε διαχωρίζεται σε περισσότερες από μία φάσεις) για 30 λεπτά, το HBSS μπορεί να εξακολουθήσει να χρησιμοποιείται ως διαλύτης. Εάν όμως διαπιστωθεί ότι η ουσία είναι αδιάλυτη στο HBSS σε αυτή τη συγκέντρωση, θα πρέπει να εξεταστεί το ενδεχόμενο χρήσης άλλων μεθόδων δοκιμών αντί της FL. Η χρήση ελαφρού ορυκτελαίου ως διαλύτη, όταν διαπιστώνεται ότι η χημική ουσία είναι αδιάλυτη στο HBSS, θα πρέπει να μελετάται με προσοχή, δεδομένου ότι δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα για τη συναγωγή συμπεράσματος σχετικά με τις επιδόσεις της δοκιμής FL υπό τις συνθήκες αυτές.

Όλα τα διαλύματα των υπό δοκιμή χημικών ουσιών παρασκευάζονται από το διάλυμα παρακαταθήκης με αραίωση, με στείρο HBSS χωρίς ερυθρό της φαινόλης, που περιέχει ασβέστιο (σε συγκέντρωση 1,0-1,8 mM), σε πέντε σταθερές συγκεντρώσεις κατά βάρος προς όγκο: 1, 25, 100, 250 mg/ml και ένα αναραίωτο ή κορεσμένο διάλυμα. Όταν η δοκιμή διεξάγεται με στερεές χημικές ουσίες, θα πρέπει να περιλαμβάνεται μια πολύ υψηλή συγκέντρωση 750 mg/ml. Η συγκεκριμένη συγκέντρωση της χημικής ουσίας ενδέχεται να πρέπει να εφαρμοστεί στα κύτταρα με σιφώνιο θετικής εκτόπισης. Εάν διαπιστωθεί τοξικότητα σε συγκέντρωση μεταξύ 25 και 100 mg/ml, θα πρέπει να ελέγχονται δύο φορές οι ακόλουθες πρόσθετες συγκεντρώσεις: 1, 25, 50, 75, 100 mg/ml. Η τιμή FL_{20} θα πρέπει να συνάγεται από αυτές τις συγκεντρώσεις, υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται τα κριτήρια αποδοχής.

Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες εφαρμόζονται στις συνεχείς κυτταρικές μονοστιβάδες, αφού απομακρυνθεί το θρεπτικό μέσο κυτταροκαλλιέργειας και εκπλυθούν τα κύτταρα δύο φορές με στείρο, θερμό (37 °C) HBSS χωρίς ερυθρό της φαινόλης, που περιέχει ασβέστιο (σε συγκέντρωση 1,0-1,8 mM). Έχει προηγηθεί οπτικός έλεγχος των ηθμών για τυχόν προϋπάρχουσες βλάβες που θα μπορούσαν εσφαλμένα να αποδοθούν σε πιθανές ασυμβατότητες με τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες. Σε κάθε σειρά μετρήσεων απαιτούνται τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις

▼M7

(replicates) για κάθε συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και για τους μάρτυρες. Μετά από έκθεση διάρκειας 1 λεπτού σε θερμοκρασία δωματίου, θα πρέπει να απομακρύνεται προσεκτικά η υπό δοκιμή χημική ουσία με αναρρόφηση, να εκπλένεται η μονοστιβάδα δύο φορές με στείρο, θερμό (37 °C) HBSS χωρίς ερυθρό της φαινόλης, που περιέχει ασβέστιο (σε συγκέντρωση 1,0-1,8 mM), και να μετράται αμέσως η διαρροή φλουορεσκεΐνης.

Σε κάθε σειρά μετρήσεων θα πρέπει να χρησιμοποιούνται παράλληλοι αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες, για να καταδεικνύεται ότι η ακεραιότητα της μονοστιβάδας και η ευαισθησία των κυττάρων εμπίπτουν στο καθορισμένο ιστορικό εύρος τιμών αποδοχής. Ως θετικός μάρτυρας συνιστάται η χημική ουσία Brij 35 (αριθ. CAS 9002-92-0) σε συγκέντρωση 100 mg/ml. Η συγκέντρωση αυτή θα πρέπει να προκαλεί διαρροή φλουορεσκεΐνης σε ποσοστό 30 % περίπου (το αποδεκτό εύρος ποσοστών διαρροής φλουορεσκεΐνης, δηλ. βλαβών στην κυτταρική στιβάδα, είναι 20-40 %). Ως αρνητικός μάρτυρας συνιστάται το διάλυμα HBSS χωρίς ερυθρό της φαινόλης, που περιέχει ασβέστιο (σε συγκέντρωση 1,0-1,8 mM) (τυφλός μάρτυρας χωρίς μεταχείριση). Σε κάθε σειρά μετρήσεων θα πρέπει επίσης να περιλαμβάνεται μάρτυρας μέγιστης διαρροής, ώστε να μπορούν να υπολογιστούν οι τιμές FL_{20}. Η μέγιστη διαρροή προσδιορίζεται με τη χρησιμοποίηση ενός ενθέματος-μάρτυρα χωρίς κύτταρα.

Προσδιορισμός της διαπερατότητας στη φλουορεσκεΐνη

Αμέσως μετά την απομάκρυνση των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων, προστίθενται στα ενθέματα (π.χ. Millicell-HA) 400 μl διαλύματος νατριούχου φλουορεσκεΐνης 0,1 mg/ml [0,01 % (κ.β.) σε HBSS χωρίς ερυθρό της φαινόλης, που περιέχει ασβέστιο (σε συγκέντρωση 1,0-1,8 mM)]. Οι καλλιέργειες διατηρούνται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στο τέλος της επώασης με φλουορεσκεΐνη, τα ενθέματα αφαιρούνται με προσοχή από κάθε μικροκοιλότητα. Κάθε ηθμός υποβάλλεται σε οπτικό έλεγχο και καταγράφεται κάθε βλάβη που μπορεί να έχει προκληθεί κατά τους χειρισμούς.

Η ποσότητα φλουορεσκεΐνης που διαρρέει μέσω της μονοστιβάδας και του ενθέματος προσδιορίζεται ποσοτικά στο διάλυμα που απομένει στις μικροκοιλότητες μετά την αφαίρεση των ενθεμάτων. Οι μετρήσεις εκτελούνται με φασματοφθορισμόμετρο σε μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής 485 nm και 530 nm αντίστοιχα. Η ευαισθησία του φασματοφθορισμόμετρου θα πρέπει να ρυθμίζεται κατά τρόπο ώστε να επιτυγχάνεται η μέγιστη αριθμητική διαφορά μεταξύ της μέγιστης FL (ένθεμα χωρίς κύτταρα) και της ελάχιστης (ένθεμα με συνεχή μονοστιβάδα που υποβάλλεται σε μεταχείριση με τον αρνητικό μάρτυρα). Λόγω των διαφορών μεταξύ των χρησιμοποιούμενων φασματοφθορισμόμετρων, προτείνεται η ευαισθησία που αποδίδει ένταση φθορισμού > 4 000 για τον μάρτυρα μέγιστης διαρροής φλουορεσκεΐνης. Η μέγιστη τιμή FL δεν θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 9 999. Η ένταση φθορισμού που αντιστοιχεί στη μέγιστη διαρροή θα πρέπει να βρίσκεται εντός της γραμμικής κλίμακας ενδείξεων του χρησιμοποιούμενου φασματοφθορισμόμετρου.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων και μοντέλο πρόβλεψης

Η έκταση της FL είναι ανάλογη προς τη βλάβη που επάγει η χημική ουσία στους στενοσυνδέσμους. Το ποσοστό FL για κάθε εξεταζόμενη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας υπολογίζεται από τις τιμές FL που προκύπτουν για την ουσία σε σχέση με τις τιμές FL για τον αρνητικό μάρτυρα (ανάγνωση από τη συνεχή μονοστιβάδα κυττάρων που υποβάλλεται σε μεταχείριση με τον αρνητικό μάρτυρα) και τον μάρτυρα μέγιστης διαρροής (ανάγνωση της έκτασης της FL σε ένθεμα χωρίς κύτταρα).

Μέση ένταση φθορισμού που αντιστοιχεί στη μέγιστη διαρροή = x

Μέση ένταση φθορισμού που αντιστοιχεί σε διαρροή 0 % (αρνητικός μάρτυρας) = y

Η μέση διαρροή 100 % υπολογίζεται με αφαίρεση της μέσης διαρροής 0 % από τη μέση μέγιστη διαρροή,

δηλ. x – y = z

Το ποσοστό διαρροής για κάθε καθορισμένη δόση υπολογίζεται με αφαίρεση της διαρροής 0 % από τη μέση τιμή των ενδείξεων έντασης φθορισμού των τριών επαναλήψεων (m) και διαίρεση της προκύπτουσας διαφοράς διά της διαρροής 100 %, ήτοι %FL = [(m-y)/z] × 100 %, όπου:

▼M7

m = η μέση ένταση φθορισμού των τριών επαναληπτικών μετρήσεων για την εκάστοτε συγκέντρωση

% FL = το ποσοστό φλουορεσκεΐνης που διαρρέει την κυτταρική στιβάδα

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της χημικής ουσίας που προκαλεί FL 20 % θα πρέπει να εφαρμόζεται η ακόλουθη εξίσωση:

$$FL_D = [(A-B) / (C-B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

όπου:

D = % αναστολής

A = % βλάβης (ποσοστό διαρροής φλουορεσκεΐνης 20 %)

B = % διαρροής φλουορεσκεΐνης < A

C = % διαρροής φλουορεσκεΐνης > A

M_C = συγκέντρωση (mg/ml) που αντιστοιχεί στο C

M_B = συγκέντρωση (mg/ml) που αντιστοιχεί στο B

Η τιμή αποκοπής FL_{20} για την πρόβλεψη της ταξινόμησης χημικών ουσιών ως διαβρωτικών/ισχυρών ερεθιστικών των οφθαλμών είναι η εξής:

FL_{20} (mg/ml)	T&E βάσει του GHS των Ηνωμένων Εθνών	T&E βάσει του CLP της ΕΕ	T&E κατά EPA των ΗΠΑ
≤ 100	Κατηγορία 1	Κατηγορία 1	Κατηγορία I

T&E: ταξινόμηση και επισήμανση

Η μέθοδος δοκιμών FL συνιστάται μόνο για τον προσδιορισμό των υδατοδιαλυτών διαβρωτικών και ισχυρών ερεθιστικών των οφθαλμών (κατηγορία 1 του GHS των Ηνωμένων Εθνών, κατηγορία 1 του CLP της ΕΕ, κατηγορία I της EPA των ΗΠΑ) (βλ. παραγράφους 1 και 10).

Για τον προσδιορισμό υδατοδιαλυτού χημικού προϊόντος (ουσίας ή μείγματος) (3) (6) (7), ως προϊόντος που «προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη» (κατηγορία 1 του GHS των Ηνωμένων Εθνών/CLP της ΕΕ) ή ως «διαβρωτικού ή ισχυρού ερεθιστικού των οφθαλμών» (κατηγορία I της EPA των ΗΠΑ), η υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να επάγει $FL_{20} \leq 100$ mg/ml.

Αποδοχή αποτελεσμάτων

Η μέση τιμή μέγιστης διαρροής φλουορεσκεΐνης (x) θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 4 000 (βλ. παράγραφο 31), η μέση διαρροή 0 % (y) να είναι ίση με 300 ή μικρότερη και η μέση διαρροή 100 % (z) να κυμαίνεται μεταξύ 3 700 και 6 000.

Η δοκιμή θεωρείται αποδεκτή εάν ο θετικός μάρτυρας προκαλεί βλάβη στην κυτταρική στιβάδα σε ποσοστό 20 % έως 40 % (μετρούμενη ως % διαρροής φλουορεσκεΐνης).

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Δεδομένα

Για κάθε σειρά μετρήσεων, θα πρέπει να αναφέρονται σε μορφή πίνακα τα δεδομένα που προέκυψαν για κάθε μικροκοιλότητα επανάληψης (π.χ. τιμές έντασης φθορισμού και υπολογισμένα επί τοις εκατό ποσοστά FL για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία, συμπεριλαμβανομένης της ταξινόμησής της). Επιπλέον, θα πρέπει να αναφέρονται οι μέσες τιμές ± SD από τις επιμέρους μετρήσεις επανάληψης σε κάθε σειρά μετρήσεων.

▼M7

Έκθεση δοκιμής

Στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημικές ουσίες και μάρτυρες

— Χημική/-ές ονομασία/-ες, όπως ο συντακτικός τύπος που χρησιμοποιείται από την υπηρεσία Chemical Abstracts Service (CAS), συνοδευόμενη/-ες από άλλες ονομασίες, εάν είναι γνωστές·

— αριθμός CAS, εφόσον είναι γνωστός·

— καθαρότητα και σύνθεση της ουσίας ή του μείγματος (σε κατά βάρος εκατοστιαία αναλογία), εφόσον τα στοιχεία αυτά είναι διαθέσιμα·

— φυσικοχημικές ιδιότητες που έχουν σημασία για τη διεξαγωγή της μελέτης (π.χ. φυσική κατάσταση, πτητικότητα, pH, σταθερότητα, υδατοδιαλυτότητα, χημική τάξη)·

— κατεργασία της υπό δοκιμή χημικής ουσίας/των μαρτύρων πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, κονιοποίηση)·

— συνθήκες αποθήκευσης.

Αιτιολόγηση της μεθόδου και του πρωτοκόλλου δοκιμής που χρησιμοποιούνται

— Θα πρέπει να περιλαμβάνει εκτιμήσεις όσον αφορά το πεδίο εφαρμογής και τους περιορισμούς της μεθόδου δοκιμών·

Συνθήκες δοκιμής

— περιγραφή του χρησιμοποιηθέντος κυτταρικού συστήματος, που περιλαμβάνει πιστοποιητικό γνησιότητας και την κατάσταση της κυτταρικής σειράς από πλευράς μυκοπλάσματος·

— λεπτομέρειες σχετικά με τη χρησιμοποιούμενη διαδικασία δοκιμής·

— χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας·

— διάρκεια έκθεσης στην υπό δοκιμή χημική ουσία·

— διάρκεια επώασης με φλουορεσκεΐνη·

— περιγραφή τυχόν τροποποιήσεων της διαδικασίας δοκιμής·

— περιγραφή των χρησιμοποιούμενων κριτηρίων αξιολόγησης·

— παραπομπή σε ιστορικά δεδομένα του μοντέλου (π.χ. αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες, ουσίες συγκριτικής αξιολόγησης, κατά περίπτωση)·

— πληροφορίες σχετικά με την απόδειξη της τεχνικής ικανότητας του εργαστηρίου.

Αποτελέσματα

— Πίνακας με τα δεδομένα για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία και μάρτυρα από κάθε σειρά μετρήσεων και κάθε επανάληψη μέτρησης (ατομικά αποτελέσματα, μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις)·

— ταξινόμηση(-εις) στην οποία κατέληξε η δοκιμή, με αναφορά του μοντέλου πρόβλεψης και/ή των κριτηρίων απόφασης που χρησιμοποιήθηκαν·

— περιγραφή άλλων επιδράσεων που παρατηρήθηκαν.

▼**M7**

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

— Θα πρέπει να περιλαμβάνει εκτιμήσεις σε περίπτωση αβέβαιης έκβασης (παράγραφος 35: FL_{20} > 100 mg/ml) και τις περαιτέρω δοκιμές·

Συμπεράσματα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Διατίθεται στη διαδικτυακή διεύθυνση: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]

(2) U.S. EPA (1996), Label Review Manual: 2nd Edition, EPA737-B-96-001, Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency.

(3) EC-ECVAM (2009), Statement on the scientific validity of cytotoxicity/cell-function based *in vitro* assays for eye irritation testing.

(4) Scott, L. *et al.* (2010), A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches, *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9

(5) Κεφάλαιο B.5 του παρόντος παραρτήματος, *Οξείας μορφής ερεθισμός/διάβρωση των οφθαλμών*.

(6) EC-ECVAM (1999), INVITOX Protocol 71: Fluorescein Leakage Test, Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). Διατίθεται στη διαδικτυακή διεύθυνση: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu

(7) EC-ECVAM (2008), Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing.

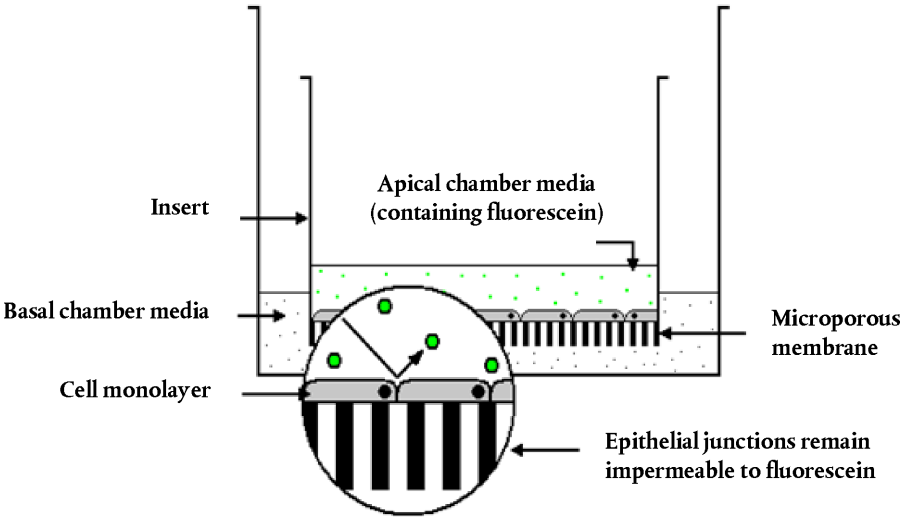
(8) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, OECD Series on Testing and Assessment No. 34. OECD, Paris.

▼M7

Προσάρτημα 1

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ MDCK ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΜΕΝΩΝ ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΕΝΘΕΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΔΟΚΙΜΩΝ FL

Καλλιεργείται συρρέουσα μονοστιβάδα κυττάρων MDCK πάνω στην ημιπερατή μεμβράνη ενθεμάτων. Τα ενθέματα τοποθετούνται στις μικροκοιλότητες πλακών των 24 μικροκοιλοτήτων.



Πηγή του σχήματος: Wilkinson, P.J. (2006), Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure, Ph.D. Thesis, University of Nottingham, UK.

▼M7

Προσάρτημα 2

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ορθότητα: η εγγύτητα της συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί κριτήριο επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών και μια από τις πτυχές της «καταλληλότητας». Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς την «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας μεθόδου δοκιμών.

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Κατηγορία I της EPA: χημικές ουσίες που προκαλούν διάβρωση (μη αναστρέψιμη καταστροφή οφθαλμικού ιστού) ή προσβολή ή ερεθισμό του κερατοειδούς που εμμένει για περισσότερες από 21 ημέρες (2).

CLP της ΕΕ (κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 σχετικά με την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων): κανονισμός με τον οποίο εφαρμόζεται στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) το σύστημα GHS των Ηνωμένων Εθνών για την ταξινόμηση των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων).

Ποσοστό ψευδοαρνητικής έκβασης: το ποσοστό του συνόλου των θετικών χημικών ουσιών που εσφαλμένα χαρακτηρίζεται αρνητικό με μια μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί έναν από τους δείκτες επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών.

Ποσοστό ψευδοθετικής έκβασης: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών χημικών ουσιών που εσφαλμένα χαρακτηρίζεται θετικό με μια μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί έναν από τους δείκτες επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών.

FL_{20}: μπορεί να υπολογιστεί κατ' εκτίμηση με προσδιορισμό της συγκέντρωσης στην οποία η υπό δοκιμή χημική ουσία προκαλεί διαρροή φλουορεσκεΐνης από την κυτταρική στιβάδα σε ποσοστό 20 %.

Διαρροή φλουορεσκεΐνης: η ποσότητα φλουορεσκεΐνης που διέρχεται μέσω της κυτταρικής στιβάδας, μετρούμενη με φασματοφθορισμομετρία.

GHS (Globally Harmonised System for the Classification and Labelling of Chemicals by the United Nations/Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα των Ηνωμένων Εθνών για την Ταξινόμηση και Επισήμανση των Χημικών Προϊόντων): σύστημα που προτείνει την ταξινόμηση των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) με βάση τυποποιημένα είδη και βαθμούς φυσικών κινδύνων και κινδύνων για την υγεία και το περιβάλλον και καλύπτει τα αντίστοιχα επικοινωνιακά στοιχεία, όπως εικονογράμματα, προειδοποιητικές λέξεις, δηλώσεις επικινδυνότητας, δηλώσεις προφύλαξης και δελτία δεδομένων ασφαλείας, για τη μετάδοση πληροφοριών σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις των εν λόγω προϊόντων, με σκοπό την προστασία των ανθρώπων (εργοδοτών, εργαζομένων, μεταφορέων, καταναλωτών και διασωστών) και του περιβάλλοντος (1).

Κατηγορία 1 του GHS: πρόκληση βλάβης στους οφθαλμικούς ιστούς ή σοβαρής μείωσης της όρασης, κατόπιν εφαρμογής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην πρόσθια επιφάνεια του οφθαλμού, η οποία δεν είναι πλήρως αναστρέψιμη εντός 21 ημερών από την εφαρμογή.

Κίνδυνος: εγγενής ιδιότητα ενός παράγοντα ή μιας κατάστασης που μπορεί να έχει δυσμενείς επιδράσεις όταν οργανισμός, σύστημα ή (υπο)πληθυσμός εκτεθεί στον συγκεκριμένο παράγοντα.

Μείγμα: χρησιμοποιείται στο πλαίσιο του GHS των Ηνωμένων Εθνών για να δηλώσει μείγμα ή διάλυμα που αποτελείται από δύο ή περισσότερες ουσίες που δεν αντιδρούν μέσα σε αυτό.

Αρνητικός μάρτυρας: δείγμα επανάληψης (replicate) που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και δεν υποβάλλεται σε μεταχείριση. Το δείγμα αυτό υποβάλλεται σε δοκιμή μαζί με τα δείγματα που έχουν υποβληθεί σε μεταχείριση με την υπό δοκιμή χημική ουσία και με άλλα δείγματα-μάρτυρες, ούτως ώστε να διαπιστώνεται αν ο διαλύτης αλληλεπιδρά με το σύστημα δοκιμής.

▼M7

Δεν ταξινομείται: χημική ουσία που δεν ταξινομείται ως ερεθιστικό των οφθαλμών κατηγορίας 1, 2A ή 2B του GHS των Ηνωμένων Εθνών· κατηγορίας 1 ή 2 του CLP της ΕΕ 2· ή κατηγορίας I, II ή III της EPA των ΗΠΑ.

Διαβρωτικό των οφθαλμών: α) χημική ουσία που προκαλεί μη αναστρέψιμη βλάβη στους οφθαλμικούς ιστούς· β) χημική ουσία που ταξινομείται ως ερεθιστικό των οφθαλμών κατηγορίας 1 του GHS των Ηνωμένων Εθνών· κατηγορίας 1 του CLP της ΕΕ· ή κατηγορίας I της EPA των ΗΠΑ.

Ερεθιστικό των οφθαλμών: α) χημική ουσία που προκαλεί αναστρέψιμη βλάβη στους οφθαλμικούς ιστούς κατόπιν εφαρμογής στην πρόσθια επιφάνεια του οφθαλμού· β) χημική ουσία που ταξινομείται ως ερεθιστικό των οφθαλμών κατηγορίας 2A ή 2B του GHS των Ηνωμένων Εθνών· κατηγορίας 2 του CLP της ΕΕ· ή κατηγορίας II ή III της EPA των ΗΠΑ.

Ισχυρό ερεθιστικό των οφθαλμών: α) χημική ουσία που προκαλεί βλάβη στους οφθαλμικούς ιστούς, κατόπιν εφαρμογής στην πρόσθια επιφάνεια του οφθαλμού, η οποία δεν είναι αναστρέψιμη εντός 21 ημερών από την εφαρμογή, ή που προκαλεί σοβαρή μείωση της όρασης· β) χημική ουσία που ταξινομείται ως ερεθιστικό των οφθαλμών κατηγορίας 1 του GHS των Ηνωμένων Εθνών· κατηγορίας 1 του CLP της ΕΕ· ή κατηγορίας I της EPA των ΗΠΑ.

Θετικός μάρτυρας: δείγμα επανάληψης που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και υποβάλλεται σε μεταχείριση με χημική ουσία που είναι γνωστό ότι προκαλεί θετική απόκριση. Για να διασφαλίζεται η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας της απόκρισης του θετικού μάρτυρα σε συνάρτηση με τον χρόνο, το μέγεθος της σοβαρής απόκρισης δεν θα πρέπει να είναι υπερβολικό.

Χημικές ουσίες ελέγχου ικανότητας: υποσύνολο του καταλόγου χημικών ουσιών αναφοράς, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί από εργαστήριο που δεν διαθέτει πείρα στην επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών αναφοράς, προκειμένου να αποδείξει τη σχετική τεχνική του ικανότητα.

Καταλληλότητα: περιγραφή της σχέσης της δοκιμής με την υπό μελέτη επίδραση και του κατά πόσον αυτή έχει σημασία και είναι χρήσιμη για συγκεκριμένο σκοπό. Πρόκειται για τον βαθμό στον οποίο η δοκιμή μετρά ή προβλέπει σωστά τη βιολογική επίδραση υπό μελέτη. Η καταλληλότητα εμπεριέχει συνεκτίμηση της ορθότητας (συμφωνίας) της μεθόδου δοκιμών (8).

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια μέθοδος δοκιμών μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, καθώς και της ενδοεργαστηριακής επαναληψιμότητας.

Δοκιμή υποκατάστασης: δοκιμή που έχει σχεδιαστεί για να υποκαταστήσει δοκιμή χρησιμοποιούμενη στην καθημερινή πρακτική, και η οποία θεωρείται αποδεκτή για τον προσδιορισμό του κινδύνου και/ή την εκτίμηση κινδύνου και η οποία, όπως έχει διαπιστωθεί, εξασφαλίζει ισοδύναμη ή βελτιωμένη προστασία της υγείας του ανθρώπου ή των ζώων ή του περιβάλλοντος, κατά περίπτωση, σε σύγκριση με την αποδεκτή δοκιμή, για όλες τις πιθανές περιστάσεις δοκιμής και όλες τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες.

Ευαισθησία: το ποσοστό του συνόλου των θετικών/δραστικών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των μεθόδων δοκιμών (8).

Σοβαρή οφθαλμική βλάβη: η πρόκληση βλάβης στους ιστούς των οφθαλμών ή η σοβαρή μείωση της όρασης, η οποία εμφανίζεται μετά την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην εμπρόσθια επιφάνεια του οφθαλμού και δεν είναι πλήρως αναστρέψιμη εντός 21 ημερών από την εφαρμογή της ουσίας.

Μάρτυρας με διαλύτη/φορέα: δείγμα που δεν υποβάλλεται σε μεταχείριση και περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής, συμπεριλαμβανομένου του διαλύτη ή του φορέα. Το δείγμα αυτό υποβάλλεται σε δοκιμή μαζί με τα δείγματα που έχουν υποβληθεί σε μεταχείριση με την υπό δοκιμή χημική ουσία και με άλλα δείγματα-μάρτυρες, με σκοπό τον καθορισμό της βασικής απόκρισης των δειγμάτων που υποβάλλονται σε μεταχείριση με την υπό δοκιμή χημική

▼M7

ουσία διαλυμένη στον ίδιο διαλύτη ή φορέα. Όταν το εν λόγω δείγμα υποβάλλεται σε δοκιμή με παράλληλο αρνητικό μάρτυρα, καταδεικνύει επίσης αν ο διαλύτης ή ο φορέας αλληλεπιδρά με το σύστημα δοκιμής.

Ειδικότητα: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών/αδρανών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των μεθόδων δοκιμών.

Ουσία: χρησιμοποιείται στο πλαίσιο του GHS των Ηνωμένων Εθνών για να δηλώσει τα χημικά στοιχεία και τις ενώσεις τους σε φυσική κατάσταση ή όπως λαμβάνονται με οποιαδήποτε παραγωγική διεργασία, στα οποία συμπεριλαμβάνονται όλα τα πρόσθετα που απαιτούνται για να διατηρείται η σταθερότητα του προϊόντος καθώς και τυχόν προσμείξεις που προκύπτουν από τη χρησιμοποιούμενη διεργασία, αλλά από τα οποία εξαιρούνται οι διαλύτες που είναι δυνατόν να διαχωριστούν χωρίς να επηρεαστεί η σταθερότητα της ουσίας ούτε να μεταβληθεί η σύνθεσή της.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Κλιμακωτή στρατηγική δοκιμών: στρατηγική δοκιμών κατά στάδια, στο πλαίσιο της οποίας όλες οι υφιστάμενες πληροφορίες για μια υπό δοκιμή χημική ουσία εξετάζονται με συγκεκριμένη σειρά, με χρήση διαδικασίας βάρους της απόδειξης σε κάθε στάδιο, προκειμένου να διαπιστώνεται, πριν από τη μετάβαση στο επόμενο στάδιο, αν διατίθενται επαρκείς πληροφορίες για να ληφθεί απόφαση περί ταξινόμησης κινδύνου. Εάν σε υπό δοκιμή χημική ουσία μπορεί να αποδοθεί δυναμικό ερεθιστικότητας βάσει των υφιστάμενων πληροφοριών, δεν απαιτούνται περαιτέρω δοκιμές. Εάν βάσει των υφιστάμενων πληροφοριών δεν είναι εφικτή η απόδοση δυναμικού ερεθιστικότητας σε υπό δοκιμή χημική ουσία, εφαρμόζεται κλιμακωτή διαδικασία διαδοχικών δοκιμών σε ζώα έως ότου καταστεί εφικτή η βέβαιη ταξινόμηση της ουσίας.

Επικυρωμένη μέθοδος δοκιμών: μέθοδος δοκιμών για την οποία έχουν ολοκληρωθεί μελέτες επικύρωσης προκειμένου να προσδιοριστούν η καταλληλότητα (συμπεριλαμβανομένης της ορθότητας) και η αξιοπιστία της για συγκεκριμένο σκοπό. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι επιδόσεις επικυρωμένης μεθόδου δοκιμών από πλευράς ορθότητας και αξιοπιστίας ενδέχεται να μην επαρκούν για να κριθεί αποδεκτή για τον προτεινόμενο σκοπό (8).

Βάρος της απόδειξης: η διαδικασία εξέτασης της ισχύος και των αδυναμιών διαφόρων πληροφοριών για τη συναγωγή και την τεκμηρίωση συμπεράσματος σχετικά με το δυναμικό κινδύνου που ενέχει μια χημική ουσία.

▼M7

Προσάρτημα 3

ΟΥΣΙΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΔΟΚΙΜΩΝ FL

Πριν εντάξουν την παρούσα μέθοδο δοκιμών στη συνήθη πρακτική, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα προσδιορίζοντας σωστά την ταξινόμηση της οφθαλμικής διαβρωτικότητας των 8 συνιστώμενων στον πίνακα 1 χημικών ουσιών. Οι ουσίες αυτές επιλέχθηκαν ως αντιπροσωπευτικές του φάσματος αποκρίσεων έναντι τοπικού(-ής) ερεθισμού/διάβρωσης των οφθαλμών, το οποίο βασίζεται σε αποτελέσματα της οφθαλμικής δοκιμής in vivo σε κουνέλια [TG 405, μέθοδος δοκιμών B.5 (5)] (δηλ. κατηγορίες 1, 2A, 2B και «δεν ταξινομείται» σύμφωνα με το GHS των Ηνωμένων Εθνών). Λαμβανομένης, ωστόσο, υπόψη της επικυρωμένης χρησιμότητας της δοκιμής FL (δηλ. για τον προσδιορισμό μόνο διαβρωτικών/ισχυρών ερεθιστικών των οφθαλμών), η τεχνική ικανότητα αποδεικνύεται μόνο με δύο εκβάσεις δοκιμών για τους σκοπούς της ταξινόμησης (διαβρωτικό/ισχυρό ερεθιστικό ή μη διαβρωτικό/μη ισχυρό ερεθιστικό). Άλλα κριτήρια επιλογής αφορούσαν τη διαθεσιμότητα των χημικών ουσιών στο εμπόριο και την ύπαρξη υψηλής ποιότητας δεδομένων αναφοράς in vivo, καθώς και δεδομένων υψηλής ποιότητας που έχουν προκύψει με τη μέθοδο δοκιμών FL. Για τον λόγο αυτό, οι χημικές ουσίες ελέγχου ικανότητας επιλέχθηκαν από το έγγραφο«Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing» (έγγραφο επισκόπησης των διαθέσιμων δεδομένων σχετικά με τον προσδιορισμό της διαρροής φλουορεσκεΐνης ως εναλλακτική μέθοδο δοκιμών οφθαλμικού ερεθισμού) (8), το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την αναδρομική επικύρωση της μεθόδου δοκιμών FL.

Πίνακας 1

Συνιστώμενες χημικές ουσίες για την απόδειξη τεχνικής ικανότητας ως προς τη δοκιμή FL

Χημική ουσία	Αριθ. CAS	Χημική κατηγορία (1)	Φυσική μορφή	Ταξινόμηση In Vivo (2)	Ταξινόμηση In Vitro (3)
Χλωριούχο βενζαλκόνιο (5 %)	8001-54-5	Ένωση κατιόντων υδριδίων	Υγρό	Κατηγορία 1	Διαβρωτικό/Ισχυρό ερεθιστικό
Υδροχλωρική προμεθαζίνη	58-33-3	Αμίνη/Αμιδίνη, Ετεροκυκλική ένωση, Οργανοθειούχος ένωση	Στερεό	Κατηγορία 1	Διαβρωτικό/Ισχυρό ερεθιστικό
Υδροξείδιο του νατρίου (10 %)	1310-73-2	Άλκαλι	Υγρό	Κατηγορία 1	Διαβρωτικό/Ισχυρό ερεθιστικό
Λαυρυλοθειικό νάτριο (15 %)	151-21-3	Καρβοξυλικό οξύ (άλας)	Υγρό	Κατηγορία 1	Διαβρωτικό/Ισχυρό ερεθιστικό
4-Καρβοξυβενζαλδεΰδη	619-66-9	Καρβοξυλικό οξύ, Αλδεΰδη	Στερεό	Κατηγορία 2(A)	Μη διαβρωτικό/Μη ισχυρό ερεθιστικό
Νιτρικό αμμώνιο	6484-52-2	Ανόργανο άλας	Στερεό	Κατηγορία 2(A)	Μη διαβρωτικό/Μη ισχυρό ερεθιστικό
2-Μεθυλακετοξικός αιθυλεστέρας	609-14-3	Κετόνη, εστέρας	Υγρό	Κατηγορία 2(B)	Μη διαβρωτικό/Μη ισχυρό ερεθιστικό
Γλυκερόλη	56-81-5	Αλκοόλη	Υγρό	Καμία κατηγορία	Μη διαβρωτικό/Μη ισχυρό ερεθιστικό

Συντμήσεις: Αριθ. CAS = Αριθμός μητρώου της υπηρεσίας Chemical Abstract Service

(1) Κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία κατατάχθηκε σε χημική κατηγορία σύμφωνα με πρότυπο σύστημα ταξινόμησης, το οποίο βασίζεται στο σύστημα ταξινόμησης Medical Subject Headings (MeSH) της National Library of Medicine (θεματικές επικεφαλίδες ιατρικού περιεχομένου της Εθνικής Ιατρικής Βιβλιοθήκης, διατίθεται στη διαδικτυακή διεύθυνση https://www.nlm.nih.gov/mesh/).

(2) Βάσει αποτελεσμάτων της οφθαλμικής δοκιμής in vivo σε κουνέλια (TG 405 του ΟΟΣΑ, μέθοδος δοκιμών B.5) και σύμφωνα με το GHS των Ηνωμένων Εθνών και τον κανονισμό CLP της ΕΕ.

(3) Βάσει αποτελεσμάτων που προέκυψαν με τη μέθοδο FL [πρωτόκολλο INVITTOX αριθ. 71 (6)]

▼M7

Β.62. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΌΣ COMET IN VIVO ΣΕ ΑΛΚΑΛΙΚΈΣ ΣΥΝΘΉΚΕΣ ΣΕ ΘΗΛΑΣΤΙΚΆ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 489 του ΟΟΣΑ (2016). Ο προσδιορισμός comet (ηλεκτροφόρηση μοναδιαίων κυττάρων σε πήκτωμα) in vivo σε αλκαλικές συνθήκες (στο εξής καλούμενος απλώς «προσδιορισμός comet») χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ρήξεων των κλώνων του DNA σε κύτταρα ή πυρήνες που απομονώνονται συγχρόνως από διαφορετικούς ιστούς ζώων, συνήθως τρωκτικών, τα οποία έχουν εκτεθεί σε δυνητικά γονιδιοτοξικές ύλες. Ο προσδιορισμός comet επανεξετάστηκε από διάφορες ομάδες εμπειρογνωμόνων που δημοσίευσαν συστάσεις (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών αποτελεί μέρος μιας σειράς μεθόδων δοκιμών γενετικής τοξικολογίας. Έχει συνταχθεί ένα έγγραφο του ΟΟΣΑ με συνοπτικές πληροφορίες για τις δοκιμές γενετικής τοξικολογίας και μια επισκόπηση των πρόσφατων αλλαγών που έγιναν σε αυτές τις κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών (11).

Σκοπός του προσδιορισμού comet είναι ο εντοπισμός χημικών ουσιών που προκαλούν βλάβη στο DNA. Υπό αλκαλικές συνθήκες (> pH 13), είναι δυνατόν να ανιχνευθούν με τον προσδιορισμό comet μονόκλωνες και δίκλωνες ρήξεις που οφείλονται, για παράδειγμα, σε άμεσες αλληλεπιδράσεις με το DNA, σε ασταθείς σε αλκαλικές συνθήκες θέσεις ή από παροδικές ρήξεις κλώνων κατά την επιδιόρθωση του DNA με εκτομή. Οι συγκεκριμένες ρήξεις κλώνων μπορεί να επιδιορθωθούν, οπότε οι επιδράσεις τους δεν παραμένουν, αλλά μπορεί και να αποβούν θανατηφόρες για το κύτταρο ή μπορεί να σταθεροποιηθούν σε μετάλλαξη που έχει ως αποτέλεσμα μόνιμη βιώσιμη μεταβολή. Είναι ακόμη δυνατόν να οδηγήσουν σε χρωμοσωμική βλάβη που συσχετίζεται επίσης με πολλές ασθένειες του ανθρώπου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου.

Την περίοδο 2006-2012 διεξήχθη επίσημη μελέτη επικύρωσης του προσδιορισμού comet in vivo σε τρωκτικά, την οποία συντόνισε το Ιαπωνικό Κέντρο για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (JaCVAM), σε σύμπραξη με το Ευρωπαϊκό Κέντρο για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (ECVAM), καθώς και με τη Διυπηρεσιακή Συντονιστική Επιτροπή για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (ICCVAM) και το Διυπηρεσιακό Κέντρο για την Αξιολόγηση Εναλλακτικών Τοξικολογικών Μεθόδων (NICEATM) του Εθνικού Προγράμματος Τοξικολογίας (NTP) των ΗΠΑ (12). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών περιλαμβάνει τη συνιστώμενη χρήση και τους περιορισμούς του προσδιορισμού comet και βασίζεται στο τελικό πρωτόκολλο (12) που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη επικύρωσης, καθώς και σε συμπληρωματικά δεδομένα, δημοσιευμένα και μη (ιδιοκτησίας των εργαστηρίων).

Οι ορισμοί των βασικών όρων παρατίθενται στο προσάρτημα 1. Σημειώνεται ότι για τον παρόντα προσδιορισμό μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλά διαφορετικά υποθέματα (αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου, κουκκίδες πηκτώματος, πλάκες 96 μικροκοιλοτήτων κ.λπ.). Χάριν ευκολίας, στο υπόλοιπο κείμενο του παρόντος εγγράφου χρησιμοποιείται ο όρος «αντικειμενοφόρος πλάκα», αλλά αυτός ο όρος καλύπτει και όλα τα άλλα υποθέματα.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Ο προσδιορισμός comet είναι μέθοδος μέτρησης των ρήξεων κλώνων του DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Μεμονωμένα κύτταρα/πυρήνες, εγκλεισμένα σε αγαρόζη πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα, υφίστανται λύση με απορρυπαντικό και υψηλής συγκέντρωσης διάλυμα άλατος. Με το στάδιο της λύσης επιτυγχάνεται η πέψη των κυτταρικών και πυρηνικών μεμβρανών και η ελευθέρωση βρόχων περιελιγμένου DNA, που ονομάζονται γενικά νουκλεοειδή, και θραυσμάτων DNA. Η ηλεκτροφόρηση σε υψηλό pH έχει ως αποτέλεσμα να εμφανίζονται δομές που μοιάζουν με κομήτες και οι οποίες, με κατάλληλη φθορίζουσα χρώση, μπορούν να παρατηρηθούν με μικροσκοπία φθορισμού. Τα θραύσματα DNA μεταναστεύουν από την «κεφαλή» προς την «ουρά» του κομήτη ανάλογα με το μέγεθός τους, ενώ η ένταση της ουράς σε σχέση με τη συνολική ένταση (κεφαλής και ουράς) αντικατοπτρίζει την έκταση των ρήξεων του DNA (13) (14) (15).

Ο προσδιορισμός comet in vivo σε αλκαλικές συνθήκες προσφέρεται ιδίως για την αξιολόγηση των κινδύνων γονιδιοτοξικότητας, δεδομένου ότι οι αποκρίσεις που ανιχνεύονται με αυτόν εξαρτώνται από την ADME (απορρόφηση, κατανομή, μεταβολισμός, απέκκριση) in vivo, καθώς και από τις διεργασίες επιδιόρθωσης του DNA. Οι παράγοντες αυτοί μπορεί να διαφέρουν μεταξύ των ζωικών ειδών, των ιστών και των τύπων βλάβης του DNA.

▼M7

Για την ικανοποίηση των απαιτήσεων που αφορούν την καλή μεταχείριση των ζώων και, ειδικότερα, τον περιορισμό της χρήσης πειραματόζωων (η αρχή 3R — Replacement, Reduction, Refinement/αντικατάσταση, μείωση, βελτίωση), ο προσδιορισμός μπορεί να ενσωματωθεί σε άλλες τοξικολογικές μελέτες, π.χ. μελέτες τοξικότητας επαναλαμβανόμενης δόσης (10) (16) (17), ή να συνδυαστεί το τελικό σημείο με άλλα τελικά σημεία γονιδιοτοξικότητας, όπως ο προσδιορισμός μικροπυρήνων σε ερυθροκύτταρα θηλαστικών (18) (19) (20). Ο προσδιορισμός comet εκτελείται ως επί το πλείστον σε τρωκτικά, παρά το γεγονός ότι έχει εφαρμοστεί και σε άλλα είδη ζώων, θηλαστικών και μη. Η χρήση άλλων ειδών εκτός των τρωκτικών θα πρέπει να αιτιολογείται κατά περίπτωση από επιστημονικής και δεοντολογικής πλευράς και συνιστάται ένθερμα να εκτελείται προσδιορισμός comet σε άλλα είδη εκτός των τρωκτικών μόνον εφόσον αποτελεί μέρος άλλης μελέτης τοξικότητας και όχι ως αυτοτελής δοκιμή.

Η επιλογή της οδού έκθεσης και των ιστών που πρόκειται να μελετηθούν θα πρέπει να βασίζεται σε όλες τις διαθέσιμες/υπάρχουσες γνώσεις για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες, π.χ. σκοπούμενη/αναμενόμενη οδός έκθεσης του ανθρώπου, μεταβολισμός και κατανομή, δυναμικό επιδράσεων στη θέση επαφής, προειδοποιητικές ενδείξεις από τη χημική δομή, άλλα δεδομένα γονιδιοτοξικότητας ή τοξικότητας, καθώς και στον σκοπό της μελέτης. Ως εκ τούτου, το γονιδιοτοξικό δυναμικό των υπό δοκιμή χημικών ουσιών μπορεί να προσδιοριστεί στους ιστούς-στόχους καρκινογόνων και/ή άλλων τοξικών επιδράσεων, εφόσον ενδείκνυται. Ο προσδιορισμός θεωρείται επίσης χρήσιμος για την περαιτέρω διερεύνηση της γονιδιοτοξικότητας που ανιχνεύεται με σύστημα δοκιμής in vitro. Η εκτέλεση του προσδιορισμού comet in vivo σε επιθυμητό ιστό ενδείκνυται όταν μπορεί εύλογα να αναμένεται ότι ο συγκεκριμένος ιστός θα εκτεθεί επαρκώς.

Η πληρέστερη επικύρωση του προσδιορισμού αφορούσε σωματικούς ιστούς αρσενικών επιμύων στο πλαίσιο συλλογικών μελετών, όπως εκείνες του JaCVAM (12) και των Rothfuss και συν., 2010 (10). Στη διεθνή μελέτη επικύρωσης του JaCVAM χρησιμοποιήθηκαν ήπαρ και στόμαχος. Το ήπαρ χρησιμοποιήθηκε διότι αποτελεί το πιο δραστήριο όργανο στον μεταβολισμό των χημικών ουσιών και, επίσης, συχνά όργανο-στόχο στην καρκινογένεση. Ο στόμαχος χρησιμοποιήθηκε επειδή είναι συνήθως η πρώτη θέση επαφής με τις χημικές ουσίες κατόπιν έκθεσης από το στόμα, μολονότι και άλλες περιοχές του γαστρεντερικού σωλήνα, όπως το δωδεκαδάκτυλο και η νήστιδα, θα πρέπει επίσης να θεωρούνται ιστοί θέσης επαφής και ίσως θεωρούνται καταλληλότεροι για μελέτες που αφορούν τον άνθρωπο απ' ό,τι ο αδενώδης στόμαχος των τρωκτικών. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μην εκτίθενται οι εν λόγω ιστοί σε υπερβολικά υψηλές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (21). Η τεχνική εφαρμόζεται καταρχήν σε κάθε ιστό από τον οποίο μπορούν να ληφθούν αναλύσιμα εναιωρήματα μεμονωμένων κυττάρων/πυρήνων. Ιδιόκτητα δεδομένα διαφόρων εργαστηρίων καταδεικνύουν την επιτυχή εφαρμογή της τεχνικής σε πολλούς διαφορετικούς ιστούς και υπάρχουν πολλές δημοσιεύσεις από τις οποίες προκύπτει η εφαρμοσιμότητά της σε άλλα όργανα και ιστούς εκτός από το ήπαρ και τον στόμαχο, π.χ. σε νήστιδα (22), νεφρούς (23) (24), δέρμα (25) (26), ουροδόχο κύστη (27) (28), κύτταρα πνευμόνων και βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (χρήσιμα σε μελέτες εισπνεόμενων χημικών ουσιών) (29) (30), ενώ έχουν επίσης διεξαχθεί δοκιμές σε πολλά όργανα συγχρόνως (31) (32).

Παρά το πιθανό ενδιαφέρον για τις γονιδιοτοξικές επιδράσεις στα γεννητικά κύτταρα, θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο τυποποιημένος προσδιορισμός comet σε αλκαλικές συνθήκες, που περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, δεν θεωρείται κατάλληλος για τη μέτρηση ρήξεων κλώνων του DNA σε ώριμα γεννητικά κύτταρα. Δεδομένου ότι, σε βιβλιογραφική επισκόπηση της χρήσης του προσδιορισμού comet για μελέτες γονιδιοτοξικότητας σε γεννητικά κύτταρα, αναφέρθηκαν υψηλά και μεταβλητά επίπεδα υποβάθρου όσον αφορά τις βλάβες του DNA (33), θεωρείται αναγκαία η τροποποίηση του πρωτοκόλλου, σε συνδυασμό με βελτιωμένες μελέτες τυποποίησης και επικύρωσης, για να μπορεί να συμπεριληφθεί στη μέθοδο δοκιμών ο προσδιορισμός comet σε ώριμα γεννητικά κύτταρα (π.χ. σπερματοζωάρια). Επιπλέον, το προτεινόμενο σχήμα έκθεσης που περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών δεν είναι το βέλτιστο και θα χρειάζονταν μεγαλύτεροι χρόνοι έκθεσης ή δειγματοληψίας για μια ουσιαστική ανάλυση των ρήξεων κλώνων του DNA σε ώριμα σπερματοζωάρια. Έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία γονιδιοτοξικές επιδράσεις που μετρήθηκαν με τον προσδιορισμό comet σε ορχικά κύτταρα διαφόρων σταδίων διαφοροποίησης (34) (35). Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι γονάδες περιέχουν μείγμα σωματικών και γεννητικών κυττάρων. Για τον λόγο αυτό, τα θετικά αποτελέσματα που αφορούν πλήρεις γονάδες (όρχεις) δεν αντικατοπτρίζουν κατ' ανάγκη βλάβες των γεννητικών κυττάρων· παρόλα αυτά, υποδηλώνουν ότι οι δοκιμασθείσες χημικές ουσίες και/ή οι μεταβολίτες τους φθάνουν στη γονάδα.

▼M7

Στις τυποποιημένες πειραματικές συνθήκες του προσδιορισμού comet δεν είναι δυνατή η αξιόπιστη ανίχνευση σταυροδεσμών. Υπό ορισμένες τροποποιημένες πειραματικές συνθήκες, θα μπορούσαν να ανιχνευθούν σταυροδεσμοί DNA-DNA και DNA-πρωτεϊνών, καθώς και άλλες μετατροπές βάσεων, όπως οι οξειδωμένες βάσεις (23) (36) (37) (38) (39). Θα χρειαστούν, όμως, περαιτέρω εργασίες για τον επαρκή χαρακτηρισμό των αναγκαίων τροποποιήσεων του πρωτοκόλλου. Ως εκ τούτου, η ανίχνευση παραγόντων σταυροσύνδεσης δεν είναι ο πρωταρχικός σκοπός του προσδιορισμού που περιγράφεται στο παρόν κεφάλαιο. Ο προσδιορισμός, ακόμη και τροποποιημένος, δεν ενδείκνυται για την ανίχνευση ανευπλοειδογόνων.

Λόγω του τρέχοντος επιπέδου των γνώσεων, ο προσδιορισμός comet in vivo υπόκειται σε μια σειρά από πρόσθετους περιορισμούς (βλ. προσάρτημα 3). Αναμένεται ότι η μέθοδος δοκιμών θα επανεξεταστεί στο μέλλον και, εάν κριθεί απαραίτητο, θα αναθεωρηθεί βάσει της πείρας που θα έχει αποκομιστεί.

Πριν από τη χρήση της μεθόδου δοκιμών σε μείγμα για την παραγωγή δεδομένων για συγκεκριμένο ρυθμιστικό σκοπό, θα πρέπει να εξετάζεται αν — και, εάν ναι, για ποιον λόγο — μπορεί να αποδώσει επαρκή αποτελέσματα για τον επιδιωκόμενο σκοπό. Οι εκτιμήσεις αυτές δεν είναι αναγκαίες όταν οι κανονιστικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τον έλεγχο του μείγματος.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τα ζώα εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία μέσω κατάλληλης οδού. Λεπτομερής περιγραφή της δοσολογίας και της δειγματοληψίας παρέχεται στις παραγράφους 36-40. Κατά τους επιλεγμένους χρόνους δειγματοληψίας, ανατέμνονται οι ιστοί που ενδιαφέρουν και παρασκευάζονται εναιωρήματα μεμονωμένων κυττάρων/πυρήνων [επιτρέπεται η επιτόπια (in situ) διαπότιση, όταν κρίνεται χρήσιμο, π.χ. προκειμένου για ήπαρ], τα οποία εγκλείονται σε μαλακό άγαρ με σκοπό την ακινητοποίησή τους σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Τα κύτταρα/πυρήνες υποβάλλονται σε κατεργασία με ρυθμιστικό διάλυμα λύσης για την απομάκρυνση της κυτταρικής και/ή πυρηνικής μεμβράνης και εκτίθενται σε ισχυρό άλκαλι, π.χ. pH ≥ 13, ώστε να καταστεί δυνατή η αποπεριέλιξη του DNA και η ελευθέρωση χαλαρωμένων βρόχων και θραυσμάτων DNA. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση του πυρηνικού DNA που βρίσκεται στο άγαρ. Τα φυσιολογικά, ακέραια μόρια DNA παραμένουν στη θέση του πυρηνικού DNA στο άγαρ, ενώ τα θραύσματα και οι χαλαρωμένοι βρόχοι DNA μεταναστεύουν προς την άνοδο. Μετά την ηλεκτροφόρηση, το DNA καθίσταται ορατό με τη χρήση κατάλληλης φθορίζουσας χρώσης. Τα παρασκευάσματα θα πρέπει να αναλύονται με μικροσκόπιο και πλήρως αυτόματα ή ημιαυτόματα συστήματα ανάλυσης εικόνων. Η έκταση της μετανάστευσης DNA κατά την ηλεκτροφόρηση και η απόσταση μετανάστευσης αντιστοιχούν στην ποσότητα και το μέγεθος των θραυσμάτων DNA. Υπάρχουν διάφορα τελικά σημεία για τον προσδιορισμό comet. Έχει διατυπωθεί η σύσταση να χρησιμοποιείται η περιεκτικότητα της ουράς σε DNA (% DNA ουράς ή % έντασης ουράς) (12) (40) (41) για την αξιολόγηση της βλάβης του DNA (12) (40) (41) (42). Μετά από ανάλυση επαρκούς αριθμού πυρήνων, τα δεδομένα αναλύονται με κατάλληλες μεθόδους για να κριθούν τα αποτελέσματα του προσδιορισμού.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η τροποποίηση διαφόρων πτυχών της μεθοδολογίας, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται η προετοιμασία των δειγμάτων, οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης, οι παράμετροι της οπτικής ανάλυσης (π.χ. ένταση της χρώσης, φωτεινή ένταση του λαμπτήρα του μικροσκοπίου και χρήση φίλτρων μικροσκοπίου και συστημάτων λήψης εικόνων με δυναμικά στοιχεία) και οι συνθήκες του περιβάλλοντος (π.χ. φωτισμός υποβάθρου), έχει διερευνηθεί και μπορεί να επηρεάσει τη μετανάστευση του DNA (43) (44) (45) (46).

ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να τεκμηριώνει την πειραματική του επάρκεια όσον αφορά τον προσδιορισμό comet, αποδεικνύοντας την ικανότητά του να λαμβάνει επαρκούς ποιότητας εναιωρήματα μεμονωμένων κυττάρων ή πυρήνων από κάθε στοχευόμενο ιστό και για κάθε χρησιμοποιούμενο ζωικό είδος. Η ποιότητα των παρασκευασμάτων αξιολογείται πρώτα από την τιμή % DNA ουράς για τα ζώα που υποβάλλονται σε μεταχείριση με τον φορέα, η οποία πρέπει να βρίσκεται εντός αναπαραγώγιμου χαμηλού εύρους τιμών. Τα σημερινά δεδομένα δείχνουν ότι η ομαδική μέση τιμή % DNA ουράς για το ήπαρ επίμυος (με βάση τη μέση τιμή των διάμεσων τιμών — βλ. παράγραφο 57 για λεπτομέρειες σχετικά με τους όρους αυτούς) θα πρέπει, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 6 %, ποσοστό που συμφωνεί με τις τιμές από τη μελέτη επικύρωσης του JaCVAM (12) και από άλλα δεδομένα, δημοσιευμένα ή ιδιοκτησίας εργαστηρίων. Δεν υπάρχουν προς

▼M7

το παρόν αρκετά δεδομένα για τη διατύπωση συστάσεων σχετικά με το βέλτιστο ή αποδεκτό εύρος τιμών για άλλους ιστούς, χωρίς αυτό να αποκλείει τη χρήση άλλων ιστών, εφόσον αιτιολογείται. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να παρέχει κατάλληλη επισκόπηση των επιδόσεων του προσδιορισμού comet στους ιστούς αυτούς σε σχέση με τις επιστημονικές δημοσιεύσεις ή με δεδομένα ιδιοκτησίας εργαστηρίων. Πρώτον, καλό είναι να υπάρχει χαμηλό εύρος τιμών % DNA ουράς στους μάρτυρες για να εξασφαλίζεται επαρκής δυναμική περιοχή για την ανίχνευση θετικών επιδράσεων. Δεύτερον, κάθε εργαστήριο θα πρέπει να είναι ικανό να αναπαράγει τις αναμενόμενες αποκρίσεις σε άμεσα μεταλλαξιγόνα και προμεταλλαξιγόνα με διαφορετικούς τρόπους δράσης, όπως τα προτεινόμενα στον πίνακα 1 (παράγραφος 29).

Θετικές ουσίες μπορούν να επιλεγούν, για παράδειγμα, από τη μελέτη επικύρωσης του JaCVAM (12) ή από άλλα δημοσιευμένα δεδομένα (βλ. παράγραφο 9), κατά περίπτωση, με αιτιολόγηση και εφόσον καταδεικνύονται σαφείς θετικές αποκρίσεις στους υπό μελέτη ιστούς. Θα πρέπει επίσης να καταδεικνύεται η ικανότητα ανίχνευσης ασθενών επιδράσεων γνωστών μεταλλαξιγόνων σε χαμηλές δόσεις, π.χ. του EMS (μεθανοσουλφονικός αιθυλεστέρας), λόγου χάριν με την απόδειξη σχέσεων δόσης-απόκρισης με κατάλληλο πλήθος δόσεων και τις ενδεδειγμένες αποστάσεις μεταξύ τους. Οι αρχικές προσπάθειες θα πρέπει να επικεντρώνονται στην απόδειξη τεχνικής ικανότητας ως προς τους ευρύτερα χρησιμοποιούμενους ιστούς, π.χ. ήπαρ τρωκτικών, στην περίπτωση των οποίων μπορεί να γίνει σύγκριση με τα υπάρχοντα δεδομένα και τα αναμενόμενα αποτελέσματα (12). Θα μπορούσαν να συλλέγονται συγχρόνως δεδομένα για άλλους ιστούς, π.χ. στόμαχο/δωδεκαδάκτυλο/νήστιδα, αίμα κ.λπ. Το εργαστήριο πρέπει να καταδεικνύει αφενός την τεχνική του ικανότητα ως προς κάθε επιμέρους ιστό κάθε ζωικού είδους που έχει προγραμματίσει να μελετήσει και, αφετέρου, τη δυνατότητα επίτευξης αποδεκτής θετικής απόκρισης με γνωστό μεταλλαξιγόνο (π.χ. EMS) στον εκάστοτε ιστό.

Θα πρέπει να συλλέγονται δεδομένα για μάρτυρες με φορέα/αρνητικούς μάρτυρες, ώστε να καταδεικνύεται η αναπαραγωγιμότητα των αρνητικών αποκρίσεων και να διασφαλίζεται ο ενδεδειγμένος έλεγχος των τεχνικών πτυχών του προσδιορισμού ή, αντίθετα, να αναδεικνύεται η ανάγκη καθορισμού νέων πεδίων τιμών για τους ιστορικούς μάρτυρες (βλ. παράγραφο 22).

Σημειωτέον ότι είναι μεν δυνατόν να συλλέγονται ταυτόχρονα πολλοί ιστοί κατά τη νεκροψία και να υποβάλλονται σε επεξεργασία για ανάλυση comet, αλλά το εργαστήριο πρέπει να διαθέτει την ικανότητα να συλλέγει διαφορετικούς ιστούς από το ίδιο ζώο, εξασφαλίζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο ότι δεν παραβλέπεται καμία δυνητική βλάβη του DNA και δεν διακυβεύεται ο προσδιορισμός comet. Το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την ευθανασία μέχρι την αφαίρεση ιστών για επεξεργασία ενδέχεται να είναι κρίσιμης σημασίας (βλ. παράγραφο 44).

Κατά την ανάπτυξη τεχνικής ικανότητας όσον αφορά την παρούσα δοκιμή πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η καλή μεταχείριση των ζώων και, ως εκ τούτου, μπορούν να αξιοποιούνται για την απόκτηση εμπειρίας στις διάφορες πτυχές της δοκιμής ιστοί προερχόμενοι από ζώα που έχουν χρησιμοποιηθεί σε άλλες δοκιμές. Επιπλέον, μπορεί να μην είναι απαραίτητο να διεξαχθεί πλήρης μελέτη κατά τα στάδια της εδραίωσης μιας νέας μεθόδου δοκιμών στο εργαστήριο και είναι δυνατόν να μειωθεί ο αριθμός των ζώων ή των συγκεντρώσεων δοκιμής που χρησιμοποιούνται κατά την ανάπτυξη των απαραίτητων δεξιοτήτων.

Ιστορικά δεδομένα για μάρτυρες

Κατά τη διάρκεια των ερευνών τεχνικής ικανότητας, το εργαστήριο θα πρέπει να δημιουργήσει ιστορική βάση δεδομένων που να καθορίζει πεδία και κατανομές τιμών στους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες για τους μελετώμενους ιστούς και ζωικά είδη. Συστάσεις για τον τρόπο δημιουργίας και χρήσης των ιστορικών δεδομένων (δηλ. κριτήρια προσθήκης στοιχείων στα ιστορικά δεδομένα και εξαίρεσης στοιχείων από αυτά, καθώς και κριτήρια αποδοχής συγκεκριμένου πειράματος) έχουν διατυπωθεί στη βιβλιογραφία (47). Οι τιμές % DNA ουράς που προκύπτουν για τους αρνητικούς μάρτυρες ενδέχεται να διαφέρουν ανάλογα με τον ιστό, το ζωικό είδος, τον φορέα και την οδό χορήγησης. Είναι, επομένως, σημαντικό να καθορίζονται πεδία τιμών αρνητικών μαρτύρων για κάθε ιστό και ζωικό είδος. Τα εργαστήρια θα πρέπει να χρησιμοποιούν μεθόδους ποιοτικού ελέγχου, όπως διαγράμματα ελέγχου [π.χ. διαγράμματα C ή X-bar (48)], για να προσδιορίζουν τη μεταβλητότητα των δεδομένων τους και να αποδεικνύουν

▼M7

ότι έχουν «υπό έλεγχο» τη μεθοδολογία. Μπορεί επίσης να χρειάζεται βελτιστοποίηση της επιλογής των κατάλληλων ουσιών ως θετικών μαρτύρων, καθώς και των κατάλληλων περιοχών δόσεων και πειραματικών συνθηκών (π.χ. συνθήκες ηλεκτροφόρησης) για την ανίχνευση ασθενών επιδράσεων (βλ. παράγραφο 17).

Κάθε αλλαγή του πειραματικού πρωτοκόλλου θα πρέπει να μελετάται υπό το πρίσμα της συμφωνίας της με τις υφιστάμενες βάσεις ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για μάρτυρες. Τυχόν σημαντικές ανακολουθίες θα πρέπει να έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία νέας βάσης ιστορικών δεδομένων για μάρτυρες.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Προετοιμασίες

Επιλογή ζωικού είδους

Κατά κανόνα χρησιμοποιούνται υγιή νεαρά ενήλικα ζώα (ηλικίας 6-10 εβδομάδων κατά την έναρξη της μεταχείρισης, αν και είναι επίσης αποδεκτά ζώα λίγο μεγαλύτερης ηλικίας) που ανήκουν σε συνήθεις εργαστηριακές φυλές. Το είδος τρωκτικών θα πρέπει να επιλέγεται με τα εξής κριτήρια: i) τα είδη που χρησιμοποιούνται σε άλλες μελέτες τοξικότητας (ώστε να υπάρχει δυνατότητα συσχέτισης των δεδομένων και εκπόνησης ολοκληρωμένων μελετών), ii) τα είδη που ανέπτυξαν όγκους σε μελέτες καρκινογενετικότητας (εφόσον διερευνάται ο μηχανισμός καρκινογένεσης) και iii) τα είδη με μεταβολισμό που πλησιάζει περισσότερο στον ανθρώπινο, εάν είναι γνωστά. Στην παρούσα δοκιμή χρησιμοποιούνται συνήθως επίμυες. Ωστόσο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη, εάν αυτό δικαιολογείται από δεοντολογικής και επιστημονικής πλευράς.

Συνθήκες στέγασης και σίτισης των ζώων

Για τα τρωκτικά, η θερμοκρασία της αίθουσας πειραματόζωων θα πρέπει, στην ιδανική περίπτωση, να είναι 22 °C (± 3 °C). Η σχετική υγρασία, η ιδανική τιμή της οποίας είναι 50-60 %, θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού της αίθουσας. Ο φωτισμός θα πρέπει να είναι τεχνητός, με φωτοπερίοδο 12 ωρών. Για τη διατροφή των ζώων μπορούν να χρησιμοποιούνται τα κλασικά εργαστηριακά σιτηρέσια, με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού. Όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται με την τροφή, η ανάγκη επαρκούς ανάμειξης της ουσίας είναι δυνατόν να επηρεάσει την επιλογή σιτηρεσίου. Τα ζώα θα πρέπει να στεγάζονται σε μικρές ομάδες (όχι περισσότερα από πέντε) του ίδιου φύλου, εφόσον δεν αναμένεται επιθετική συμπεριφορά. Η ατομική στέγαση των ζώων επιτρέπεται, μόνον εάν αιτιολογείται επιστημονικά. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατά το δυνατόν συμπαγή δάπεδα, διότι τα δάπεδα από συρματόπλεγμα μπορούν να προκαλέσουν σοβαρούς τραυματισμούς (49). Πρέπει να προβλέπεται κατάλληλος εμπλουτισμός του περιβάλλοντος.

Προετοιμασία των ζώων

Τα ζώα κατανέμονται τυχαία στις ομάδες μαρτύρων και μεταχείρισης. Ταυτοποιούνται με αποκλειστικό αναγνωριστικό και εγκλιματίζονται στις εργαστηριακές συνθήκες τουλάχιστον για πέντε ημέρες πριν από την έναρξη της μεταχείρισης. Πρέπει να χρησιμοποιείται η λιγότερο επεμβατική μέθοδος αποκλειστικής ταυτοποίησης των ζώων. Κατάλληλες μέθοδοι είναι, μεταξύ άλλων, η δακτυλίωση, η σήμανση με ενώτιο, η τοποθέτηση μικροτσίπ και η βιομετρική ταυτοποίηση. Η αποκοπή τμήματος δακτύλου ή αυτιού δεν δικαιολογείται επιστημονικά στις συγκεκριμένες δοκιμές. Οι κλωβοί θα πρέπει να διατάσσονται με τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται οι πιθανές επιδράσεις της θέσης τους. Στην αρχή της μελέτης, οι διαφορές βάρους μεταξύ των ζώων θα πρέπει να είναι ελάχιστες και να μην υπερβαίνουν το ± 20 %.

Παρασκευή των δόσεων

Οι στερεές υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να διαλύονται ή να διασπείρονται (σχηματισμός εναιωρήματος) σε κατάλληλους φορείς ή να αναμειγνύονται με την τροφή ή το πόσιμο νερό, πριν χορηγηθούν στα ζώα. Οι υγρές υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορούν να χορηγούνται ως έχουν ή να αραιώνονται πριν από τη χορήγηση. Σε περίπτωση έκθεσης μέσω της εισπνοής, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορούν να χορηγούνται ως αέριο, ατμοί ή αερόλυμα στερεού/υγρού, ανάλογα με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες (50) (51).

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσφατα παρασκευάσματα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εκτός αν τα στοιχεία σχετικά με τη σταθερότητά της καταδεικνύουν ότι είναι αποδεκτή η φύλαξή της και καθορίζουν τις κατάλληλες συνθήκες φύλαξης.

▼M7

Συνθήκες δοκιμής

Φορέας

Ο φορέας θα πρέπει να μην έχει τοξικές επιδράσεις στους χρησιμοποιούμενους όγκους δόσεων, ούτε να υπάρχουν υπόνοιες για πιθανή χημική αντίδρασή του με τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες. Εάν χρησιμοποιείται άλλος φορέας εκτός των καθιερωμένων, η χρήση του θα πρέπει να τεκμηριώνεται με δεδομένα αναφοράς που αποδεικνύουν τη συμβατότητά του ως προς τα ζώα, την οδό χορήγησης και το τελικό σημείο της δοκιμής. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατό, να εξετάζεται πρώτα αν μπορεί να χρησιμοποιηθεί υδατικός διαλύτης/φορέας. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ορισμένοι φορείς (ιδίως οι παχύρρευστοι) μπορούν να προκαλέσουν φλεγμονή και αύξηση των επιπέδων υποβάθρου των ρήξεων κλώνων του DNA στη θέση επαφής, ιδίως σε περίπτωση πολλαπλής χορήγησης.

Μάρτυρες

Θετικοί μάρτυρες

Επί του παρόντος, κάθε δοκιμή θα πρέπει κανονικά να περιλαμβάνει μία ομάδα αποτελούμενη από τουλάχιστον 3 αναλύσιμα ζώα του ίδιου φύλου ή, εάν χρησιμοποιούνται και τα δύο φύλα, από κάθε φύλο (βλ. παράγραφο 32), τα οποία υποβάλλονται σε μεταχείριση με ουσία που χρησιμεύει ως θετικός μάρτυρας. Στο μέλλον, θα είναι ίσως δυνατόν να καταδειχθεί επαρκής τεχνική ικανότητα που θα μειώνει την ανάγκη για θετικούς μάρτυρες. Εάν χρησιμοποιούνται περισσότεροι του ενός χρόνοι δειγματοληψίας (π.χ. με πρωτόκολλο εφάπαξ χορήγησης), αρκεί να περιλαμβάνονται θετικοί μάρτυρες μόνο σε έναν από τους χρόνους αυτούς, αλλά θα πρέπει να εξασφαλίζεται ισόρροπος σχεδιασμός (βλ. παράγραφο 48). Οι ουσίες που χρησιμεύουν ως παράλληλοι θετικοί μάρτυρες δεν είναι απαραίτητο να χορηγούνται από την ίδια οδό όπως η υπό δοκιμή χημική ουσία, αλλά είναι σημαντικό να χρησιμοποιείται η ίδια οδός όταν μετρώνται οι επιδράσεις στη θέση επαφής. Οι ουσίες που χρησιμεύουν ως θετικοί μάρτυρες θα πρέπει αποδεδειγμένα να επάγουν ρήξεις κλώνων του DNA σε όλους τους ιστούς που ενδιαφέρουν ως προς την υπό δοκιμή χημική ουσία και ο θετικός μάρτυρας επιλογής είναι πιθανότατα ο EMS, δεδομένου ότι έχει προκαλέσει ρήξεις κλώνων σε όλους τους ιστούς που έχουν μελετηθεί. Οι δόσεις των ουσιών που χρησιμεύουν ως θετικοί μάρτυρες θα πρέπει να επιλέγονται κατά τρόπο ώστε να έχουν μέτριες επιδράσεις, μέσω των οποίων κρίνονται ορθά οι επιδόσεις και η ευαισθησία του προσδιορισμού, η δε επιλογή τους θα μπορούσε να βασίζεται σε καμπύλες δόσης-απόκρισης που χάραξε το εργαστήριο στο πλαίσιο της απόδειξης τεχνικής ικανότητας. Το % DNA ουράς για τα ζώα που χρησιμεύουν ως παράλληλοι θετικοί μάρτυρες θα πρέπει να συμφωνεί με το προκαθορισμένο από το εργαστήριο εύρος τιμών σε κάθε ιστό και χρόνο δειγματοληψίας για το είδος των ζώων αυτών (βλ. παράγραφο 16). Παραδείγματα χημικών ουσιών που χρησιμεύουν ως θετικοί μάρτυρες και ορισμένοι από τους ιστούς-στόχους τους (στα τρωκτικά) περιλαμβάνονται στον πίνακα 1. Μπορούν να επιλεγούν ουσίες διαφορετικές από εκείνες που παρατίθενται στον πίνακα 1, εφόσον αιτιολογείται επιστημονικά.

Πίνακας 1

Παραδείγματα χημικών ουσιών που χρησιμεύουν ως θετικοί μάρτυρες και ορισμένοι από τους ιστούς-στόχους τους

Ουσίες και αριθ. CAS RN
Μεθανοσουλφονικός αιθυλεστέρας (αριθ. CAS RN 62-50-0), όλοι οι ιστοί
Αιθυλονιτροζουρία (αριθ. CAS RN 759-73-9), ήπαρ και στόμαχος, δωδεκαδάκτυλο ή νήστιδα
Μεθανοσουλφονικός μεθυλεστέρας (αριθ. CAS RN 66-27-3), ήπαρ, στόμαχος, δωδεκαδάκτυλο ή νήστιδα, κύτταρα πνευμόνων και βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BAL), νεφροί, ουροδόχος κύστη, πνεύμονες, όρχεις και μυελός των οστών/αίμα
N-Μεθυλο-N′-νιτρο-*N*-νιτρωδογουανιδίνη (αριθ. CAS RN 70-25-7), στόμαχος, δωδεκαδάκτυλο ή νήστιδα
Διυδροχλωρική 1,2-διμεθυλυδραζίνη (αριθ. CAS RN306-37-6), ήπαρ και έντερο
N-Μεθυλο-*N*-νιτροζουρία (αριθ. CAS RN 684-93-5), ήπαρ, μυελός των οστών, αίμα, νεφροί, στόμαχος, νήστιδα και εγκέφαλος.

▼M7

Αρνητικοί μάρτυρες

Κάθε δοκιμή θα πρέπει να περιλαμβάνει, σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας και για κάθε ιστό, μία ομάδα ζώων που χρησιμεύουν ως αρνητικοί μάρτυρες, η οποία υποβάλλεται σε μεταχείριση μόνο με τον φορέα και, κατά τα άλλα, υφίσταται τους ίδιους χειρισμούς όπως οι ομάδες μεταχείρισης. Το % DNA ουράς στα ζώα που χρησιμεύουν ως αρνητικοί μάρτυρες θα πρέπει να βρίσκεται εντός του προκαθορισμένου από το εργαστήριο εύρους τιμών υποβάθρου για κάθε ιστό και χρόνο δειγματοληψίας και για το είδος των ζώων αυτών (βλ. παράγραφο 16). Εάν δεν υπάρχουν ιστορικά ή δημοσιευμένα δεδομένα για μάρτυρες που να δείχνουν ότι ο επιλεγμένος φορέας, ο αριθμός χορηγούμενων δόσεων και η οδός χορήγησης δεν επάγουν επιβλαβείς ή γονιδιοτοξικές επιδράσεις, θα πρέπει να διεξάγονται αρχικές μελέτες πριν από την πλήρη μελέτη για να διαπιστώνεται αν είναι αποδεκτοί οι μάρτυρες με φορέα.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αριθμός και φύλο των ζώων

Αν και υπάρχουν ελάχιστα δεδομένα για θηλυκά ζώα, που να επιτρέπουν τη σύγκριση μεταξύ των φύλων όσον αφορά τον προσδιορισμό comet, άλλες αποκρίσεις γονιδιοτοξικότητας in vivo είναι γενικά παρόμοιες μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ζώων και, ως εκ τούτου, οι περισσότερες μελέτες θα μπορούσαν να διεξαχθούν σε οποιοδήποτε φύλο. Δεδομένα που καταδεικνύουν σημαντικές διαφορές μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ζώων (π.χ. διαφορές συστημικής τοξικότητας, μεταβολισμού, βιοδιαθεσιμότητας κ.λπ., συμπεριλαμβανομένων, π.χ., δεδομένων από μελέτη προσδιορισμού εύρους τιμών) ευνοούν τη χρησιμοποίηση ζώων και των δύο φύλων. Στην περίπτωση αυτή, ίσως είναι σκόπιμο να διεξάγεται μελέτη και στα δύο φύλα, π.χ. στο πλαίσιο μελέτης τοξικότητας επαναλαμβανόμενης δόσης. Σε περίπτωση χρήσης και των δύο φύλων, θα ήταν ενδεχομένως σκόπιμη η εφαρμογή παραγοντικού σχεδιασμού. Λεπτομέρειες σχετικά με τον τρόπο ανάλυσης των δεδομένων με τη χρήση αυτού του σχεδιασμού παρέχονται στο προσάρτημα 2.

Το μέγεθος των ομάδων κατά την έναρξη της μελέτης (και κατά την απόδειξη τεχνικής ικανότητας) θα πρέπει να καθορίζεται με γνώμονα την εξασφάλιση, ανά ομάδα, τουλάχιστον 5 αναλύσιμων ζώων του ίδιου φύλου ή, εάν χρησιμοποιούνται ζώα και των δύο φύλων, από κάθε φύλο (μικρότερου αριθμού στην ομάδα που χρησιμεύει ως παράλληλος θετικός μάρτυρας — βλ. παράγραφο 29). Όταν η έκθεση του ανθρώπου σε μια χημική ουσία αφορά μόνο το ένα φύλο, όπως π.χ. στην περίπτωση ορισμένων φαρμακευτικών προϊόντων, η δοκιμή θα πρέπει να διεξάγεται σε ζώα του αντίστοιχου φύλου. Ενδεικτικά, όσον αφορά τις τυπικές απαιτήσεις για τον μέγιστο αριθμό ζώων, για τη διεξαγωγή μελέτης σύμφωνα με τις παραμέτρους που καθορίζονται στην παράγραφο 33, με τρεις ομάδες δόσης και παράλληλους αρνητικούς και θετικούς μάρτυρες (κάθε ομάδα αποτελούμενη από πέντε ζώα του ίδιου φύλου), θα απαιτούνταν 25 έως 35 ζώα.

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Τα ζώα θα πρέπει να υποβάλλονται σε μεταχείριση καθημερινά επί 2 ή περισσότερες ημέρες (δηλ. χορήγηση δύο ή περισσότερων δόσεων με μεσοδιαστήματα περίπου 24 ωρών) και τα δείγματα να συλλέγονται μία φορά 2-6 ώρες (ή κατά τον T_{max}) μετά την τελευταία μεταχείριση (12). Είναι αποδεκτά δείγματα από παρατεταμένα δοσολογικά σχήματα (π.χ. καθημερινή δόση επί 28 ημέρες). Έχει αποδειχθεί ότι ο συνδυασμός του προσδιορισμού comet με τη δοκιμή μικροπυρήνων σε ερυθροκύτταρα είναι επιτυχής (10) (19). Ωστόσο, θα πρέπει να αποδίδεται ιδιαίτερη προσοχή στις οργανωτικές απαιτήσεις που επιβάλλει η δειγματοληψία ιστών για ανάλυση comet, παράλληλα με την ικανοποίηση των απαιτήσεων της δειγματοληψίας ιστών για άλλα είδη τοξικολογικών αξιολογήσεων. Στις περισσότερες περιπτώσεις, δεν ενδείκνυται η συλλογή 24 ώρες μετά τη χορήγηση της τελευταίας δόσης, όπως γίνεται συνήθως κατά τις μελέτες γενικής τοξικότητας (βλ. παράγραφο 40 σχετικά με τον χρόνο δειγματοληψίας). Η χρήση άλλων προγραμμάτων μεταχείρισης και δειγματοληψίας θα πρέπει να αιτιολογείται (βλ. προσάρτημα 3). Για παράδειγμα, θα μπορούσε να εφαρμοστεί εφάπαξ μεταχείριση με πολλαπλή δειγματοληψία, αλλά θα πρέπει να σημειωθεί ότι χρειάζονται περισσότερα ζώα για τις μελέτες με εφάπαξ χορήγηση, λόγω της ανάγκης για πολλούς χρόνους δειγματοληψίας. Ωστόσο, η επιλογή αυτή μπορεί να είναι προτιμότερη σε ορισμένες περιπτώσεις, π.χ. όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία επάγει υπερβολική τοξικότητα μετά από επαναλαμβανόμενη χορήγηση.

▼M7

Όλοι οι τρόποι διεξαγωγής της δοκιμής είναι αποδεκτοί, υπό την προϋπόθεση ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία παρέχει θετική απόκριση ή, σε περίπτωση μελέτης με αρνητικό αποτέλεσμα, τεκμηριώνεται με άμεσα ή έμμεσα στοιχεία η έκθεση των στοχευόμενων ιστών ή η τοξικότητα για τους ιστούς αυτούς ή εάν επιτυγχάνεται η οριακή δόση (βλ. παράγραφο 36).

Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορούν επίσης να χορηγούνται σε διαιρεμένες δόσεις, δηλ. δύο μεταχειρίσεις την ίδια ημέρα, χωρίς να μεσολαβούν μεταξύ τους περισσότερες από 2-3 ώρες, για να διευκολύνεται η χορήγηση μεγάλων όγκων. Υπό τις περιστάσεις αυτές, ο χρόνος δειγματοληψίας θα πρέπει να προγραμματίζεται με βάση τον χρόνο της τελευταίας χορήγησης δόσης (βλ. παράγραφο 40).

Επίπεδα δόσης

Εάν χρειάζεται προκαταρκτική μελέτη προσδιορισμού εύρους δόσεων, επειδή δεν υπάρχουν κατάλληλα δεδομένα από άλλες συναφείς μελέτες για να υποβοηθήσουν την επιλογή δόσεων, η εν λόγω μελέτη θα πρέπει να διεξάγεται στο ίδιο εργαστήριο, με τη χρήση του ίδιου είδους, φυλής, φύλου ζώων και σχήματος μεταχείρισης με αυτά που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στην κύρια μελέτη, σύμφωνα με τις τρέχουσες προσεγγίσεις για τη διεξαγωγή μελετών προσδιορισμού εύρους δόσεων. Η μελέτη θα πρέπει να αποσκοπεί στον προσδιορισμό της μέγιστης ανεκτής δόσης (ΜΑΔ), η οποία ορίζεται ως η δόση που επάγει ελαφρές τοξικές επιδράσεις σε σχέση με τη διάρκεια της μελέτης (π.χ. σαφή κλινικά σημεία, όπως ασυνήθης συμπεριφορά ή ασυνήθεις αντιδράσεις, μικρή μείωση του σωματικού βάρους ή κυτταροτοξικότητα στον στοχευόμενο ιστό), αλλά όχι θάνατο ή εκδήλωση πόνου, ταλαιπωρίας ή δυσφορίας που καθιστούν αναγκαία τη θανάτωση με ευθανασία. Για μη τοξικές υπό δοκιμή χημικές ουσίες, με περίοδο χορήγησης 14 ημερών και άνω, η μέγιστη (οριακή) δόση είναι 1 000 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα. Για περιόδους χορήγησης μικρότερες των 14 ημερών, η μέγιστη (οριακή) δόση είναι 2 000 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα. Για ορισμένα είδη υπό δοκιμή χημικών ουσιών (π.χ. φαρμακευτικά προϊόντα για τον άνθρωπο) που καλύπτονται από ειδικές κανονιστικές διατάξεις τα όρια αυτά μπορεί να διαφέρουν.

Οι χημικές ουσίες που παρουσιάζουν κορεσμό τοξικοκινητικών ιδιοτήτων ή επάγουν διεργασίες αποτοξίνωσης που μπορεί να επιφέρουν μείωση της έκθεσης μετά από μακροχρόνια χορήγηση ίσως αποτελούν εξαιρέσεις από τα κριτήρια καθορισμού των δόσεων και θα πρέπει να αξιολογούνται κατά περίπτωση.

Τόσο στην οξεία όσο και στην υποξεία παραλλαγή του προσδιορισμού comet, εκτός από τη μέγιστη δόση (ΜΑΔ, μέγιστη εφικτή δόση, μέγιστη έκθεση ή οριακή δόση) θα πρέπει να επιλέγεται, για κάθε χρόνο δειγματοληψίας, μια φθίνουσα σειρά από τουλάχιστον δύο επιπλέον επίπεδα δόσης με κατάλληλες αποστάσεις μεταξύ τους (κατά προτίμηση, με παράγοντα απόστασης μικρότερο από 10) για να καταδεικνύονται οι σχετιζόμενες με τη δόση αποκρίσεις. Ωστόσο, τα χρησιμοποιούμενα επίπεδα δόσης θα πρέπει επίσης να καλύπτουν, κατά προτίμηση, μια περιοχή από τη μέγιστη δόση μέχρι εκείνη που προκαλεί ελάχιστη ή μηδενική τοξικότητα. Όταν παρατηρείται τοξικότητα στον στοχευόμενο ιστό σε όλα τα επίπεδα δόσης που έχουν δοκιμαστεί, συνιστάται η διεξαγωγή περαιτέρω μελέτης με μη τοξικές δόσεις (βλ. παραγράφους 54-55). Οι μελέτες με τις οποίες επιδιώκεται η πληρέστερη διερεύνηση του σχήματος της καμπύλης δόσης-απόκρισης ενδέχεται να απαιτούν μία ή περισσότερες πρόσθετες ομάδες δόσης.

Χορήγηση των δόσεων

Κατά τον σχεδιασμό της δοκιμής θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η προβλεπόμενη οδός έκθεσης του ανθρώπου. Επιτρέπεται επομένως η αιτιολογημένη επιλογή οδών έκθεσης, όπως μέσω της τροφής ή του πόσιμου νερού, με τοπική εφαρμογή, με υποδόρια ή ενδοφλέβια ένεση, από το στόμα (με στομαχικό καθετήρα), μέσω της εισπνοής, η ενδοτραχειακή οδός ή η εμφύτευση. Σε κάθε περίπτωση, η επιλεγόμενη οδός χορήγησης θα πρέπει να εξασφαλίζει επαρκή έκθεση των στοχευόμενων ιστών. Η ενδοπεριτοναϊκή ένεση γενικά δεν συνιστάται, επειδή δεν αποτελεί συνήθως συναφή οδό έκθεσης του ανθρώπου και θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο με ειδική αιτιολόγηση (π.χ. για ορισμένες ουσίες που χρησιμεύουν ως θετικοί μάρτυρες, για διερεύνηση ή για ορισμένα φάρμακα

▼M7

που χορηγούνται ενδοπεριτοναϊκώς). Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί με στομαχικό καθετήρα ή ένεση κάθε φορά εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Ο όγκος δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 1 ml/100 g βάρους σώματος, εκτός στην περίπτωση υδατικών διαλυμάτων όπου μπορούν να χρησιμοποιούνται 2 ml/100 g βάρους σώματος. Η χρήση μεγαλύτερου όγκου (εφόσον το επιτρέπει η νομοθεσία για την καλή μεταχείριση των ζώων) θα πρέπει να αιτιολογείται. Στο μέτρο του δυνατού, τα διάφορα επίπεδα δόσης θα πρέπει να επιτυγχάνονται με ρύθμιση της συγκέντρωσης του δοσολογικού σκευάσματος, ώστε να εξασφαλίζεται σταθερός όγκος σε σχέση με το σωματικό βάρος σε όλα τα επίπεδα δόσης.

Χρόνος δειγματοληψίας

Ο χρόνος δειγματοληψίας αποτελεί κρίσιμη μεταβλητή, διότι καθορίζεται από το χρονικό διάστημα που απαιτείται για την επίτευξη της μέγιστης συγκέντρωσης των υπό δοκιμή χημικών ουσιών στον στοχευόμενο ιστό και για την επαγωγή ρήξεων κλώνων του DNA, πριν όμως προλάβουν οι τελευταίες να εξαλειφθούν, να επιδιορθωθούν ή να προκαλέσουν κυτταρικό θάνατο. Κάποιες από τις βλάβες που οδηγούν σε ρήξεις κλώνων του DNA, οι οποίες ανιχνεύονται με τον προσδιορισμό comet, μπορεί να παραμένουν για πολύ σύντομο χρονικό διάστημα, τουλάχιστον με ορισμένες χημικές ουσίες σε δοκιμές in vitro (52) (53). Εάν επομένως υπάρχουν υπόνοιες για τέτοιες παροδικές βλάβες στο DNA, θα πρέπει να λαμβάνονται μέτρα για τον μετριασμό της απώλειάς τους, με την εξασφάλιση αρκετά έγκαιρης δειγματοληψίας ιστών, ενδεχομένως νωρίτερα από τους προεπιλεγμένους χρόνους που υποδεικνύονται κατωτέρω. Οι βέλτιστοι χρόνοι δειγματοληψίας μπορεί να είναι ειδικοί για την εκάστοτε χημική ουσία ή οδό έκθεσης, με αποτέλεσμα, λόγου χάριν, την ταχεία έκθεση του ιστού κατόπιν ενδοφλέβιας χορήγησης ή μέσω της εισπνοής. Κατά συνέπεια, οι χρόνοι δειγματοληψίας θα πρέπει να καθορίζονται με βάση κινητικά δεδομένα, εφόσον είναι διαθέσιμα [π.χ. ο χρόνος (T_{max}) κατά τον οποίο επιτυγχάνεται η συγκέντρωση αιχμής (C_{max}) στο πλάσμα ή στον ιστό ή η σταθερή κατάσταση, προκειμένου για πολλαπλή χορήγηση]. Εάν δεν υπάρχουν κινητικά δεδομένα, μια ικανοποιητική συμβιβαστική λύση για τη μέτρηση της γονιδιοτοξικότητας είναι η δειγματοληψία 2-6 ώρες μετά την τελευταία μεταχείριση, προκειμένου για δύο ή περισσότερες μεταχειρίσεις, ή δύο δειγματοληψίες 2-6 και 16-26 ώρες μετά τη μεταχείριση στην περίπτωση της εφάπαξ χορήγησης, αν και θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να γίνεται νεκροψία όλων των ζώων κατά την ίδια χρονική στιγμή μετά την τελευταία (ή τη μοναδική) δόση. Για την επιλογή κατάλληλων χρόνων δειγματοληψίας μπορούν επίσης να χρησιμοποιούνται πληροφορίες που αφορούν την εμφάνιση των τοξικών επιδράσεων στα στοχευόμενα όργανα (εφόσον είναι διαθέσιμες).

Παρατηρήσεις

Τα ζώα θα πρέπει να υποβάλλονται σε γενική κλινική εξέταση και καταγραφή των κλινικών παρατηρήσεων που αφορούν την υγεία τους, τουλάχιστον μία φορά ημερησίως, κατά προτίμηση την ίδια ώρα και λαμβανομένου υπόψη του χρονικού διαστήματος κορύφωσης των αναμενόμενων επιδράσεων μετά τη χορήγηση των δόσεων (54). Όλα τα ζώα θα πρέπει να εξετάζονται τουλάχιστον δύο φορές ημερησίως για τη διαπίστωση νοσηρότητας και θνησιμότητας. Στις μελέτες μεγαλύτερης διάρκειας όλα τα ζώα θα πρέπει να ζυγίζονται τουλάχιστον σε εβδομαδιαία βάση, καθώς και κατά τη λήξη της περιόδου δοκιμής. Η κατανάλωση τροφής θα πρέπει να μετράται σε κάθε αλλαγή τροφής και τουλάχιστον σε εβδομαδιαία βάση. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται με το πόσιμο νερό, η κατανάλωσή νερού θα πρέπει να μετράται σε κάθε αλλαγή νερού και, τουλάχιστον, εβδομαδιαίως. Τα ζώα που εμφανίζουν μη θανατηφόρους δείκτες υπερβολικής τοξικότητας θα πρέπει να υποβάλλονται σε ευθανασία πριν από τη λήξη της περιόδου δοκιμής και, γενικά, δεν χρησιμοποιούνται για ανάλυση comet.

Συλλογή ιστών

Δεδομένου ότι η επαγωγή ρήξεων κλώνων του DNA («κομητών») είναι δυνατόν να μελετηθεί σχεδόν σε οποιονδήποτε ιστό, η αιτιολογία της επιλογής ιστών προς συλλογή θα πρέπει να είναι σαφής και να βασίζεται στον λόγο διεξαγωγής της μελέτης, σε συνδυασμό με τυχόν υπάρχοντα δεδομένα ADME, γονιδιοτοξικότητας, καρκινογενετικότητας ή άλλα δεδομένα τοξικότητας για τις μελετώμενες με τη δοκιμή χημικές ουσίες. Σημαντικοί παράγοντες που θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη είναι, μεταξύ άλλων, η οδός χορήγησης (με βάση τις πιθανές οδούς έκθεσης του ανθρώπου), η προβλεπόμενη κατανομή και απορρόφηση στους ιστούς, ο ρόλος του μεταβολισμού και ο πιθανός μηχανισμός δράσης των υπό δοκιμή χημικών ουσιών. Το ήπαρ είναι ο ιστός που μελετάται συχνότερα και για τον οποίο έχουν συγκεντρωθεί τα περισσότερα δεδομένα. Ως εκ

▼M7

τούτου, ελλείψει προϋπαρχόντων στοιχείων και εάν δεν έχουν προσδιοριστεί συγκεκριμένοι ιστοί για μελέτη, η δειγματοληψία ήπατος θα είναι δικαιολογημένη, δεδομένου ότι το όργανο αυτό αποτελεί την πρωταρχική θέση ξενοβιοτικού μεταβολισμού και συχνά εκτίθεται σε μεγάλο βαθμό, τόσο στις μητρικές ουσίες όσο και στους μεταβολίτες τους. Σε ορισμένες περιπτώσεις η δοκιμή με τη μέγιστη καταλληλότητα μπορεί να συνίσταται στην εξέταση της θέσης απευθείας επαφής (όπως ο αδενώδης στόμαχος ή το δωδεκαδάκτυλο/η νήστιδα στην περίπτωση των χημικών ουσιών που χορηγούνται από το στόμα ή οι πνεύμονες, προκειμένου για εισπνεόμενες ουσίες). Η επιλογή επιπλέον ή εναλλακτικών ιστών θα πρέπει να βασίζεται στους ειδικούς λόγους που υπαγορεύουν τη διεξαγωγή της δοκιμής. Ωστόσο, μπορεί να είναι χρήσιμη η εξέταση διαφορετικών ιστών προερχόμενων από τα ίδια ζώα, υπό τον όρο ότι το εργαστήριο έχει αποδείξει την τεχνική του ικανότητα όσον αφορά τους συγκεκριμένους ιστούς και την επάρκειά του για τον ταυτόχρονο χειρισμό πολλών διαφορετικών ιστών.

Παρασκευή των δοκιμίων

Για τις διεργασίες που περιγράφονται στις επόμενες παραγράφους (44-49) είναι σημαντικό να χρησιμοποιούνται όλα τα διαλύματα ή σταθερά εναιωρήματα πριν από την ημερομηνία λήξης τους ή να παρασκευάζονται νέα, εάν είναι αναγκαίο. Στις επόμενες παραγράφους, επίσης, οι χρόνοι που χρειάζονται για i) την αφαίρεση κάθε ιστού μετά τη νεκροψία, ii) την επεξεργασία κάθε ιστού για να ληφθούν εναιωρήματα κυττάρων/πυρήνων και iii) την επεξεργασία των εναιωρημάτων και την επίστρωση σε αντικειμενοφόρες πλάκες θεωρούνται κρίσιμες μεταβλητές (βλ. ορισμούς στο προσάρτημα 1) και θα πρέπει να έχει καθοριστεί αποδεκτή χρονική διάρκεια για καθένα από αυτά τα στάδια κατά την εδραίωση της μεθόδου στο εργαστήριο και την απόδειξη της τεχνικής του ικανότητας.

Τα ζώα υποβάλλονται σε ευθανασία, σύμφωνα με την εφαρμοζόμενη νομοθεσία για την καλή μεταχείριση των ζώων και την αρχή 3R, κατά τους κατάλληλους χρόνους μετά την τελευταία μεταχείριση με την υπό δοκιμή χημική ουσία. Οι επιλεγμένοι ιστοί αφαιρούνται, ανατέμνονται και ένα μέρος του καθενός συλλέγεται για τον προσδιορισμό comet, ενώ ταυτόχρονα θα πρέπει να λαμβάνεται μια τομή από το ίδιο μέρος του ιστού και να τοποθετείται σε διάλυμα φορμαλδεΰδης ή κατάλληλο μονιμοποιητικό για ενδεχόμενη ιστοπαθολογική εξέταση (βλ. παράγραφο 55) σύμφωνα με πρότυπες μεθόδους (12). Ο ιστός που προορίζεται για τον προσδιορισμό comet τοποθετείται σε ρυθμιστικό διάλυμα μικροτεμαχισμού, εκπλένεται επαρκώς με ψυχρό ρυθμιστικό διάλυμα μικροτεμαχισμού για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων αίματος και φυλάσσεται σε παγωμένο ρυθμιστικό διάλυμα μικροτεμαχισμού, έως ότου υποβληθεί σε επεξεργασία. Επιτρέπεται επίσης η επιτόπια διαπότιση, π.χ. για το ήπαρ ή τους νεφρούς.

Έχουν δημοσιευθεί πολλές μέθοδοι απομόνωσης κυττάρων/πυρήνων. Σε αυτές περιλαμβάνονται ο μικροτεμαχισμός ιστών, π.χ. ήπατος και νεφρών, η απόξεση επιφανειών του βλεννογόνου στην περίπτωση του γαστρεντερικού σωλήνα, η ομογενοποίηση και η ενζυμική πέψη. Η μελέτη επικύρωσης του JaCVAM αφορούσε μόνο απομονωμένα κύτταρα και, ως εκ τούτου, προτιμώνται τα απομονωμένα κύτταρα για την εδραίωση της μεθόδου στο εργαστήριο και για να είναι δυνατόν να αποδειχθεί η τεχνική ικανότητα με παραπομπή στα δεδομένα της μελέτης του JaCVAM. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι είτε χρησιμοποιηθούν απομονωμένα κύτταρα είτε απομονωμένοι πυρήνες, δεν υπάρχει ουσιώδης διαφορά στο αποτέλεσμα του προσδιορισμού (8). Ομοίως, οι διαφορετικές μέθοδοι απομόνωσης κυττάρων/πυρήνων (π.χ. ομογενοποίηση, μικροτεμαχισμός, ενζυμική πέψη και διήθηση με πλέγμα) παρέχουν συγκρίσιμα αποτελέσματα (55). Κατά συνέπεια μπορούν να χρησιμοποιούνται απομονωμένα κύτταρα ή απομονωμένοι πυρήνες. Το εργαστήριο θα πρέπει να αξιολογεί διεξοδικά και να επικυρώνει ειδικές για κάθε ιστό μεθόδους απομόνωσης μοναδιαίων κυττάρων/πυρήνων. Όπως εξηγείται στην παράγραφο 40, κάποιες από τις βλάβες που οδηγούν σε ρήξεις κλώνων του DNA, οι οποίες ανιχνεύονται με τον προσδιορισμό comet, μπορεί να είναι πολύ βραχύβιες (52) (53). Ως εκ τούτου, ανεξάρτητα από τη μέθοδο που χρησιμοποιείται για την παρασκευή των εναιωρημάτων μοναδικών κυττάρων/πυρήνων, είναι σημαντικό να υποβάλλονται οι ιστοί σε επεξεργασία το ταχύτερο δυνατόν μετά την ευθανασία των ζώων και να φέρονται σε συνθήκες που περιορίζουν την εξάλειψη βλαβών (π.χ. με τη διατήρηση των ιστών σε χαμηλές θερμοκρασίες). Τα εναιωρήματα κυττάρων θα πρέπει να διατηρούνται παγωμένα έως ότου είναι έτοιμα προς χρήση, ώστε να μπορούν να καταδειχθούν ελάχιστη διαδειγματική μεταβλητότητα και κατάλληλες αποκρίσεις στους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες.

▼M7

ΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟΦΟΡΩΝ ΠΛΑΚΩΝ

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες θα πρέπει να ετοιμάζονται το ταχύτερο δυνατόν (στην ιδανική περίπτωση, εντός μίας ώρας) μετά την παρασκευή του εναιωρήματος μοναδικών κυττάρων/πυρήνων, αλλά η θερμοκρασία και ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ του θανάτου των ζώων και της ετοιμασίας των αντικειμενοφόρων πλακών θα πρέπει να ελέγχονται αυστηρά και να επικυρώνονται στις συνθήκες του εργαστηρίου. Ο όγκος του εναιωρήματος κυττάρων που προστίθεται σε αγαρόζη χαμηλού σημείου τήξης (συνήθως 0,5-1,0 %) για την ετοιμασία των αντικειμενοφόρων πλακών δεν θα πρέπει να μειώνει την εκατοστιαία αναλογία αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξης σε επίπεδα κάτω του 0,45 %. Η βέλτιστη πυκνότητα κυττάρων καθορίζεται από το σύστημα ανάλυσης εικόνων που χρησιμοποιείται για την καταμέτρηση των «κομητών».

Λύση

Οι συνθήκες λύσης αποτελούν επίσης κρίσιμη μεταβλητή και μπορεί να επηρεάσουν τις ρήξεις κλώνων που οφείλονται σε συγκεκριμένους τύπους τροποποίησης του DNA (ορισμένες αλκυλιώσεις του DNA και χημικές προσθήκες στις βάσεις του). Ως εκ τούτου, συνιστάται η διατήρηση όσο το δυνατόν σταθερότερων συνθηκών λύσης για όλες τις αντικειμενοφόρες πλάκες δεδομένου πειράματος. Μετά την ετοιμασία τους, οι αντικειμενοφόρες πλάκες θα πρέπει να εμβαπτίζονται σε διάλυμα λύσης υπό ψύξη τουλάχιστον για μία ώρα (ή όλη τη νύχτα), σε συνθήκες θερμοκρασίας περίπου 2-8°C και χαμηλού φωτισμού, π.χ. κίτρινο φως (ή φωτοστεγανό περιβάλλον), για να αποφεύγεται η έκθεση σε λευκό φως που μπορεί να περιέχει υπεριώδεις συνιστώσες. Μετά από αυτήν την περίοδο επώασης, οι αντικειμενοφόρες πλάκες θα πρέπει να εκπλένονται για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων απορρυπαντικού και αλάτων πριν από το στάδιο της αποπεριέλιξης με άλκαλι. Για την έκπλυση αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί νερό υψηλής καθαρότητας, ρυθμιστικό διάλυμα εξουδετέρωσης ή ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων, όπως επίσης και ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Κατ' αυτόν τον τρόπο διατηρούνται οι αλκαλικές συνθήκες στον θάλαμο ηλεκτροφόρησης.

Αποπεριέλιξη και ηλεκτροφόρηση

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες θα πρέπει να τοποθετούνται τυχαία στην τράπεζα οριζόντιας (τύπου υποβρυχίου) μονάδας ηλεκτροφόρησης που περιέχει επαρκή ποσότητα διαλύματος ηλεκτροφόρησης, ώστε οι επιφάνειες των αντικειμενοφόρων πλακών να είναι πλήρως καλυμμένες (το βάθος βύθισης θα πρέπει επίσης να παραμένει σταθερό μεταξύ των ηλεκτροφορήσεων). Σε άλλου τύπου μονάδες ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό comet, δηλ. μονάδες με ενεργητικό σύστημα ψύξης, κυκλοφορία του ψυκτικού μέσου και υψηλής απόδοσης τροφοδοτικό ρεύματος, η ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος αυξάνεται όταν αυξάνεται το ύψος του διαλύματος υπό σταθερή τάση. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται ισόρροπος σχεδιασμός για την τοποθέτηση των αντικειμενοφόρων πλακών στη δεξαμενή ηλεκτροφόρησης, ώστε να μετριάζονται οι επιδράσεις τυχόν τάσεων μεταβολής ή του φαινομένου των άκρων (edge effect) στο εσωτερικό της δεξαμενής και να ελαχιστοποιείται η μεταβλητότητα μεταξύ των παρτίδων, δηλ. σε κάθε εκτέλεση ηλεκτροφόρησης θα πρέπει να τοποθετείται ο ίδιος αριθμός αντικειμενοφόρων πλακών από κάθε ζώο της μελέτης και να περιλαμβάνονται δείγματα από τις διαφορετικές δοσολογικές ομάδες, καθώς και από τους αρνητικούς και θετικούς μάρτυρες. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες θα πρέπει να αφήνονται σε ηρεμία επί τουλάχιστον 20 λεπτά για να αποπεριελιχθεί το DNA και, στη συνέχεια, να υποβάλλονται σε ηλεκτροφόρηση υπό ελεγχόμενες συνθήκες που να μεγιστοποιούν την ευαισθησία και τη δυναμική περιοχή της δοκιμής (δηλ. να δίνουν αποδεκτά επίπεδα % DNA ουράς στους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες για μέγιστη ευαισθησία). Ο βαθμός μετανάστευσης του DNA συνδέεται γραμμικά με τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης, καθώς και με το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο (V/cm). Με βάση τη μελέτη του JaCVAM, το τελευταίο μπορεί να είναι 0,7 V/cm για τουλάχιστον 20 λεπτά. Η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης θεωρείται κρίσιμη μεταβλητή και θα πρέπει να καθορίζεται με γνώμονα τη βελτιστοποίηση της δυναμικής περιοχής. Η αύξηση της διάρκειας της ηλεκτροφόρησης (π.χ. 30 ή 40 λεπτά για τη μεγιστοποίηση της ευαισθησίας) συνήθως οδηγεί σε ισχυρότερες θετικές αποκρίσεις σε γνωστά μεταλλαξιγόνα. Ωστόσο, μπορεί επίσης να έχει ως αποτέλεσμα υπερβολική μετανάστευση στα δείγματα μαρτύρων. Σε κάθε πείραμα η τάση θα πρέπει να διατηρείται σταθερή, ενώ η μεταβλητότητα των λοιπών παραμέτρων θα πρέπει να βρίσκεται εντός μικρού και καθορισμένου εύρους· για παράδειγμα, στη μελέτη του JaCVAM, η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου 0,7 V/cm απέδωσε αρχική ένταση ρεύματος 300 mA. Το βάθος του ρυθμιστικού διαλύματος θα πρέπει να ρυθμίζεται κατά τρόπο ώστε να επιτυγχάνονται οι απαιτούμενες συνθήκες, και να διατηρείται σε όλη τη

▼M7

διάρκεια του πειράματος. Η ένταση του ρεύματος θα πρέπει να καταγράφεται στην αρχή και στο τέλος της ηλεκτροφόρησης. Κατά συνέπεια, οι βέλτιστες συνθήκες θα πρέπει να καθορίζονται από το εκάστοτε εργαστήριο κατά την αρχική απόδειξη τεχνικής ικανότητας για κάθε μελετώμενο ιστό. Η θερμοκρασία του διαλύματος ηλεκτροφόρησης θα πρέπει να διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα, συνήθως 2-10 °C (10), σε όλη τη διάρκεια της αποπεριέλιξης και της ηλεκτροφόρησης και να καταγράφεται κατά την έναρξη της αποπεριέλιξης, καθώς και στην αρχή και στο τέλος της ηλεκτροφόρησης.

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, οι αντικειμενοφόρες πλάκες θα πρέπει να εμβαπτίζονται στο ρυθμιστικό διάλυμα εξουδετέρωσης ή εκπλένονται με αυτό για 5 λεπτά τουλάχιστον. Η χρώση και η ανάλυση των πηκτωμάτων μπορούν να πραγματοποιούνται όταν αυτά είναι νωπά (π.χ. εντός 1-2 ημερών) ή μετά από αφυδάτωση για μεταγενέστερη μέτρηση (π.χ. εντός 1-2 εβδομάδων μετά τη χρώση) (56). Ωστόσο, οι συνθήκες θα πρέπει να επικυρώνονται κατά την απόδειξη τεχνικής ικανότητας και θα πρέπει να συγκεντρώνονται και να διατηρούνται χωριστά ιστορικά δεδομένα για κάθε συνθήκη. Στη δεύτερη περίπτωση, οι αντικειμενοφόρες πλάκες θα πρέπει να αφυδατώνονται με εμβάπτιση σε απόλυτη αιθανόλη για τουλάχιστον 5 λεπτά, να αφήνονται να ξηρανθούν στον αέρα και, στη συνέχεια, να φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου ή σε δοχείο στο ψυγείο μέχρι την ανάλυση.

Μέθοδοι μέτρησης

Οι «κομήτες» θα πρέπει να ποσοτικοποιούνται με αυτόματο ή ημιαυτόματο σύστημα ανάλυσης εικόνων. Για τη χρώση των αντικειμενοφόρων πλακών χρησιμοποιείται κατάλληλη φθορίζουσα χρωστική, π.χ. SYBR Gold, Green I, ιωδιούχο προπίδιο ή βρωμιούχο αιθίδιο, και για τη μέτρηση μικροσκόπιο επιφθορισμού με κατάλληλη μεγέθυνση (π.χ. 200x), εφοδιασμένο με τους ενδεδειγμένους ανιχνευτές ή με ψηφιακή συσκευή λήψης εικόνων (π.χ. με αισθητήρα CCD).

Τα κύτταρα μπορούν να καταταχθούν σε τρεις κατηγορίες, όπως περιγράφεται στον άτλαντα εικόνων κομητών (57), ήτοι μετρήσιμα, μη μετρήσιμα και σκιώδη κύτταρα (βλ. παράγραφο 56 για επεξήγηση). Για την αποφυγή τεχνητών αποτελεσμάτων, μόνο τα μετρήσιμα κύτταρα (με σαφές περίγραμμα κεφαλής και ουράς, χωρίς παρεμβολές από γειτονικά κύτταρα) θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη στον προσδιορισμό του % DNA ουράς. Δεν είναι αναγκαίο να αναφέρεται η συχνότητα των μη μετρήσιμων κυττάρων. Η συχνότητα των σκιωδών κυττάρων θα πρέπει να προσδιορίζεται με βάση οπτική εξέταση (δεδομένου ότι η απουσία κεφαλής με σαφές περίγραμμα συνεπάγεται ότι δεν είναι εύκολο να ανιχνευθούν με ανάλυση εικόνων) τουλάχιστον 150 κυττάρων ανά δείγμα (βλ. παράγραφο 56 για επεξήγηση) και να τεκμηριώνεται χωριστά.

Όλες οι προς ανάλυση αντικειμενοφόρες πλάκες, συμπεριλαμβανομένων των πλακών των θετικών και αρνητικών μαρτύρων, θα πρέπει να κωδικοποιούνται χωριστά και να εξετάζονται τυφλά, ώστε ο εξεταστής να μη γνωρίζει τη συνθήκη μεταχείρισης. Για κάθε δείγμα (ανά ιστό και ανά ζώο), θα πρέπει να αναλύονται τουλάχιστον 150 κύτταρα (χωρίς τα σκιώδη, βλ. παράγραφο 56). Η καταμέτρηση 150 κυττάρων ανά ζώο με τουλάχιστον 5 ζώα ανά δόση (λιγότερα στην ομάδα που χρησιμεύει ως παράλληλος θετικός μάρτυρας, βλ. παράγραφο 29) παρέχει επαρκή στατιστική ισχύ σύμφωνα με την ανάλυση των Smith και συν., 2008 (5). Εάν χρησιμοποιούνται αντικειμενοφόρες πλάκες, ο αριθμός αυτός θα μπορούσε να εξασφαλιστεί με την ανάλυση 2 ή 3 πλακών ανά δείγμα, όταν χρησιμοποιούνται ομάδες πέντε ζώων. Θα πρέπει να παρατηρούνται πολλές περιοχές των αντικειμενοφόρων πλακών με πυκνότητα που να αποκλείει την αλληλεπικάλυψη των ουρών. Η καταμέτρηση στα άκρα των αντικειμενοφόρων πλακών θα πρέπει να αποφεύγεται.

Οι ρήξεις κλώνων του DNA μπορούν να μετρηθούν στον προσδιορισμό comet με ανεξάρτητα τελικά σημεία, όπως το % DNA ουράς, το μήκος της ουράς και η ορμή της. Όλες αυτές οι μετρήσεις μπορούν να εκτελούνται, εάν χρησιμοποιείται το κατάλληλο λογισμικό ανάλυσης εικόνων. Ωστόσο, για την αξιολόγηση και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, συνιστάται η χρήση του % DNA ουράς (γνωστό και ως % έντασης ουράς) (12) (40) (41) (42), το οποίο προσδιορίζεται από την ένταση φθορισμού των θραυσμάτων DNA της ουράς, εκφραζόμενη ως επί τοις εκατό ποσοστό της συνολικής έντασης φθορισμού του κυττάρου (13).

▼M7

Βλάβες των ιστών και κυτταροτοξικότητα

Τα θετικά ευρήματα στον προσδιορισμό comet μπορεί να μην οφείλονται αποκλειστικά σε γονιδιοτοξικότητα, καθώς η τοξικότητα για τον στοχευόμενο ιστό ενδέχεται επίσης να επιφέρει αύξηση της μετανάστευσης του DNA (12) (41). Αντιστρόφως, παρατηρείται συχνά χαμηλή ή μέτρια κυτταροτοξικότητα με γνωστές γονιδιοτοξίνες (12), γεγονός που δείχνει ότι, μόνο με τον προσδιορισμό comet, δεν είναι δυνατόν να γίνει διάκριση μεταξύ της μετανάστευσης του DNA που επάγεται από γονιδιοτοξικότητα και εκείνης που επάγεται από κυτταροτοξικότητα. Ωστόσο, όταν παρατηρούνται αυξήσεις της μετανάστευσης του DNA, συνιστάται η εξέταση ενός ή περισσότερων δεικτών κυτταροτοξικότητας, δεδομένου ότι αυτή μπορεί να υποβοηθήσει την ερμηνεία των ευρημάτων. Η αύξηση της μετανάστευσης του DNA που συνοδεύεται από σαφή εκδήλωση κυτταροτοξικότητας θα πρέπει να ερμηνεύεται με προσοχή.

Έχουν προταθεί πολλά μέσα μέτρησης της κυτταροτοξικότητας και, μεταξύ αυτών, οι ιστοπαθολογικές αλλαγές θεωρούνται κατάλληλη παράμετρος τοξικότητας για τους ιστούς. Μολονότι παρατηρήσεις όπως φλεγμονές, κυτταρική διήθηση και αποπτωτικές ή νεκρωτικές αλλαγές έχουν συσχετιστεί με αύξηση της μετανάστευσης του DNA, εν τούτοις, όπως κατέδειξε η μελέτη επικύρωσης του JaCVAM (12), δεν υπάρχει οριστικός κατάλογος ιστοπαθολογικών αλλαγών που να συνδέονται πάντοτε με την αύξηση της μετανάστευσης του DNA. Οι μεταβολές παραμέτρων κλινικής χημείας (π.χ. ηπατικά ένζυμα AST και ALT) μπορούν επίσης να προσφέρουν χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με βλάβες ιστών, ενώ μπορούν επίσης να λαμβάνονται υπόψη επιπλέον δείκτες, όπως η ενεργοποίηση κασπασών, η χρώση TUNEL ή με αννεξίνη V κ.λπ. Ωστόσο, τα δημοσιευμένα δεδομένα σχετικά με περιπτώσεις χρήσης των τελευταίων σε μελέτες in vivo είναι περιορισμένα και άνισης αξιοπιστίας.

Τα σκιώδη κύτταρα (ή κύτταρα-φαντάσματα/ghost cells) είναι κύτταρα των οποίων η μικροσκοπική εικόνα συνίσταται σε μικρή ή ανύπαρκτη κεφαλή και πλατιά διάχυτη ουρά και τα οποία θεωρείται ότι έχουν υποστεί σοβαρή βλάβη, αν και η αιτιολογία της παρουσίας τους είναι αβέβαιη (βλ. προσάρτημα 3). Λόγω της όψης τους, οι μετρήσεις του % DNA ουράς με ανάλυση εικόνων δεν είναι αξιόπιστες και, ως εκ τούτου, τα σκιώδη κύτταρα θα πρέπει να αξιολογούνται χωριστά. Η εμφάνιση σκιωδών κυττάρων θα πρέπει να σημειώνεται και να αναφέρεται, ενώ κάθε σχετική αύξηση που πιστεύεται ότι οφείλεται στην υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να διερευνάται και να ερμηνεύεται με προσοχή. Η γνώση του δυνητικού τρόπου δράσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μπορεί να συμβάλει στις εν λόγω εκτιμήσεις.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Η πειραματική μονάδα είναι το ζώο και, ως εκ τούτου, θα πρέπει να παρουσιάζονται σε μορφή πίνακα τόσο τα δεδομένα για κάθε ζώο όσο και σύνοψη των αποτελεσμάτων. Λόγω του ιεραρχικού χαρακτήρα των δεδομένων, συνιστάται να προσδιορίζεται η διάμεση τιμή % DNA ουράς για κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα και να υπολογίζεται η μέση τιμή των διάμεσων τιμών για κάθε ζώο (12). Στη συνέχεια, προσδιορίζεται ο μέσος όρος των μέσων τιμών των επιμέρους ζώων για να προκύψει ομαδική μέση τιμή. Όλες αυτές οι τιμές θα πρέπει να περιλαμβάνονται στην έκθεση. Μπορούν να εφαρμοστούν εναλλακτικές προσεγγίσεις (βλ. παράγραφο 53), εφόσον δικαιολογούνται από επιστημονικής και στατιστικής πλευράς. Η στατιστική ανάλυση μπορεί να διενεργηθεί με την εφαρμογή διαφόρων προσεγγίσεων (58) (59) (60) (61). Κατά την επιλογή των στατιστικών μεθόδων που θα χρησιμοποιηθούν, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η ανάγκη μετασχηματισμού (π.χ. λογαριθμικού ή τετραγωνικού) των δεδομένων και/ή προσθήκης ενός μικρού αριθμού (π.χ. 0,001) σε όλες τις τιμές (ακόμη και στις μη μηδενικές) για τον μετριασμό των επιπτώσεων των μηδενικών τιμών κυττάρων, όπως εξηγείται στις ανωτέρω βιβλιογραφικές παραπομπές. Λεπτομέρειες για την ανάλυση των αλληλεπιδράσεων μεταχείρισης-φύλου, όταν χρησιμοποιούνται και τα δύο φύλα, και για την επακόλουθη ανάλυση των δεδομένων, αναλόγως του αν διαπιστώνονται διαφορές ή όχι, παρατίθενται στο προσάρτημα 2. Θα πρέπει επίσης να αναφέρονται δεδομένα για την τοξικότητα και τα κλινικά σημεία.

Κριτήρια αποδοχής

Η αποδοχή μιας δοκιμής βασίζεται στα ακόλουθα κριτήρια:

α. Θεωρείται αποδεκτή η προσθήκη του παράλληλου αρνητικού μάρτυρα στη βάση δεδομένων του εργαστηρίου για ιστορικούς αρνητικούς μάρτυρες, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 16.

▼M7

β. Οι παράλληλοι θετικοί μάρτυρες (βλ. παράγραφο 26) θα πρέπει να επάγουν αποκρίσεις συμβατές με εκείνες που έχουν καταχωριστεί στη βάση δεδομένων για ιστορικούς θετικούς μάρτυρες και να επιφέρουν στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα.

γ. Αναλύεται επαρκής αριθμός κυττάρων και δόσεων (παράγραφοι 52 και 36-38).

δ. Τα κριτήρια επιλογής της μέγιστης δόσης είναι σύμφωνα με αυτά που περιγράφονται στην παράγραφο 36.

Αξιολόγηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται σαφώς θετική εάν:

α. τουλάχιστον σε μία από τις δόσεις δοκιμής εμφανίζεται στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα,

β. η αύξηση σχετίζεται με τη δόση, όταν αξιολογείται με κατάλληλο έλεγχο τάσης,

γ. κάποιο από τα αποτελέσματα βρίσκεται εκτός της κατανομής των ιστορικών δεδομένων που αφορούν αρνητικούς μάρτυρες, για δεδομένο ζωικό είδος, φορέα, οδό έκθεσης, ιστό και αριθμό δόσεων.

Όταν πληρούνται όλα αυτά τα κριτήρια, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται ικανή να επάγει ρήξη κλώνων του DNA στους ιστούς που μελετώνται με το παρόν σύστημα δοκιμής. Εάν πληρούνται μόνο ένα ή δύο από αυτά τα κριτήρια, βλ. παράγραφο 62.

Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται σαφώς αρνητική εάν:

α. σε καμία από τις συγκεντρώσεις δοκιμής δεν εμφανίζεται στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα,

β. δεν παρατηρείται σχετιζόμενη με τη συγκέντρωση αύξηση, όταν αξιολογείται με κατάλληλο έλεγχο τάσης,

γ. όλα τα αποτελέσματα βρίσκονται εντός της κατανομής των ιστορικών δεδομένων που αφορούν αρνητικούς μάρτυρες, για δεδομένο ζωικό είδος, φορέα, οδό έκθεσης, ιστό και αριθμό δόσεων,

δ. τεκμηριώνεται με άμεσα ή έμμεσα στοιχεία η έκθεση των στοχευόμενων ιστών ή η τοξικότητα για τους ιστούς αυτούς.

Η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται τότε ότι δεν μπορεί να επαγάγει ρήξη κλώνων του DNA στους ιστούς που μελετώνται με το παρόν σύστημα δοκιμής.

Δεν απαιτείται επαλήθευση των σαφώς θετικών ή αρνητικών αποκρίσεων.

Σε περίπτωση που η απόκριση δεν είναι σαφώς θετική ούτε σαφώς αρνητική (δηλ. δεν πληρούνται όλα τα κριτήρια της παραγράφου 59 ή 60) και για να διαπιστωθεί η βιολογική σημασία ενός αποτελέσματος, τα δεδομένα θα πρέπει να αξιολογούνται κατά την κρίση των ειδικών και/ή με περαιτέρω διερεύνηση, εφόσον δικαιολογείται επιστημονικά. Η καταμέτρηση επιπλέον κυττάρων (κατά περίπτωση) ή η επανάληψη του πειράματος, ενδεχομένως με τη χρήση βελτιστοποιημένων πειραματικών συνθηκών (π.χ. αποστάσεις μεταξύ των δόσεων, άλλες οδοί χορήγησης, άλλοι χρόνοι δειγματοληψίας ή άλλοι ιστοί) θα μπορούσε να είναι χρήσιμη.

Σε σπάνιες περιπτώσεις, ακόμη και μετά από περαιτέρω διερεύνηση, το σύνολο δεδομένων δεν επιτρέπει την εξαγωγή συμπεράσματος για θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα και, κατά συνέπεια, η έκβαση κρίνεται διφορούμενη.

▼M7

Για την αξιολόγηση της βιολογικής σημασίας θετικού ή διφορούμενου αποτελέσματος, απαιτούνται στοιχεία σχετικά με την κυτταροτοξικότητα στον στοχευόμενο ιστό (βλ. παραγράφους 54-55). Όταν υπάρχουν θετικά ή διφορούμενα ευρήματα μόνο παράλληλα με σαφείς ενδείξεις κυτταροτοξικότητας, η μελέτη θα κρίνεται διφορούμενη ως προς τη γονιδιοτοξικότητα, εκτός εάν υπάρχουν επαρκή στοιχεία που να στηρίζουν τη συναγωγή οριστικού συμπεράσματος. Σε περίπτωση αρνητικής έκβασης της μελέτης, η οποία συνοδεύεται από σημεία τοξικότητας σε όλες τις δοκιμασθείσες δόσεις, μπορεί να είναι σκόπιμη η περαιτέρω μελέτη με μη τοξικές δόσεις.

Έκθεση δοκιμής

Στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

— προέλευση, αριθμός παρτίδας εάν είναι διαθέσιμος·

— σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, καταληκτική ημερομηνία χρήσης ή ημερομηνία νέας ανάλυσης, εάν είναι γνωστή.

Μονοσυστατική ουσία:

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες·

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμίξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγματα:

— περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Διαλύτης/φορέας:

— αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη/φορέα,

— διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον διαλύτη/φορέα, εάν είναι γνωστές·

— παρασκευή των δοσολογικών σκευασμάτων·

— αναλυτικοί προσδιορισμοί στα σκευάσματα (π.χ. σταθερότητα, ομοιογένεια, ονομαστικές συγκεντρώσεις).

Ζώα δοκιμής:

— είδος/φυλή που χρησιμοποιήθηκε και επιστημονική και δεοντολογική αιτιολόγηση της επιλογής του·

— αριθμός, ηλικία και φύλο των ζώων·

— προέλευση, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσιο, εμπλουτισμός του περιβάλλοντος κ.λπ.·

— βάρος κάθε ζώου κατά την έναρξη και τη λήξη της δοκιμής, συμπεριλαμβανομένων του εύρους τιμών, της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης για κάθε ομάδα.

Συνθήκες δοκιμής:

— δεδομένα για τους θετικούς μάρτυρες και τους αρνητικούς μάρτυρες με φορέα/διαλύτη·

▼**M7**

— αποτελέσματα της μελέτης προσδιορισμού του εύρους δόσεων (εφόσον διεξήχθη)·

— αιτιολόγηση της επιλογής των επιπέδων δόσης·

— λεπτομέρειες για το παρασκεύασμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας·

— λεπτομέρειες σχετικά με τη χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας·

— αιτιολόγηση της επιλογής της οδού χορήγησης·

— σημείο ένεσης (για μελέτες με υποδόρια ή ενδοφλέβια χορήγηση)·

— μέθοδοι προετοιμασίας του δείγματος εάν είναι διαθέσιμες, ιστοπαθολογικές εξετάσεις, ιδίως σε περίπτωση χημικής ουσίας που προκαλεί θετική απόκριση στον προσδιορισμό comet·

— αιτιολόγηση της επιλογής του ιστού·

— μέθοδοι με τις οποίες εξακριβώθηκε ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία έφτασε στον στοχευόμενο ιστό ή εισήλθε στη γενική κυκλοφορία του αίματος, εάν τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά·

— πραγματική δόση (mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα), υπολογιζόμενη από τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο σιτηρέσιο/στο πόσιμο νερό (ppm) και την κατανάλωση, κατά περίπτωση·

— λεπτομερή στοιχεία σχετικά με την ποιότητα της τροφής και του νερού·

— λεπτομερής περιγραφή των προγραμμάτων αγωγής και δειγματοληψίας και αιτιολόγηση των επιλογών (π.χ. τοξικοκινητικά δεδομένα, εάν είναι διαθέσιμα)·

— μέθοδος ανακούφισης του πόνου, αναλγησία·

— μέθοδος ευθανασίας·

— διαδικασίες απομόνωσης και διατήρησης των ιστών·

— μέθοδοι παρασκευής εναιωρήματος μοναδιαίων κυττάρων/πυρήνων·

— προέλευση και αριθμοί παρτίδας όλων των χημικών αντιδραστηρίων (κατά το δυνατόν)·

— μέθοδοι αξιολόγησης της κυτταροτοξικότητας·

— συνθήκες ηλεκτροφόρησης·

— τεχνικές χρώσης που χρησιμοποιούνται, και

— μέθοδοι ανάλυσης και μέτρησης των «κομητών».

Αποτελέσματα:

— γενικές κλινικές παρατηρήσεις, εάν υπάρχουν, πριν από τη δοκιμή και καθ' όλη τη διάρκειά της ανά ζώο·

— αποδεικτικά στοιχεία κυτταροτοξικότητας, εφόσον υπάρχουν·

▼M7

— για μελέτες διάρκειας μεγαλύτερης της μίας εβδομάδας: βάρος κάθε ζώου κατά τη διάρκεια της μελέτης, συμπεριλαμβανομένων του εύρους τιμών, της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης για κάθε ομάδα, κατανάλωση τροφής·

— σχέση δόσης-απόκρισης, εάν είναι προφανής·

— για κάθε ιστό/ζώο, % DNA ουράς (ή άλλες παράμετροι, εφόσον επιλέχθηκαν) και διάμεσες τιμές ανά αντικειμενοφόρο πλάκα, μέσες τιμές ανά ζώο και μέσες τιμές ανά ομάδα·

— δεδομένα για παράλληλους και ιστορικούς αρνητικούς μάρτυρες, με πεδία τιμών, μέσες/διάμεσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις, για κάθε ιστό που αξιολογήθηκε·

— δεδομένα για παράλληλους και ιστορικούς θετικούς μάρτυρες·

— για άλλους ιστούς εκτός του ήπατος, καμπύλη δόσης-απόκρισης με χρήση του θετικού μάρτυρα. Η καμπύλη αυτή μπορεί να προέρχεται από δεδομένα που συγκεντρώθηκαν κατά την απόδειξη τεχνικής ικανότητας (βλ. παραγράφους 16-17) και θα πρέπει να συνοδεύεται από αιτιολόγηση, με παραπομπές στην τρέχουσα βιβλιογραφία, για την καταλληλότητα του μεγέθους και της διασποράς των αποκρίσεων στους μάρτυρες στον εκάστοτε ιστό·

— στατιστικές αναλύσεις και εφαρμοσθείσες μέθοδοι· και κριτήρια χαρακτηρισμού των αποκρίσεων ως θετικών, αρνητικών ή διφορούμενων·

— συχνότητα των σκιωδών κυττάρων σε κάθε ομάδα και ανά ζώο.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Συμπέρασμα

Βιβλιογραφία

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Kirkland, D., G. Speit (2008), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing *in vivo*, *Mutation Research*, Vol. 654/2, pp. 114-32.

(2) Brendler-Schwaab, S. *et al*. (2005), The *in vivo* Comet assay: use and status in genotoxicity testing, *Mutagenesis*, Vol. 20/4, pp. 245-54.

(3) Burlinson, B. *et al*. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol. 627/1, pp. 31-5.

(4) Burlinson, B. (2012), The *in vitro* and *in vivo* Comet assays, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 143-63.

(5) Smith, C.C. *et al*. (2008), Recommendations for design of the rat Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 233-40.

(6) Hartmann, A. et al. (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/1, pp. 45-51.

(7) McKelvey-Martin, V.J. et al. (1993), The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review, *Mutation Research*, Vol. 288/1, pp. 47-63.

(8) Tice, R.R. et al. (2000), Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 206-21.

▼M7

(9) Singh, N.P. et al. (1988), A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, Vol. 175/1, pp. 184-91.

(10) Rothfuss, A. et al. (2010), Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies, *Mutation Research*, Vol., 702/1, pp. 40-69.

(11) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(12) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.

(13) Olive, P.L., J.P. Banath, R.E. Durand (1990), Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the «Comet» assay, *Radiation Research*, Vol. 122/1, pp. 86-94.

(14) Tice, R.R., G.H. Strauss (1995), The single cell gel electrophoresis/Comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans, *Stem Cells*, Vol. 13/1, pp. 207-14.

(15) Collins, A.R (2004), The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Molecular Biotechnology*, Vol. 26/3, pp. 249-61.

(16) Rothfuss, A. et al. (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 108-20.

(17) Kushwaha, S. *et al.* (2010), Evaluation of multi-organ DNA damage by Comet assay from 28 days repeated dose oral toxicity test in mice: A practical approach for test integration in regulatory toxicity testing, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 58/1, pp. 145–54.

(18) Vasquez, M.Z. (2010), Combining the *in vivo* Comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 187-99.

(19) Bowen, D.E. (2011), Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 722/1, pp. 7-19.

(20) Recio, L. *et al*. (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *The Journal of Toxicological Science*, Vol. 35/2, pp. 149-62.

(21) O'Donovan, M., B. Burlinson (2013), Maximum dose levels for the rodent comet assay to examine damage at the site of contact or to the gastrointestinal tract, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 621-3.

(22) Hartmann, A. (2004), **Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations,** *Mutagenesis*, Vol. 19/1, pp. 51-9.

(23) Nesslany, F. (2007), *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 630/1, pp. 28-41.

(24) Brendler-Schwaab, S.Y., B.A. Herbold (1997), A new method for the enrichment of single renal proximal tubular cells and their first use in the Comet assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 393/1-2, pp. 175-8.

▼**M7**

(25) Toyoizumi, T. et al. (2011), Use of the *in vivo* skin Comet assay to evaluate the DNA-damaging potential of chemicals applied to the skin, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 726/2, pp. 175-80.

(26) Struwe, M. et al. (2008), Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo Comet assay, *Photochemical and Photobiological Sciences*, Vol. 7/2, pp. 240-9.

(27) O WADA, K. και συν (2012), A comparison of cell-collecting methods for the Comet assay in urinary bladders of rats, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 742/1-2, pp. 26-30.

(28) Wang, A. et al. (2007), Measurement of DNA damage in rat urinary bladder transitional cells: improved selective harvest of transitional cells and detailed Comet assay protocols, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/ 1-2, pp. 51-9.

(29) Burlinson, B. et al. (2007), *In Vivo* Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 627/1, pp. 31-5.

(30) Jackson, P. et al. (2012), Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring, *Nanotoxicology*, Vol. 6/5, pp. 486-500.

(31) Sasaki, Y.F. et al. (2000), The comet assay with multiple mouse organs: comparison of Comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database, *Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 30/6, pp. 629-799.

(32) Sekihashi, K. et al. (2002), Comparative investigations of multiple organs of mice and rats in the Comet assay, *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, pp. 53-74.

(33) Speit, G, M. Vasquez, A. Hartmann (2009), **The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity,** *Mutation Research*, Vol. 681/1, pp. 3-12.

(34) Zheng, H., P.L. Olive (1997), Influence of oxygen on radiation-induced DNA damage in testicular cells of C3H mice, *International Journal of Radiation Biology*, Vol. 71/3, pp. 275-282.

(35) Cordelli, E.et al. (2003), Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation, *Journal of Radiation Research*, Vol. 160/4, pp. 443-451.

(36) Merk, O., G. Speit (1999), Detection of crosslinks with the Comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 33/2, pp. 167-72.

(37) Pfuhler, S., H.U. Wolf (1996), Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline Comet assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 196-201.

(38) Wu, J.H., N.J. Jones (2012), Assessment of DNA interstrand crosslinks using the modified alkaline Comet assay, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 165-81.

(39) Spanswick, V.J., J.M. Hartley, J.A. Hartley (2010), **Measurement of DNA interstrand crosslinking in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay,** *Methods in Molecular Biology*, Vol. 613, pp. 267-282.

▼M7

(40) Kumaravel, T.S., A.N. Jha (2006), Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 605(1-2), pp. 7-16.

(41) Burlinson, B. *et al*. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol.627/1, pp. 31-5.

(42) Kumaravel, T.S. et al. (2009), Comet Assay measurements: a perspective, *Cell Biology and Toxicology*, Vol. 25/1, pp. 53-64.

(43) Ersson, C., L. Möller (2011), The effects on DNA migration of altering parameters in the Comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments, *Mutagenesis*, Vol. 26/6, pp. 689-95.

(44) Møller, P. *et al*. (2010), Assessment and reduction of Comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 109-11.

(45) Recio, L. *et al*. (2010), Variation in the measurement of DNA damage by Comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 113-23.

(46) Azqueta, A.et al. (2011), Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions, *Mutation Research*, Vol. 724/1-2, pp. 41-45.

(47) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 87-90.

(48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement,* John Wiley and Sons, New York 2nd ed.

(49) Προσάρτημα Α της Ευρωπαϊκής Σύμβασης για την προστασία των σπονδυλωτών ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς και άλλους επιστημονικούς σκοπούς (ΣΕΣ αριθ. 123).

(50) Κεφάλαιο Β.8 του παρόντος παραρτήματος: *Υποξεία αναπνευστική τοξικότητα: Μελέτη 28 ημερών*.

(51) Κεφάλαιο Β.29 του παρόντος παραρτήματος: *Υποχρόνια αναπνευστική τοξικότητα: Μελέτη 90 ημερών*.

(52) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1984), Transient DNA lesions induced by benzo[a]pyrene in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 140/2-3, pp. 141-45.

(53) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1990), The role of excision repair in the removal of transient benzo[a]pyrene-induced DNA lesions in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 236/1, pp. 35-41.

(54) OECD (2002), «Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.

(55) Nakajima, M. (2012), Tissue sample preparation for *in vivo* rodent alkaline Comet assay, *Genes and Environment*, Vol. 34/1, pp. 50-4.

(56) Hartmann, A. et al. (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol.18/1, pp.45–51.

(57) Atlas of Comet Assay Images, Scientist Press Co., Ltd., Tokyo, Japan.

(58) Lovell, D.P., G. Thomas, R. Dubow (1999), Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* Comet studies, *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis*, Vol. 19/2, pp. 109-19.

▼**M7**

(59) Wiklund, S.J., E. Agurell (2003), Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/2, pp. 167-75.

(60) Bright, J. et al. (2011), Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay, *Pharmaceutical Statistics*, Vol. 10/6, pp. 485-93.

(61) Lovell, D.P., T. Omori (2008), Statistical issues in the use of the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 171-82.

▼**M7**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ηλεκτροφόρηση μοναδικών κυττάρων σε πήκτωμα σε αλκαλικές συνθήκες: ευαίσθητη τεχνική για την ανίχνευση πρωτογενών βλαβών του DNA σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων/πυρήνων.

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Comet (κομήτης): το σχήμα που παίρνουν τα νουκλεοειδή υπό την επίδραση ηλεκτροφορητικού πεδίου και το οποίο μοιάζει με κομήτη: η κεφαλή του είναι ο πυρήνας και η ουρά του αποτελείται από DNA που μεταναστεύει από τον πυρήνα εντός του ηλεκτρικού πεδίου.

Κρίσιμη μεταβλητή/παράμετρος: πρόκειται για μεταβλητή του πρωτοκόλλου, μια μικρή αλλαγή της οποίας μπορεί να έχει μεγάλο αντίκτυπο στο συμπέρασμα του προσδιορισμού. Οι κρίσιμες μεταβλητές μπορεί να είναι ειδικές για κάθε ιστό. Δεν θα πρέπει να τροποποιούνται, ιδίως κατά τη διάρκεια μιας δοκιμής, χωρίς να λαμβάνεται υπόψη ο τρόπος με τον οποίο η τροποποίηση θα μεταβάλει την απόκριση στον προσδιορισμό, όπως προκύπτει, για παράδειγμα, από το μέγεθος και τη μεταβλητότητα της απόκρισης των θετικών και αρνητικών μαρτύρων. Στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να απαριθμούνται οι τροποποιήσεις κρίσιμων μεταβλητών που έγιναν κατά τη διάρκεια της δοκιμής ή σε σύγκριση με το τυποποιημένο πρωτόκολλο του εργαστηρίου και να αιτιολογείται κάθε τροποποίηση.

Ένταση ουράς ή % DNA ουράς: αντιστοιχεί στην ένταση φθορισμού της ουράς του κομήτη σε σχέση με τη συνολική ένταση (κεφαλής και ουράς) και αντικατοπτρίζει την έκταση της ρήξης του DNA, εκφραζόμενη ως εκατοστιαία αναλογία.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

UVCB: Ουσίες άγνωστης ή μεταβλητής σύνθεσης, πολύπλοκα προϊόντα αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά.

▼M7

Προσάρτημα 2

ΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΦΥΛΩΝ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ COMET IN VIVO

Ο παραγοντικός σχεδιασμός και η σχετική ανάλυση

Σύμφωνα με τον παρόντα σχεδιασμό, υποβάλλονται σε δοκιμή τουλάχιστον 5 αρσενικά και 5 θηλυκά άτομα σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης, με αποτέλεσμα τη χρήση τουλάχιστον 40 ζώων (20 αρσενικών και 20 θηλυκών, συν τους αντίστοιχους θετικούς μάρτυρες.)

Πρόκειται για έναν από τους απλούστερους παραγοντικούς σχεδιασμούς, που ισοδυναμεί με αμφίδρομη ανάλυση διασποράς στην οποία ως κύριες επιδράσεις θεωρούνται το φύλο και το επίπεδο συγκέντρωσης. Τα δεδομένα μπορούν να αναλυθούν με πολλά τυποποιημένα στατιστικά πακέτα λογισμικού, όπως τα SPSS, SAS, STATA, Genstat, καθώς και με τη χρήση του συστήματος R.

Κατά την ανάλυση διαχωρίζεται η μεταβλητότητα στο σύνολο δεδομένων σε μεταβλητότητα μεταξύ των φύλων, μεταβλητότητα μεταξύ των συγκεντρώσεων και μεταβλητότητα σχετιζόμενη με την αλληλεπίδραση μεταξύ των φύλων και των συγκεντρώσεων. Καθένας από τους όρους αυτούς συγκρίνεται με την εκτίμηση της μεταβλητότητας μεταξύ των ζώων επανάληψης (replicates) που απαρτίζουν τις ομάδες ζώων του ίδιου φύλου στις οποίες χορηγείται η ίδια συγκέντρωση. Περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με την υποκείμενη μεθοδολογία είναι διαθέσιμες σε πολλά κλασικά εγχειρίδια στατιστικής (βλ. βιβλιογραφία) και στις λειτουργίες βοήθειας (Help) που παρέχονται με τα στατιστικά πακέτα λογισμικού.

Στο επόμενο στάδιο της ανάλυσης εξετάζεται ο όρος αλληλεπίδρασης φύλο x συγκέντρωση σε πίνακα ANOVA ([1]). Ελλείψει σημαντικού όρου αλληλεπίδρασης, οι συνδυασμένες τιμές στα φύλα ή στα επίπεδα συγκέντρωσης τροφοδοτούν έγκυρους στατιστικούς ελέγχους μεταξύ των επιπέδων με βάση τη συγχωνευμένη ενδοομαδική μεταβλητότητα (pooled within-group variability), όρο που παρέχεται από την ANOVA.

Η ανάλυση συνεχίζεται με τον διαχωρισμό της εκτίμησης της μεταβλητότητας μεταξύ των συγκεντρώσεων σε αντιθέσεις που τροφοδοτούν έλεγχο για τις γραμμικές και τετραγωνικές αντιθέσεις των αποκρίσεων σε όλα τα επίπεδα συγκέντρωσης. Όταν υπάρχει σημαντική αλληλεπίδραση φύλου x συγκέντρωση, ο όρος αυτός μπορεί επίσης να διαχωριστεί σε αντιθέσεις γραμμικής x φύλο και τετραγωνικής x φύλο αλληλεπίδρασης. Οι εν λόγω όροι τροφοδοτούν ελέγχους με σκοπό να εξακριβωθεί αν οι αποκρίσεις στη συγκέντρωση είναι παράλληλες για τα δύο φύλα ή διαφοροποιούνται ανάλογα με το φύλο.

Η εκτίμηση της συγχωνευμένης ενδοομαδικής μεταβλητότητας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για κατά ζεύγη ελέγχους της διαφοράς μεταξύ των μέσων τιμών. Οι έλεγχοι αυτοί μπορούν να αφορούν συγκρίσεις μεταξύ των μέσων τιμών στα δύο φύλα και μεταξύ των μέσων τιμών στα διάφορα επίπεδα συγκέντρωσης, όπως π.χ. οι συγκρίσεις με τα επίπεδα των αρνητικών μαρτύρων. Στις περιπτώσεις σημαντικής αλληλεπίδρασης, μπορούν να γίνουν συγκρίσεις μεταξύ των μέσων τιμών των διαφόρων συγκεντρώσεων στο ίδιο φύλο ή μεταξύ των μέσων τιμών των φύλων στην ίδια συγκέντρωση.

Βιβλιογραφία

Υπάρχουν πολλά εγχειρίδια στατιστικής που πραγματεύονται τη θεωρία, τον σχεδιασμό, τη μεθοδολογία, την ανάλυση και την ερμηνεία παραγοντικών σχεδιασμών οι οποίοι εκτείνονται από τις απλούστερες αναλύσεις δύο παραγόντων έως τις πλέον περίπλοκες μορφές που χρησιμοποιούνται στη μεθοδολογία σχεδιασμού πειραμάτων. Ο κατάλογος που ακολουθεί δεν είναι πλήρης. Ορισμένα βιβλία παρέχουν πρακτικά παραδείγματα εφαρμογής συγκρίσιμων σχεδιασμών, συνοδευόμενα σε ορισμένες περιπτώσεις από κώδικα για τη διενέργεια των αναλύσεων με τη χρήση διαφόρων πακέτων λογισμικού.

([1]) Οι στατιστικολόγοι που υιοθετούν προσέγγιση μοντελοποίησης, όπως η χρήση γενικών γραμμικών μοντέλων (General Linear Models/GLM), μπορεί να προσεγγίζουν την ανάλυση με διαφορετικό αλλά συγκρίσιμο τρόπο, χωρίς ωστόσο να συνάγουν αναγκαστικά τον παραδοσιακό πίνακα ANOVA, που ανάγεται στις αλγοριθμικές προσεγγίσεις για τον υπολογισμό των στατιστικών στοιχείων οι οποίες αναπτύχθηκαν πριν από την εποχή των υπολογιστών.

▼**M7**

(1) Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

(2) Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987) Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

(3) Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007) Analysis of Variance and Covariance: How to choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

(4) Mead, R. (1990) The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

(5) Montgomery D.C. (1997) Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

(6) Winer, B.J. (1971) Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

(7) Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009) Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼M7

Προσάρτημα 3

ΤΡΕΧΟΝΤΕΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

Λόγω του σημερινού επιπέδου γνώσεων, ο προσδιορισμός comet in vivo υπόκειται σε διάφορους περιορισμούς. Αναμένεται ότι οι περιορισμοί αυτοί θα μειωθούν ή θα καθοριστούν με ακριβέστερες λεπτομέρειες, όταν θα έχει αποκομιστεί μεγαλύτερη πείρα στην εφαρμογή του εν λόγω προσδιορισμού για την αντιμετώπιση ζητημάτων ασφάλειας εντός ρυθμιστικού πλαισίου.

1. Ορισμένοι τύποι βλαβών του DNA μπορεί να είναι βραχύβιοι, δηλ. να επιδιορθώνονται τόσο γρήγορα ώστε να μην παρατηρούνται πλέον μετά 24 ή περισσότερες ώρες από την τελευταία δόση. Δεν υπάρχει αναγνωρισμένος κατάλογος με τους τύπους βραχύβιων βλαβών ή με τις χημικές ουσίες που είναι πιθανόν να τις προκαλούν, ούτε είναι γνωστό το χρονικό διάστημα εντός του οποίου μπορούν να ανιχνευθούν οι βλάβες τέτοιου τύπου. Ο βέλτιστος χρόνος δειγματοληψίας μπορεί επίσης να είναι ειδικός για την εκάστοτε χημική ουσία ή οδό έκθεσης και οι χρόνοι δειγματοληψίας θα πρέπει να καθορίζονται με βάση κινητικά δεδομένα (για παράδειγμα, τον χρόνο, T_{max}, κατά τον οποίο επιτυγχάνεται η συγκέντρωση αιχμής στο πλάσμα ή στους ιστούς), εφόσον είναι διαθέσιμα. Οι περισσότερες από τις μελέτες επικύρωσης στις οποίες στηρίζεται η παρούσα μέθοδος δοκιμών ορίζουν τον χρόνο νεκροψίας σε 2 ή 3 ώρες μετά τη χορήγηση της τελευταίας δόσης. Οι περισσότερες δημοσιευμένες μελέτες αναφέρουν ότι η τελική δόση χορηγήθηκε 2 έως 6 ώρες πριν από τη θανάτωση των ζώων. Κατόπιν τούτου, αυτές οι εμπειρίες χρησιμοποιήθηκαν ως βάση για τη σύσταση που διατυπώνεται στη μέθοδο δοκιμών, να χορηγείται η τελική δόση σε καθορισμένη χρονική στιγμή μεταξύ 2 και 6 ωρών πριν από τη νεκροψία, εφόσον δεν υπάρχουν στοιχεία που να επιβάλλουν διαφορετικά.

2. Δεν υπάρχουν αναγνωρισμένα δεδομένα μελετών από τα οποία να προκύπτει ότι έχει εξεταστεί η ευαισθησία της δοκιμής για την ανίχνευση βραχύβιων βλαβών του DNA μετά από χορήγηση με την τροφή ή το πόσιμο νερό σε σύγκριση με τη χορήγηση με στομαχικό καθετήρα. Έχουν ανιχνευθεί βλάβες του DNA μετά από χορήγηση με την τροφή ή το πόσιμο νερό, αλλά οι σχετικές εργασίες είναι λίγες, αν συγκριθούν με την πολύ μεγαλύτερη εμπειρία στη χορήγηση με στομαχικό καθετήρα και από την ενδοπεριτοναϊκή οδό. Συνεπώς, η ευαισθησία του προσδιορισμού μπορεί να μειώνεται στην περίπτωση των χημικών ουσιών που προκαλούν βραχύβιες βλάβες, όταν χορηγούνται με την τροφή ή το πόσιμο νερό.

3. Δεν έχουν διεξαχθεί διεργαστηριακές μελέτες σε άλλους ιστούς εκτός του ήπατος και του στομάχου και, ως εκ τούτου, δεν έχει διατυπωθεί σύσταση για τον τρόπο με τον οποίο μπορεί να επιτευχθεί ευαίσθητη και αναπαραγώγιμη απόκριση σε άλλους ιστούς εκτός του ήπατος, όπως π.χ. οι αναμενόμενες περιοχές απόκρισης σε θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες. Όσον αφορά το ήπαρ, επίσης, δεν στάθηκε δυνατόν να επιτευχθεί συμφωνία σχετικά με τη μείωση της οριακής τιμής για τους αρνητικούς μάρτυρες.

4. Ενώ υπάρχουν πολλές δημοσιεύσεις που καταδεικνύουν τη συγχυτική επίδραση της κυτταροτοξικότητας in vitro, ελάχιστα δεδομένα έχουν δημοσιευθεί από διερεύνηση in vivo και, ως εκ τούτου, δεν ήταν δυνατόν να προταθεί μία και μόνη παράμετρος για τη μέτρηση της κυτταροτοξικότητας. Μολονότι ιστοπαθολογικές αλλαγές όπως η φλεγμονή, η κυτταρική διήθηση και οι αποπτωτικές ή νεκρωτικές αλλαγές έχουν συσχετιστεί με την αύξηση της μετανάστευσης του DNA, εν τούτοις, όπως κατέδειξε η μελέτη επικύρωσης του JaCVAM (ΟΟΣΑ, 2014), οι αλλαγές αυτές δεν οδηγούν πάντοτε σε θετικά ευρήματα στον προσδιορισμό comet και, κατά συνέπεια δεν υπάρχει οριστικός κατάλογος ιστοπαθολογικών αλλαγών που να συνδέονται πάντοτε με την αύξηση της μετανάστευσης του DNA. Τα σκιώδη κύτταρα (ή κύτταραφαντάσματα) έχουν προταθεί στο παρελθόν ως δείκτης κυτταροτοξικότητας, πλην όμως, η αιτιολογία της παρουσίας τους είναι αβέβαιη. Σύμφωνα με τα υπάρχοντα δεδομένα, μπορεί να οφείλονται στην κυτταροτοξικότητα χημικών ουσιών, σε μηχανικές/επαγόμενες από ένζυμα βλάβες που ξεκινούν κατά την προετοιμασία του δείγματος (Guerard και συν., 2014) και/ή σε πιο ακραία επίδραση της γονιδιοτοξικότητας των υπό δοκιμή χημικών ουσιών. Από άλλα δεδομένα φαίνεται να προκύπτει ότι οφείλονται σε εκτεταμένη, ίσως όμως επιδιορθώσιμη βλάβη του DNA (Lorenzo et al., 2013).

▼M7

5. Η κατάψυξη ιστών ή πυρήνων κυττάρων για μεταγενέστερη ανάλυση έχει αποδειχθεί επιτυχής. Η επίπτωσή της στην απόκριση στους μάρτυρες με φορέα και τους θετικούς μάρτυρες είναι συνήθως μετρήσιμη (Recio και συν., 2010· Recio και συν., 2012· και συν., 2013). Εάν το εργαστήριο εφαρμόζει την πρακτική αυτή, θα πρέπει να καταδεικνύει την τεχνική του ικανότητα όσον αφορά τη μεθοδολογία κατάψυξης και να επιβεβαιώνει ότι οι τιμές % DNA ουράς στους στοχευόμενους ιστούς των ζώων που υποβάλλονται σε μεταχείριση με τον φορέα βρίσκονται εντός αποδεκτού χαμηλού εύρους και ότι οι θετικές αποκρίσεις παραμένουν ανιχνεύσιμες. Στη βιβλιογραφία περιγράφονται διάφορες μέθοδοι κατάψυξης ιστών. Ωστόσο, δεν υπάρχει επί του παρόντος συμφωνία για τον βέλτιστο τρόπο κατάψυξης και απόψυξης ιστών ούτε για τον τρόπο με τον οποίο μπορεί να εκτιμηθεί κατά πόσον μια δυνητικά τροποποιημένη απόκριση μπορεί να επηρεάσει την ευαισθησία της δοκιμής.

6. Πρόσφατες εργασίες καταδεικνύουν ότι ο αριθμός των κρίσιμων μεταβλητών αναμένεται να συνεχίσει να μειώνεται και οι παράμετροι που σχετίζονται με αυτές θα οριστούν με μεγαλύτερη ακρίβεια (Guerard και συν., 2014).

Βιβλιογραφία

(1) Guerard, M., C. Marchand, U. Plappert-Helbig (2014), Influence of Experimental Conditions on Data Variability in the Liver Comet Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 55/2, pp. 114-21.

(2) Jackson, P. et al. (2013), Validation of use of frozen tissues in high-throughput comet assay with fully-automatic scoring, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 699-707.

(3) Lorenzo,Y. et al. (2013), The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead, *Mutagenesis*, Vol. 28/4, pp. 427-32.

(4) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.

(5) Recio L, Hobbs C, Caspary W, Witt KL, (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *J. Toxicol. Sci.* 35:149-62.

(6) Recio, L. *et al*. (2012), Comparison of Comet assay dose-response for ethyl methanesulfonate using freshly prepared versus cryopreserved tissues, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 53/2, pp. 101-13.

▼**M8**

Β.63. ΔΟΚΙΜΗ ΔΙΑΛΟΓΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ/ΑΝΑΠΤΥΞΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 421 του ΟΟΣΑ (2016). Οι κατευθυντήριες γραμμές του ΟΟΣΑ για τον έλεγχο χημικών ουσιών αναθεωρούνται ανά διαστήματα ώστε να λαμβάνονται υπόψη οι εξελίξεις στον επιστημονικό τομέα. Η αρχική κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών διαλογής 421 εγκρίθηκε το 1995, βάσει ενός πρωτοκόλλου για την προκαταρκτική δοκιμή διαλογής τοξικότητας στην αναπαραγωγή που συζητήθηκε σε δύο συναντήσεις εμπειρογνωμόνων, στο Λονδίνο το 1990 (1) και στο Τόκυο το 1992 (2).

2. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών έχει επικαιροποιηθεί με παραμέτρους που αφορούν τους ενδοκρινικούς διαταράκτες, στο πλαίσιο της δράσης πρώτης προτεραιότητας που ξεκίνησε ο ΟΟΣΑ το 1998 με σκοπό την αναθεώρηση των υφιστάμενων κατευθυντήριων γραμμών δοκιμών και την ανάπτυξη νέων κατευθυντήριων γραμμών δοκιμών για τη διαλογή και τη διεξαγωγή δοκιμών σε δυνητικούς ενδοκρινικούς διαταράκτες (3). Για παράδειγμα, η TG 407 (μελέτη τοξικότητας από το στόμα, 28 ημερών, με επαναλαμβανόμενη δόση σε τρωκτικά, κεφάλαιο Β.7 του παρόντος παραρτήματος) του ΟΟΣΑ, ενισχύθηκε το 2008 με παραμέτρους κατάλληλες για την ανίχνευση ενδοκρινικής δραστηριότητας υπό δοκιμή χημικών ουσιών. Ο στόχος της επικαιροποίησης της TG 421 ήταν η συμπερίληψη ορισμένων παραμέτρων σχετικά με τους ενδοκρινικούς διαταράκτες σε TG διαλογής στις οποίες οι περίοδοι έκθεσης καλύπτουν ορισμένες από τις ευαίσθητες περιόδους κατά την ανάπτυξη (προγεννητική ή πρώτη μεταγεννητική περίοδος).

3. Οι επιλεχθείσες πρόσθετες παράμετροι σχετικά με τους ενδοκρινικούς διαταράκτες, που αποτελούν επίσης μέρος της TG 443 (εκτεταμένη μελέτη τοξικότητας στην αναπαραγωγή μίας γενεάς, κεφάλαιο Β.56 του παρόντος παραρτήματος), περιλήφθηκαν στην TG 421 βάσει μελέτης σκοπιμότητας στην οποία θίγονται επιστημονικά και τεχνικά θέματα που σχετίζονται με τη συμπερίληψή τους, καθώς και πιθανές προσαρμογές του σχεδιασμού δοκιμής που χρειάζονται για τη συμπερίληψή τους (4).

4. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών έχει σχεδιαστεί για να παρέχει πληροφορίες σχετικά με τις επιδράσεις μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας στις αναπαραγωγικές επιδόσεις αρσενικών και θηλυκών ατόμων, όπως η λειτουργία των γονάδων, η συμπεριφορά ζευγαρώματος, η σύλληψη, η ανάπτυξη του κυήματος και ο τοκετός. Δεν αποτελεί εναλλακτική μέθοδο ούτε αντικαθιστά τις υφιστάμενες μεθόδους δοκιμών Β.31, Β.34, Β.35 ή Β.56.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

5. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών διαλογής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παροχή αρχικών πληροφοριών σχετικά με τις πιθανές επιδράσεις στην αναπαραγωγή και/ή την ανάπτυξη, είτε σε πρώιμο στάδιο της αξιολόγησης των τοξικολογικών ιδιοτήτων χημικών ουσιών είτε σχετικά με χημικές ουσίες που προκαλούν ανησυχία. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως μέρος ενός συνόλου αρχικών δοκιμών διαλογής για υπάρχουσες χημικές ουσίες για τις οποίες οι διαθέσιμες τοξικολογικές πληροφορίες είναι ελάχιστες ή ανύπαρκτες, ως μελέτη προσδιορισμού εύρους δόσεων με σκοπό τη διεξαγωγή πιο εκτεταμένων μελετών της αναπαραγωγής/ανάπτυξης, ή όταν θεωρηθεί για άλλους λόγους κατάλληλη. Κατά τη διεξαγωγή της μελέτης θα πρέπει να εφαρμόζονται οι γενικές αρχές και τα κριτήρια που περιγράφονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 19 του ΟΟΣΑ σχετικά με την αναγνώριση, την αξιολόγηση και τη χρήση κλινικών σημείων ως ανώδυνων παραμέτρων για τα πειραματόζωα που χρησιμοποιούνται σε αξιολογήσεις ασφάλειας (5).

▼**M8**

6. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν παρέχει ολοκληρωμένες πληροφορίες για όλες τις πτυχές της αναπαραγωγής και της ανάπτυξης. Πιο συγκεκριμένα, παρέχει περιορισμένα μόνο μέσα ανίχνευσης των μεταγεννητικών εκδηλώσεων της προγεννητικής έκθεσης, ή των επαγόμενων κατά τη μεταγεννητική έκθεση πιθανών επιδράσεων. Λόγω (μεταξύ άλλων) των σχετικά μικρών αριθμών ζώων που περιλαμβάνονται στις ομάδες δόσεων, της επιλεκτικότητας των παραμέτρων και της μικρής διάρκειας της μελέτης, η παρούσα μέθοδος δεν θα παρέχει αποδεικτικά στοιχεία που να στηρίζουν οριστικούς ισχυρισμούς περί ανυπαρξίας επιδράσεων. Επιπλέον, σε περίπτωση απουσίας δεδομένων από άλλες δοκιμές τοξικότητας στην αναπαραγωγή/ανάπτυξη, τα θετικά αποτελέσματα είναι χρήσιμα για την αρχική αξιολόγηση της επικινδυνότητας και συμβάλλουν στη διαδικασία λήψης αποφάσεων όσον αφορά την αναγκαιότητα και το χρονοδιάγραμμα διεξαγωγής πρόσθετων δοκιμών.

7. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις σχετικές με το ενδοκρινικό σύστημα παραμέτρους θα πρέπει να μελετώνται στο πλαίσιο του εννοιολογικού πλαισίου για τον έλεγχο και την αξιολόγηση χημικών ενδοκρινικών διαταρακτών (Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals) του ΟΟΣΑ (6). Σε αυτό το εννοιολογικό πλαίσιο, η ενισχυμένη TG 421 του ΟΟΣΑ περιλαμβάνεται στο επίπεδο 4 ως *in vivo* δοκιμασία που παρέχει δεδομένα για τις δυσμενείς επιδράσεις των παραμέτρων που σχετίζονται με το ενδοκρινικό σύστημα. Εντούτοις, ένα ενδοκρινικό σήμα μπορεί να μη θεωρηθεί επαρκώς ισχυρό στοιχείο ώστε μια χημική ουσία να χαρακτηριστεί ενδοκρινικός διαταράκτης.

8. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών θεωρείται ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται από το στόμα. Εάν χρησιμοποιηθούν άλλες οδοί έκθεσης, ενδέχεται να χρειαστούν τροποποιήσεις.

9. Πριν από τη χρήση της μεθόδου δοκιμών σε μείγμα για την παραγωγή δεδομένων για συγκεκριμένο κανονιστικό σκοπό, θα πρέπει να εξετάζεται αν –και, εάν ναι, για ποιον λόγο– μπορεί να αποδώσει αποτελέσματα κατάλληλα για τον επιδιωκόμενο σκοπό. Τέτοια εξέταση δεν χρειάζεται όταν οι κανονιστικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τον έλεγχο του μείγματος.

10. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

11. Η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται σε διαβαθμισμένες δόσεις σε αρκετές ομάδες αρσενικών και θηλυκών ατόμων. Η χορήγηση των δόσεων στα αρσενικά θα πρέπει να διαρκεί τουλάχιστον τέσσερις εβδομάδες και να φθάνει μέχρι και την ημέρα πριν από την προγραμματισμένη θανάτωση (σε αυτό το χρονοδιάγραμμα περιλαμβάνονται τουλάχιστον δύο εβδομάδες πριν το ζευγάρωμα, η περίοδος του ζευγαρώματος και περίπου δύο εβδομάδες μετά το ζευγάρωμα). Δεδομένης της περιορισμένης περιόδου χορήγησης των δόσεων στα αρσενικά πριν από το ζευγάρωμα, η γονιμότητα ενδέχεται να μην αποτελεί ιδιαίτερα ευαίσθητο δείκτη της τοξικότητας στους όρχεις. Ως εκ τούτου, είναι ιδιαίτερα σημαντική η διεξαγωγή αναλυτικής ιστολογικής εξέτασης. Ο συνδυασμός περιόδου χορήγησης πριν από το ζευγάρωμα διάρκειας δύο εβδομάδων και επακόλουθων παρατηρήσεων όσον αφορά το ζευγάρωμα/γονιμότητα με συνολική περίοδο χορήγησης τουλάχιστον τεσσάρων εβδομάδων, ακολουθούμενων από αναλυτική ιστοπαθολογική εξέταση των γονάδων των αρσενικών, θεωρείται επαρκής για την ανίχνευση της πλειονότητας των επιδράσεων στη γονιμότητα των αρσενικών και τη σπερματογένεση.

12. Η χορήγηση δόσεων στα θηλυκά θα πρέπει να διαρκεί καθ' όλο το διάστημα διεξαγωγής της μελέτης. Η εν λόγω χορήγηση περιλαμβάνει δύο εβδομάδες πριν από το ζευγάρωμα (με στόχο να καλυφθούν τουλάχιστον δύο πλήρεις κύκλοι οίστρου), το μεταβλητό χρονικό διάστημα μέχρι τη σύλληψη, τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και τουλάχιστον δεκατρείς ημέρες μετά τη γέννηση, έως και την ημέρα πριν από την προγραμματισμένη θανάτωση.

13. Η διάρκεια της μελέτης, μετά τον εγκλιματισμό και την αξιολόγηση του κύκλου οίστρου πριν από τη χορήγηση των δόσεων, εξαρτάται από τις επιδόσεις των θηλυκών και είναι κατά προσέγγιση 63 ημέρες [τουλάχιστον 14 ημέρες πριν από το ζευγάρωμα, (έως) 14 ημέρες ζευγαρώματος, 22 ημέρες κύησης, 13 ημέρες γαλουχίας].

▼M8

14. Τα ζώα εξετάζονται με προσοχή καθημερινά κατά τη διάρκεια της περιόδου χορήγησης για τυχόν συμπτώματα τοξικότητας. Τα ζώα που πεθαίνουν ή θανατώνονται κατά τη διάρκεια της περιόδου δοκιμής νεκροτομούνται και, στο τέλος της δοκιμής, αυτά που έχουν επιζήσει θανατώνονται και νεκροτομούνται επίσης.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Επιλογή ζωικού είδους

15. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών έχει σχεδιαστεί για χρήση με επίμυ. Η διερεύνηση των παραμέτρων που προσδιορίζονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών σε άλλα είδη τρωκτικών πρέπει να αιτιολογείται αναλυτικά. Στο διεθνές πρόγραμμα επικύρωσης για την ανίχνευση ενδοκρινικών διαταρακτών της TG 407 του ΟΟΣΑ (που αντιστοιχεί στο κεφάλαιο B.7 του παρόντος παραρτήματος), ο επίμυς ήταν το μόνο είδος που χρησιμοποιήθηκε. Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται φυλές με χαμηλή γονιμότητα ή γνωστή υψηλή συχνότητα εμφάνισης αναπτυξιακών ελαττωμάτων. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή παρθένα ζώα, που δεν έχουν υποβληθεί προηγουμένως σε πειράματα. Τα πειραματόζωα θα πρέπει να χαρακτηρίζονται ως προς το είδος, τη φυλή, το φύλο, το βάρος και την ηλικία. Στην αρχή της μελέτης, η διακύμανση των βαρών των χρησιμοποιούμενων ζώων θα πρέπει να είναι ελάχιστη και να μην υπερβαίνει το 20 % της μέσης τιμής για κάθε φύλο. Σε περίπτωση που η μελέτη διεξάγεται ως προκαταρκτικό στάδιο μακροχρόνιας μελέτης ή μελέτης πλήρους γενεάς, συνιστάται να χρησιμοποιούνται και στις δύο μελέτες ζώα της ίδιας φυλής και προέλευσης.

Στέγαση και διατροφή

16. Σε όλες οι διαδικασίες πρέπει να τηρούνται τα τοπικά πρότυπα φροντίδας των πειραματόζωων. Η θερμοκρασία του θαλάμου πειραματόζωων πρέπει να είναι 22 °C (± 3 °). Αν και η σχετική υγρασία θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου, εν τούτοις θα πρέπει να επιδιώκεται μια τιμή 50-60 %. Ο φωτισμός πρέπει να είναι τεχνητός και η φωτοπερίοδος 12ωρη. Για τη διατροφή μπορούν να χρησιμοποιούνται συνήθη εργαστηριακά σιτηρέσια, με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού. Όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται μέσω της παρούσας μεθόδου, η επιλογή σιτηρεσίου ενδέχεται να επηρεάζεται από την ανάγκη κατάλληλης ανάμειξης της ουσίας.

17. Τα ζώα θα πρέπει να στεγάζονται σε μικρές ομάδες του ίδιου φύλου. Επιτρέπεται η ατομική στέγαση, εάν αιτιολογείται επιστημονικά. Σε περίπτωση ομαδικής στέγασης, κάθε κλωβός δεν πρέπει να περιέχει περισσότερα από πέντε ζώα. Οι διαδικασίες ζευγαρώματος θα πρέπει να εκτελούνται σε κλωβούς κατάλληλους για τον σκοπό αυτό. Τα έγκυα θηλυκά θα πρέπει να στεγάζονται σε ατομικούς κλωβούς και θα πρέπει να τους παρέχονται υλικά φωλιάσματος. Τα θηλυκά κατά τη γαλουχία τοποθετούνται σε ατομικούς κλωβούς μαζί με τα νεογνά τους.

18. Η τροφή πρέπει να υποβάλλεται τακτικά σε ανάλυση ώστε να εντοπίζονται τυχόν ξένες προσμείξεις. Ένα δείγμα του σιτηρεσίου θα πρέπει να διατηρείται έως την οριστικοποίηση της έκθεσης.

Προετοιμασία των ζώων

19. Υγιή νεαρά ενήλικα ζώα κατανέμονται τυχαία στις ομάδες μαρτύρων και αγωγής. Οι κλωβοί θα πρέπει να διατάσσονται με τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται οι πιθανές επιδράσεις της θέσης τους. Τα ζώα ταυτοποιούνται με αποκλειστικό αναγνωριστικό και παραμένουν στα κλουβιά τους τουλάχιστον πέντε ημέρες πριν από την έναρξη της μελέτης για να μπορέσουν να εγκλιματιστούν στις εργαστηριακές συνθήκες.

Παρασκευή των δόσεων

20. Συνιστάται η χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας από το στόμα, εκτός εάν θεωρούνται καταλληλότερες άλλες οδοί χορήγησης. Όταν επιλέγεται η οδός από το στόμα, η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται συνήθως με στομαχικό καθετήρα· εντούτοις, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορούν εναλλακτικά να χορηγούνται μέσω του σιτηρεσίου ή του πόσιμου νερού.

▼M8

21. Εφόσον είναι αναγκαίο, παρασκευάζεται διάλυμα ή εναιώρημα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε κατάλληλο φορέα. Συνιστάται, οσάκις είναι δυνατό, να εξετάζεται πρώτα η δυνατότητα χρήσης υδατικού διαλύματος/εναιωρήματος, κατόπιν το ενδεχόμενο διαλύματος/γαλακτώματος σε λάδι (π.χ. αραβοσιτέλαιο) και, τέλος, η χρήση διαλύματος σε άλλους φορείς. Σε περίπτωση που ο φορέας δεν είναι το νερό, θα πρέπει να είναι γνωστά τα τοξικά χαρακτηριστικά του. Θα πρέπει να προσδιορίζεται η σταθερότητα και η ομοιογένεια της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον φορέα.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αριθμός και φύλο των ζώων

22. Συνιστάται κάθε ομάδα να περιλαμβάνει αρχικά τουλάχιστον 10 αρσενικά και 12-13 θηλυκά. Πριν από την έκθεση, θα αξιολογείται η κυκλικότητα του οίστρου των θηλυκών και τα ζώα που δεν παρουσιάζουν τυπικούς κύκλους 4-5 ημερών δεν θα περιλαμβάνονται στη μελέτη· ως εκ τούτου, συνιστάται η προσθήκη επιπλέον θηλυκών στις ομάδες ώστε αυτές να αποτελούνται από 10 θηλυκά έκαστη. Εκτός της περίπτωσης έντονων τοξικών επιδράσεων, αναμένεται ότι κατ' αυτόν τον τρόπο θα εξασφαλίζονται τουλάχιστον 8 έγκυα θηλυκά ανά ομάδα, που είναι συνήθως ο ελάχιστος αποδεκτός αριθμός έγκυων θηλυκών ανά ομάδα. Στόχος είναι να προκαλούνται επαρκείς κυοφορίες και απόγονοι για να εξασφαλίζεται η ουσιαστική αξιολόγηση της ικανότητας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας να επιδρά στη γονιμότητα, στην κύηση, στη μητρική συμπεριφορά και στη συμπεριφορά θηλασμού των ζώων, καθώς και στην αύξηση και την ανάπτυξη των απογόνων της F_1 από τη σύλληψη ως τη 13η ημέρα μετά τον τοκετό.

Δοσολογία

23. Κατά κανόνα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τρεις ομάδες δοκιμής και μία ομάδα μαρτύρων. Τα επίπεδα των δόσεων μπορούν να καθορίζονται βάσει πληροφοριών από δοκιμές οξείας τοξικότητας ή αποτελέσματα από μελέτες επαναλαμβανόμενης δόσης. Εκτός από τη χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, τα ζώα της ομάδας μαρτύρων θα πρέπει να υφίστανται την ίδια ακριβώς μεταχείριση όπως τα υποκείμενα των ομάδων δοκιμής. Εάν χρησιμοποιείται φορέας για τη χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, η ομάδα μαρτύρων πρέπει να λαμβάνει τον φορέα στον μέγιστο χρησιμοποιούμενο όγκο.

24. Τα επίπεδα των δόσεων θα πρέπει να επιλέγονται λαμβανομένων υπόψη τυχόν υφιστάμενων δεδομένων για την τοξικότητα και την (τοξικο-)κινητική. Επίσης, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι ενδέχεται να υπάρχουν διαφορές στην ευαισθησία μεταξύ έγκυων και μη έγκυων ζώων. Το υψηλότερο επίπεδο δόσης πρέπει να επιλέγεται με σκοπό να προκαλέσει τοξικές εκδηλώσεις, όχι όμως τον θάνατο ή έντονη οδύνη. Στη συνέχεια επιλέγεται φθίνουσα σειρά δοσολογικών επιπέδων με σκοπό τον εντοπισμό απόκρισης συνδεόμενης με τη δόση και του χαμηλότερου επιπέδου δόσης στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις (NOAEL). Για τον καθορισμό της φθίνουσας σειράς δοσολογικών επιπέδων η βέλτιστη επιλογή είναι συνήθως ο υποδιπλασιασμός ή υποτετραπλασιασμός, ενώ η προσθήκη μιας τέταρτης ομάδας δοκιμής είναι συχνά προτιμότερη από τη χρησιμοποίηση πολύ μεγάλων συντελεστών (π.χ. άνω του 10) μεταξύ των δόσεων.

25. Όταν παρατηρείται γενική τοξικότητα (π.χ. μειωμένο βάρος σώματος, επιδράσεις στο ήπαρ, την καρδιά, τους πνεύμονες, τους νεφρούς κ.λπ.) ή άλλη αλλαγή που μπορεί να μην είναι τοξική αντίδραση (π.χ. μειωμένη πρόσληψη τροφής, διόγκωση του ήπατος), οι παρατηρούμενες επιδράσεις στις παραμέτρους που συνδέονται με ευαισθησία του ενδοκρινικού συστήματος θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή.

Οριακή δοκιμή

26. Εάν μια δοκιμή από το στόμα σύμφωνα με τις περιγραφόμενες για την παρούσα μελέτη διαδικασίες, με επίπεδο δόσης τουλάχιστον 1 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα ή, εφόσον πρόκειται για χορήγηση μέσω του σιτηρεσίου ή του πόσιμου νερού, με αντίστοιχη εκατοστιαία αναλογία στο σιτηρέσιο ή στο πόσιμο νερό, δεν έχει ως αποτέλεσμα παρατηρήσιμες τοξικές επιδράσεις και εάν, βάσει των διαθέσιμων δεδομένων για χημικές ουσίες ανάλογης δομής, δεν αναμένεται τοξικότητα, η πλήρης μελέτη με αρκετά επίπεδα δόσης μπορεί να μην είναι απαραίτητη. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οριακή δοκιμή, εκτός εάν, με βάση την έκθεση του ανθρώπου, διαφαίνεται η ανάγκη χρησιμοποίησης υψηλότερου επιπέδου δόσης από το στόμα. Σε περίπτωση χορήγησης από άλλη οδό, όπως εισπνοή ή εφαρμογή στο δέρμα, η μέγιστη εφικτή συγκέντρωση μπορεί να εξαρτάται συχνά από τις φυσικές και χημικές ιδιότητες των υπό δοκιμή ουσιών.

▼M8

Χορήγηση των δόσεων

27. Η δόση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στα ζώα χορηγείται καθημερινά επί 7 ημέρες την εβδομάδα. Όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται με καθετήρα, η χορήγηση πρέπει να γίνεται εφάπαξ με τη βοήθεια στομαχικού καθετήρα ή κατάλληλης διασωλήνωσης. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Ο όγκος δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 1 ml/100 g βάρους σώματος, εκτός της περίπτωσης υδατικών διαλυμάτων όπου μπορούν να χρησιμοποιούνται 2 ml/100 g βάρους σώματος. Εκτός από την περίπτωση των ερεθιστικών ή διαβρωτικών υπό δοκιμή χημικών ουσιών, οι οποίες σε υψηλότερες συγκεντρώσεις συνήθως προκαλούν εντονότερες επιδράσεις, η μεταβλητότητα των όγκων δοκιμής πρέπει να ελαχιστοποιείται με ρύθμιση της συγκέντρωσης, ώστε να εξασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλα τα επίπεδα δόσης.

28. Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες που χορηγούνται με την τροφή ή το πόσιμο νερό, πρέπει να εξασφαλίζεται ότι οι χορηγούμενες ποσότητες υπό δοκιμή χημικής ουσίας δεν επηρεάζουν το κανονικό διατροφικό ισοζύγιο ή ισοζύγιο νερού. Όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται μέσω του σιτηρεσίου, μπορεί να χρησιμοποιείται είτε σταθερή συγκέντρωση στο σιτηρέσιο (ppm) είτε σταθερό επίπεδο δόσης, εκφρασμένο επί του βάρους σώματος του ζώου. Η χρησιμοποιούμενη εναλλακτική επιλογή πρέπει να διευκρινίζεται. Για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που χορηγούνται με καθετήρα, η δόση θα πρέπει να χορηγείται την ίδια περίπου ώρα κάθε μέρα και να ρυθμίζεται τουλάχιστον κάθε εβδομάδα ώστε να διατηρείται σταθερό επίπεδο δόσης ως προς το βάρος του σώματος.

Χρονοδιάγραμμα πειράματος

29. Η χορήγηση δόσεων και στα δύο φύλα θα πρέπει να ξεκινά τουλάχιστον δύο εβδομάδες πριν από το ζευγάρωμα, αφού έχουν εγκλιματιστεί για τουλάχιστον πέντε ημέρες και τα θηλυκά έχουν υποβληθεί σε διαδικασία διαλογής ως προς την κανονικότητα των κύκλων οίστρου (στη διάρκεια περιόδου δύο εβδομάδων πριν από την αγωγή). Η μελέτη θα πρέπει να προγραμματίζεται κατά τρόπον ώστε η αξιολόγηση των κύκλων οίστρου να ξεκινά σε σύντομο χρονικό διάστημα αφότου τα ζώα έχουν φθάσει σε πλήρη σεξουαλική ωρίμανση. Το εν λόγω διάστημα μπορεί να διαφέρει ελαφρώς για διαφορετικές φυλές επιμύων σε διαφορετικά εργαστήρια, π.χ. επίμυες Sprague Dawley ηλικίας 10 εβδομάδων, επίμυες Wistar ηλικίας περίπου 12 εβδομάδων. Οι μητέρες με απογόνους πρέπει να θανατώνονται τη 13η ημέρα μετά τον τοκετό, ή σύντομα μετά από αυτό. Η ημέρα γέννησης (όταν έχει ολοκληρωθεί ο τοκετός) ορίζεται ως η ημέρα 0 μετά τον τοκετό. Τα θηλυκά που δεν εμφανίζουν ενδείξεις συνουσίας θανατώνονται 24-26 ημέρες μετά την τελευταία ημέρα της περιόδου ζευγαρώματος. Η χορήγηση συνεχίζεται και στα δύο φύλα κατά τη διάρκεια της περιόδου ζευγαρώματος. Στα αρσενικά η χορήγηση θα πρέπει να συνεχίζεται και μετά την περίοδο ζευγαρώματος, τουλάχιστον έως ότου ολοκληρωθεί η ελάχιστη συνολική περίοδος χορήγησης των 28 ημερών. Στη συνέχεια θανατώνονται ή, εναλλακτικά, διατηρούνται και συνεχίζουν να λαμβάνουν δόσεις με σκοπό την πιθανή πραγματοποίηση δεύτερου ζευγαρώματος, εάν χρειαστεί.

30. Η καθημερινή χορήγηση στα γονικά θηλυκά θα πρέπει να συνεχίζεται καθ' όλη τη διάρκεια της κύησης και τουλάχιστον μέχρι και τη 13η ημέρα μετά τον τοκετό ή την ημέρα πριν τη θανάτωση. Για μελέτες όπου η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται μέσω εισπνοής ή διά του δέρματος, η χορήγηση θα πρέπει να συνεχίζεται τουλάχιστον μέχρι και τη 19η ημέρα της κύησης, και θα πρέπει να ξεκινά εκ νέου το συντομότερο δυνατό, το αργότερο μέχρι την 4η ημέρα μετά τη γέννηση.

31. Στο παράρτημα 2 παρατίθεται χρονοδιάγραμμα διεξαγωγής των πειραμάτων.

Διαδικασία ζευγαρώματος

32. Κανονικά, στην παρούσα μελέτη θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ζευγαρώματα 1:1 (ένα αρσενικό προς ένα θηλυκό). Μπορεί να υπάρξουν εξαιρέσεις, στην περίπτωση περιστασιακών θανάτων αρσενικών. Το θηλυκό θα πρέπει να τοποθετείται μαζί με το ίδιο αρσενικό μέχρις ότου παρατηρηθούν ενδείξεις συνουσίας ή μέχρι να παρέλθει διάστημα δύο εβδομάδων. Κάθε πρωί, τα θηλυκά πρέπει να εξετάζονται για την παρουσία σπέρματος ή κολπικού βύσματος. Ως ημέρα 0 της κύησης ορίζεται η ημέρα κατά την οποία επιβεβαιώνονται οι ενδείξεις ζευγαρώματος (ανιχνεύεται κολπικό βύσμα ή σπέρμα). Σε περίπτωση που το ζευγάρωμα αποδειχθεί ανεπιτυχές, πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο νέου ζευγαρώματος των θηλυκών με ελεγμένα αρσενικά της ίδιας ομάδας.

▼M8

Μέγεθος γέννας

33. Την 4η ημέρα μετά τη γέννηση, το μέγεθος κάθε γέννας μπορεί να ρυθμίζεται διά της απομάκρυνσης των πλεοναζόντων νεογνών με τυχαία επιλογή, ούτως ώστε να παραμένουν, όπου είναι εφικτό, τέσσερα ή πέντε νεογνά ανά φύλο ανά γέννα, ανάλογα με το σύνηθες μέγεθος γέννας στη φυλή των επιμύων που χρησιμοποιείται. Από δυο από τα πλεονάζοντα νεογνά θα πρέπει να συλλέγονται δείγματα αίματος, τα οποία θα συγκεντρώνονται και θα χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των επιπέδων T4 στον ορό. Δεν ενδείκνυται η επιλεκτική απομάκρυνση νεογνών, π.χ. βάσει του σωματικού βάρους ή της πρωκτογεννητικής απόστασης (AGD). Όταν ο αριθμός των αρσενικών ή θηλυκών νεογνών δεν φθάνει τα τέσσερα ή πέντε νεογνά ανά φύλο ανά γέννα, είναι αποδεκτή η μερική ρύθμιση (π.χ. έξι αρσενικά και τέσσερα θηλυκά). Δεν απομακρύνεται κανένα νεογνό όταν το μέγεθος της γέννας είναι χαμηλότερο του στόχου (8 ή 10 νεογνά/γέννα). Εάν υπάρχει ένα μόνο νεογνό πάνω από τον στόχο απομάκρυνσης, θα απομακρύνεται μόνο ένα νεογνό, το οποίο θα χρησιμοποιείται για συλλογή αίματος με σκοπό την πιθανή διενέργεια αξιολογήσεων της T4.

34. Εάν δεν ρυθμιστεί το μέγεθος της γέννας, την 4η ημέρα μετά τη γέννηση θανατώνονται δύο νεογνά ανά γέννα και λαμβάνονται δείγματα αίματος για μέτρηση των συγκεντρώσεων θυρεοειδικών ορμονών στον ορό. Ει δυνατόν, τα δύο νεογνά ανά γέννα θα πρέπει να είναι θηλυκά προκειμένου να διατηρηθούν τα αρσενικά νεογνά για αξιολογήσεις διατηρούμενων θηλών, εκτός εάν η απομάκρυνση των δύο νεογνών θα είχε ως αποτέλεσμα να μην υπάρχουν άλλα θηλυκά προς αξιολόγηση κατά τη λήξη της μελέτης. Δεν απομακρύνεται κανένα νεογνό εάν έτσι το μέγεθος της γέννας θα μειωνόταν κάτω από τα 8 έως 10 νεογνά/γέννα (ανάλογα με το κανονικό μέγεθος γέννας στη χρησιμοποιούμενη φυλή επιμύων). Εάν υπάρχει ένα μόνο νεογνό πάνω από το κανονικό μέγεθος γέννας, θα απομακρύνεται μόνο ένα νεογνό, το οποίο θα χρησιμοποιείται για συλλογή αίματος με σκοπό την πιθανή διενέργεια αξιολογήσεων της T4.

Παρατηρήσεις εν ζωή

Κλινικές παρατηρήσεις

35. Καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου δοκιμής θα πρέπει να διεξάγονται γενικές κλινικές παρατηρήσεις τουλάχιστον μία φορά τη μέρα, και συχνότερα σε περίπτωση που παρατηρηθούν τοξικά συμπτώματα. Αυτές οι παρατηρήσεις θα πρέπει να διεξάγονται κατά προτίμηση τις ίδιες ώρες κάθε ημέρα, λαμβανομένου υπόψη του χρόνου κορύφωσης των αναμενόμενων επιδράσεων μετά τη χορήγηση της δόσης. Σχετικές μεταβολές στη συμπεριφορά, σημεία δύσκολου ή παρατεταμένου τοκετού και όλα τα σημεία τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένης της θνησιμότητας, πρέπει να καταγράφονται. Οι εν λόγω καταγραφές θα πρέπει να περιλαμβάνουν τη χρονική στιγμή εμφάνισης, τη σοβαρότητα και τη διάρκεια των τοξικών συμπτωμάτων.

Σωματικό βάρος και κατανάλωση τροφής/νερού

36. Τα αρσενικά και τα θηλυκά θα πρέπει να ζυγίζονται κατά την πρώτη ημέρα της χορήγησης και, στη συνέχεια, τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα, καθώς και κατά τη λήξη της μελέτης. Στη διάρκεια της κύησης, τα θηλυκά πρέπει να ζυγίζονται τις ημέρες 0, 7, 14 και 20, και εντός 24 ωρών από τον τοκετό (ημέρα 0 ή 1η ημέρα μετά τον τοκετό) και τουλάχιστον την 4η και 13η ημέρα μετά τον τοκετό. Οι παρατηρήσεις αυτές θα πρέπει να αναφέρονται ξεχωριστά για κάθε ενήλικο ζώο.

37. Στη διάρκεια της περιόδου πριν από το ζευγάρωμα, της εγκυμοσύνης και της γαλουχίας, η κατανάλωση τροφής πρέπει να μετράται τουλάχιστον μια φορά την εβδομάδα. Η μέτρηση της κατανάλωσης τροφής κατά το ζευγάρωμα είναι προαιρετική. Η κατανάλωση νερού στη διάρκεια των εν λόγω περιόδων θα πρέπει επίσης να μετράται, όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται μέσω πόσιμου νερού.

Οιστρικοί κύκλοι

38. Οι οιστρικοί κύκλοι θα πρέπει να παρακολουθούνται πριν από την έναρξη της αγωγής προκειμένου να επιλέγονται για τη δοκιμή θηλυκά με κανονική κυκλικότητα (βλ. παράγραφο 22). Επίσης, θα πρέπει να παρακολουθούνται καθημερινά κολπικά επιχρίσματα, από την έναρξη της περιόδου αγωγής

▼M8

μέχρις ότου διαπιστωθούν ενδείξεις ζευγαρώματος. Εάν υπάρχει ανησυχία για οξείες αγχογόνες επιδράσεις που μπορεί να μεταβάλλουν τους οιστρικούς κύκλους με την έναρξη της χορήγησης, τα εργαστήρια μπορούν να υποβάλλουν τα ζώα σε έκθεση 2 εβδομάδων και, στη συνέχεια, να συλλέγουν καθημερινά κολπικά επιχρίσματα προκειμένου να παρακολουθούν τον οιστρικό κύκλο για τουλάχιστον δύο εβδομάδες κατά την περίοδο πριν από το ζευγάρωμα, και να συνεχίζουν την παρακολούθηση καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου ζευγαρώματος μέχρι να ανιχνευθούν ενδείξεις ζευγαρώματος. Κατά τη λήψη κολπικών/τραχηλικών κυττάρων, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγεται η διαταραχή των βλεννογόνων που μπορεί να επαγάγει ψευδοκύηση (7) (8).

Παράμετροι σχετικές με τους απογόνους

39. Η διάρκεια της κύησης πρέπει να καταγράφεται και υπολογίζεται από την ημέρα 0 της εγκυμοσύνης. Κάθε γέννα πρέπει να εξετάζεται το συντομότερο δυνατό μετά τον τοκετό για να προσδιορίζεται ο αριθμός και το φύλο των νεογνών, τα θνησιγενή νεογνά, τα ζώντα νεογνά, τα καχεκτικά νεογνά (νεογνά μεγέθους αρκετά μικρότερου από τα αντίστοιχα νεογνά μάρτυρες) και η παρουσία μακροσκοπικώς ορατών ανωμαλιών.

40. Τα ζώντα νεογνά πρέπει να καταμετρώνται και να προσδιορίζεται το φύλο τους, ενώ οι ομάδες των νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα πρέπει να ζυγίζονται εντός 24 ωρών από τον τοκετό (ημέρα 0 ή 1 μετά τον τοκετό) και τουλάχιστον την 4η και τη 13η ημέρα μετά τον τοκετό. Πέραν των παρατηρήσεων που περιγράφονται στην παράγραφο 35, θα πρέπει να καταγράφεται τυχόν μη φυσιολογική συμπεριφορά των απογόνων.

41. Η πρωκτογεννητική απόσταση κάθε νεογνού θα πρέπει να μετράται την ίδια ημέρα μεταγεννητικά, μεταξύ της μεταγεννητικής ημέρας (ΜΓΗ) 0 και 4. Θα πρέπει να προσδιορίζεται το σωματικό βάρος του νεογνού την ημέρα μέτρησης της πρωκτογεννητικής απόστασης, η οποία θα πρέπει να κανονικοποιείται σε ένα μέτρο του μεγέθους του νεογνού, κατά προτίμηση στην κυβική ρίζα του σωματικού βάρους (9). Θα πρέπει να καταμετράται ο αριθμός των θηλών/άλων στα αρσενικά νεογνά τη 12η ή 13η ΜΓΗ, όπως συνιστάται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 151 του ΟΟΣΑ (10).

Εξετάσεις κλινικής βιοχημείας

42. Λαμβάνονται δείγματα αίματος από καθορισμένο σημείο με βάση το ακόλουθο χρονοδιάγραμμα:

— από τουλάχιστον δύο νεογνά ανά γέννα την 4η ημέρα μετά τη γέννηση, εάν το επιτρέπει ο αριθμός των νεογνών (βλ. παραγράφους 33-34)

— από όλες τις μητέρες και από τουλάχιστον δύο νεογνά ανά γέννα κατά τη λήξη της μελέτης τη 13η ημέρα, και

— από όλα τα ενήλικα αρσενικά κατά τη λήξη της μελέτης.

Όλα τα δείγματα αίματος αποθηκεύονται υπό κατάλληλες συνθήκες. Δείγματα αίματος νεογνών 13ης ΜΓΗ και των ενήλικων αρσενικών αξιολογούνται ως προς τα επίπεδα θυρεοειδικών ορμονών (Τ4). Ανάλογα με την περίπτωση, διενεργείται περαιτέρω αξιολόγηση της Τ4 σε δείγματα αίματος από τις μητέρες και νεογνά 4ης ΜΓΗ. Ανάλογα με την περίπτωση, μπορούν να μετρηθούν προαιρετικά και άλλες ορμόνες. Το αίμα νεογνών μπορεί να συγκεντρώνεται ανά γέννα για τη διενέργεια αναλύσεων θυρεοειδικών ορμονών. Οι θυρεοειδικές ορμόνες (Τ4 και TSH) θα πρέπει, κατά προτίμηση να μετρώνται ως «σύνολο».

43. Οι ακόλουθοι παράγοντες ενδέχεται να επηρεάζουν τη μεταβλητότητα και τις απόλυτες τιμές συγκέντρωσης των προσδιοριζόμενων ορμονών:

— ο χρόνος θανάτωσης, λόγω της ημερήσιας διακύμανσης των συγκεντρώσεων ορμονών,

— η μέθοδος θανάτωσης, και ως εκ τούτου πρέπει να αποφεύγεται η περιττή καταπόνηση των ζώων, που μπορεί να επηρεάσει τις συγκεντρώσεις των ορμονών,

— οι σειρές αντιδραστηρίων (κιτ) ορμονικού προσδιορισμού που ενδέχεται να διαφέρουν ως προς τις πρότυπες καμπύλες τους.

▼M8

44. Τα δείγματα πλάσματος που προορίζονται ειδικά για ορμονικό προσδιορισμό θα πρέπει να λαμβάνονται σε παραπλήσια ώρα της ημέρας. Οι αριθμητικές τιμές που προκύπτουν από ανάλυση των συγκεντρώσεων ορμονών διαφέρουν ανάλογα με τα διάφορα κιτ δοκιμασιών που είναι διαθέσιμα στο εμπόριο.

Παθολογοανατομία

Νεκροψία-νεκροτομή

45. Σε περίπτωση θανάτωσης ή θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης, τα ενήλικα αρσενικά θα πρέπει να εξετάζονται μακροσκοπικά για τυχόν ανωμαλίες ή παθολογικές αλλοιώσεις. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίδεται στα όργανα του αναπαραγωγικού συστήματος. Ο αριθμός των σημείων εμφύτευσης θα πρέπει να καταγράφεται. Θα πρέπει να εξετάζονται κολπικά επιχρίσματα το πρωί της ημέρας της νεκροψίας για να προσδιοριστεί το στάδιο του οιστρικού κύκλου και να καταστεί εφικτή η συσχέτιση με την ιστοπαθολογία των ωοθηκών.

46. Οι όρχεις και επιδιδυμίδες, ο προστάτης και οι σπερματοδόχοι κύστεις με τους πηκτοειδείς αδένες στο σύνολό τους, όλων των αρσενικών ενήλικων ζώων θα πρέπει να απαλλάσσονται από τυχόν προσφυόμενους ιστούς, ανάλογα με την περίπτωση, και να ζυγίζονται νωπά όσο το δυνατόν συντομότερα μετά την ανατομή ώστε να αποφεύγεται η ξήρανσή τους. Επιπλέον, μπορούν να μετρώνται προαιρετικά τα βάρη οργάνων όπως το σύμπλεγμα ανελκτήρων του πρωκτού και βολβοσηραγγωδών μυών, οι βολβοουρηθραίοι αδένες (αδένες του Cowper) και η βάλανος του πέους στα αρσενικά και ωοθήκες σε ζεύγη (βάρος σε νωπή κατάσταση) και η μήτρα (περιλαμβανομένου του τραχήλου) στα θηλυκά· σε περίπτωση που περιλαμβάνονται, τα εν λόγω βάρη θα πρέπει να μετρώνται το συντομότερο δυνατό μετά την ανατομή.

47. Τα νεκρά νεογνά και τα νεογνά που θανατώνονται τη 13η ημέρα μετά τον τοκετό, ή σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά από αυτήν, θα πρέπει, τουλάχιστον, να εξετάζονται προσεκτικά εξωτερικά για μακροσκοπικές ανωμαλίες. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίνεται στα εξωτερικά όργανα του γεννητικού συστήματος, τα οποία θα πρέπει να εξετάζονται για τυχόν ύπαρξη σημείων ανώμαλης ανάπτυξης. Τη 13η ΜΓΗ θα πρέπει να λαμβάνεται και να φυλάσσεται ο θυρεοειδής από 1 αρσενικό και 1 θηλυκό νεογνό ανά γέννα.

48. Οι ωοθήκες, οι όρχεις, άλλα όργανα του γεννητικού συστήματος (μήτρα και τράχηλος, επιδιδυμίδες, προστάτης, σπερματοδόχοι κύστεις και πηκτοειδείς αδένες), ο θυρεοειδής και όλα τα όργανα που παρουσιάζουν μακροσκοπικές βλάβες, από όλα τα ενήλικα ζώα, πρέπει να διατηρούνται. Η μονιμοποίηση σε φορμόλη δεν συνιστάται για τη συνήθη εξέταση των όρχεων και των επιδιδυμίδων. Μια αποδεκτή μέθοδος είναι η χρήση μονιμοποιητικού Bouin ή τροποποιημένου μονιμοποιητικού Davidson (11). Ο ινώδης χιτώνας (tunica albuginea) μπορεί να διατρυπάται με βελόνα, με ήπιες κινήσεις, σε μικρό βάθος και στα δύο άκρα ώστε να διευκολύνεται η διείσδυση του μονιμοποιητικού υλικού.

Ιστοπαθολογία

49. Θα πρέπει να διενεργούνται αναλυτικές ιστολογικές εξετάσεις των ωοθηκών, των όρχεων και των επιδιδυμίδων (με ιδιαίτερη έμφαση στα στάδια της σπερματογένεσης και την ιστοπαθολογία της δομής των διάμεσων κυττάρων των όρχεων) των ζώων της ομάδας στην οποία χορηγείται η υψηλότερη δόση και της ομάδας μαρτύρων. Εφόσον απαιτείται, μπορεί να εξετάζονται και τα άλλα διατηρούμενα όργανα, περιλαμβανομένου του θυρεοειδούς νεογνών και ενήλικων ζώων. Μετά τη μονιμοποίηση μπορεί να προσδιορίζεται το βάρος του θυρεοειδούς. Ο καθαρισμός θα πρέπει και στην περίπτωση αυτή να πραγματοποιείται με μεγάλη προσοχή και μόνο μετά τη μονιμοποίηση, ώστε να μην προκαλείται βλάβη στους ιστούς. Οι βλάβες των ιστών μπορούν να βλάψουν την εγκυρότητα της ιστοπαθολογικής ανάλυσης. Οι εξετάσεις επεκτείνονται στα ζώα των ομάδων άλλων δόσεων εάν στην ομάδα της υψηλότερης δόσης έχουν παρατηρηθεί αλλοιώσεις. Το έγγραφο καθοδήγησης σχετικά με την ιστοπαθολογία (11) παρέχει επιπρόσθετες πληροφορίες για την ανατομή, τη μονιμοποίηση, την τομή και την ιστολογική ανάλυση των ενδοκρινικών ιστών.

▼M8

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Δεδομένα

50. Πρέπει να παρέχονται δεδομένα για κάθε ζώο ξεχωριστά. Επιπλέον, όλα τα δεδομένα θα πρέπει να συνοψίζονται σε μορφή πινάκων, όπου θα δίνεται για κάθε ομάδα δοκιμής ο αριθμός των ζώων στην αρχή της δοκιμής, ο αριθμός των ζώων που βρέθηκαν νεκρά κατά τη διάρκεια της δοκιμής ή θανατώθηκαν με ευθανασία, η χρονική στιγμή κάθε θανάτου ή θανάτωσης, ο αριθμός των γόνιμων ζώων, ο αριθμός των έγκυων θηλυκών, ο αριθμός των ζώων που εμφάνισαν σημεία τοξικότητας, μια περιγραφή των παρατηρηθέντων σημείων τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένης της χρονικής στιγμής εμφάνισης, της διάρκειας και της σοβαρότητας κάθε τοξικής δράσης, οι τύποι των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων και κάθε σχετικό στοιχείο για τις γέννες. Στο προσάρτημα 3 παρέχεται ένας μορφότυπος συνοπτικής αναφοράς σε μορφή πίνακα που έχει αποδεχθεί ιδιαίτερα χρήσιμος για την αξιολόγηση των επιδράσεων στην αναπαραγωγή/ανάπτυξη.

51. Λόγω του περιορισμένου μεγέθους της μελέτης, οι στατιστικές αναλύσεις υπό μορφή ελέγχων σημαντικότητας είναι περιορισμένης αξίας για πολλές παραμέτρους, ιδίως τις παραμέτρους σχετικά με την αναπαραγωγή. Σε περίπτωση χρήσης στατιστικών αναλύσεων, η επιλεγόμενη μέθοδος θα πρέπει να είναι κατάλληλη για την κατανομή της υπό εξέταση μεταβλητής, και να επιλέγεται πριν από την έναρξη της μελέτης. Η στατιστική ανάλυση πρωκτογεννητικής απόστασης και διατηρούμενων θηλών θα πρέπει να βασίζεται σε ατομικά στοιχεία για κάθε νεογνό, και θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι επιδράσεις στη γέννα. Όπου αρμόζει, μονάδα της ανάλυσης θα πρέπει να είναι η γέννα από την ίδια μητέρα. Η στατιστική ανάλυση σωματικού βάρους των νεογνών θα πρέπει να βασίζεται σε ατομικά στοιχεία για κάθε νεογνό, και θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το πλήθος νεογνών της γέννας. Λόγω του μικρού μεγέθους της ομάδας, μπορεί να είναι χρήσιμη η χρήση ιστορικών δεδομένων μαρτύρων (π.χ. σχετικά με το μέγεθος της γέννας), εάν υπάρχουν, ως βοήθημα στην ερμηνεία της μελέτης.

Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

52. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης τοξικότητας θα πρέπει να αξιολογούνται ως προς τις παρατηρούμενες επιδράσεις, τα ευρήματα της νεκροψίας και τα μικροσκοπικά ευρήματα. Στην αξιολόγηση περιλαμβάνεται η σχέση μεταξύ της δόσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και της παρουσίας ή απουσίας, της συχνότητας εμφάνισης και της σοβαρότητας των ανωμαλιών, συμπεριλαμβανομένων των μακροσκοπικών αλλοιώσεων, των ταυτοποιημένων οργάνων στόχων, της στειρότητας, των κλινικών ανωμαλιών, των επιδράσεων στις επιδόσεις στην αναπαραγωγή και στις γέννες, των μεταβολών στα σωματικά βάρη, των επιδράσεων στη θνησιμότητα και κάθε άλλου τοξικού φαινομένου.

53. Λόγω της σύντομης περιόδου αγωγής των αρσενικών, κατά την αξιολόγηση των επιδράσεων στην αναπαραγωγή των αρσενικών, μαζί με τα δεδομένα για τη γονιμότητα θα πρέπει να εξετάζεται και η ιστοπαθολογία των όρχεων και των επιδιδυμίδων. Επικουρικά, χρήσιμη στην ερμηνεία της μελέτης μπορεί να είναι και η χρήση ιστορικών δεδομένων μαρτύρων (π.χ. σχετικά με το μέγεθος της γέννας, την πρωκτογεννητική απόσταση, τις διατηρούμενες θηλές, τα επίπεδα T4 στον ορό), εάν υπάρχουν.

54. Για τον ποιοτικό έλεγχο προτείνεται η συλλογή ιστορικών δεδομένων μαρτύρων και ο υπολογισμός συντελεστών μεταβλητότητας για τα αριθμητικά δεδομένα, ιδίως όσον αφορά τις παραμέτρους που συνδέονται με την ανίχνευση ενδοκρινικών διαταρακτών. Τα δεδομένα αυτά μπορούν να χρησιμοποιούνται για συγκρίσεις κατά την αξιολόγηση πραγματικών μελετών.

Έκθεση δοκιμής

55. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

— πηγή, αριθμός παρτίδας, καταληκτική ημερομηνία χρήσης, αν υπάρχει,

— σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εάν είναι γνωστή,

▼**M8**

Μονοσυστατική ουσία:

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμίξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγματα:

— περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Φορέας (εάν χρησιμοποιείται):

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα, εάν δεν είναι το νερό.

Πειραματόζωα:

— είδος/φυλή χρησιμοποιηθέντων ζώων,

— αριθμός, ηλικία και φύλο των ζώων,

— προέλευση των ζώων, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσιο κ.λπ.,

— βάρος κάθε ζώου κατά την έναρξη της δοκιμής.

— αιτιολόγηση της επιλογής άλλου είδους εκτός από τον επίμυ.

Συνθήκες δοκιμής:

— αιτιολόγηση της επιλογής των επιπέδων δόσης,

— λεπτομέρειες σχετικά με το παρασκεύασμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας/τροφής και τις επιτευχθείσες συγκεντρώσεις, σταθερότητα και ομοιογένεια του παρασκευάσματος,

— λεπτομέρειες σχετικά με τη χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας,

— κατά περίπτωση, μετατροπή της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο σιτηρέσιο ή το πόσιμο νερό (ppm) σε πραγματική δόση (mg/kg βάρους σώματος/ημέρα),

— λεπτομέρειες σχετικά με την ποιότητα της τροφής και του νερού,

— αναλυτική περιγραφή της διαδικασίας τυχαιοποίησης για την επιλογή των νεογνών προς απομάκρυνση, εφόσον απαιτείται.

Αποτελέσματα:

— βάρος του σώματος/μεταβολές βάρους σώματος,

— κατανάλωση τροφής και νερού, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— δεδομένα τοξικής αντίδρασης ανά φύλο και δόση, περιλαμβανομένης της γονιμότητας, της κύησης, καθώς και όποιων άλλων σημείων τοξικότητας,

— διάρκεια κύησης,

— τοξικές ή άλλες επιδράσεις στην αναπαραγωγή, στα νεογνά, στη μεταγεννητική ανάπτυξη κ.λπ.,

— φύση, σοβαρότητα και διάρκεια των κλινικών παρατηρήσεων (αναστρέψιμων και μη),

— αριθμός ενήλικων θηλυκών με κανονικό ή μη κανονικό οιστρικό κύκλο και διάρκεια του κύκλου,

— αριθμός ζώντων νεογνών και απώλειες μετά την εμφύτευση,

— δεδομένα για το βάρος του σώματος των νεογνών,

— πρωκτογεννητική απόσταση για όλα τα νεογνά (και βάρος σώματος την ημέρα της μέτρησης της πρωκτογεννητικής απόστασης)

▼M8

— διατηρούμενες θηλές σε αρσενικά νεογνά,

— επίπεδα θυρεοειδικών ορμονών, σε νεογνά 13ης ΜΓΗ και σε ενήλικα αρσενικά (και σε μητέρες και νεογνά 4ης ΜΓΗ, εφόσον μετρώνται)

— αριθμός νεογνών με μακροσκοπικά ορατές ανωμαλίες, μακροσκοπική αξιολόγηση των εξωτερικών γεννητικών οργάνων, αριθμός καχεκτικών νεογνών,

— χρόνος θανάτου των ζώων κατά τη διάρκεια της μελέτης ή επιβίωση έως το τέλος,

— αριθμός εμφυτευμένων νεογνών, μέγεθος γέννας και βάρη νεογνών γέννας κατά τη χρονική στιγμή της καταγραφής,

— βάρος σώματος κατά τη θανάτωση και δεδομένα βάρους οργάνων για τα γονικά ζώα,

— ευρήματα νεκροψίας,

— λεπτομερής περιγραφή των ιστοπαθολογικών ευρημάτων,

— δεδομένα για την απορρόφηση (εάν υπάρχουν διαθέσιμα),

— στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, κατά περίπτωση.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

56. Η μελέτη θα παράσχει αξιολογήσεις της τοξικότητας στην αναπαραγωγή/ανάπτυξη που συνδέεται με τη χορήγηση επαναλαμβανόμενων δόσεων (βλ. παραγράφους 5 και 6). Μπορεί να περιλαμβάνει υπόδειξη της ανάγκης διενέργειας περαιτέρω ερευνών και παρέχει καθοδήγηση όσον αφορά τον σχεδιασμό επακόλουθων μελετών. Για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων που αφορούν την αναπαραγωγή και την ανάπτυξη θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως βοήθημα το έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 43 του ΟΟΣΑ (12). Στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 106 του ΟΟΣΑ για την ιστολογική αξιολόγηση των ενδοκρινικών και αναπαραγωγικών δοκιμών σε τρωκτικά (11) παρέχονται πληροφορίες σχετικά με την προετοιμασία και την αξιολόγηση των (ενδοκρινικών) οργάνων και των κολπικών επιχρισμάτων που μπορεί να είναι χρήσιμα για την παρούσα TG.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Διατίθεται κατόπιν αιτήματος από τον Οργανισμό για την Οικονομική Συνεργασία και την Ανάπτυξη, Παρίσι.

(2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Διατίθεται κατόπιν αιτήματος από τον Οργανισμό για την Οικονομική Συνεργασία και την Ανάπτυξη, Παρίσι.

(3) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998. Διατίθεται κατόπιν αιτήματος από τον Οργανισμό για την Οικονομική Συνεργασία και την Ανάπτυξη, Παρίσι.

(4) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(5) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations. Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development,.Paris.

▼**M8**

(6) OECD (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment(No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) Goldman, J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84-97.

(8) Sadleir R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(9) Gallavan R.H. Jr, Holson J.F., Stump D.G., Knapp J.F. and Reynolds V.L.(1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

(10) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(11) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No106), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(12) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ [ΒΛ. ΕΠΙΣΗΣ ΤΟ ΕΓΓΡΑΦΟ ΚΑΘΟΔΗΓΗΣΗΣ ΑΡΙΘ. 150 ΤΟΥ ΟΟΣΑ (6)]

Ανδρογονικότητα: η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να δρα όπως μια φυσική ανδρογόνος ορμόνη (π.χ. τεστοστερόνη) στον οργανισμό θηλαστικού.

Αντιανδρογονικότητα: η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να καταστέλλει τη δράση μιας φυσικής ανδρογόνου ορμόνης (π.χ. τεστοστερόνη) στον οργανισμό θηλαστικού.

Αντιοιστρογονικότητα: η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να καταστέλλει τη δράση μιας φυσικής οιστρογόνου ορμόνης (π.χ. 17β-οιστραδιόλη) στον οργανισμό θηλαστικού.

Αντιθυρεοειδική δραστηριότητα: η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να καταστέλλει τη δράση μιας φυσικής θυρεοειδικής ορμόνης (π.χ. T_3) στον οργανισμό θηλαστικού.

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Τοξικότητα στην ανάπτυξη: η εκδήλωση τοξικότητας στην αναπαραγωγή, η οποία περιλαμβάνει προγεννητικές, περιγεννητικές και μεταγεννητικές δομικές ή λειτουργικές διαταραχές των απογόνων.

Δοσολογία: γενικός όρος που περιλαμβάνει τη δόση, τη συχνότητα και τη διάρκεια χορήγησης.

Δόση: η χορηγούμενη ποσότητα υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Η δόση εκφράζεται σε βάρος υπό δοκιμή χημικής ουσίας ανά μονάδα βάρους πειραματόζωου ανά ημέρα (π.χ. mg/kg βάρους σώματος/ημέρα) ή σε σταθερή συγκέντρωση στην τροφή.

Έκδηλη τοξικότητα: γενικός όρος που δηλώνει σαφή σημεία τοξικότητας μετά από χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Αυτά πρέπει να επαρκούν για την εκτίμηση της επικινδυνότητας και να είναι τέτοια ώστε η αύξηση της χορηγούμενης δόσης να αναμένεται ότι θα προκαλέσει σοβαρές τοξικές εκδηλώσεις και πιθανώς θνησιμότητα.

Εξασθένιση της γονιμότητας: αντιπροσωπεύει διαταραχές των αναπαραγωγικών λειτουργιών ή της ικανότητας αρσενικών ή θηλυκών.

Τοξικότητα στη μητέρα: δυσμενείς επιδράσεις σε κυοφορούντα θηλυκά, είτε ειδικής εκδήλωσης (άμεση επίδραση) είτε μη ειδικής εκδήλωσης (έμμεση επίδραση).

NOAEL (no-observed-adverse effect level): πρόκειται για το υψηλότερο επίπεδο δόσης στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις λόγω της αγωγής.

Οιστρογονικότητα: η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να δρα όπως μια φυσική οιστρογόνος ορμόνη (π.χ. 17β-οιστραδιόλη) στον οργανισμό θηλαστικού.

Τοξικότητα στην αναπαραγωγή: αντιπροσωπεύει τις επιβλαβείς επιδράσεις στους απογόνους και/ή την εξασθένιση των αναπαραγωγικών λειτουργιών ή ικανότητας αρσενικών και θηλυκών.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

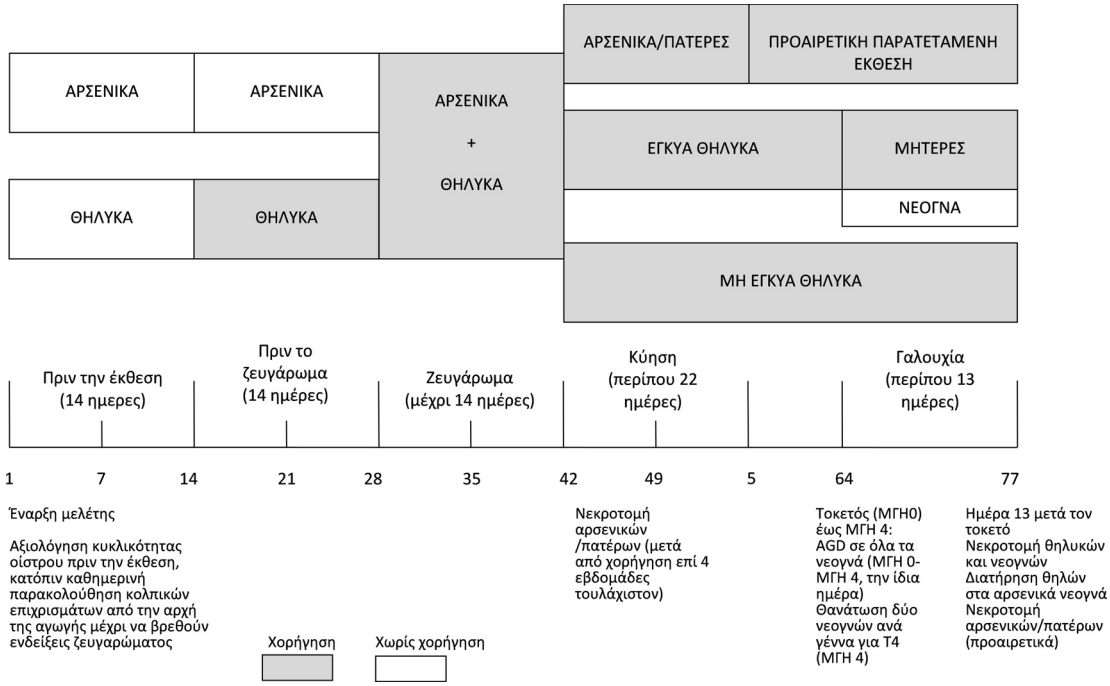
Θυρεοειδική δραστηριότητα: η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να δρα όπως μια φυσική θυρεοειδική ορμόνη (π.χ. T_3) στον οργανισμό θηλαστικού.

Επικύρωση: επιστημονική διαδικασία που αποσκοπεί στον χαρακτηρισμό των λειτουργικών απαιτήσεων και περιορισμών μιας μεθόδου δοκιμών και στην απόδειξη της αξιοπιστίας της και της καταλληλότητάς της για συγκεκριμένο σκοπό.

▼**M8**

Προσάρτημα 2

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΓΙΣΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ, ΒΑΣΕΙ ΠΛΗΡΟΥΣ ΠΕΡΙΟΔΟΥ ΖΕΥΓΑΡΩΜΑΤΟΣ 14 ΗΜΕΡΩΝ



▼**M8**

Προσάρτημα 3

ΣΥΝΟΠΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ/ΑΝΑΠΤΥΞΗ

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ	ΤΙΜΕΣ				
Δοσολογία (μονάδες)	0 (μάρτυρας)	…	…	…	…
Ζεύγη κατά την έναρξη (N)					
Οιστρικός κύκλος (τουλάχιστον μέση διάρκεια και συχνότητα μη κανονικών κύκλων)					
Θηλυκά που παρουσιάζουν ενδείξεις συνουσίας (N)					
Θηλυκά που καθίστανται έγκυα (N)					
Ημέρες σύλληψης 1 - 5 (N)					
Ημέρες σύλληψης 6 -… ([1]) (N)					
Εγκυμοσύνη ≤ 21 ημέρες (N)					
Εγκυμοσύνη = 22 ημέρες (N)					
Εγκυμοσύνη ≥ 23 ημέρες (N)					
Μητέρες με ζώντα νεογνά (N)					
Μητέρες με ζώντα νεογνά την 4η ημέρα (N)					
Εμφυτευμένα έμβρυα/μητέρα (μέσος όρος)					
Ζώντα νεογνά/μητέρα κατά τη γέννα (μέσος όρος)					
Ζώντα νεογνά/μητέρα κατά την 4η ημέρα (μέσος όρος)					
Αναλογία φύλων (α/θ) κατά τη γέννα (μέσος όρος)					
Αναλογία φύλων (α/θ) κατά την 4η ημέρα (μέσος όρος)					
Βάρος γέννας κατά τη γέννηση (μέσος όρος)					
Βάρος γέννας κατά την 4η ημέρα (μέσος όρος)					
Βάρος νεογνών κατά τη γέννηση (μέσος όρος)					
Βάρος νεογνών κατά τη μέτρηση της πρωκτογεννητικής απόστασης (μέσος όρος αρσενικών, μέσος όρος θηλυκών)					

▼**M8**

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ	ΤΙΜΕΣ				
Δοσολογία (μονάδες)	0 (μάρτυρας)	…	…	…	…
Πρωκτογεννητική απόσταση νεογνών κατά την ίδια μεταγεννητική ημέρα, τη γέννηση – την 4η ημέρα (μέσος όρος αρσενικών, μέσος όρος θηλυκών, καταγραφή της ΜΓΗ)					
Βάρος νεογνών κατά την 4η ημέρα (μέσος όρος)					
Διατηρούμενες θηλές αρσενικών νεογνών τη 13η ημέρα (μέσος όρος)					
Βάρος νεογνών κατά τη 13η ημέρα (μέσος όρος)					
ΜΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΝΕΟΓΝΑ					
Μητέρες με 0					
Μητέρες με 1					
Μητέρες με ≥ 2					
ΑΠΩΛΕΙΑ ΑΠΟΓΟΝΩΝ					
Προγεννητική/μετά την εμφύτευση (εμφυτευμένα έμβρυα μείον ζώντα νεογνά)					
Θηλυκά με 0					
Θηλυκά με 1					
Θηλυκά με 2					
Θηλυκά με ≥ 3					
Μεταγεννητική (ζώντα κατά τη γέννα μείον ζώντα κατά τη 13η ΜΓΗ)					
Θηλυκά με 0					
Θηλυκά με 1					
Θηλυκά με 2					
Θηλυκά με ≥ 3					

([1]) τελευταία ημέρα της περιόδου ζευγαρώματος

▼M8

B.64 **ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗΣ ΔΟΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΔΟΚΙΜΗ ΔΙΑΛΟΓΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ/ΑΝΑΠΤΥΞΗ**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 422 του ΟΟΣΑ (2016). Οι κατευθυντήριες γραμμές του ΟΟΣΑ για τον έλεγχο χημικών ουσιών αναθεωρούνται ανά διαστήματα ώστε να λαμβάνονται υπόψη οι επιστημονικές εξελίξεις. Η αρχική κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών διαλογής 422 εγκρίθηκε το 1996, βάσει ενός πρωτοκόλλου για συνδυασμένη δοκιμή επαναλαμβανόμενης δόσης και διαλογής αναπαραγωγής/ανάπτυξης που συζητήθηκε σε δύο συναντήσεις εμπειρογνωμόνων, στο Λονδίνο το 1990 (1) και στο Τόκυο το 1992 (2).

2. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών συνδυάζει ένα μέρος που συνίσταται στη διαλογή ως προς την τοξικότητα στην αναπαραγωγή/ανάπτυξη, το οποίο βασίζεται στην εμπειρία που απέκτησαν τα κράτη μέλη από τη χρήση της αρχικής μεθόδου σε υφιστάμενες χημικές ουσίες υψηλού όγκου παραγωγής και σε διερευνητικές μελέτες με ουσίες που χρησιμεύουν ως θετικοί μάρτυρες (3) (4), και ένα άλλο μέρος σχετικό με την τοξικότητα επαναλαμβανόμενης δόσης σύμφωνα με την κατευθυντήρια γραμμή 407 του ΟΟΣΑ (μελέτη τοξικότητας από το στόμα, 28 ημερών, με επαναλαμβανόμενη δόση σε τρωκτικά, που αντιστοιχεί στο κεφάλαιο B.7 του παρόντος παραρτήματος).

3. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών έχει επικαιροποιηθεί με παραμέτρους που αφορούν τους ενδοκρινικούς διαταράκτες, στο πλαίσιο της δράσης πρώτης προτεραιότητας που ξεκίνησε ο ΟΟΣΑ το 1998 με σκοπό την αναθεώρηση των υφιστάμενων κατευθυντήριων γραμμών δοκιμών και την ανάπτυξη νέων κατευθυντήριων γραμμών δοκιμών για τη διαλογή και τη διεξαγωγή δοκιμών σε δυνητικούς ενδοκρινικούς διαταράκτες (5). Σε αυτό το πλαίσιο, η TG 407 (που αντιστοιχεί στο κεφάλαιο B.7 του παρόντος παραρτήματος) ενισχύθηκε το 2008 με παραμέτρους κατάλληλες για την ανίχνευση ενδοκρινικής δραστηριότητας υπό δοκιμή χημικών ουσιών. Ο στόχος της επικαιροποίησης της TG 422 ήταν η συμπερίληψη ορισμένων παραμέτρων σχετικά με τους ενδοκρινικούς διαταράκτες σε TG διαλογής στις οποίες οι περίοδοι έκθεσης καλύπτουν ορισμένες από τις ευαίσθητες περιόδους κατά την ανάπτυξη (προγεννητική ή πρώτη μεταγεννητική περίοδος).

4. Οι επιλεχθείσες πρόσθετες παράμετροι σχετικά με τους ενδοκρινικούς διαταράκτες, που αποτελούν επίσης μέρος της TG 443 (εκτεταμένη μελέτη τοξικότητας στην αναπαραγωγή μίας γενεάς, που αντιστοιχεί στο κεφάλαιο B.56 του παρόντος παραρτήματος), περιλήφθηκαν στην TG 422 βάσει μελέτης σκοπιμότητας στην οποία θίγονται επιστημονικά και τεχνικά θέματα που σχετίζονται με τη συμπερίληψή τους, καθώς και πιθανές προσαρμογές του σχεδιασμού δοκιμής που χρειάζονται για τη συμπερίληψή τους (6).

5. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών έχει σχεδιαστεί για να παρέχει πληροφορίες σχετικά με τις επιδράσεις μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην αναπαραγωγική συμπεριφορά αρσενικών και θηλυκών ατόμων, όπως η λειτουργία των γονάδων, η συμπεριφορά ζευγαρώματος, η σύλληψη, η ανάπτυξη του κυήματος και ο τοκετός. Δεν αποτελεί εναλλακτική μέθοδο ούτε αντικαθιστά τις υφιστάμενες μεθόδους δοκιμών B.31, B.34, B.35 ή B.56.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

6. Κατά την εκτίμηση και αξιολόγηση των τοξικών χαρακτηριστικών μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας, μπορεί να προσδιοριστεί η τοξικότητά της από το στόμα με τη χρήση επαναλαμβανόμενης δόσης μετά τη λήψη αρχικών πληροφοριών για την τοξικότητα μέσω δοκιμών οξείας τοξικότητας. Η παρούσα μελέτη παρέχει πληροφορίες σχετικά με τους κινδύνους για την υγεία που είναι πιθανό να προκύψουν από την επαναλαμβανόμενη έκθεση για σχετικά περιορισμένη χρονική περίοδο. Η μέθοδος περιλαμβάνει τη βασική μελέτη τοξικότητας με επαναλαμβανόμενη δόση, που μπορεί να χρησιμοποιείται για χημικές ουσίες για τις οποίες δεν δικαιολογείται η διεξαγωγή μελέτης 90 ημερών (π.χ. όταν ο όγκος παραγωγής δεν υπερβαίνει συγκεκριμένα όρια) ή ως προκαταρκτικό στάδιο μιας μακροχρόνιας μελέτης. Κατά τη διεξαγωγή της μελέτης θα πρέπει να εφαρμόζονται οι γενικές αρχές και τα κριτήρια που περιγράφονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 19 του ΟΟΣΑ σχετικά με την αναγνώριση, την αξιολόγηση και τη χρήση κλινικών σημείων ως ανώδυνων παραμέτρων για τα πειραματόζωα που χρησιμοποιούνται σε αξιολογήσεις ασφάλειας (7).

▼M8

7. Επίσης, περιλαμβάνει δοκιμή διαλογής ως προς την τοξικότητα στην αναπαραγωγή/ανάπτυξη και, ως εκ τούτου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την παροχή αρχικών πληροφοριών σχετικά με τις δυνητικές επιδράσεις στις αναπαραγωγικές επιδόσεις αρσενικών και θηλυκών όπως η λειτουργία των γονάδων, η συμπεριφορά ζευγαρώματος, η σύλληψη, η ανάπτυξη του κυήματος και ο τοκετός, είτε σε πρώιμο στάδιο της αξιολόγησης των τοξικολογικών ιδιοτήτων υπό δοκιμή χημικών ουσιών είτε για χημικές ουσίες που προκαλούν ανησυχία. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν παρέχει ολοκληρωμένες πληροφορίες για όλες τις πτυχές της αναπαραγωγής και της ανάπτυξης. Πιο συγκεκριμένα, παρέχει περιορισμένα μόνο μέσα ανίχνευσης των μεταγεννητικών εκδηλώσεων της προγεννητικής έκθεσης, ή των επαγόμενων κατά τη μεταγεννητική έκθεση πιθανών επιδράσεων. Λόγω (μεταξύ άλλων) της επιλεκτικότητας των παραμέτρων και της μικρής διάρκειας της μελέτης, η παρούσα μέθοδος δεν θα παρέχει αποδεικτικά στοιχεία που να στηρίζουν οριστικούς ισχυρισμούς περί ανυπαρξίας επιδράσεων στην αναπαραγωγή/ανάπτυξη. Επιπλέον, σε περίπτωση απουσίας δεδομένων από άλλες δοκιμές τοξικότητας στην αναπαραγωγή/ανάπτυξη, τα θετικά αποτελέσματα είναι χρήσιμα για την αρχική αξιολόγηση της επικινδυνότητας και συμβάλλουν στη διαδικασία λήψης αποφάσεων όσον αφορά την αναγκαιότητα και το χρονοδιάγραμμα διεξαγωγής πρόσθετων δοκιμών.

8. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις σχετικές με το ενδοκρινικό σύστημα παραμέτρους θα πρέπει να μελετώνται στο πλαίσιο του εννοιολογικού πλαισίου για τον έλεγχο και την αξιολόγηση χημικών ενδοκρινικών διαταρακτών (Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals) του ΟΟΣΑ (8). Σε αυτό το εννοιολογικό πλαίσιο, η ενισχυμένη TG 422 του ΟΟΣΑ περιλαμβάνεται στο επίπεδο 4 ως *in vivo* δοκιμασία που παρέχει δεδομένα για τις δυσμενείς επιδράσεις των παραμέτρων που σχετίζονται με το ενδοκρινικό σύστημα. Εντούτοις, ένα ενδοκρινικό σήμα μπορεί να μη θεωρηθεί επαρκώς ισχυρό στοιχείο ώστε μια χημική ουσία να χαρακτηριστεί ενδοκρινικός διαταράκτης.

9. Η μέθοδος δοκιμών δίδει μεγαλύτερη έμφαση στις νευρολογικές επιδράσεις ως ειδική παράμετρο καθώς και στην ανάγκη προσεκτικής κλινικής παρατήρησης των ζώων με σκοπό τη συγκέντρωση όσο το δυνατόν περισσοτέρων πληροφοριών. Επιδιώκεται η αναγνώριση χημικών ουσιών με νευροτοξικό δυναμικό, για τις οποίες ενδέχεται να χρειάζεται περαιτέρω εις βάθος διερεύνηση. Επιπλέον, η μέθοδος μπορεί επίσης να παράσχει βασικές ενδείξεις επιδράσεων στο ανοσοποιητικό σύστημα.

10. Σε περίπτωση απουσίας δεδομένων από άλλες μελέτες συστηματικής τοξικότητας, τοξικότητας στην αναπαραγωγή/ανάπτυξη, νευροτοξικότητας και/ή ανοσοτοξικότητας, τα θετικά αποτελέσματα είναι χρήσιμα για την αρχική αξιολόγηση της επικινδυνότητας και συμβάλλουν στη διαδικασία λήψης αποφάσεων όσον αφορά την αναγκαιότητα και το χρονοδιάγραμμα διεξαγωγής πρόσθετων δοκιμών. Η δοκιμή μπορεί να είναι ιδιαίτερα χρήσιμη ως μέρος του συνόλου εξέτασης δεδομένων πληροφοριών (SIDS) του ΟΟΣΑ για την αξιολόγηση υφιστάμενων χημικών ουσιών για τις οποίες οι διαθέσιμες τοξικολογικές πληροφορίες είναι περιορισμένες ή ανύπαρκτες, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική λύση αντί της διεξαγωγής δύο χωριστών δοκιμών για την τοξικότητα επαναλαμβανόμενης δόσης (TG 407 του ΟΟΣΑ, που αντιστοιχεί στο κεφάλαιο B.7 του παρόντος παραρτήματος) και την τοξικότητα στην αναπαραγωγή/ανάπτυξη (TG 421 του ΟΟΣΑ, που αντιστοιχεί στο κεφάλαιο B.63 του παρόντος παραρτήματος) αντίστοιχα. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως μελέτη προσδιορισμού εύρους δόσεων για πιο εκτεταμένες μελέτες της αναπαραγωγής/ανάπτυξης, ή όταν θεωρηθεί για άλλους λόγους κατάλληλη.

11. Γενικά, σε ό,τι αφορά την ευαισθησία, θεωρείται ότι υπάρχουν διαφορές μεταξύ των έγκυων και των μη έγκυων ζώων. Κατά συνέπεια, ο προσδιορισμός των επιπέδων δόσεων που είναι επαρκή για την αξιολόγηση της γενικής συστηματικής τοξικότητας και της ειδικής τοξικότητας στην αναπαραγωγή/ανάπτυξη με την παρούσα συνδυαστική δοκιμή μπορεί να είναι πιο περίπλοκος απ' ό,τι όταν οι μεμονωμένες δοκιμές διεξάγονται χωριστά. Επιπλέον, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμής όσον αφορά τη γενική συστηματική τοξικότητα μπορεί να είναι πιο δύσκολη απ' ό,τι όταν διεξάγεται χωριστή μελέτη επαναλαμβανόμενης δόσης, ιδίως όταν οι ορολογικές

▼M8

και οι ιστοπαθολογικές παράμετροι δεν αξιολογούνται κατά την ίδια χρονική στιγμή στη μελέτη. Εξαιτίας αυτών των πολύπλοκων τεχνικών πτυχών, για τη διεξαγωγή της παρούσας συνδυαστικής δοκιμής διαλογής απαιτείται σημαντική εμπειρία στη διεξαγωγή δοκιμών τοξικότητας. Από την άλλη πλευρά, πέραν του μικρότερου πλήθους χρησιμοποιούμενων ζώων, η συνδυαστική μελέτη μπορεί να προσφέρει έναν καλύτερο τρόπο διάκρισης των άμεσων επιδράσεων στην αναπαραγωγή/ανάπτυξη από τις επιδράσεις που θεωρούνται δευτερογενείς προς άλλες (συστηματικές) επιδράσεις.

12. Στην παρούσα δοκιμή, η διάρκεια της περιόδου χορήγησης είναι μεγαλύτερη απ' ό,τι στην κλασική μελέτη επαναλαμβανόμενης δόσης 28 ημερών. Ωστόσο, στην παρούσα δοκιμή χρησιμοποιείται μικρότερο πλήθος ζώων από κάθε φύλο ανά ομάδα σε σύγκριση με τη διεξαγωγή κλασικής μελέτης επαναλαμβανόμενης δόσης 28 ημερών συν μια δοκιμή διαλογής ως προς την τοξικότητα στην αναπαραγωγή/ανάπτυξη.

13. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών θεωρείται ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται από το στόμα. Εάν χρησιμοποιηθούν άλλες οδοί έκθεσης, ενδέχεται να χρειαστούν τροποποιήσεις.

14. Πριν από τη χρήση της μεθόδου δοκιμών σε μείγμα για την παραγωγή δεδομένων για συγκεκριμένο κανονιστικό σκοπό, θα πρέπει να εξετάζεται αν –και, εάν ναι, για ποιον λόγο– μπορεί να αποδώσει αποτελέσματα κατάλληλα για τον επιδιωκόμενο σκοπό. Τέτοια εξέταση δεν χρειάζεται όταν οι κανονιστικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τον έλεγχο του μείγματος.

15. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

16. Η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται σε διαβαθμισμένες δόσεις σε αρκετές ομάδες αρσενικών και θηλυκών ατόμων. Η χορήγηση των δόσεων στα αρσενικά θα πρέπει να διαρκεί τουλάχιστον τέσσερις εβδομάδες και να φθάνει μέχρι και την ημέρα πριν από την προγραμματισμένη θανάτωση (σε αυτό το χρονοδιάγραμμα περιλαμβάνονται τουλάχιστον δύο εβδομάδες πριν το ζευγάρωμα, η περίοδος του ζευγαρώματος και περίπου δύο εβδομάδες μετά το ζευγάρωμα). Λόγω της περιορισμένης περιόδου χορήγησης των δόσεων στα αρσενικά πριν από το ζευγάρωμα, η γονιμότητα ενδέχεται να μην αποτελεί ιδιαίτερα ευαίσθητο δείκτη της τοξικότητας στους όρχεις. Ως εκ τούτου, είναι ιδιαίτερα σημαντική ηδιεξαγωγή αναλυτικής ιστολογικής εξέτασης. Ο συνδυασμός μιας περιόδου χορήγησης διάρκειας δύο εβδομάδων πριν από το ζευγάρωμα και επακόλουθων παρατηρήσεων όσον αφορά το ζευγάρωμα/γονιμότητα με συνολική περίοδο χορήγησης τουλάχιστον τεσσάρων εβδομάδων, ακολουθούμενων από αναλυτική ιστοπαθολογική εξέταση των γονάδων των αρσενικών, θεωρείται επαρκής για την ανίχνευση της πλειονότητας των επιδράσεων στη γονιμότητα των αρσενικών και τη σπερματογένεση.

17. Η χορήγηση δόσεων στα θηλυκά θα πρέπει να διαρκεί καθ' όλο το διάστημα διεξαγωγής της μελέτης. Η εν λόγω χορήγηση περιλαμβάνει δύο εβδομάδες πριν από το ζευγάρωμα (με στόχο να καλυφθούν τουλάχιστον δύο πλήρεις κύκλοι οίστρου), το μεταβλητό χρονικό διάστημα μέχρι τη σύλληψη, τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και τουλάχιστον δεκατρείς ημέρες μετά τη γέννηση, έως και την ημέρα πριν από την προγραμματισμένη θανάτωση.

18. Η διάρκεια της μελέτης, μετά τον εγκλιματισμό και την αξιολόγηση του κύκλου οίστρου πριν από τη χορήγηση των δόσεων, εξαρτάται από τις επιδόσεις των θηλυκών και είναι κατά προσέγγιση 63 ημέρες [τουλάχιστον 14 ημέρες πριν από το ζευγάρωμα, (έως) 14 ημέρες ζευγαρώματος, 22 ημέρες κύησης, 13 ημέρες γαλουχίας].

19. Τα ζώα εξετάζονται με προσοχή καθημερινά κατά τη διάρκεια της περιόδου χορήγησης για τυχόν συμπτώματα τοξικότητας. Τα ζώα που πεθαίνουν ή θανατώνονται κατά τη διάρκεια της δοκιμής νεκροτομούνται και, στο τέλος της δοκιμής, αυτά που έχουν επιζήσει θανατώνονται και νεκροτομούνται επίσης.

▼M8

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Επιλογή ζωικού είδους

20. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών έχει σχεδιαστεί για χρήση με επίμυ. Η διερεύνηση των παραμέτρων που προσδιορίζονται στην παρούσα TG 422 σε άλλα είδη τρωκτικών πρέπει να αιτιολογείται αναλυτικά. Στο διεθνές πρόγραμμα επικύρωσης για την ανίχνευση ενδοκρινικών διαταρακτών της TG 407, ο επίμυς ήταν το μόνο είδος που χρησιμοποιήθηκε. Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται φυλές με χαμηλή γονιμότητα ή γνωστή υψηλή συχνότητα εμφάνισης αναπτυξιακών ελαττωμάτων. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή παρθένα ζώα, που δεν έχουν υποβληθεί προηγουμένως σε πειράματα. Τα πειραματόζωα θα πρέπει να χαρακτηρίζονται ως προς το είδος, τη φυλή, το φύλο, το βάρος και την ηλικία. Στην αρχή της μελέτης, η διακύμανση των βαρών των χρησιμοποιούμενων ζώων θα πρέπει να είναι ελάχιστη και να μην υπερβαίνει το ± 20 % της μέσης τιμής για κάθε φύλο. Σε περίπτωση που η μελέτη διεξάγεται ως προκαταρκτικό στάδιο μακροχρόνιας μελέτης ή μελέτης πλήρους γενεάς, συνιστάται να χρησιμοποιούνται και στις δύο μελέτες ζώα της ίδιας φυλής και προέλευσης.

Στέγαση και διατροφή

21. Σε όλες οι διαδικασίες πρέπει να τηρούνται τα τοπικά πρότυπα φροντίδας των πειραματόζωων. Η θερμοκρασία του θαλάμου πειραματόζωων θα πρέπει να είναι 22 °C (± 3 °C). Η σχετική υγρασία θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου. Ο φωτισμός πρέπει να είναι τεχνητός και η φωτοπερίοδος 12ωρη. Για τη διατροφή μπορούν να χρησιμοποιούνται συνήθη εργαστηριακά σιτηρέσια, με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού. Όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται μέσω της παρούσας μεθόδου, η επιλογή σιτηρεσίου ενδέχεται να επηρεάζεται από την ανάγκη κατάλληλης ανάμειξης της ουσίας.

22. Τα ζώα θα πρέπει να στεγάζονται σε μικρές ομάδες του ίδιου φύλου. Επιτρέπεται η ατομική στέγαση, εάν αιτιολογείται επιστημονικά. Σε περίπτωση ομαδικής στέγασης, κάθε κλωβός δεν πρέπει να περιέχει περισσότερα από πέντε ζώα. Οι διαδικασίες ζευγαρώματος θα πρέπει να εκτελούνται σε κλωβούς κατάλληλους για τον σκοπό αυτό. Τα έγκυα θηλυκά θα πρέπει να στεγάζονται σε ατομικούς κλωβούς και θα πρέπει να τους παρέχονται υλικά φωλιάσματος. Τα θηλυκά κατά τη γαλουχία τοποθετούνται σε ατομικούς κλωβούς μαζί με τα νεογνά τους.

23. Η τροφή πρέπει να υποβάλλεται τακτικά σε ανάλυση ώστε να εντοπίζονται τυχόν ξένες προσμείξεις. Ένα δείγμα του σιτηρεσίου θα πρέπει να διατηρείται έως την οριστικοποίηση της έκθεσης.

Προετοιμασία των ζώων

24. Λαμβάνονται τυχαία υγιή, νεαρά, ενήλικα ζώα και κατανέμονται στις ομάδες και τους κλωβούς του πειράματος. Οι κλωβοί θα πρέπει να διατάσσονται με τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται οι πιθανές επιδράσεις της θέσης τους. Τα ζώα ταυτοποιούνται με αποκλειστικό αναγνωριστικό και παραμένουν στα κλουβιά τους τουλάχιστον πέντε ημέρες πριν από την έναρξη της μελέτης προκειμένου να εγκλιματιστούν στις εργαστηριακές συνθήκες.

Παρασκευή των δόσεων

25. Συνιστάται η χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας από το στόμα, εκτός εάν θεωρούνται καταλληλότερες άλλες οδοί χορήγησης. Όταν επιλέγεται η οδός από το στόμα, η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται συνήθως με στομαχικό καθετήρα· εντούτοις, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορούν εναλλακτικά να χορηγούνται μέσω του σιτηρεσίου ή του πόσιμου νερού.

26. Εφόσον είναι αναγκαίο, παρασκευάζεται διάλυμα ή εναιώρημα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε κατάλληλο φορέα. Συνιστάται να εξετάζεται ως πρώτη επιλογή, εφόσον είναι δυνατόν, η χρήση υδατικού διαλύματος/εναιωρήματος, έπειτα η χρήση διαλύματος/εναιωρήματος σε έλαιο (π.χ. αραβοσιτέλαιο) και, ως τελευταία επιλογή, η χρήση διαλύματος σε άλλο φορέα. Σε περίπτωση που ο φορέας δεν είναι το νερό, θα πρέπει να είναι γνωστά τα τοξικά χαρακτηριστικά του. Θα πρέπει να προσδιορίζεται η σταθερότητα και η ομοιογένεια της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον φορέα.

▼M8

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αριθμός και φύλο των ζώων

27. Συνιστάται κάθε ομάδα να περιλαμβάνει αρχικά τουλάχιστον 10 αρσενικά και 12-13 θηλυκά. Πριν από την έκθεση, θα αξιολογείται η κυκλικότητα του οίστρου των θηλυκών και τα ζώα που δεν παρουσιάζουν τυπικούς κύκλους 4-5 ημερών δεν θα περιλαμβάνονται στη μελέτη· ως εκ τούτου, συνιστάται η προσθήκη επιπλέον θηλυκών στις ομάδες ώστε αυτές να αποτελούνται από 10 θηλυκά έκαστη. Εκτός της περίπτωσης έντονων τοξικών επιδράσεων, αναμένεται ότι κατ' αυτόν τον τρόπο θα εξασφαλίζονται τουλάχιστον 8 έγκυα θηλυκά ανά ομάδα, που είναι συνήθως ο ελάχιστος αποδεκτός αριθμός έγκυων θηλυκών ανά ομάδα. Στόχος είναι να προκαλούνται επαρκείς κυοφορίες και απόγονοι για να εξασφαλίζεται η ουσιαστική αξιολόγηση της ικανότητας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας να επιδρά στη γονιμότητα, στην κύηση, στη μητρική συμπεριφορά και στη συμπεριφορά θηλασμού των ζώων, καθώς και στην αύξηση και την ανάπτυξη των απογόνων της F_1 από τη σύλληψη ως τη 13η ημέρα μετά τον τοκετό. Εάν προβλέπονται θανατώσεις κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, ο αριθμός αυξάνεται ανάλογα κατά τον αριθμό των ζώων που πρόκειται να θανατωθούν πριν την ολοκλήρωση της μελέτης. Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης επιπρόσθετης δορυφορικής ομάδας πέντε ζώων ανά φύλο στην ομάδα μαρτύρων και στην ομάδα μέγιστης δόσης, με σκοπό την παρατήρηση της αναστρεψιμότητας, της εμμονής ή της καθυστερημένης εμφάνισης συστηματικών τοξικών επιδράσεων επί 14 ημέρες τουλάχιστον μετά την αγωγή. Τα ζώα της δορυφορικής ομάδας δεν θα ζευγαρώνουν και, κατά συνέπεια, δεν χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της τοξικότητας στην αναπαραγωγή/ανάπτυξη.

Δοσολογία

28. Κατά κανόνα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τρεις ομάδες δοκιμής και μία ομάδα μαρτύρων. Εάν δεν διατίθενται κατάλληλα δεδομένα γενικής τοξικότητας, είναι δυνατόν να εκπονηθεί μελέτη προσδιορισμού του εύρους (ζώα της ίδιας φυλής και προέλευσης) για να διευκολύνει τον καθορισμό των δόσεων που θα χρησιμοποιηθούν. Εκτός από τη χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, τα ζώα της ομάδας μαρτύρων θα πρέπει να υφίστανται την ίδια ακριβώς μεταχείριση όπως τα υποκείμενα των ομάδων δοκιμής. Εάν χρησιμοποιείται φορέας για τη χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, η ομάδα μαρτύρων πρέπει να λαμβάνει τον φορέα στον μέγιστο χρησιμοποιούμενο όγκο.

29. Τα επίπεδα των δόσεων θα πρέπει να επιλέγονται λαμβανομένων υπόψη τυχόν υφιστάμενων δεδομένων για την τοξικότητα και την (τοξικο-)κινητική. Επίσης, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι ενδέχεται να υπάρχουν διαφορές στην ευαισθησία μεταξύ έγκυων και μη έγκυων ζώων. Το υψηλότερο επίπεδο δόσης πρέπει να επιλέγεται με σκοπό να προκαλέσει τοξικές εκδηλώσεις, όχι όμως τον θάνατο ούτε έντονη οδύνη. Στη συνέχεια επιλέγεται φθίνουσα σειρά δοσολογικών επιπέδων με σκοπό τον εντοπισμό απόκρισης συνδεόμενης με τη δόση και του χαμηλότερου επιπέδου δόσης στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις. Η βέλτιστη επιλογή είναι συνήθως ο υποδιπλασιασμός ή υποτετραπλασιασμός, ενώ η προσθήκη μιας τέταρτης ομάδας δοκιμής είναι συχνά προτιμότερη από τη χρησιμοποίηση πολύ μεγάλων συντελεστών (π.χ. άνω του 10) μεταξύ των δόσεων.

30. Όταν παρατηρείται γενική τοξικότητα (π.χ. μειωμένο βάρος σώματος, επιδράσεις στο ήπαρ, την καρδιά, τους πνεύμονες, τους νεφρούς κ.λπ.) ή άλλη αλλαγή που μπορεί να μην είναι τοξική αντίδραση (π.χ. μειωμένη πρόσληψη τροφής, διόγκωση του ήπατος), οι παρατηρούμενες επιδράσεις στις παραμέτρους που συνδέονται με ευαισθησία του ενδοκρινικού συστήματος θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή.

Οριακή δοκιμή

31. Εάν μια δοκιμή από το στόμα σύμφωνα με τις περιγραφόμενες για την παρούσα μελέτη διαδικασίες, με επίπεδο δόσης τουλάχιστον 1 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα ή, εφόσον πρόκειται για χορήγηση μέσω του σιτηρεσίου, με αντίστοιχη εκατοστιαία αναλογία στο σιτηρέσιο ή στο πόσιμο νερό (βάσει μετρήσεων του βάρους σώματος), δεν έχει ως αποτέλεσμα παρατηρήσιμες τοξικές επιδράσεις και εάν, βάσει των διαθέσιμων δεδομένων

▼M8

για χημικές ουσίες ανάλογης δομής, δεν αναμένεται τοξικότητα, είναι δυνατόν να μην απαιτείται διεξαγωγή πλήρους μελέτης με πολλά επίπεδα δόσεων. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οριακή δοκιμή, εκτός εάν, με βάση την έκθεση του ανθρώπου, διαφαίνεται η ανάγκη χρησιμοποίησης υψηλότερου επιπέδου δόσης. Σε περίπτωση χορήγησης από άλλη οδό, όπως εισπνοή ή εφαρμογή στο δέρμα, η μέγιστη εφικτή έκθεση μπορεί να εξαρτάται συχνά από τις φυσικές και χημικές ιδιότητες των υπό δοκιμή ουσιών.

Χορήγηση των δόσεων

32. Η δόση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας χορηγείται στα ζώα καθημερινά επί 7 ημέρες την εβδομάδα. Όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται με καθετήρα, η χορήγηση πρέπει να γίνεται εφάπαξ με τη βοήθεια στομαχικού καθετήρα ή κατάλληλης διασωλήνωσης. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Ο όγκος δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 1 ml/100 g βάρους σώματος, εκτός της περίπτωσης υδατικών διαλυμάτων όπου μπορούν να χρησιμοποιούνται 2 ml/100 g βάρους σώματος. Εκτός από την περίπτωση των ερεθιστικών διαβρωτικών υπό δοκιμή χημικών ουσιών, οι οποίες σε υψηλότερες συγκεντρώσεις συνήθως προκαλούν εντονότερες επιδράσεις, η μεταβλητότητα των όγκων δοκιμής πρέπει να ελαχιστοποιείται με ρύθμιση της συγκέντρωσης, ώστε να εξασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλα τα επίπεδα δόσης.

33. Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες που χορηγούνται με την τροφή ή το πόσιμο νερό, πρέπει να εξασφαλίζεται ότι οι χορηγούμενες ποσότητες υπό δοκιμή χημικής ουσίας δεν επηρεάζουν το κανονικό διατροφικό ισοζύγιο ή ισοζύγιο νερού. Όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται μέσω του σιτηρεσίου, μπορεί να χρησιμοποιείται είτε σταθερή συγκέντρωση στο σιτηρέσιο (ppm) είτε σταθερό επίπεδο δόσης, εκφρασμένο επί του βάρους σώματος του ζώου. Η χρησιμοποιούμενη εναλλακτική επιλογή πρέπει να διευκρινίζεται. Για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που χορηγούνται με καθετήρα, η δόση θα πρέπει να χορηγείται την ίδια περίπου ώρα κάθε μέρα και να ρυθμίζεται τουλάχιστον κάθε εβδομάδα ώστε να διατηρείται σταθερό επίπεδο δόσης ως προς το βάρος του σώματος. Όταν η συνδυαστική μελέτη χρησιμοποιείται ως προκαταρκτικό στάδιο μακροχρόνιας μελέτης ή πλήρους μελέτης τοξικότητας στην αναπαραγωγή, θα πρέπει να χρησιμοποιείται παρόμοιο σιτηρέσιο και στις δύο μελέτες.

Χρονοδιάγραμμα πειράματος

34. Η χορήγηση δόσεων και στα δύο φύλα θα πρέπει να ξεκινά δύο εβδομάδες πριν από το ζευγάρωμα, αφού έχουν εγκλιματιστεί για τουλάχιστον πέντε ημέρες και τα θηλυκά έχουν υποβληθεί σε διαδικασία διαλογής ως προς την κανονικότητα των κύκλων οίστρου (στη διάρκεια περιόδου δύο εβδομάδων πριν από την αγωγή). Η μελέτη θα πρέπει να προγραμματίζεται κατά τρόπον ώστε η αξιολόγηση των κύκλων οίστρου να ξεκινά σε σύντομο χρονικό διάστημα αφότου τα ζώα έχουν φθάσει σε πλήρη σεξουαλική ωρίμανση. Το εν λόγω διάστημα μπορεί να διαφέρει ελαφρώς για διαφορετικές φυλές επιμύων σε διαφορετικά εργαστήρια, π.χ. επίμυες Sprague Dawley ηλικίας 10 εβδομάδων, επίμυες Wistar ηλικίας περίπου 12 εβδομάδων. Οι μητέρες με απογόνους πρέπει να θανατώνονται τη 13η ημέρα μετά τον τοκετό, ή σύντομα μετά από αυτό. Για να αφεθούν οι μητέρες σε ολονύκτια νηστεία πριν από την αιμοληψία (εφόσον προτιμηθεί αυτή η επιλογή), δεν χρειάζεται να θανατωθούν οι μητέρες και τα νεογνά την ίδια ημέρα. Η ημέρα γέννησης (όταν έχει ολοκληρωθεί ο τοκετός) ορίζεται ως η ημέρα 0 μετά τον τοκετό. Τα θηλυκά που δεν εμφανίζουν ενδείξεις συνουσίας θανατώνονται 24-26 ημέρες μετά την τελευταία ημέρα της περιόδου ζευγαρώματος. Η χορήγηση συνεχίζεται και στα δύο φύλα κατά τη διάρκεια της περιόδου ζευγαρώματος. Στα αρσενικά η χορήγηση θα πρέπει να συνεχίζεται και μετά την περίοδο ζευγαρώματος, τουλάχιστον έως ότου ολοκληρωθεί η ελάχιστη συνολική περίοδος χορήγησης των 28 ημερών. Στη συνέχεια θανατώνονται ή, εναλλακτικά, διατηρούνται και συνεχίζουν να λαμβάνουν δόσεις με σκοπό την πιθανή πραγματοποίηση δεύτερου ζευγαρώματος, εάν χρειαστεί.

35. Η καθημερινή χορήγηση στα γονικά θηλυκά θα πρέπει να συνεχίζεται καθ' όλη τη διάρκεια της κύησης και τουλάχιστον μέχρι και τη 13η ημέρα μετά τον τοκετό ή την ημέρα πριν τη θανάτωση. Για μελέτες όπου η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται μέσω εισπνοής ή διά του δέρματος, η χορήγηση θα πρέπει να συνεχίζεται τουλάχιστον μέχρι και τη 19η ημέρα της κύησης, και θα πρέπει να ξεκινά εκ νέου το συντομότερο δυνατό, το αργότερο μέχρι την 4η ημέρα μετά τη γέννηση (ΜΓΗ).

▼M8

36. Τα ζώα που ανήκουν σε δορυφορική ομάδα για την οποία έχουν προγραμματιστεί επακόλουθες παρατηρήσεις, εφόσον προβλέπονται, δεν ζευγαρώνονται. Θα πρέπει να διατηρούνται για τουλάχιστον 14 ακόμη ημέρες μετά την πρώτη προγραμματισμένη θανάτωση των μητέρων, χωρίς αγωγή, προκειμένου να διαπιστωθεί τυχόν καθυστερημένη εκδήλωση, ή εμμονή, ή ανάρρωση από τοξικές επιδράσεις.

37. Στο παράρτημα 2 παρατίθεται διάγραμμα του χρονοδιαγράμματος διεξαγωγής των πειραμάτων.

Οιστρικοί κύκλοι

38. Οι οιστρικοί κύκλοι θα πρέπει να παρακολουθούνται πριν από την έναρξη της αγωγής προκειμένου να επιλέγονται για τη δοκιμή θηλυκά με κανονική κυκλικότητα (βλ. παράγραφο 27). Επίσης, θα πρέπει να παρακολουθούνται καθημερινά κολπικά επιχρίσματα, από την έναρξη της περιόδου αγωγής μέχρις ότου διαπιστωθούν ενδείξεις ζευγαρώματος. Εάν υπάρχει ανησυχία για οξείες αγχογόνες επιδράσεις που μπορεί να μεταβάλλουν τους οιστρικούς κύκλους με την έναρξη της χορήγησης, τα εργαστήρια μπορούν να υποβάλλουν τα ζώα σε έκθεση 2 εβδομάδων και, στη συνέχεια, να συλλέγουν καθημερινά κολπικά επιχρίσματα προκειμένου να παρακολουθούν τον οιστρικό κύκλο για τουλάχιστον δύο εβδομάδες κατά την περίοδο πριν από το ζευγάρωμα, και να συνεχίζουν την παρακολούθηση καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου ζευγαρώματος μέχρι να ανιχνευθούν ενδείξεις ζευγαρώματος. Κατά τη λήψη κολπικών/τραχηλικών κυττάρων, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγεται η διαταραχή των βλεννογόνων που μπορεί να επαγάγει ψευδοκύηση (8) (9).

Διαδικασία ζευγαρώματος

39. Κανονικά, στην παρούσα μελέτη θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ζευγαρώματα 1:1 (ένα αρσενικό προς ένα θηλυκό). Μπορεί να υπάρξουν εξαιρέσεις, στην περίπτωση περιστασιακών θανάτων αρσενικών. Το θηλυκό θα πρέπει να τοποθετείται μαζί με το ίδιο αρσενικό μέχρις ότου παρατηρηθούν ενδείξεις συνουσίας ή μέχρι να παρέλθει διάστημα δύο εβδομάδων. Κάθε πρωί, τα θηλυκά πρέπει να εξετάζονται για την παρουσία σπέρματος ή κολπικού βύσματος. Ως ημέρα 0 της κύησης ορίζεται η ημέρα κατά την οποία επιβεβαιώνονται οι ενδείξεις ζευγαρώματος (ανιχνεύεται κολπικό βύσμα ή σπέρμα). Σε περίπτωση που το ζευγάρωμα αποδειχθεί ανεπιτυχές, πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο νέου ζευγαρώματος των θηλυκών με ελεγμένα αρσενικά της ίδιας ομάδας.

Μέγεθος γέννας

40. Την 4η ημέρα μετά τη γέννηση, το μέγεθος κάθε γέννας μπορεί να ρυθμίζεται διά της απομάκρυνσης των πλεοναζόντων νεογνών με τυχαία επιλογή, ούτως ώστε να παραμένουν, όπου είναι εφικτό, τέσσερα ή πέντε νεογνά ανά φύλο ανά γέννα, ανάλογα με το σύνηθες μέγεθος γέννας στη φυλή των επιμύων που χρησιμοποιείται. Από δύο από τα πλεονάζοντα νεογνά θα πρέπει να συλλέγονται δείγματα αίματος, να συγκεντρώνονται και να χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των επιπέδων της Τ4 στον ορό. Δεν ενδείκνυται η επιλεκτική απομάκρυνση νεογνών, π.χ. βάσει του σωματικού βάρους ή της πρωκτογεννητικής απόστασης (AGD). Όταν ο αριθμός των αρσενικών ή θηλυκών νεογνών δεν φθάνει τα τέσσερα ή πέντε νεογνά ανά φύλο ανά γέννα, είναι αποδεκτή η μερική ρύθμιση (π.χ. έξι αρσενικά και τέσσερα θηλυκά). Δεν απομακρύνεται κανένα νεογνό όταν το μέγεθος της γέννας είναι χαμηλότερο του στόχου (8 ή 10 νεογνά/γέννα). Εάν υπάρχει ένα μόνο νεογνό πάνω από τον στόχο απομάκρυνσης, θα απομακρύνεται μόνο ένα νεογνό, το οποίο θα χρησιμοποιείται για συλλογή αίματος με σκοπό την πιθανή διενέργεια αξιολογήσεων της Τ4.

41. Εάν δεν ρυθμιστεί το μέγεθος της γέννας, την 4η ημέρα μετά τη γέννηση θανατώνονται δύο νεογνά ανά γέννα και λαμβάνονται δείγματα αίματος για μέτρηση των συγκεντρώσεων θυρεοειδικών ορμονών στον ορό. Ει δυνατόν, τα δύο νεογνά ανά γέννα θα πρέπει να είναι θηλυκά προκειμένου να διατηρηθούν τα αρσενικά νεογνά για αξιολογήσεις διατηρούμενων θηλών, εκτός εάν η απομάκρυνση των δύο νεογνών θα είχε ως αποτέλεσμα να μην υπάρχουν άλλα θηλυκά προς αξιολόγηση κατά τη λήξη της μελέτης. Δεν απομακρύνεται κανένα νεογνό εάν έτσι το μέγεθος της γέννας θα μειωνόταν κάτω από τα 8 έως 10 νεογνά/γέννα (ανάλογα με το κανονικό μέγεθος γέννας στη χρησιμοποιούμενη φυλή επιμύων). Εάν υπάρχει ένα μόνο νεογνό πάνω από το κανονικό μέγεθος γέννας, θα απομακρύνεται μόνο ένα νεογνό, το οποίο θα χρησιμοποιείται για συλλογή αίματος με σκοπό την πιθανή διενέργεια αξιολογήσεων της Τ4.

▼M8

Παρατηρήσεις

42. Θα πρέπει να διεξάγονται γενικές κλινικές παρατηρήσεις τουλάχιστον μια φορά ημερησίως, κατά προτίμηση την ίδια ώρα κάθε ημέρα και λαμβανομένου υπόψη του χρόνου κορύφωσης των αναμενόμενων επιδράσεων μετά τη χορήγηση της δόσης. Η κατάσταση της υγείας των ζώων θα πρέπει να καταγράφεται. Όλα τα ζώα εξετάζονται τουλάχιστον δύο φορές την ημέρα για τη διαπίστωση νοσηρότητας και θνησιμότητας.

43. Όλα τα γονικά ζώα πρέπει να υποβάλλονται σε λεπτομερή κλινική παρατήρηση μία φορά πριν από την πρώτη έκθεση (προκειμένου να γίνουν συγκρίσεις της κατάστασης κάθε ζώου) και στη συνέχεια τουλάχιστον μια φορά την εβδομάδα. Οι παρατηρήσεις αυτές πρέπει να διενεργούνται κατά προτίμηση την ίδια ώρα κάθε ημέρα, έξω από τους κλωβούς σε έναν τυποποιημένο χώρο. Οι παρατηρήσεις πρέπει να καταγράφονται επιμελώς, κατά προτίμηση με χρήση συστημάτων βαθμολόγησης, τα οποία προσδιορίζονται διεξοδικά από το εργαστήριο που διεξάγει τις δοκιμές. Καταβάλλεται προσπάθεια ώστε οι συνθήκες της δοκιμής να παρουσιάζουν τις ελάχιστες δυνατές διακυμάνσεις και οι παρατηρήσεις να διεξάγονται κατά προτίμηση από άτομα που δεν γνωρίζουν την αγωγή. Σημεία που θα πρέπει να καταγράφονται είναι, μεταξύ άλλων, μεταβολές στο δέρμα, το τρίχωμα, τους οφθαλμούς και τους βλεννογόνους, εκκρίσεις και απεκκρίσεις, καθώς και δραστηριότητα του αυτόνομου νευρικού συστήματος (π.χ. δακρύρροια, ανόρθωση τριχών, μεταβολή του μεγέθους της κόρης του οφθαλμού, ασυνήθης ρυθμός αναπνοής). Καταγράφονται επίσης μεταβολές στο βάδισμα, στη στάση και στην αντίδραση κατά τη μεταχείριση, καθώς και η εμφάνιση κλονικών ή τονικών κινήσεων, στερεότυπων κινήσεων (όπως υπερβολική περιποίηση του τριχώματος, συνεχές κυκλικό βάδισμα), δυσχερούς ή παρατεταμένου τοκετού ή περίεργης συμπεριφοράς (όπως αυτοτραυματισμός, βάδισμα προς τα πίσω) (10).

44. Μία φορά στη διάρκεια της μελέτης θα πρέπει να αξιολογείται η αισθητηριακή ανταπόκριση σε διαφορετικών ειδών ερεθίσματα (π.χ. ακουστικά, οπτικά και ιδιοδεκτικά ερεθίσματα) (8) (9) (11), η δύναμη λαβής (12) και η κινητικότητα (13) σε πέντε αρσενικά και πέντε θηλυκά που επιλέγονται τυχαία από κάθε ομάδα. Λεπτομερέστερη περιγραφή των διαδικασιών που μπορούν να ακολουθηθούν δίνονται στις αντίστοιχες βιβλιογραφικές παραπομπές. Εναλλακτικές διαδικασίες, διαφορετικές από τις περιγραφόμενες στις βιβλιογραφικές παραπομπές, μπορούν να χρησιμοποιηθούν επίσης. Στα αρσενικά, οι εν λόγω παρατηρήσεις των λειτουργιών θα πρέπει να γίνονται προς το τέλος της περιόδου χορήγησης των δόσεών τους, λίγο πριν την προγραμματισμένη θανάτωση αλλά πριν από τη δειγματοληψία αίματος για αιματολογικές εξετάσεις ή αναλύσεις κλινικής χημείας (βλ. παραγράφους 53-56, περιλαμβανομένης της υποσημείωσης 1). Στη διάρκεια αυτών των δοκιμών, τα θηλυκά θα πρέπει να βρίσκονται σε κατάσταση ανάλογη από άποψη φυσιολογίας και θα πρέπει, κατά προτίμηση, να υποβάλλονται σε δοκιμή τουλάχιστον εφάπαξ την τελευταία εβδομάδα της γαλουχίας (π.χ. LD 6-13), λίγο πριν από την προγραμματισμένη θανάτωση. Στον βαθμό που είναι εφικτό, θα πρέπει να ελαχιστοποιείται το χρονικό διάστημα χωρισμού των νεογνών από τις μητέρες.

45. Οι παρατηρήσεις των λειτουργιών που γίνονται εφάπαξ προς το τέλος της μελέτης μπορούν να παραλειφθούν όταν η μελέτη διεξάγεται ως προκαταρκτικό στάδιο επακόλουθης υποχρόνιας (90 ημερών) ή μακροχρόνιας μελέτης. Στην περίπτωση αυτή, οι παρατηρήσεις των λειτουργιών θα πρέπει να περιλαμβάνονται στην επακόλουθη αυτή μελέτη. Από την άλλη πλευρά όμως, η ύπαρξη δεδομένων για τις λειτουργίες από την παρούσα μελέτη επαναλαμβανόμενης δόσης είναι δυνατόν να διευκολύνει την επιλογή επίπεδων δόσεων για μια επακόλουθη υποχρόνια ή μακροχρόνια μελέτη.

46. Κατ' εξαίρεση, οι παρατηρήσεις των λειτουργιών μπορούν επίσης να παραλείπονται όταν οι ομάδες εμφανίζουν εκδηλώσεις τοξικότητας σε βαθμό που παρεμποδίζει σημαντικά την εκτέλεση της δοκιμής λειτουργιών.

47. Η διάρκεια της κύησης πρέπει να καταγράφεται και υπολογίζεται από την ημέρα 0 της εγκυμοσύνης. Κάθε γέννα πρέπει να εξετάζεται το συντομότερο δυνατό μετά τον τοκετό για να προσδιορίζεται ο αριθμός και το φύλο των νεογνών, τα θνησιγενή νεογνά, τα ζώντα νεογνά, τα καχεκτικά νεογνά (νεογνά αρκετά μικρότερου μεγέθους από τα αντίστοιχα νεογνά μάρτυρες) και η παρουσία μακροσκοπικώς ορατών ανωμαλιών.

▼M8

48. Τα ζώντα νεογνά πρέπει να καταμετρώνται και να προσδιορίζεται το φύλο τους, ενώ οι ομάδες των νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα πρέπει να ζυγίζονται εντός 24 ωρών από τον τοκετό (ημέρα 0 ή 1 μετά τον τοκετό) και τουλάχιστον την 4η και τη 13η ημέρα μετά τον τοκετό. Πέραν των παρατηρήσεων επί των γονικών ζώων (βλ. παραγράφους 43 και 44), θα πρέπει να καταγράφεται τυχόν μη φυσιολογική συμπεριφορά των απογόνων.

49. Η πρωκτογεννητική απόσταση κάθε νεογνού θα πρέπει να μετράται την ίδια ημέρα μεταγεννητικά, μεταξύ της μεταγεννητικής ημέρας (ΜΓΗ) 0 και 4. Θα πρέπει να προσδιορίζεται το σωματικό βάρος του νεογνού την ημέρα μέτρησης της πρωκτογεννητικής απόστασης, η οποία θα πρέπει να κανονικοποιείται σε ένα μέτρο του μεγέθους του νεογνού, κατά προτίμηση στην κυβική ρίζα του σωματικού βάρους (14). Θα πρέπει να καταμετράται ο αριθμός των θηλών/άλων στα αρσενικά νεογνά τη 12η ή 13η ΜΓΗ, όπως συνιστάται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 151 του ΟΟΣΑ (15).

Σωματικό βάρος και κατανάλωση τροφής/νερού

50. Τα αρσενικά και τα θηλυκά θα πρέπει να ζυγίζονται κατά την πρώτη ημέρα της χορήγησης και, στη συνέχεια, τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα, καθώς και κατά τη λήξη της μελέτης. Στη διάρκεια της κύησης, τα θηλυκά πρέπει να ζυγίζονται τις ημέρες 0, 7, 14 και 20, και εντός 24 ωρών από τον τοκετό (ημέρα 0 ή 1η ημέρα μετά τον τοκετό) και τουλάχιστον την 4η και 13η ημέρα μετά τον τοκετό. Οι παρατηρήσεις αυτές θα πρέπει να αναφέρονται ξεχωριστά για κάθε ενήλικο ζώο.

51. Στη διάρκεια της περιόδου πριν από το ζευγάρωμα, της εγκυμοσύνης και της γαλουχίας, η κατανάλωση τροφής πρέπει να μετράται τουλάχιστον μια φορά την εβδομάδα. Η μέτρηση της κατανάλωσης τροφής κατά το ζευγάρωμα είναι προαιρετική. Η κατανάλωση νερού στη διάρκεια των εν λόγω περιόδων θα πρέπει επίσης να μετράται, όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται μέσω του νερού.

Αιματολογικές εξετάσεις

52. Μια φορά στη διάρκεια της μελέτης, θα πρέπει να πραγματοποιούνται οι ακόλουθες αιματολογικές εξετάσεις σε πέντε αρσενικά και πέντε θηλυκά που επιλέγονται τυχαία από κάθε ομάδα: προσδιορισμός αιματοκρίτη, συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης, αριθμού ερυθρών αιμοσφαιρίων, δικτυοερυθροκυττάρων, αριθμού λευκών αιμοσφαιρίων και λευκοκυτταρικού τύπου, αριθμού αιμοπεταλίων, χρόνου πήξεως και πηκτικότητας του αίματος. Εάν υπάρχουν υπόνοιες ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία ή οι θεωρητικοί μεταβολίτες της έχουν οξειδωτικές ιδιότητες, θα πρέπει να προσδιορίζονται επίσης, μεταξύ άλλων, η συγκέντρωση μεθαιμοσφαιρίνης και τα σωμάτια Heinz.

53. Τα δείγματα αίματος θα πρέπει να λαμβάνονται από καθορισμένο σημείο. Κατά τη δειγματοληψία, τα θηλυκά θα πρέπει να βρίσκονται σε ανάλογη από φυσιολογικής απόψεως κατάσταση. Για την αποφυγή των πρακτικών δυσκολιών που συνδέονται με τη μεταβλητότητα της χρονικής στιγμής έναρξης της κύησης, η αιμοληψία από τα θηλυκά μπορεί να πραγματοποιείται στο τέλος της περιόδου πριν από το ζευγάρωμα ως εναλλακτική λύση αντί της αιμοληψίας αμέσως πριν ή κατά την ευθανασία των ζώων. Τα δείγματα αίματος των αρσενικών θα πρέπει, κατά προτίμηση, να λαμβάνονται αμέσως πριν ή κατά την ευθανασία των ζώων. Εναλλακτικά, η αιμοληψία στα αρσενικά μπορεί να πραγματοποιείται στο τέλος της περιόδου πριν από το ζευγάρωμα, όταν έχει επιλεγεί το συγκεκριμένο χρονικό σημείο για τα θηλυκά.

54. Τα δείγματα αίματος θα πρέπει να αποθηκεύονται υπό κατάλληλες συνθήκες.

Εξετάσεις κλινικής βιοχημείας

55. Θα πρέπει να διενεργούνται εξετάσεις κλινικής βιοχημείας για τη διερεύνηση σοβαρών τοξικών επιδράσεων στους ιστούς και, ειδικότερα, επιδράσεων στους νεφρούς και το ήπαρ, σε δείγματα αίματος που λαμβάνονται από τα

▼M8

επιλεγμένα πέντε αρσενικά και πέντε θηλυκά κάθε ομάδας. Συνιστάται να παραμένουν νηστικά τα ζώα τη νύχτα που προηγείται της αιμοληψίας ([1]). Οι εξετάσεις στο πλάσμα ή στον ορό του αίματος θα πρέπει να περιλαμβάνουν προσδιορισμό νατρίου, καλίου, γλυκόζης, ολικής χοληστερόλης, ουρίας, κρεατινίνης, ολικής πρωτεΐνης και αλβουμίνης, δύο τουλάχιστον ενζύμων ενδεικτικών ηπατοκυτταρικής επίδρασης (όπως της αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης, της αμινοτρασφεράσης του ασπαρτικού και της αφυδρογονάσης της σορβιτόλης) και των χολικών οξέων. Η μέτρηση και άλλων ενζύμων (ηπατικής ή άλλης προέλευσης) και της χολερυθρίνης είναι δυνατόν να παρέχει χρήσιμες πληροφορίες σε ορισμένες περιπτώσεις.

56. Λαμβάνονται δείγματα αίματος από καθορισμένο σημείο με βάση το ακόλουθο χρονοδιάγραμμα:

— από τουλάχιστον δύο νεογνά ανά γέννα την 4η ημέρα μετά τη γέννηση, εάν το επιτρέπει ο αριθμός των νεογνών (βλ. παραγράφους 40-41)

— από όλες τις μητέρες και από τουλάχιστον δύο νεογνά ανά γέννα κατά τη λήξη της μελέτης τη 13η ημέρα, και

— από όλα τα ενήλικα αρσενικά κατά τη λήξη της μελέτης.

Όλα τα δείγματα αίματος αποθηκεύονται υπό κατάλληλες συνθήκες. Δείγματα αίματος νεογνών 13ης ΜΓΗ και των ενήλικων αρσενικών αξιολογούνται ως προς τα επίπεδα θυρεοειδικών ορμονών (Τ4). Ανάλογα με την περίπτωση, διενεργείται περαιτέρω αξιολόγηση της Τ4 σε δείγματα αίματος από τις μητέρες και νεογνά 4ης ΜΓΗ. Ανάλογα με την περίπτωση, μπορούν να μετρηθούν προαιρετικά και άλλες ορμόνες. Το αίμα νεογνών μπορεί να συγκεντρώνεται ανά γέννα για τη διενέργεια αναλύσεων θυρεοειδικών ορμονών. Οι θυρεοειδικές ορμόνες (Τ4 και TSH) θα πρέπει, κατά προτίμηση να μετρώνται ως «σύνολο».

57. Προαιρετικά, κατά την τελευταία εβδομάδα της μελέτης μπορούν να διεξαχθούν οι ακόλουθες αναλύσεις ούρων σε πέντε τυχαία επιλεγμένα αρσενικά κάθε ομάδας χρησιμοποιώντας ούρα συλλεχθέντα σε καθορισμένο χρόνο: προσδιορισμός όψης, όγκου, ωσμωτικότητας ή ειδικού βάρους, pH, πρωτεϊνών, γλυκόζης και αίματος/αιμοκυττάρων.

58. Επιπλέον, εξετάζεται κατά πόσο είναι σκόπιμο να μελετηθούν δείκτες του ορού για τυχόν γενικές ιστικές βλάβες. Άλλοι προσδιορισμοί που απαιτούνται όταν οι γνωστές ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ενδέχεται ή αναμένεται να επηρεάσουν τα σχετικά μεταβολικά χαρακτηριστικά αφορούν το ασβέστιο, τα φωσφορικά, τα τριγλυκερίδια και τη γλυκόζη μετά από νηστεία, ειδικές ορμόνες, τη μεθαιμοσφαιρίνη και τη χολινεστεράση. Τα εν λόγω χαρακτηριστικά πρέπει να προσδιορίζονται κατά περίπτωση.

59. Οι ακόλουθοι παράγοντες ενδέχεται να επηρεάζουν τη μεταβλητότητα και τις απόλυτες τιμές συγκέντρωσης των προσδιοριζόμενων ορμονών:

— ο χρόνος θανάτωσης, λόγω της ημερήσιας διακύμανσης των συγκεντρώσεων ορμονών,

([1]) Για πολλές μετρήσεις στον ορό και στο πλάσμα, ιδίως για τη γλυκόζη, προτιμάται η ολονύκτια νηστεία. Ο κυριότερος λόγος γι' αυτό είναι ότι η αυξημένη μεταβλητότητα των τιμών, αναπόφευκτη αν τα ζώα δεν υποβληθούν σε νηστεία, θα τείνει να καλύψει λεπτότερες επιδράσεις και να δυσχεράνει την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Από την άλλη πλευρά, εντούτοις, η ολονύκτια νηστεία μπορεί να επηρεάσει τον γενικό μεταβολισμό των (έγκυων) ζώων, να διαταράξει τη γαλουχία και τη συμπεριφορά κατά τη γαλουχία, και, ιδίως στο πλαίσιο μελετών διατροφής, μπορεί να διαταράξει την καθημερινή έκθεση στην υπό δοκιμή χημική ουσία. Σε περίπτωση που επιλέγεται η λύση της ολονύκτιας νηστείας, οι εξετάσεις κλινικής βιοχημείας θα πρέπει να διεξάγονται μετά τις παρατηρήσεις των λειτουργιών της 4ης εβδομάδας της μελέτης στα αρσενικά. Οι μητέρες θα πρέπει να διατηρούνται για μία ακόμη ημέρα μετά την απομάκρυνση των νεογνών, για παράδειγμα, τη 13η ΜΓΗ. Οι μητέρες θα πρέπει να υποβάλλονται σε ολονύκτια νηστεία από τη 13η-14η ημέρα της γαλουχίας και για τις εξετάσεις παραμέτρων κλινικής χημείας θα πρέπει να χρησιμοποιείται δείγμα αίματος από την ευθανασία.

▼M8

— η μέθοδος θανάτωσης, και ως εκ τούτου πρέπει να αποφεύγεται η περιττή καταπόνηση των ζώων, που μπορεί να επηρεάσει τις συγκεντρώσεις των ορμονών,

— οι σειρές αντιδραστηρίων (κιτ) ορμονικού προσδιορισμού που ενδέχεται να διαφέρουν ως προς τις πρότυπες καμπύλες τους.

60. Τα δείγματα πλάσματος που προορίζονται ειδικά για ορμονικό προσδιορισμό θα πρέπει να λαμβάνονται σε παραπλήσια ώρα της ημέρας. Οι αριθμητικές τιμές που προκύπτουν από ανάλυση των συγκεντρώσεων ορμονών διαφέρουν ανάλογα με τα διάφορα κιτ δοκιμασιών που είναι διαθέσιμα στο εμπόριο.

61. Εάν τα ιστορικά δεδομένα αναφοράς είναι ανεπαρκή, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο προσδιορισμού των μεταβλητών αιματολογίας και κλινικής βιοχημείας πριν από την έναρξη της χορήγησης των δόσεων ή, κατά προτίμηση, σε μια ομάδα ζώων που δεν περιλαμβάνεται στις πειραματικές ομάδες. Για τα θηλυκά, τα δεδομένα πρέπει να αφορούν γαλουχούντα ζώα.

ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΑ

Νεκροψία-νεκροτομή

62. Όλα τα ενήλικα ζώα της μελέτης πρέπει να υποβάλλονται σε πλήρη, λεπτομερή νεκροψία-νεκροτομή η οποία περιλαμβάνει προσεκτική εξέταση της εξωτερικής επιφάνειας του σώματος, όλων των στομίων, της κρανιακής, θωρακικής και περιτοναϊκής κοιλότητας και του περιεχομένου τους. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίδεται στα όργανα του αναπαραγωγικού συστήματος. Ο αριθμός των σημείων εμφύτευσης θα πρέπει να καταγράφεται. Θα πρέπει να εξετάζονται κολπικά επιχρίσματα την ημέρα της νεκροψίας για να προσδιοριστεί το στάδιο του οιστρικού κύκλου και να καταστεί εφικτή η συσχέτιση με την ιστοπαθολογία των αναπαραγωγικών οργάνων των θηλυκών.

63. Οι όρχεις και επιδιδυμίδες, ο προστάτης και οι σπερματοδόχοι κύστεις με τους πηκτοειδείς αδένες στο σύνολό τους, όλων των αρσενικών ενήλικων ζώων θα πρέπει να απαλλάσσονται από τυχόν προσφυόμενους ιστούς, ανάλογα με την περίπτωση, και να ζυγίζονται νωπά όσο το δυνατόν συντομότερα μετά την ανατομή ώστε να αποφεύγεται η ξήρανσή τους. Επιπλέον, μπορούν να μετρώνται προαιρετικά τα βάρη οργάνων όπως το σύμπλεγμα ανελκτήρων του πρωκτού και βολβοσηραγγωδών μυών, οι βολβοουρηθραίοι αδένες (αδένες του Cowper) και η βάλανος του πέους στα αρσενικά και ωοθήκες σε ζεύγη (βάρος σε νωπή κατάσταση) και η μήτρα (περιλαμβανομένου του τραχήλου) στα θηλυκά· σε περίπτωση που περιλαμβάνονται, τα εν λόγω βάρη θα πρέπει να μετρώνται το συντομότερο δυνατό μετά την ανατομή. Οι ωοθήκες, οι όρχεις, οι επιδιδυμίδες, άλλα όργανα του αναπαραγωγικού συστήματος, και όλα τα όργανα που εμφανίζουν μακροσκοπικές αλλοιώσεις, από όλα τα ενήλικα ζώα, θα πρέπει να διατηρούνται.

64. Οι θυρεοειδείς αδένες από όλα τα ενήλικα αρσενικά και θηλυκά και από ένα αρσενικό και θηλυκό νεογνό 13ης ΜΓΗ από κάθε γέννα θα πρέπει να διατηρούνται σε μέσο μονιμοποίησης κατάλληλο για το είδος ιστοπαθολογικής εξέτασης στο οποίο ενδεχομένως να υποβληθούν στο μέλλον. Μετά τη μονιμοποίηση μπορεί να προσδιορίζεται το βάρος του θυρεοειδούς. Ο καθαρισμός θα πρέπει και στην περίπτωση αυτή να πραγματοποιείται με μεγάλη προσοχή και μόνο μετά τη μονιμοποίηση, ώστε να μην προκαλείται βλάβη στους ιστούς. Οι βλάβες των ιστών μπορούν να βλάψουν την εγκυρότητα της ιστοπαθολογικής ανάλυσης. Τα δείγματα αίματος πρέπει να λαμβάνονται από καθορισμένο σημείο ακριβώς πριν από τη θανάτωση των ζώων ή κατά τη διάρκειά της και να διατηρούνται υπό κατάλληλες συνθήκες (βλ. παράγραφο 56).

▼M8

65. Επιπλέον, για τουλάχιστον πέντε ενήλικα αρσενικά και θηλυκά, τυχαία επιλεγμένα από κάθε ομάδα (εκτός όσων είναι ετοιμοθάνατα και/ή θανατώνονται με ευθανασία πριν από τη λήξη της μελέτης), το ήπαρ, οι νεφροί, τα επινεφρίδια, ο θύμος αδένας, ο σπλήνας, ο εγκέφαλος και η καρδιά θα πρέπει να απαλλάσσονται από τυχόν προσφυόμενους ιστούς, ανάλογα με την περίπτωση, και να ζυγίζονται νωπά όσο το δυνατόν συντομότερα μετά την ανατομή ώστε να αποφευχθεί η ξήρανσή τους. Οι ακόλουθοι ιστοί θα πρέπει να διατηρούνται σε μονιμοποιητικό μέσο κατάλληλο και για τον τύπο ιστού και για το είδος ιστοπαθολογικής εξέτασης στο οποίο προβλέπεται να υποβληθούν: κάθε ιστός που εμφανίζει μακροσκοπικές αλλοιώσεις, εγκέφαλος (αντιπροσωπευτικές περιοχές του κυρίου τμήματος, της παρεγκεφαλίδας και της γέφυρας), νωτιαίος μυελός, οφθαλμοί, στόμαχος, λεπτό και παχύ έντερο (συμπεριλαμβανομένων παϋέριων πλακών), ήπαρ, νεφροί,επινεφρίδια, σπλήνας, καρδιά, θύμος αδένας, τραχεία και πνεύμονες (διατηρημένοι με εμφύσηση μονιμοποιητικού υλικού, ακολουθούμενη από εμβάπτιση), γεννητικοί αδένες (όρχεις και ωοθήκες), άλλα όργανα του γεννητικού συστήματος (μήτρα και τράχηλος της μήτρας, επιδιδυμίδες, προστάτης και σπερματοδόχοι κύστεις με τους πηκτοειδείς αδένες), κολπική κοιλότητα, ουροδόχος κύστη, λεμφαδένες [πέραν του εγγύτερου παροχετεύοντα αδένα, θα πρέπει να λαμβάνεται και άλλος ένας λεμφαδένας ανάλογα με την πείρα του εργαστηρίου (16)], περιφερειακό νεύρο (ισχιακό ή κνημιαίο) κατά προτίμηση από θέση πολύ κοντά στον μυ, σκελετικός μυς και οστό με μυελό των οστών (τομή ή, εναλλακτικά, πρόσφατο παρασκεύασμα αναρροφηθέντος μυελού). Συνιστάται να μονιμοποιούνται οι όρχεις με εμβάπτιση σε μονιμοποιητικό υλικό Bouin ή τροποποιημένο μονιμοποιητικό υλικό Davidson (16) (17) (18)· για τους συγκεκριμένους ιστούς δεν συνιστάται μονιμοποίηση σε φορμόλη. Ο ινώδης χιτώνας (tunica albuginea) μπορεί να διατρυπάται με βελόνα, με ήπιες κινήσεις, σε μικρό βάθος και στα δύο άκρα ώστε να διευκολύνεται η διείσδυση του μονιμοποιητικού υλικού. Κλινικά και άλλα ευρήματα ενδεχομένως υποδεικνύουν ότι θα πρέπει να εξεταστούν και άλλοι πρόσθετοι ιστοί. Κάθε όργανο που, λόγω των γνωστών ιδιοτήτων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, θεωρείται πιθανό να αποτελεί όργανο-στόχο, πρέπει επίσης να διατηρείται.

66. Από τους ακόλουθους ιστούς είναι δυνατόν να ληφθούν πολύτιμες ενδείξεις για ενδοκρινικές επιδράσεις: γεννητικοί αδένες (όρχεις και ωοθήκες), άλλα όργανα του γεννητικού συστήματος (μήτρα και τράχηλος της μήτρας, επιδιδυμίδες, σπερματοδόχοι κύστεις με τους πηκτοειδείς αδένες, ραχιαιοπλάγιος και κοιλιακός λοβός προστάτη), κολπική κοιλότητα, υπόφυση, αρσενικός μαστικός αδένας και επινεφρίδιος αδένας. Δεν έχουν τεκμηριωθεί επαρκώς οι μεταβολές στους αρσενικούς μαστικούς αδένες, αλλά η παράμετρος αυτή ενδέχεται να είναι πολύ ευαίσθητη σε ουσίες με οιστρογόνο δράση. Η παρατήρηση οργάνων/ιστών που δεν απαριθμούνται στην παράγραφο 65 είναι προαιρετική.

67. Τα νεκρά νεογνά και τα νεογνά που θανατώνονται τη 13η ημέρα μετά τον τοκετό, ή σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά από αυτήν, θα πρέπει, τουλάχιστον, να εξετάζονται προσεκτικά εξωτερικά για μακροσκοπικές ανωμαλίες. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίνεται στα εξωτερικά όργανα του αναπαραγωγικού συστήματος, τα οποία θα πρέπει να εξετάζονται για τυχόν ύπαρξη σημείων ανώμαλης ανάπτυξης.

Ιστοπαθολογία

68. Θα πρέπει να διεξάγονται πλήρεις ιστοπαθολογικές εξετάσεις στα διατηρημένα όργανα και ιστούς των επιλεγμένων ζώων στις ομάδες μαρτύρων και υψηλής δόσης (με ιδιαίτερη έμφαση στα στάδια της σπερματογένεσης στους γεννητικούς αδένες των αρσενικών και στην ιστοπαθολογία της δομής των διάμεσων κυττάρων των όρχεων). Εφόσον απαιτείται, μπορεί να εξετάζεται και ο θυρεοειδής αδένας νεογνών και των υπόλοιπων ενήλικων ζώων. Οι εξετάσεις θα πρέπει να γίνονται και στα ζώα των ομάδων άλλων δόσεων εάν στην ομάδα υψηλής δόσης παρατηρηθούν μεταβολές σχετιζόμενες με την αγωγή. Το έγγραφο καθοδήγησης σχετικά με την ιστοπαθολογία (10) παρέχει επιπρόσθετες πληροφορίες για την ανατομή, τη μονιμοποίηση, την τομή και την ιστολογική ανάλυση των ενδοκρινικών ιστών.

69. Θα πρέπει να εξετάζονται όλες οι μακροσκοπικές βλάβες. Για λόγους συμβολής στην αποσαφήνιση των NOAEL, θα πρέπει να εξετάζονται όργανα-στόχοι σε άλλες ομάδες δόσης, ιδίως σε ομάδες που θεωρείται ότι παρουσιάζουν NOAEL.

▼M8

70. Όταν χρησιμοποιείται δορυφορική ομάδα, εκτελείται ιστοπαθολογική εξέταση στους ιστούς και στα όργανα τα οποία έχει διαπιστωθεί ότι εμφανίζουν επιδράσεις στις ομάδες που υποβάλλονται σε αγωγή.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Δεδομένα

71. Πρέπει να παρέχονται δεδομένα για κάθε ζώο ξεχωριστά. Επιπλέον, όλα τα δεδομένα θα συνοψίζονται σε μορφή πινάκων, όπου θα δίνεται για κάθε ομάδα δοκιμής ο αριθμός των ζώων στην αρχή της δοκιμής, ο αριθμός των ζώων που βρέθηκαν νεκρά κατά τη διάρκεια της δοκιμής ή θανατώθηκαν με ευθανασία, η χρονική στιγμή κάθε θανάτου ή θανάτωσης, ο αριθμός των γόνιμων ζώων, ο αριθμός των έγκυων θηλυκών, ο αριθμός των ζώων που εμφάνισαν σημεία τοξικότητας, μια περιγραφή των παρατηρηθέντων σημείων τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένης της χρονικής στιγμής εμφάνισης, της διάρκειας και της σοβαρότητας κάθε τοξικής δράσης, οι τύποι των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων και κάθε σχετικό στοιχείο για τις γέννες. Στο προσάρτημα 3 παρέχεται ένας μορφότυπος συνοπτικής αναφοράς σε μορφή πίνακα που έχει αποδεχθεί ιδιαίτερα χρήσιμος για την αξιολόγηση των επιδράσεων στην αναπαραγωγή/ανάπτυξη.

72. Όταν είναι δυνατόν, τα αριθμητικά αποτελέσματα αξιολογούνται με τη βοήθεια κατάλληλης στατιστικής μεθόδου γενικής αποδοχής. Με τη σύγκριση των επιδράσεων σε ένα εύρος δόσεων αποφεύγεται η χρήση πολλών ελέγχων t. Οι στατιστικές μέθοδοι πρέπει να επιλέγονται κατά τον σχεδιασμό της μελέτης. Η στατιστική ανάλυση πρωκτογεννητικής απόστασης και διατηρούμενων θηλών θα πρέπει να βασίζεται σε ατομικά στοιχεία για κάθε νεογνό, και θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι επιδράσεις στη γέννα. Όπου αρμόζει, μονάδα της ανάλυσης θα πρέπει να είναι η γέννα από την ίδια μητέρα. Η στατιστική ανάλυση σωματικού βάρους των νεογνών θα πρέπει να βασίζεται σε ατομικά στοιχεία για κάθε νεογνό, και θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το πλήθος νεογνών της γέννας. Λόγω του περιορισμένου μεγέθους της μελέτης, οι στατιστικές αναλύσεις υπό μορφή ελέγχων σημαντικότητας είναι περιορισμένης αξίας για πολλές παραμέτρους, ιδίως τις παραμέτρους σχετικά με την αναπαραγωγή. Ορισμένες από τις πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους, ιδίως παραμετρικοί έλεγχοι για μέτρα κεντρικής τάσης, είναι ακατάλληλες. Σε περίπτωση χρήσης στατιστικών αναλύσεων, η επιλεγόμενη μέθοδος θα πρέπει να είναι κατάλληλη για την κατανομή της υπό εξέταση μεταβλητής, και να επιλέγεται πριν από την έναρξη της μελέτης.

Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

73. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης τοξικότητας θα πρέπει να αξιολογούνται ως προς τις παρατηρούμενες επιδράσεις, τα ευρήματα της νεκροψίας-νεκροτομής και τα μικροσκοπικά ευρήματα. Στην αξιολόγηση περιλαμβάνεται η σχέση μεταξύ της δόσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και της παρουσίας ή απουσίας, της συχνότητας εμφάνισης και της σοβαρότητας των ανωμαλιών, συμπεριλαμβανομένων των μακροσκοπικών αλλοιώσεων, των ταυτοποιημένων οργάνων στόχων, της στειρότητας, των κλινικών ανωμαλιών, των επιδράσεων στις επιδόσεις στην αναπαραγωγή και στις γέννες, των μεταβολών στα σωματικά βάρη, των επιδράσεων στη θνησιμότητα και κάθε άλλου τοξικού φαινομένου.

74. Λόγω της σύντομης περιόδου αγωγής των αρσενικών, κατά την αξιολόγηση των επιδράσεων στην αναπαραγωγή των αρσενικών, μαζί με τα δεδομένα για τη γονιμότητα θα πρέπει να εξετάζεται και η ιστοπαθολογία των όρχεων και των επιδιδυμίδων. Επικουρικά, χρήσιμη στην ερμηνεία της μελέτης μπορεί να είναι και η χρήση ιστορικών δεδομένων μαρτύρων (π.χ. σχετικά με το μέγεθος της γέννας, την πρωκτογεννητική απόσταση, τις διατηρούμενες θηλές, τα επίπεδα T4 στον ορό), εάν υπάρχουν.

75. Για τον ποιοτικό έλεγχο προτείνεται η συλλογή ιστορικών δεδομένων ως μάρτυρα και ο υπολογισμός συντελεστών μεταβλητότητας για τα αριθμητικά δεδομένα, ιδίως όσον αφορά τις παραμέτρους που συνδέονται με την ανίχνευση ενδοκρινικών διαταρακτών. Τα δεδομένα αυτά μπορούν να χρησιμοποιούνται για συγκρίσεις κατά την αξιολόγηση πραγματικών μελετών.

▼**M8**

Έκθεση δοκιμής

76. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

— πηγή, αριθμός παρτίδας, καταληκτική ημερομηνία χρήσης, αν υπάρχει,

— σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εάν είναι γνωστή,

Μονοσυστατική ουσία:

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμίξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγματα:

— περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες.*Φορέας (εάν χρησιμοποιείται):*

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα, εάν δεν είναι το νερό.

Πειραματόζωα:

— είδος/φυλή χρησιμοποιηθέντων ζώων,

— αριθμός, ηλικία και φύλο των ζώων,

— προέλευση των ζώων, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσιο κ.λπ.,

— βάρος κάθε ζώου κατά την έναρξη της δοκιμής,

— αιτιολόγηση της επιλογής άλλου είδους εκτός από τον επίμυ.

Συνθήκες δοκιμής:

— αιτιολόγηση της επιλογής των επιπέδων δόσης,

— λεπτομέρειες σχετικά με το παρασκεύασμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας/τροφής και τις επιτευχθείσες συγκεντρώσεις, σταθερότητα και ομοιογένεια του παρασκευάσματος,

— λεπτομέρειες σχετικά με τη χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας,

— κατά περίπτωση, μετατροπή της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο σιτηρέσιο ή το πόσιμο νερό (ppm) σε πραγματική δόση (mg/kg βάρους σώματος/ημέρα),

— λεπτομέρειες σχετικά με την ποιότητα της τροφής και του νερού,

— αναλυτική περιγραφή της διαδικασίας τυχαιοποίησης για την επιλογή των νεογνών προς απομάκρυνση, εφόσον απαιτείται.

Αποτελέσματα:

— βάρος του σώματος/μεταβολές βάρους σώματος,

— κατά περίπτωση, κατανάλωση τροφής και νερού,

▼**M8**

— δεδομένα τοξικής αντίδρασης ανά φύλο και δόση, περιλαμβανομένης της γονιμότητας, της κύησης, καθώς και όποιων άλλων σημείων τοξικότητας,

— διάρκεια κύησης,

— τοξικές ή άλλες επιδράσεις στην αναπαραγωγή, στους απογόνους, στη μεταγεννητική ανάπτυξη κ.λπ.,

— φύση, σοβαρότητα και διάρκεια των κλινικών παρατηρήσεων (αναστρέψιμων και μη),

— αξιολόγηση των αισθητήριων λειτουργιών, της δύναμης της λαβής και της κινητικότητας,

— αιματολογικές εξετάσεις με τις αντίστοιχες τιμές αναφοράς,

— εξετάσεις κλινικής βιοχημείας με τις αντίστοιχες τιμές αναφοράς,

— αριθμός ενήλικων θηλυκών με κανονικό ή μη κανονικό οιστρικό κύκλο και διάρκεια του κύκλου,

— αριθμός ζώντων νεογνών και απώλειες μετά την εμφύτευση,

— αριθμός νεογνών με μακροσκοπικά ορατές ανωμαλίες, μακροσκοπική εξέταση των εξωτερικών γεννητικών οργάνων, αριθμός καχεκτικών νεογνών,

— χρόνος θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης ή επιβίωση έως τη λήξη της,

— αριθμός εμφυτευμένων νεογνών, μέγεθος γέννας και βάρη νεογνών γέννας κατά τη χρονική στιγμή της καταγραφής,

— δεδομένα για το βάρος του σώματος των νεογνών,

— πρωκτογεννητική απόσταση για όλα τα νεογνά (και βάρος σώματος την ημέρα της μέτρησης της πρωκτογεννητικής απόστασης)

— διατηρούμενες θηλές σε αρσενικά νεογνά,

— επίπεδα θυρεοειδικών ορμονών, σε νεογνά 13ης ΜΓΗ και σε ενήλικα αρσενικά (και σε μητέρες και νεογνά 4ης ΜΓΗ, εφόσον μετρώνται),

— βάρος σώματος κατά τη θανάτωση και δεδομένα βάρους οργάνων για τα γονικά ζώα,

— ευρήματα νεκροψίας-νεκροτομής,

— λεπτομερής περιγραφή των ιστοπαθολογικών ευρημάτων,

— δεδομένα για την απορρόφηση (εάν υπάρχουν διαθέσιμα),

— στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, κατά περίπτωση.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

▼**M8**

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

77. Η μελέτη θα παράσχει αξιολογήσεις της τοξικότητας στην αναπαραγωγή/ανάπτυξη που συνδέεται με τη χορήγηση επαναλαμβανόμενων δόσεων. Πιο συγκεκριμένα, δεδομένου ότι δίνεται έμφαση σε παραμέτρους τόσο γενικής τοξικότητας όσο και τοξικότητας στην αναπαραγωγή/ανάπτυξη, τα αποτελέσματα της μελέτης επιτρέπουν τη διάκριση μεταξύ των επιδράσεων στην αναπαραγωγή/ανάπτυξη χωρίς γενική τοξικότητα και εκείνων που εκφράζονται μόνο σε επίπεδα που είναι τοξικά και για τα γονικά ζώα (βλ. παραγράφους 7-11). Μπορεί να περιλαμβάνει υπόδειξη της ανάγκης διενέργειας περαιτέρω ερευνών και παρέχει καθοδήγηση όσον αφορά τον σχεδιασμό επακόλουθων μελετών. Για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων που αφορούν την αναπαραγωγή και την ανάπτυξη θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως βοήθημα το έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 43 του ΟΟΣΑ (19). Στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 106 του ΟΟΣΑ για την ιστολογική αξιολόγηση των ενδοκρινικών και αναπαραγωγικών δοκιμών σε τρωκτικά (16) παρέχονται πληροφορίες σχετικά με την προετοιμασία και την αξιολόγηση των (ενδοκρινικών) οργάνων και των κολπικών επιχρισμάτων, που μπορεί να είναι χρήσιμες για την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Διατίθεται κατόπιν αιτήματος από τον Οργανισμό για την Οικονομική Συνεργασία και την Ανάπτυξη, Παρίσι.

(2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Διατίθεται κατόπιν αιτήματος από τον Οργανισμό για την Οικονομική Συνεργασία και την Ανάπτυξη, Παρίσι.

(3) Mitsumori K., Kodama Y., Uchida O., Takada K., Saito M. Naito K., Tanaka S., Kurokawa Y., Usami, M., Kawashima K., Yasuhara K., Toyoda K., Onodera H., Furukawa F., Takahashi M. and Hayashi Y. (1994). Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). J. *Toxicol*, Sci., 19, 141-149.

(4) Tanaka S., Kawashima K., Naito K., Usami M., Nakadate M., Imaida K., Takahashi M., Hayashi Y., Kurokawa Y. and Tobe M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. Fundam. Appl. *Toxicol*., 18, 89-95.

(5) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(6) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

(8) Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M.and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84-97.

(9) Sadleir R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (Eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(10) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document (No 60).

(11) Moser V.C., McDaniel K.M. and Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol*. Appl. *Pharmacol*., 108, 267-283.

(12) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C. and Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. *Toxicol*., 1, 233-236.

(13) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13, 599-609.

(14) Gallavan R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds. (1999). «Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights», Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

(15) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(16) OECD (2009).Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 106) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(17) Hess RA and Moore BJ. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. Στο: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (Eds.). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.

(18) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol*. 30, 524-533.

(19) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(20) OECD (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ (ΒΛ. ΕΠΙΣΗΣ (20) GD 150 ΤΟΥ ΟΟΣΑ)

Ανδρογονικότητα η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να δρα όπως μια φυσική ανδρογόνος ορμόνη (π.χ. τεστοστερόνη) στον οργανισμό θηλαστικού.

Αντιανδρογονικότητα η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να καταστέλλει τη δράση μιας φυσικής ανδρογόνου ορμόνης (π.χ. τεστοστερόνη) στον οργανισμό θηλαστικού.

Αντιοιστρογονικότητα η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να καταστέλλει τη δράση μιας φυσικής οιστρογόνου ορμόνης (π.χ. 17β-οιστραδιόλη) στον οργανισμό θηλαστικού.

Αντιθυρεοειδική δραστηριότητα η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να καταστέλλει τη δράση μιας φυσικής θυρεοειδικής ορμόνης (π.χ. T_3) στον οργανισμό θηλαστικού.

Χημικό προϊόν μια ουσία ή ένα μείγμα.

Τοξικότητα στην ανάπτυξη η εκδήλωση τοξικότητας στην αναπαραγωγή, η οποία περιλαμβάνει προγεννητικές, περιγεννητικές και μεταγεννητικές δομικές ή λειτουργικές διαταραχές των απογόνων.

Δόση η χορηγούμενη ποσότητα υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Η δόση εκφράζεται σε βάρος υπό δοκιμή χημικής ουσίας ανά μονάδα βάρους πειραματόζωου ανά ημέρα (π.χ. mg/kg βάρους σώματος/ημέρα) ή σε σταθερή συγκέντρωση στην τροφή.

Δοσολογία γενικός όρος που περιλαμβάνει τη δόση, τη συχνότητα και τη διάρκεια χορήγησης.

Έκδηλη τοξικότητα γενικός όρος που δηλώνει σαφή σημεία τοξικότητας μετά από χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Αυτά πρέπει να επαρκούν για την εκτίμηση του κινδύνου και να είναι τέτοια ώστε η αύξηση της χορηγούμενης δόσης να αναμένεται ότι θα προκαλέσει σοβαρές τοξικές εκδηλώσεις και πιθανώς θνησιμότητα.

Εξασθένιση της γονιμότητας αντιπροσωπεύει διαταραχές των αναπαραγωγικών λειτουργιών η της ικανότητας αρσενικών ή θηλυκών.

Τοξικότητα στη μητέρα: δυσμενείς επιδράσεις σε κυοφορούντα θηλυκά, είτε ειδικής εκδήλωσης (άμεση επίδραση) είτε μη ειδικής εκδήλωσης (έμμεση επίδραση), που σχετίζονται με την κατάσταση κύησης.

NOAEL (no-observed-adverse effect level): πρόκειται για το υψηλότερο επίπεδο δόσης στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις λόγω της αγωγής.

Οιστρογονικότητα η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να δρα όπως μια φυσική οιστρογόνος ορμόνη (π.χ. 17β-οιστραδιόλη) στον οργανισμό θηλαστικού.

Τοξικότητα στην αναπαραγωγή αντιπροσωπεύει τις επιβλαβείς επιδράσεις στους απογόνους και/ή την εξασθένιση των αναπαραγωγικών λειτουργιών ή ικανότητας αρσενικών και θηλυκών.

Υπό δοκιμή χημική ουσία κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

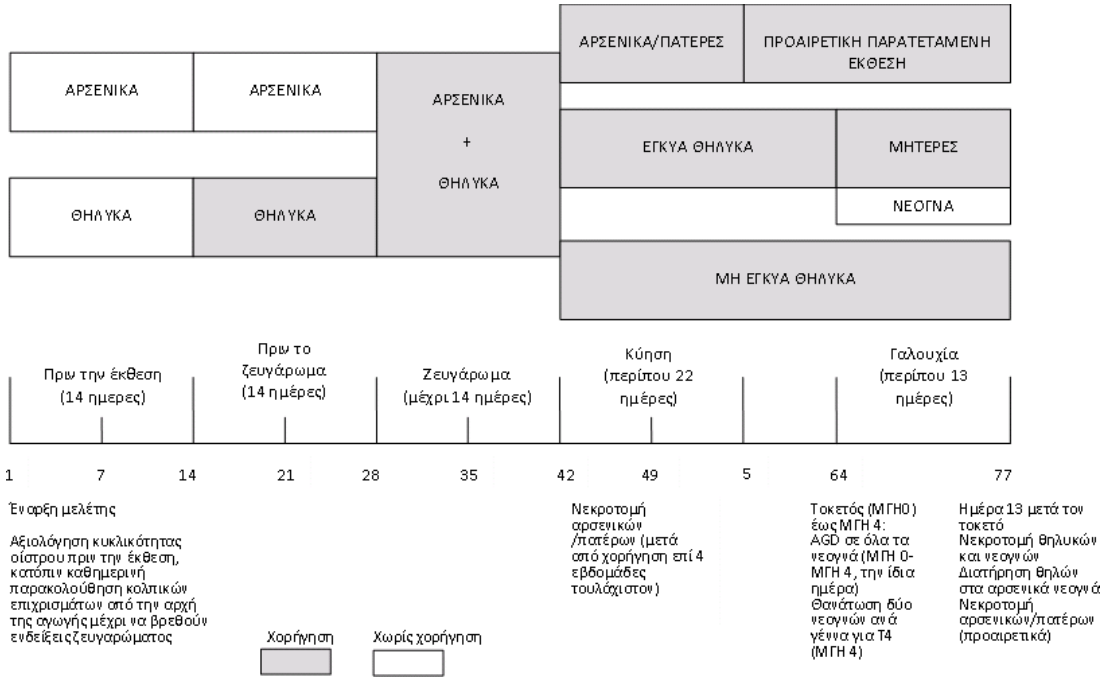
Θυρεοειδική δραστηριότητα η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να δρα όπως μια φυσική θυρεοειδική ορμόνη (π.χ. T_3) στον οργανισμό θηλαστικού.

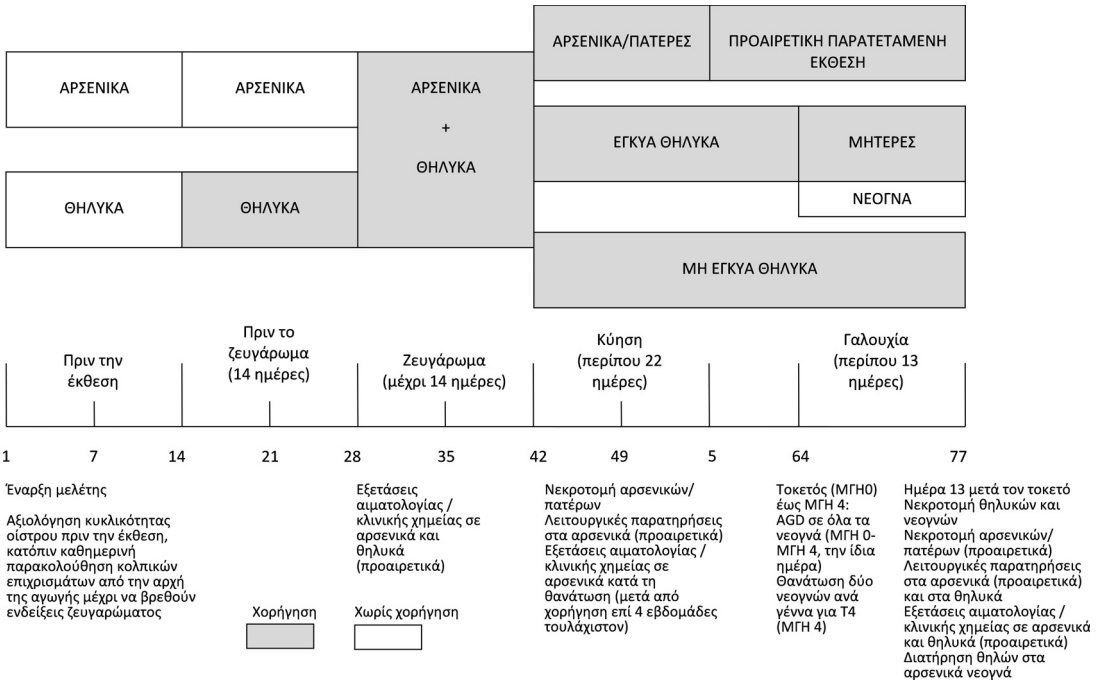
Επικύρωση επιστημονική διαδικασία που αποσκοπεί στον χαρακτηρισμό των λειτουργικών απαιτήσεων και περιορισμών μιας μεθόδου δοκιμών και στην απόδειξη της αξιοπιστίας της και της καταλληλότητάς της για συγκεκριμένο σκοπό.

▼**M8**

Προσάρτημα 2

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΓΙΣΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ, ΒΑΣΕΙ ΠΛΗΡΟΥΣ ΠΕΡΙΟΔΟΥ ΖΕΥΓΑΡΩΜΑΤΟΣ 14 ΗΜΕΡΩΝ





▼**M8**

Προσάρτημα 3

ΣΥΝΟΠΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ/ΑΝΑΠΤΥΞΗ

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ	ΤΙΜΕΣ				
Δοσολογία (μονάδες)…….	0 (μάρτυρας)	…	…	…	…
Ζεύγη κατά την έναρξη (N)					
Οιστρικός κύκλος (τουλάχιστον μέση διάρκεια και συχνότητα μη κανονικών κύκλων)					
Θηλυκά που παρουσιάζουν ενδείξεις συνουσίας (N)					
Θηλυκά που καθίστανται έγκυα (N)					
Ημέρες σύλληψης 1 - 5 (N)					
Ημέρες σύλληψης 6 -… ([1]) (N)					
Εγκυμοσύνη ≤ 21 ημέρες (N)					
Εγκυμοσύνη = 22 ημέρες (N)					
Εγκυμοσύνη ≥ 23 ημέρες (N)					
Μητέρες με ζώντα νεογνά (N)					
Μητέρες με ζώντα νεογνά την 4η ημέρα (N)					
Εμφυτευμένα έμβρυα/μητέρα (μέσος όρος)					
Ζώντα νεογνά/μητέρα κατά τη γέννα (μέσος όρος)					
Ζώντα νεογνά/μητέρα κατά την 4η ημέρα (μέσος όρος)					
Αναλογία φύλων (α/θ) κατά τη γέννα (μέσος όρος)					
Αναλογία φύλων (α/θ) κατά την 4η ημέρα (μέσος όρος)					
Βάρος γέννας κατά τη γέννηση (μέσος όρος)					
Βάρος γέννας κατά την 4η ημέρα (μέσος όρος)					
Βάρος νεογνών κατά τη γέννηση (μέσος όρος)					
Βάρος νεογνών κατά τη μέτρηση της πρωκτογεννητικής απόστασης (μέσος όρος αρσενικών, μέσος όρος θηλυκών)					
Πρωκτογεννητική απόσταση νεογνών κατά την ίδια μεταγεννητική ημέρα, τη γέννηση – την 4η ημέρα (μέσος όρος αρσενικών, μέσος όρος θηλυκών, καταγραφή της ΜΓΗ)					
Βάρος νεογνών κατά την 4η ημέρα (μέσος όρος)					
Βάρος νεογνών κατά την 13η ημέρα (μέσος όρος)					

▼**M8**

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ	ΤΙΜΕΣ				
Διατηρούμενες θηλές αρσενικών νεογνών τη 13η ημέρα (μέσος όρος)					
ΜΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΝΕΟΓΝΑ					
Μητέρες με 0					
Μητέρες με 1					
Μητέρες με ≥ 2					
ΑΠΩΛΕΙΑ ΑΠΟΓΟΝΩΝ					
Προγεννητική (εμφυτευμένα έμβρυα μείον ζώντα νεογνά)					
Θηλυκά με 0					
Θηλυκά με 1					
Θηλυκά με 2					
Θηλυκά με ≥ 3					
Μεταγεννητική (ζώντα κατά τη γέννα μείον ζώντα κατά τη 13η ΜΓΗ)					
Θηλυκά με 0					
Θηλυκά με 1					
Θηλυκά με 2					
Θηλυκά με ≥ 3					

([1]) τελευταία ημέρα της περιόδου ζευγαρώματος

▼M8

Β.65 *IN VITRO* ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ΦΡΑΓΜΟΥ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΓΙΑ ΔΙΑΒΡΩΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 435 του ΟΟΣΑ (2015). Η διάβρωση του δέρματος αναφέρεται στην πρόκληση μη αναστρέψιμης βλάβης στο δέρμα που εκδηλώνεται με τη μορφή ορατής νέκρωσης που διαπερνά την επιδερμίδα φθάνοντας στο χόριο μετά από εφαρμογή υπό δοκιμή χημικής ουσίας, όπως ορίζεται στο Παγκόσμια Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Ουσιών των Ηνωμένων Εθνών [Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)] (1) και στον κανονισμό (ΕΕ) 1272/2008 για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων (CLP) της Ευρωπαϊκής Ένωσης ([1]). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών, που είναι ισοδύναμη με την επικαιροποιημένη κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών αριθ. 435 του ΟΟΣΑ, αποτελεί *in vitro* μέθοδο δοκιμών φραγμού μεμβράνης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των διαβρωτικών χημικών ουσιών. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών χρησιμοποιείται μια τεχνητή μεμβράνη, σχεδιασμένη έτσι ώστε να αντιδρά στις διαβρωτικές χημικές ουσίες κατά τρόπο ανάλογο με δέρμα ζώου *in situ*.

2. Η διαβρωτικότητα στο δέρμα αξιολογείται παραδοσιακά μέσω εφαρμογής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο δέρμα ζώντων ζώων και την αξιολόγηση της έκτασης της βλάβης στους ιστούς μετά από καθορισμένο χρονικό διάστημα (2). Πέραν της παρούσας μεθόδου δοκιμών, έχουν εγκριθεί αρκετές άλλες *in vitro* μέθοδοι δοκιμών ως εναλλακτικές λύσεις (3)(4) αντί της τυπικής *in vivo* διαδικασίας σε δέρμα κουνελιού (κεφάλαιο Β.4 του παρόντος παραρτήματος, που ισοδυναμεί με την TG 404 του ΟΟΣΑ) που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό διαβρωτικών χημικών ουσιών (2). Στη στρατηγική κλιμακωτών δοκιμών και αξιολόγησης του GHS του ΟΗΕ για την αξιολόγηση και την ταξινόμηση της διαβρωτικότητας στο δέρμα, και στο έγγραφο καθοδήγησης «Ολοκληρωμένη προσέγγιση για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση (ΙΑΤΑ) για τον ερεθισμό/διάβρωση του δέρματος» του ΟΟΣΑ συνιστάται η χρήση επικυρωμένων και αποδεκτών *in vitro* μεθόδων δοκιμών βάσει των ενοτήτων 3 και 4 (1)(5). Στην ΙΑΤΑ περιγράφονται ορισμένες ενότητες για την ομαδοποίηση πηγών πληροφοριών και εργαλείων ανάλυσης, και i) παρέχεται καθοδήγηση σχετικά με τον τρόπο ενσωμάτωσης και χρήσης των υφιστάμενων δεδομένων δοκιμών και δεδομένων εκτός δοκιμών για την αξιολόγηση του δυναμικού των χημικών ουσιών για ερεθισμό και διάβρωση του δέρματος και ii) προτείνεται μια προσέγγιση σε περίπτωση που απαιτείται η διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών, συμπεριλαμβανομένων και των περιπτώσεων όπου λαμβάνονται αρνητικά αποτελέσματα (5). Στο πλαίσιο αυτής της τμηματικής προσέγγισης, τα θετικά αποτελέσματα από μεθόδους δοκιμών *in vitro* μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταξινόμηση μιας χημικής ουσίας ως διαβρωτικής χωρίς να χρειαστεί να διεξαχθούν δοκιμές σε ζώα, ώστε να περιορίζεται και να βελτιώνεται η χρήση των ζώων και να αποφεύγεται η πρόκληση πόνου και αγωνίας.

3. Έχουν ολοκληρωθεί μελέτες επικύρωσης για το *in vitro* μοντέλο φραγμού μεμβράνης που διατίθεται στο εμπόριο με την επωνυμία Corrositex® (6)(7)(8), στις οποίες καταδεικνύεται συνολική ορθότητα πρόβλεψης της διαβρωτικότητας στο δέρμα 79 % (128/163), ευαισθησία 85 % (76/89) και ειδικότητα 70 % (52/74) σε μια βάση δεδομένων 163 ουσιών και μειγμάτων (7). Δεδομένης της αναγνωρισμένης εγκυρότητάς της, η εν λόγω επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς (VRM) συνιστάται για χρήση στο πλαίσιο στρατηγικής κλιμακωτών δοκιμών για την αξιολόγηση της δυνητικής επικινδυνότητας διάβρωσης του δέρματος που ενέχουν οι χημικές ουσίες (5)(7). Για να καταστεί δυνατή η χρήση *in vitro* μοντέλου φραγμού μεμβράνης για τη διάβρωση του δέρματος για κανονιστικούς σκοπούς, θα πρέπει να προσδιορίζεται η αξιοπιστία, η καταλληλότητα (ορθότητα) και οι περιορισμοί της σε σχέση με την προτεινόμενη χρήση της, ούτως ώστε να διασφαλίζεται ότι είναι παρεμφερή με τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά της επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς (9), σύμφωνα με τα προκαθορισμένα πρότυπα επιδόσεων (10). Η αμοιβαία αποδοχή δεδομένων του ΟΟΣΑ θα διασφαλίζεται μόνον αφού

([1]) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων, την τροποποίηση και την κατάργηση των οδηγιών 67/548/ΕΟΚ και 1999/45/ΕΚ και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006, ΕΕ L 353/1 της 31.12.2008.

▼M8

τυχόν προτεινόμενη νέα ή επικαιροποιημένη μέθοδος που συμμορφώνεται με τα πρότυπα επιδόσεων επανεξεταστεί και συμπεριληφθεί στην ισοδύναμη κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών του ΟΟΣΑ. Επί του παρόντος, η κατευθυντήρια γραμμή 435 του ΟΟΣΑ και η παρούσα μέθοδος δοκιμών καλύπτουν μόνο μία *in vitro* μέθοδο, το εμπορικά διαθέσιμο μοντέλο Corrositex®.

4. Άλλες μέθοδοι δοκιμών για τη διεξαγωγή δοκιμών διαβρωτικότητας στο δέρμα βασίζονται στη χρήση ανασυσταθέντος ανθρώπινου δέρματος (TG 431 ΟΟΣΑ) (3) και απομονωμένου δέρματος επίμυος (TG 430 ΟΟΣΑ) (4). Η παρούσα κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών προβλέπει επίσης την ταξινόμηση των διαβρωτικών χημικών ουσιών στις τρεις υποκατηγορίες διαβρωτικότητας του GHS του ΟΗΕ και στις τρεις ομάδες συσκευασίας μεταφοράς του ΟΗΕ για τη διαβρωτικότητα. Αυτή η κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών εγκρίθηκε αρχικά το 2006 και επικαιροποιήθηκε το 2015 ώστε να παραπέμπει στο έγγραφο καθοδήγησης ΙΑΤΑ και για λόγους επικαιροποίησης του καταλόγου ουσιών ελέγχου ικανότητας.

ΟΡΙΣΜΟΙ

5. Οι χρησιμοποιούμενοι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

6. Η δοκιμή που περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών επιτρέπει τον προσδιορισμό διαβρωτικών υπό δοκιμή χημικών ουσιών και την ταξινόμηση των διαβρωτικών ουσιών σε υποκατηγορίες σύμφωνα με το GHS του ΟΗΕ / τον κανονισμό CLP (πίνακας 1). Επιπλέον, αυτή η μέθοδος δοκιμών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ληφθούν αποφάσεις περί της διαβρωτικότητας ή μη ειδικών κατηγοριών χημικών ουσιών, π.χ. οργανικών και ανόργανων οξέων, παραγώγων οξέων ([1]) καιβάσεων για ορισμένες δοκιμές που αφορούν τις μεταφορές (7)(11)(12). Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών περιγράφεται μια γενική διαδικασία, παρεμφερής με αυτήν της επικυρωμένης μεθόδου δοκιμών αναφοράς (7). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν παρέχει επαρκείς πληροφορίες σχετικά με τον ερεθισμό του δέρματος, αλλά η μέθοδος δοκιμών B.46 (ισοδύναμη με την TG 439 του ΟΟΣΑ) αφορά ειδικά τον ερεθισμό του δέρματος *in vitro* (13). Για την πλήρη αξιολόγηση των τοπικών επιδράσεων στο δέρμα μετά από εφάπαξ έκθεση του δέρματος, ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ για τις ολοκληρωμένες προσεγγίσεις για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση (5).

Πίνακας 1

Η κατηγορία και οι υποκατηγορίες ουσιών διαβρωτικών του δέρματος κατά το GHS του ΟΗΕ ([1])

Κατηγορία διαβρωτικών (κατηγορία 1) (για αρχές που δεν χρησιμοποιούν υποκατηγορίες)	Υποκατηγορίες δυνητικά διαβρωτικών ([1]) (για αρχές που χρησιμοποιούν υποκατηγορίες, περιλαμβανομένου του κανονισμού CLP)	Διαβρωτικό σε ≥ 1 από 3 ζώα	
		Έκθεση	Παρατήρηση
Διαβρωτικό	Υποκατηγορία διαβρωτικών 1A	≤ 3 λεπτά	≤ 1 ώρα
	Υποκατηγορία διαβρωτικών 1B	> 3 λεπτά / ≤ 1 ώρα	≤ 14 ημέρες
	Υποκατηγορία διαβρωτικών 1C	> 1 ώρα / ≤ 4 ώρες	≤ 14 ημέρες

([1]) Για την ΕΕ, ο κανονισμός CLP εφαρμόζει τις τρεις υποκατηγορίες διάβρωσης του δέρματος 1A, 1B και 1C.

7. Ένας περιορισμός της επικυρωμένης μεθόδου δοκιμών (7) είναι ότι πολλές μη διαβρωτικές χημικές ουσίες και ορισμένες διαβρωτικές χημικές ουσίες μπορεί να μην πληρούν τα κριτήρια ώστε να υποβληθούν σε δοκιμές, βάσει

([1]) Ο όρος «παράγωγο οξύ» είναι ένας χαρακτηρισμός μη ειδικής κατηγορίας, ο οποίος αφορά, υπό την ευρεία έννοια, χημική ουσία που παράγεται από οξύ είτε άμεσα είτε μέσω τροποποίησης ή μερικής υποκατάστασης. Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει τους ανυδρίτες, τα αλογονωμένα οξέα, τα άλατα και άλλα είδη χημικών ουσιών.

▼M8

των αποτελεσμάτων της αρχικής δοκιμής συμβατότητας (βλ. παράγραφο 13). Οι υδατικές χημικές ουσίες με pH που κυμαίνεται από 4,5 έως 8,5 συχνά δεν πληρούν τα κριτήρια ώστε να υποβληθούν σε δοκιμές· εντούτοις, το 85 % των χημικών ουσιών με pH εντός της συγκεκριμένης κλίμακας που υποβλήθηκαν σε δοκιμές ήταν μη διαβρωτικές σε δοκιμές σε ζώα (7). Η *in vitro* μέθοδος φραγμού μεμβράνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο στερεών (διαλυτών ή μη διαλυτών στο νερό), υγρών (υδατικών ή μη υδατικών) και γαλακτωμάτων. Εντούτοις, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν προκαλούν ανιχνεύσιμες μεταβολές στη δοκιμή συμβατότητας [αλλαγή χρώματος στο σύστημα ανίχνευσης χημικών ουσιών (CDS) της επικυρωμένης μεθόδου δοκιμών αναφοράς] δεν μπορούν να υποβληθούν σε δοκιμή με τη μέθοδο φραγμού μεμβράνης και θα πρέπει να ελέγχονται με χρήση άλλων μεθόδων δοκιμών.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

8. Το σύστημα δοκιμής απαρτίζεται από δύο στοιχεία: έναν συνθετικό μακρομοριακό βιοφραγμό και ένα σύστημα ανίχνευσης χημικών ουσιών (CDS)· η παρούσα μέθοδος δοκιμών ανιχνεύει μέσω του φραγμού μεμβράνης CDS τις βλάβες που προκαλούν οι διαβρωτικές χημικές ουσίες μετά την εφαρμογή τους στην επιφάνεια του συνθετικού μακρομοριακού φραγμού μεμβράνης (7), προφανώς μέσω του ή των ίδιων μηχανισμών διάβρωσης που λειτουργούν και στο ζωντανό δέρμα.

9. Η διείσδυση διαμέσου του φραγμού μεμβράνης («διαφυγή») μπορεί να μετρηθεί με χρήση διαφόρων διαδικασιών ή CDS, περιλαμβανομένης της αλλαγής του χρώματος χρωματικού δείκτη pH ή κάποιας άλλης ιδιότητας του διαλύματος δείκτη κάτω από τον φραγμό.

10. Ο φραγμός μεμβράνης θα πρέπει να ελέγχεται ως προς την εγκυρότητά του, δηλαδή την καταλληλότητα και την αξιοπιστία του για τον σκοπό για τον οποίο προορίζεται. Στο πλαίσιο του εν λόγω ελέγχου θα πρέπει να διασφαλίζεται ότι τα διάφορα παρασκευάσματα συνάδουν με τις ιδιότητες του φραγμού, π.χ. μπορούν να διατηρούν έναν φραγμό όταν χρησιμοποιούνται μη διαβρωτικές χημικές ουσίες και να παρέχουν τη δυνατότητα κατηγοριοποίησης των διαβρωτικών ιδιοτήτων των χημικών ουσιών με βάση τις διάφορες υποκατηγορίες διαβρωτικότητας του GHS του ΟΗΕ (1). Η ταξινόμηση βασίζεται στον χρόνο που απαιτείται για τη διείσδυση μιας χημικής ουσίας μέσω του φραγμού μεμβράνης στο διάλυμα δείκτη.

ΑΠΟΔΕΙΞΗ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

11. Πριν εντάξουν στην καθημερινή πρακτική την *in vitro* μέθοδο φραγμού μεμβράνης, που συμμορφώνεται με την παρούσα μέθοδο δοκιμών, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα ταξινομώντας σωστά τις δώδεκα συνιστώμενες στον πίνακα 2 ουσίες ελέγχου ικανότητας. Σε περιπτώσεις όπου μια απαριθμούμενη ουσία δεν είναι διαθέσιμη, ή εφόσον δικαιολογείται, μπορεί να χρησιμοποιείται άλλη ουσία για την οποία υπάρχουν επαρκή δεδομένα αναφοράς *in vivo* και *in vitro* [π.χ. από τον κατάλογο χημικών ουσιών αναφοράς (10)], υπό την προϋπόθεση ότι εφαρμόζονται τα ίδια κριτήρια επιλογής που περιγράφονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 2

Ουσίες ελέγχου ικανότητας [1]

Ουσία [2]	CASRN	Χημική κατηγορία	*In vivo* υποκατηγορία του GHS του ΟΗΕ [3]	*In vitro* υποκατηγορία του GHS του ΟΗΕ [3]
Τριφθοριούχο βόριο διένυδρο	13319-75-0	Ανόργανα οξέα	1A	1A
Νιτρικό οξύ	7697-37-2	Ανόργανα οξέα	1A	1A
Πενταχλωρίδιο του φωσφόρου	10026-13-8	Πρόδρομες ουσίες ανόργανων οξέων	1A	1A
Βαλεριανυλοχλωρίδιο	638-29-9	Χλωρίδια οξέων	1B	1B
Υδροξείδιο του νατρίου	1310-73-2	Ανόργανες βάσεις	1B	1B

▼**M8**

Ουσία ([2])	CASRN	Χημική κατηγορία	*In vivo* υποκατηγορία του GHS του ΟΗΕ ([3])	*In vitro* υποκατηγορία του GHS του ΟΗΕ ([3])
1-(2-Αμινοαιθυλο)-πιπεραζίνη	140-31-8	Αλειφατικές αμίνες	1B	1B
Βενζυλοσουλφονυλοχλωρίδιο	98-09-9	Χλωρίδια οξέων	1C	1C
N,N-Διμεθυλοβενζυλαμίνη	103-83-3	Ανιλίνες	1C	1C
Τετρααιθυλενοπενταμίνη	112-57-2	Αλειφατικές αμίνες	1C	1C
Ευγενόλη	97-53-0	Φαινόλες	NC	NC
Ακρυλικός εννεϋλεστέρας	2664-55-3	Ακρυλικές/μεθακρυλικές ενώσεις	NC	NC
Όξινο ανθρακικό νάτριο	144-55-8	Ανόργανα άλατα	NC	NC

([1]) Οι δώδεκα ουσίες που απαριθμούνται ανωτέρω περιλαμβάνουν τρεις ουσίες από καθεμία από τις τρεις υποκατηγορίες διαβρωτικών ουσιών του GHS του ΟΗΕ, διατίθενται άμεσα από εμπορικούς προμηθευτές, και η κατάταξη σε υποκατηγορία του GHS του ΟΗΕ βασίζεται στα αποτελέσματα *in vivo* δοκιμών υψηλής ποιότητας. Οι εν λόγω ουσίες προέρχονται από τον κατάλογο των 40 ουσιών αναφοράς που περιλαμβάνονται στον κατάλογο ελαχίστων χημικών ουσιών που έχει διαπιστωθεί ότι αποδεικνύουν την ορθότητα και καταλληλότητα των μεθόδων δοκιμών που είναι δομικά και λειτουργικά παρεμφερείς με την επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών αναφοράς, και οι οποίες επιλέχθηκαν από τις 163 χημικές ουσίες αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά για την επικύρωση της μεθόδου δοκιμών αναφοράς (Corrositex®) (7) (10) (14). Ο στόχος της εν λόγω διαδικασίας επιλογής ήταν η συμπερίληψη, στον βαθμό που ήταν εφικτό, χημικών ουσιών που παρουσίαζαν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: ήταν αντιπροσωπευτικές του φάσματος αποκρίσεων διαβρωτικότητας (π.χ. μη διαβρωτικές, διαβρωτικές των ομάδων συσκευασίας I, II και III του ΟΗΕ) τις οποίες η επικυρωμένη μέθοδος δοκιμών αναφοράς μπορεί να μετρά ή να προβλέπει, ήταν αντιπροσωπευτικές των χημικών κατηγοριών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία επικύρωσης, έχουν καλά προσδιορισμένες χημικές δομές, επήγαγαν αναπαραγώγιμα αποτελέσματα στην επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών αναφοράς, επήγαγαν οριστικά αποτελέσματα στην *in vivo* δοκιμή αναφοράς, ήταν εμπορικά διαθέσιμες, και δεν συνεπάγονταν απαγορευτικό κόστος απόρριψης (14).

([2]) Οι ουσίες υποβλήθηκαν σε δοκιμή αμιγείς ή με καθαρότητα ≥ 90 %

([3]) Οι ομάδες συσκευασίας του ΟΗΕ I, II και III αντιστοιχούν στις υποκατηγορίες 1A, 1B και 1C του GHS του ΟΗΕ. NC: Μη διαβρωτικό.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

12. Στις ακόλουθες παραγράφους περιγράφονται τα στοιχεία και οι διαδικασίες μεθόδου δοκιμών τεχνητού φραγμού μεμβράνης για την αξιολόγηση της διαβρωτικότητας (7)(15), με βάση την υφιστάμενη επικυρωμένη μέθοδο αναφοράς, τη μέθοδο Corrositex® του εμπορίου. Ο φραγμός μεμβράνης και τα διαλύματα συμβατότητας/δείκτη και κατηγοριοποίησης μπορούν να κατασκευαστούν, να παρασκευαστούν ή να αποκτηθούν από το εμπόριο, όπως στην περίπτωση της μεθόδου Corrositex®. Για την επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών αναφοράς διατίθεται παράδειγμα πρωτοκόλλου μεθόδου δοκιμών (7). Οι δοκιμές θα πρέπει να διεξάγονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (17-25 °C) και τα στοιχεία της μεθόδου θα πρέπει να πληρούν τις ακόλουθες προϋποθέσεις.

Δοκιμή συμβατότητας χημικών ουσιών

13. Πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμής φραγμού μεμβράνης, διεξάγεται δοκιμή συμβατότητας για να προσδιοριστεί εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι ανιχνεύσιμη από το CDS. Εάν το CDS δεν ανιχνεύει την υπό δοκιμή χημική ουσία, η μέθοδος δοκιμών φραγμού μεμβράνης δεν είναι κατάλληλη για την αξιολόγηση της συγκεκριμένης ουσίας και θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί διαφορετική μέθοδος δοκιμών. Το CDS και οι συνθήκες έκθεσης που χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή συμβατότητας θα πρέπει να αντικατοπτρίζουν την έκθεση στην επακόλουθη δοκιμή φραγμού μεμβράνης.

Δοκιμή κατηγορίας χρονικής κλίμακας για υπό δοκιμή χημική ουσία

14. Εφόσον αρμόζει για τη μέθοδο δοκιμών, μια υπό δοκιμή χημική ουσία που έχει χαρακτηριστεί συμβατή βάσει της δοκιμής συμβατότητας θα πρέπει να υποβάλλεται σε δοκιμή κατηγορίας χρονικής κλίμακας, δηλαδή μια δοκιμή διαλογής για τη διάκριση μεταξύ ασθενών και ισχυρών οξέων ή βάσεων. Για παράδειγμα, στην επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών αναφοράς χρησιμοποιείται

▼M8

δοκιμή κατηγοριοποίησης χρονικής κλίμακας προκειμένου να υποδειχθεί ποια από τις δύο χρονικές κλίμακες θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί με βάση το κατά πόσον ανιχνεύεται σημαντικό όξινο/αλκαλικό απόθεμα. Για τον προσδιορισμό της διαβρωτικότητας και της υποκατηγορίας διαβρωτικότητας στο δέρμα κατά GHS του ΟΗΕ θα πρέπει να χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικές χρονικές κλίμακες διαφυγής, με βάση το όξινο/αλκαλικό απόθεμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ ΦΡΑΓΜΟΥ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ

Φραγμός μεμβράνης

15. Ο φραγμός μεμβράνης απαρτίζεται από δύο στοιχεία: μια πρωτεϊνούχο μακρομοριακή υδατική γέλη και μια διαπερατή μεμβράνη υποστήριξης. Η πρωτεϊνούχος γέλη θα πρέπει να είναι αδιαπέρατη από τα υγρά και τα στερεά, αλλά να μπορεί να διαβρωθεί και να καταστεί διαπερατή. Ο πλήρως κατασκευασμένος φραγμός μεμβράνης θα πρέπει να αποθηκεύεται υπό προκαθορισμένες συνθήκες που έχει καταδειχθεί ότι αποτρέπουν κάθε αλλοίωση της γέλης, π.χ. ξήρανση, ανάπτυξη μικροβίων, μετατόπιση ή ράγισμα, που θα μπορούσε να υποβαθμίσει τις επιδόσεις της. Θα πρέπει να καθορίζεται η αποδεκτή περίοδος αποθήκευσης και τα παρασκευάσματα φραγμού μεμβράνης δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται μετά από αυτή την περίοδο.

16. Η διαπερατή μεμβράνη υποστήριξης παρέχει μηχανική στήριξη στην πρωτεϊνούχο γέλη κατά τη διεργασία σχηματισμού της γέλης και την έκθεση στην υπό δοκιμή χημική ουσία. Η μεμβράνη υποστήριξης θα πρέπει να αποτρέπει τη χαλάρωση ή τη μετατόπιση της γέλης και θα πρέπει να είναι εύκολα διαπερατή από όλες τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες.

17. Η πρωτεϊνούχος γέλη αποτελείται από πρωτεΐνες, π.χ. κερατίνη, κολλαγόνο, ή μείγματα πρωτεϊνών που σχηματίζουν μία μήτρα γέλης, και χρησιμεύει ως στόχος για την υπό δοκιμή χημική ουσία. Το πρωτεϊνούχο υλικό τοποθετείται στην επιφάνεια της μεμβράνης υποστήριξης και αφήνεται να σχηματίσει γέλη προτού ο φραγμός μεμβράνης τοποθετηθεί πάνω από το διάλυμα δείκτη. Το πάχος και η πυκνότητα της πρωτεϊνούχου γέλης θα πρέπει να είναι ομοιόμορφα σε όλη τη γέλη και δεν θα πρέπει να υπάρχουν φυσαλίδες αέρα ή ελαττώματα που θα μπορούσαν να βλάψουν τη λειτουργική ακεραιότητά της.

Σύστημα ανίχνευσης χημικών ουσιών (CDS)

18. Το διάλυμα δείκτης, που είναι το ίδιο διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για τη δοκιμή συμβατότητας, θα πρέπει να αποκρίνεται στην παρουσία υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται χρωματικός δείκτης ή συνδυασμός χρωματικών δεικτών pH, π.χ. ερυθρό κρεζόλης και πορτοκαλί του μεθυλίου, που θα αλλάξουν χρώμα παρουσία της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Το σύστημα μέτρησης μπορεί να είναι οπτικό ή ηλεκτρονικό.

19. Τα συστήματα ανίχνευσης που αναπτύσσονται για την ανίχνευση της διέλευσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μέσω της μεμβράνης φραγμού θα πρέπει να αξιολογούνται ως προς την καταλληλότητα και την αξιοπιστία τους προκειμένου να καταδεικνύεται το φάσμα των χημικών ουσιών που μπορούν να ανιχνευθούν καθώς και τα ποσοτικά όρια της ανίχνευσης.

ΕΠΙΔΟΣΕΙΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Συναρμολόγηση των στοιχείων της μεθόδου δοκιμών

20. Ο φραγμός μεμβράνης τοποθετείται σε φιαλίδιο (ή σωλήνα) που περιέχει το διάλυμα δείκτη κατά τρόπον ώστε η μεμβράνη υποστήριξης να έρχεται σε πλήρη επαφή με το διάλυμα δείκτη χωρίς να υπάρχουν φυσαλίδες αέρα. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να διασφαλίζεται η ακεραιότητα του φραγμού.

▼M8

Εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας

21. Κατάλληλη ποσότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, π.χ. 500 μl υγρού ή 500 mg στερεού που έχει κονιοποιηθεί σε λεπτούς κόκκους (7), επιστρώνεται προσεκτικά και κατανέμεται ομοιόμορφα στην επάνω επιφάνεια του φραγμού μεμβράνης. Προετοιμάζεται κατάλληλος αριθμός πανομοιότυπων φιαλιδίων, π.χ. τέσσερις (7) για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία και τους αντίστοιχους μάρτυρες (βλ. παραγράφους 23 έως 25). Καταγράφεται η χρονική στιγμή εφαρμογής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον φραγμό μεμβράνης. Προκειμένου να διασφαλίζεται η ορθή καταγραφή των σύντομων χρόνων διάβρωσης, η υπό δοκιμή χημική ουσία τοποθετείται σε κάθε πανομοιότυπο φιαλίδιο αφού παρέλθει ένα ορισμένο χρονικό διάστημα μετά την τοποθέτηση στο προηγούμενο φιαλίδιο.

Μέτρηση διεισδύσεων φραγμού μεμβράνης

22. Κάθε φιαλίδιο παρακολουθείται δεόντως, καταγράφεται η χρονική στιγμή της πρώτης παρατηρούμενης αλλαγής στο διάλυμα δείκτη, δηλαδή της διείσδυσης μέσω του φραγμού, και προσδιορίζεται ο χρόνος μεταξύ της εφαρμογής και της διείσδυσης μέσω του φραγμού μεμβράνης.

Μάρτυρες

23. Σε δοκιμές που περιλαμβάνουν τη χρήση φορέα ή διαλύτη με την υπό δοκιμή χημική ουσία, ο φορέας ή ο διαλύτης θα πρέπει να είναι συμβατοί με το σύστημα φραγμού μεμβράνης, δηλ. να μην υποβαθμίζουν την ακεραιότητα του συστήματος φραγμού μεμβράνης, και δεν θα πρέπει να αλλοιώνουν τη διαβρωτικότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Ανάλογα με την περίπτωση, ένας μάρτυρας διαλύτη (ή φορέα) θα πρέπει να υποβάλλεται σε δοκιμή παράλληλα με την υπό δοκιμή χημική ουσία προκειμένου να καταδεικνύεται η συμβατότητα του διαλύτη με το σύστημα φραγμού μεμβράνης.

24. Ένας θετικός (διαβρωτικός) μάρτυρας μέτριας διαβρωτικής δραστηριότητας, π.χ. 110 ± 15 mg υδροξειδίου του νατρίου (υποκατηγορία διαβρωτικών 1B του GHS του ΟΗΕ) (7), θα πρέπει να υποβάλλεται σε δοκιμή παράλληλα με την υπό δοκιμή χημική ουσία προκειμένου να αξιολογείται κατά πόσον οι επιδόσεις του συστήματος δοκιμής είναι αποδεκτές. Ένας δεύτερος θετικός μάρτυρας της ίδιας χημικής κατηγορίας με την υπό δοκιμή χημική ουσία μπορεί να είναι χρήσιμος για την αξιολόγηση του σχετικού δυναμικού διαβρωτικότητας μιας διαβρωτικής ουσίας. Θα πρέπει να επιλέγονται θετικοί μάρτυρες μέτριας διαβρωτικότητας (π.χ. υποκατηγορία 1B του GHS του ΟΗΕ) προκειμένου να ανιχνεύονται αλλαγές που επιμηκύνουν ή συντομεύουν τον χρόνο διείσδυσης σε βαθμό μη αποδεκτό σε σχέση με την καθορισμένη τιμή αναφοράς, και που, ως εκ τούτου, υποδεικνύουν ότι το σύστημα δοκιμής δεν λειτουργεί σωστά. Για τον σκοπό αυτό, οι εξαιρετικά διαβρωτικές (υποκατηγορία 1A του GHS του ΟΗΕ) ή οι μη διαβρωτικές χημικές ουσίες δεν είναι ιδιαίτερα χρήσιμες. Μια διαβρωτική χημική ουσία υποκατηγορίας 1B του GHS του ΟΗΕ θα επιτρέψει τον εντοπισμό ιδιαίτερα σύντομου ή ιδιαίτερα αργού χρόνου διαφυγής. Ένα ασθενές διαβρωτικό (υποκατηγορία 1C του GHS του ΟΗΕ) μπορεί να χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας για τη μέτρηση της ικανότητας της μεθόδου δοκιμών να διακρίνει με συνέπεια τις ασθενώς διαβρωτικές από τις μη διαβρωτικές ουσίες. Ανεξάρτητα από τη χρησιμοποιούμενη προσέγγιση, θα πρέπει να αναπτύσσεται ένα αποδεκτό εύρος απόκρισης θετικού μάρτυρα με βάση το ιστορικό εύρος χρόνων διαφυγής για τους χρησιμοποιούμενους θετικούς μάρτυρες, όπως οι μέσες τιμές ± 2-3 τυπικές αποκλίσεις. Σε κάθε μελέτη, θα πρέπει να καθορίζεται ο ακριβής χρόνος διαφυγής για τον θετικό μάρτυρα ούτως ώστε να είναι εφικτός ο εντοπισμός των αποκλίσεων που δεν εμπίπτουν στο αποδεκτό εύρος.

25. Επίσης, θα πρέπει να υποβάλλεται σε δοκιμή αρνητικός (μη διαβρωτικός) μάρτυρας, π.χ. 10 % κιτρικό οξύ, 6 % προπιονικό οξύ (7), παράλληλα με την υπό δοκιμή χημική ουσία, ως ένα ακόμη μέτρο ποιοτικού ελέγχου που καταδεικνύει τη λειτουργική ακεραιότητα του φραγμού μεμβράνης.

▼M8

Κριτήρια αποδοχής της μελέτης

26. Σύμφωνα με τις καθιερωμένες χρονικές παραμέτρους για καθεμία από τις υποκατηγορίες διαβρωτικότητας του GHS του ΟΗΕ, ο χρόνος (σε λεπτά) που παρέρχεται μεταξύ της εφαρμογής μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον φραγμό μεμβράνης και της διείσδυσης διαμέσου του φραγμού χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη της διαβρωτικότητας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Προκειμένου μια μελέτη να θεωρηθεί αποδεκτή, ο παράλληλος θετικός μάρτυρας θα πρέπει να εμφανίζει τον αναμενόμενο χρόνο απόκρισης διείσδυσης (π.χ. 8-16 λεπτά χρόνου διαφυγής για το υδροξείδιο του νατρίου, εφόσον χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας), ο παράλληλος αρνητικός μάρτυρας δεν θα πρέπει να είναι διαβρωτικός, και, εφόσον περιλαμβάνεται, ο παράλληλος μάρτυρας με διαλύτη δεν θα πρέπει να είναι ούτε διαβρωτικός ούτε να αλλοιώνει το δυναμικό διαβρωτικότητας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Πριν χρησιμοποιήσουν στην καθημερινή πρακτική μια μέθοδο που συμφωνεί με την παρούσα μέθοδο δοκιμών, τα εργαστήρια θα πρέπει να μπορούν να αποδείξουν την τεχνική τους ικανότητα, χρησιμοποιώντας τις συνιστώμενες δώδεκα ουσίες που εμφαίνονται στον πίνακα 2. Για τις νέες μεθόδους παρόμοιου τύπου («me-too») που αναπτύσσονται βάσει της παρούσας μεθόδου δοκιμών και οι οποίες είναι δομικά και λειτουργικά παρεμφερείς με την επικυρωμένη μέθοδο αναφοράς (14), θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τα προκαθορισμένα πρότυπα επιδόσεων για να καταδεικνύεται η αξιοπιστία και η ορθότητα της νέας μεθόδου, πριν από τη χρήση της για τη διεξαγωγή δοκιμών για κανονιστικούς σκοπούς (10).

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων και κατηγοριοποίηση διαβρωτικότητας των υπό δοκιμή χημικών ουσιών

27. Ο χρόνος (σε λεπτά) που παρέρχεται μεταξύ της εφαρμογής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον φραγμό μεμβράνης και της διείσδυσης μέσω της μεμβράνης χρησιμοποιείται για την ταξινόμηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ως προς τις υποκατηγορίες διαβρωτικών του GHS του ΟΗΕ (1) και, ανάλογα με την περίπτωση, την ομάδα συσκευασίας ΟΗΕ (16). Για κάθε προτεινόμενη μέθοδο δοκιμών καθορίζονται τιμές χρόνου αποκοπής για καθεμία από τις τρεις υποκατηγορίες διαβρωτικών. Κατά τις τελικές αποφάσεις σχετικά με τους χρόνους αποκοπής θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η ανάγκη ελαχιστοποίησης της υποτίμησης της επικινδυνότητας διάβρωσης κατά την ταξινόμηση (ψευδοαρνητικά αποτελέσματα). Στην παρούσα κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οι χρόνοι αποκοπής της μεθόδου Corrositex®, όπως δίνονται στον πίνακα 3, διότι αυτή είναι η μοναδική μέθοδος δοκιμών που εμπίπτει επί του παρόντος στην κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (7).

Πίνακας 3

Μοντέλο πρόβλεψης Corrositex®

Μέσος χρόνος διαφυγής (λεπτά)		Πρόβλεψη του GHS του ΟΗΕ ([3])
Χημικές ουσίες δοκιμής κατηγορίας 1 ([1]) (καθορίζονται βάσει της δοκιμής κατηγοριοποίησης της μεθόδου)	Χημικές ουσίες δοκιμής κατηγορίας 2 ([2]) (καθορίζονται βάσει της δοκιμής κατηγοριοποίησης της μεθόδου)	
0-3 λεπτά	0-3 λεπτά	Διαβρωτικό προαιρετική υποκατηγορία 1A
> 3 έως 60 λεπτά	> 3 έως 30 λεπτά	Διαβρωτικό προαιρετική υποκατηγορία 1B
> 60 έως 240 λεπτά	> 30 έως 60 λεπτά	Διαβρωτικό προαιρετική υποκατηγορία 1C
> 240 λεπτά	> 60 λεπτά	Μη διαβρωτικό

([1]) Υπό δοκιμή χημικές ουσίες με υψηλό όξινο/αλκαλικό απόθεμα (6)
([2]) Υπό δοκιμή χημικές ουσίες με χαμηλό όξινο/αλκαλικό απόθεμα (6)
([3]) Υποκατηγορίες 1A, 1B και 1C του GHS του ΟΗΕ που αντιστοιχούν στις ομάδες συσκευασίας I, II και III του ΟΗΕ αντίστοιχα

▼**M8**

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Δεδομένα

28. Ο χρόνος (σε λεπτά) που παρέρχεται μεταξύ της εφαρμογής και της διείσδυσης μέσω του φραγμού για την υπό δοκιμή χημική ουσία και τον θετικό μάρτυρα/-ες θα πρέπει να αναφέρεται υπό μορφή πίνακα ως δεδομένα μεμονωμένων πανομοιότυπων δειγμάτων, καθώς και ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση για κάθε δοκιμή.

Έκθεση δοκιμής

29. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία και μάρτυρες:

— Μονοσυστατική ουσία: ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμίξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

— Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγμα: περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες,

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

— προέλευση, αριθμός παρτίδας εάν είναι διαθέσιμος,

— κατεργασία της υπό δοκιμή χημικής ουσίας/μάρτυρα πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, κονιοποίηση),

— σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, καταληκτική ημερομηνία χρήσης ή ημερομηνία νέας ανάλυσης, εάν είναι γνωστή,

— συνθήκες φύλαξης.

Φορέας:

— ταυτοποίηση, συγκέντρωση (κατά περίπτωση), όγκος που χρησιμοποιήθηκε,

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα.

Χρησιμοποιούμενο in vitro μοντέλο φραγμού μεμβράνης και πρωτόκολλο, περιλαμβανομένης της καταδειχθείσας ορθότητας και αξιοπιστίας

Συνθήκες δοκιμής:

— περιγραφή του χρησιμοποιηθέντος εξοπλισμού και διαδικασιών προετοιμασίας,

— προέλευση και σύνθεση του χρησιμοποιηθέντος *in vitro* φραγμού μεμβράνης,

— σύνθεση και ιδιότητες του διαλύματος δείκτη,

— μέθοδος ανίχνευσης,

— ποσότητες υπό δοκιμή χημικής ουσίας και μαρτύρων,

— αριθμός πανομοιότυπων δειγμάτων,

— περιγραφή και αιτιολόγηση της δοκιμής κατηγοριοποίησης χρονικής κλίμακας,

▼**M8**

— μέθοδος εφαρμογής,

— χρόνοι παρατήρησης,

— περιγραφή των κριτηρίων αξιολόγησης και ταξινόμησης που εφαρμόστηκαν,

— κατάδειξη της τεχνικής ικανότητας διεξαγωγής της μεθόδου δοκιμών προτού χρησιμοποιηθεί στην καθημερινή πρακτική, μέσω ελέγχου των χημικών ουσιών ελέγχου ικανότητας.

Αποτελέσματα:

— παρουσίαση υπό μορφή πίνακα των ατομικών ανεπεξέργαστων δεδομένων από μεμονωμένα δείγματα δοκιμής και μάρτυρα για κάθε πανομοιότυπο δείγμα,

— περιγραφή άλλων επιδράσεων που παρατηρήθηκαν,

— ταξινόμηση στην οποία κατέληξε η δοκιμή, με αναφορά του μοντέλου πρόβλεψης / των κριτηρίων απόφασης που χρησιμοποιήθηκαν.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Κεφάλαιο Β.4 του παρόντος παραρτήματος: Οξείας μορφής ερεθισμός/διάβρωση του δέρματος.

(3) Κεφάλαιο Β.40α του παρόντος παραρτήματος: Διάβρωση του δέρματος *in vitro*: μέθοδος δοκιμών σε ανασυσταθείσα ανθρώπινη επιδερμίδα (RhE).

(4) Κεφάλαιο Β.40 του παρόντος παραρτήματος: Διάβρωση του δέρματος *in vitro*: Διαδερμική ηλεκτρική αντίσταση (TER).

(5) OECD (2015). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.-G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicology *In Vitro* 12, 483-524.

(7) ICCVAM (1999). Corrositex®. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication (No 99-4495.)

(8) Gordon V.C., Harvell J.D. and Maibach H.I. (1994). Dermal Corrosion, the Corrositex® System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro* Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Alternative Methods in Toxicology 10, 37-45.

▼**M8**

(9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications. Series on testing and Assessment (No 34).

(10) OECD (2014). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf.

(11) ECVAM (2001). Statement on the Application of the CORROSITEX® Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispra, Italy. ATLA 29, 96-97.

(12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision). (September 20, 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.

(13) Κεφάλαιο B.46 του παρόντος παραρτήματος: Δερματικός ερεθισμός *in vitro*: μέθοδος δοκιμών σε ανασυσταθείσα ανθρώπινη επιδερμίδα. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.

(14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf.

(15) United Nations (UN) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Part, Chapter 2.8), UN, 2013. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

▼**M8**

Προσάρτημα

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ορθότητα: ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί κριτήριο επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών και μια από τις πτυχές της «καταλληλότητας». Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς τη «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας μεθόδου δοκιμών (9).

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Σύστημα ανίχνευσης χημικών ουσιών (CDS): σύστημα οπτικής ή ηλεκτρονικής μέτρησης με διάλυμα δείκτη που αντιδρά στην παρουσία μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας, π.χ. με αλλαγή του χρωματικού δείκτη ή του συνδυασμού χρωματικών δεικτών pH, των οποίων το χρώμα αλλάζει παρουσία της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, ή με άλλα είδη χημικών ή ηλεκτροχημικών αντιδράσεων.

Συμφωνία: μέτρο των επιδόσεων των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Ο όρος χρησιμοποιείται ενίοτε εναλλακτικά προς τον όρο «ορθότητα», και ορίζεται ως το ποσοστό επί του συνόλου των υπό δοκιμή χημικών ουσιών που έχουν ταξινομηθεί ορθά ως θετικές ή αρνητικές. Η συμφωνία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον επιπολασμό των θετικών ουσιών στα είδη των υπό δοκιμή χημικών ουσιών που ελέγχονται (9).

GHS (Globally Harmonised System for the Classification and Labelling of Chemicals – Παγκόσμια Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Προϊόντων): σύστημα που προτείνει την ταξινόμηση των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) με βάση τυποποιημένα είδη και βαθμούς φυσικής επικινδυνότητας και επικινδυνότητας για την υγεία και το περιβάλλον και καλύπτει τα αντίστοιχα στοιχεία γνωστοποίησης, όπως εικονογράμματα, προειδοποιητικές λέξεις, δηλώσεις επικινδυνότητας, δηλώσεις προφύλαξης και δελτία δεδομένων ασφαλείας, με τα οποία γνωστοποιούνται πληροφορίες σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις με σκοπό την προστασία των ανθρώπων (εργοδοτών, εργαζομένων, μεταφορέων, καταναλωτών και διασωστών) και του περιβάλλοντος (1).

IATA (Integrated Approach on Testing and Assessment): ολοκληρωμένη προσέγγιση για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση.

Μείγμα: ένα μείγμα ή διάλυμα που αποτελείται από δύο ή περισσότερες ουσίες.

Μονοσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας ένα κύριο συστατικό περιέχεται σε ποσοστό τουλάχιστον 80 % κ.β.

Πολυσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας περισσότερα από ένα κύρια συστατικά περιέχονται σε συγκέντρωση ≥ 10 % κ.β. και < 80 % κ.β. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα μεταποιητικών διεργασιών. Η διαφορά μεταξύ μείγματος και πολυσυστατικής ουσίας είναι ότι το μείγμα λαμβάνεται με ανάμειξη δύο ή περισσότερων ουσιών, χωρίς χημική αντίδραση. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα χημικών αντιδράσεων.

NC: μη διαβρωτικό.

Πρότυπα επιδόσεων: πρότυπα που βασίζονται σε επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών και παρέχουν τη βάση για την αξιολόγηση της συγκρισιμότητας προτεινόμενης μεθόδου δοκιμών η οποία είναι μηχανιστικά και λειτουργικά παρεμφερής. Περιλαμβάνονται i) βασικά στοιχεία της μεθόδου δοκιμών, ii) κατάλογος ελάχιστων ουσιών αναφοράς, οι οποίες έχουν επιλεγεί μεταξύ των χημικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για την απόδειξη των αποδεκτών επιδόσεων της επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς, και iii) τα ανάλογα επίπεδα αξιοπιστίας και ορθότητας, που βασίζονται στα επιτευχθέντα για την επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών και τα οποία πρέπει να επιδεικνύει η προτεινόμενη μέθοδος δοκιμών, όταν αξιολογείται με χρήση του καταλόγου ελαχίστων ουσιών αναφοράς (9).

▼**M8**

Καταλληλότητα: περιγραφή της σχέσης της μεθόδου δοκιμών με την υπό μελέτη επίδραση και του κατά πόσον αυτή είναι αρμόζουσα και χρήσιμη για συγκεκριμένο σκοπό. Πρόκειται για τον βαθμό στον οποίο η μέθοδος δοκιμών μετρά ή προβλέπει σωστά τη βιολογική επίδραση υπό μελέτη. Η καταλληλότητα εμπεριέχει συνεκτίμηση της ορθότητας (συμφωνίας) της μεθόδου δοκιμών (9).

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια μέθοδος δοκιμών μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (9).

Ευαισθησία: το ποσοστό του συνόλου των θετικών/δραστικών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των μεθόδων δοκιμών (9).

Διάβρωση του δέρματος *in vivo*: η πρόκληση μη αναστρέψιμων βλαβών στο δέρμα, όπως εμφανούς νεκρώσεως που διαπερνά την επιδερμίδα φθάνοντας στο χόριο, μετά την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας για χρονικό διάστημα έως 4 ωρών. Τυπικές διαβρωτικές αντιδράσεις είναι τα έλκη, η αιμορραγία, οι αιματηρές εσχάρες και, στο τέλος της παρατήρησης μετά παρέλευση 14 ημερών, ο αποχρωματισμός λόγω λευκοδερμίας, επιφάνειες με τέλεια αλωπεκία και ουλές. Για την αξιολόγηση των αμφισβητήσιμων αλλοιώσεων θα πρέπει να διερευνάται η δυνατότητα ιστοπαθολογικής εξέτασης.

Ειδικότητα: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών/αδρανών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των μεθόδων δοκιμών (9).

Ουσία: ένα χημικό στοιχείο και οι ενώσεις του σε φυσική κατάσταση ή όπως λαμβάνονται με οποιαδήποτε παραγωγική διεργασία, στα οποία συμπεριλαμβάνονται όλα τα πρόσθετα που απαιτούνται για να διατηρείται η σταθερότητά του, καθώς και τυχόν προσμείξεις που προκύπτουν από τη χρησιμοποιούμενη διεργασία, αλλά από τα οποία εξαιρούνται οι διαλύτες που είναι δυνατόν να διαχωριστούν χωρίς να επηρεαστεί η σταθερότητα της ουσίας ούτε να μεταβληθεί η σύνθεσή της.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

UVCB: ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, πολύπλοκα προϊόντα αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά.

▼M8

Β.66 *IN VITRO* ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΔΙΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΑΘΕΡΩΣ ΔΙΑΜΟΛΥΝΘΕΝΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΓΩΝΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΩΝ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών του ΟΟΣΑ με βάση τις επιδόσεις

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 455 του ΟΟΣΑ (2016). Η TG 455 είναι μια κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών με βάση τις επιδόσεις (PBTG), στην οποία περιγράφονται οι *in vitro* δοκιμασίες διενεργοποίησης σταθερώς διαμολυνθέντων κυττάρων για την ανίχνευση αγωνιστών και ανταγωνιστών των υποδοχέων οιστρογόνων (δοκιμασίες ER TA). Περιλαμβάνει αρκετές μηχανιστικά και λειτουργικά παρεμφερείς μεθόδους δοκιμών για τον προσδιορισμό των αγωνιστών και ανταγωνιστών των υποδοχέων οιστρογόνων (δηλ. ERα και/ή ERβ) και αναμένεται να διευκολύνει την ανάπτυξη νέων παρεμφερών ή τροποποιημένων μεθόδων δοκιμών, σύμφωνα με τις αρχές επικύρωσης που καθορίζονται στο έγγραφο καθοδήγησης «Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment» (Έγγραφο καθοδήγησης για την επικύρωση και τη διεθνή αποδοχή νέων ή επικαιροποιημένων μεθόδων δοκιμών για την αξιολόγηση του κινδύνου) του ΟΟΣΑ (1). Οι πλήρως επικυρωμένες μέθοδοι δοκιμών αναφοράς (προσάρτημα 2 και προσάρτημα 3) που αποτελούν τη βάση για την εν λόγω PBTG είναι οι ακόλουθες:

— Η δοκιμασία διενεργοποίησης σταθερώς διαμολυνθέντων κυττάρων (STTA) (2) όπου χρησιμοποιείται η κυτταρική σειρά (h) ERα-HeLa-9903, και

— Η δοκιμασία ER TA VM7Luc (3) όπου χρησιμοποιείται η κυτταρική σειρά VM7Luc4E2 ([1]), η οποία εκφράζει κυρίως τον hERα με κάποια συμβολή και του hERβ (4)(5).

Όσον αφορά την ανάπτυξη και την επικύρωση παρεμφερών δοκιμασιών για την ίδια παράμετρο επικινδυνότητας, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τα διαθέσιμα πρότυπα επιδόσεων (6) (7). Επιτρέπουν την έγκαιρη τροποποίηση της PBTG 455, ούτως ώστε να υπάρχει η δυνατότητα να προστίθενται νέες παρεμφερείς δοκιμασίες σε μια επικαιροποιημένη PBTG· εντούτοις, παρεμφερείς δοκιμασίες θα προστίθενται μόνο αφού τις εξετάσει ο ΟΟΣΑ και συμφωνήσει ότι πληρούνται τα πρότυπα επιδόσεων. Οι δοκιμασίες που περιλαμβάνονται στην TG 455 μπορούν να χρησιμοποιούνται αδιακρίτως για τη συαμμόρφωση προς τις απαιτήσεις των χωρών μελών του ΟΟΣΑ όσον αφορά τα αποτελέσματα δοκιμών σχετικά με τη διενεργοποίηση των υποδοχέων οιστρογόνων, με παράλληλη αξιοποίηση της αμοιβαίας αποδοχής δεδομένων του ΟΟΣΑ.

Ιστορικό και αρχές των δοκιμασιών που περιλαμβάνονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών

2. Το 1998 ο ΟΟΣΑ ανέλαβε μια δράση πρώτης προτεραιότητας με σκοπό την αναθεώρηση των υφιστάμενων και την εκπόνηση νέων κατευθυντήριων γραμμών δοκιμών για τη διαλογή και τις δοκιμές δυνητικών ενδοκρινικών

([1]) Πριν από τον Ιούνιο του 2016 αυτή η κυτταρική σειρά ονομαζόταν BG1Luc. Τα κύτταρα BG-1 περιγράφηκαν αρχικά από τους Geisinger et al. (1998) (35) και χαρακτηρίστηκαν αργότερα από ερευνητές του Εθνικού Ινστιτούτου Περιβαλλοντικών Επιστημών Υγείας των ΗΠΑ (NIEHS) (36). Σχετικά πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι υπάρχουν δύο διαφορετικές παραλλαγές των κυττάρων BG-1 που χρησιμοποιούνται από τους ερευνητές, τα κύτταρα BG-1 Fr και BG-1 NIEHS. Εις βάθος ανάλυση, που περιλάμβανε και αναλύσεις DNA, αυτών των δύο παραλλαγών της κυτταρικής σειράς BG-1, που διενήργησαν οι Li και συνεργάτες (2014) (37), κατέδειξε ότι η BG-1 Fr ήταν μοναδική και ότι η BG-1 NIEHS, δηλαδή η αρχική κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη της δοκιμασίας, δεν ήταν η κυτταρική σειρά καρκινώματος των ωοθηκών του ανθρώπου BG1 αλλά μια παραλλαγή της κυτταρικής σειράς καρκίνου του μαστού του ανθρώπου MCF7. Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε στη δοκιμασία, η οποία ονομαζόταν αρχικά BG1Luc4E2 (38), θα ονομάζεται στο εξής VM7Luc4E2 («V» = παραλλαγή· «M7» = κύτταρα MCF7). Αντίστοιχα, η δοκιμασία θα ονομάζεται στο εξής ER TA VM7Luc. Παρότι, με βάση τα παραπάνω, αλλάζει η προέλευση της κυτταρικής σειράς στην οποία βασίζεται η δοκιμασία, δεν επηρεάζονται οι δημοσιευμένες μελέτες επικύρωσης ούτε η χρησιμότητα και η εφαρμογή της εν λόγω δοκιμασίας για τη διαλογή των χημικών ουσιών με οιστρογόνο/αντιοιστρογόνο δράση.

▼**M8**

διαταρακτών. Το εννοιακό πλαίσιο του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση δυνητικών ενδοκρινικών διαταρακτών αναθεωρήθηκε το 2012. Το αρχικό και το αναθεωρημένο εννοιακό πλαίσιο περιλαμβάνονται ως παραρτήματα στο έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ «Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption» (Τυποποιημένες κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών για την αξιολόγηση του δυναμικού χημικών ουσιών ως ενδοκρινικών διαταρακτών) (8). Το εννοιακό πλαίσιο περιλαμβάνει πέντε επίπεδα, καθένα εκ των οποίων αντιστοιχεί σε διαφορετικό επίπεδο βιολογικής πολυπλοκότητας. Οι δοκιμασίες διενεργοποίησης (ΤΑ) ER που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών κατατάσσονται στο επίπεδο 2, το οποίο περιλαμβάνει «*in vitro δοκιμασίες για την παροχή δεδομένων σχετικά με επιλεγμένους ενδοκρινικούς μηχανισμούς/οδούς*». Η παρούσα μέθοδος δοκιμών αφορά *in vitro* δοκιμασίες διενεργοποίησης (ΤΑ) που έχουν σχεδιαστεί για τον προσδιορισμό των αγωνιστών και ανταγωνιστών των υποδοχέων οιστρογόνων (ER).

3. Η αλληλεπίδραση των οιστρογόνων με τους ER μπορεί να επηρεάσει τη μεταγραφή των ελεγχόμενων από τα οιστρογόνα γονιδίων, με αποτέλεσμα την επαγωγή ή την αναστολή κυτταρικών διεργασιών, περιλαμβανομένων όσων είναι αναγκαίες για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τη φυσιολογική ανάπτυξη του εμβρύου και την αναπαραγωγική λειτουργία (9)(10)(11). Η διατάραξη των φυσιολογικών οιστρογονικών συστημάτων μπορεί να προκαλέσει δυσμενείς επιπτώσεις στη φυσιολογική ανάπτυξη (οντογένεση), την αναπαραγωγική υγεία και την ακεραιότητα του αναπαραγωγικού συστήματος.

4. Οι *in vitro* δοκιμασίες ΤΑ βασίζονται στην άμεση ή έμμεση αλληλεπίδραση των ουσιών με ειδικό υποδοχέα που ρυθμίζει τη μεταγραφή προϊόντος γονιδίου αναφοράς. Οι δοκιμασίες αυτές χρησιμοποιούνται ευρέως για την αξιολόγηση της γονιδιακής έκφρασης που ρυθμίζεται από ειδικούς πυρηνικούς υποδοχείς όπως οι ER (12) (13) (14) (15) (16). Έχουν προταθεί για την ανίχνευση της οιστρογονικής διενεργοποίησης που ρυθμίζεται από τον ER (17) (18) (19). Υπάρχουν τουλάχιστον δύο κύριοι υποτύποι πυρηνικών ER, οι α και β, που κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια. Οι αντίστοιχες πρωτεΐνες έχουν διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες καθώς και διαφορετικές κατανομές στους ιστούς και συγγένειες δέσμευσης προσδεμάτων (20)(21)(22)(23)(24)(25)(26). Ο πυρηνικός ERα διαμεσολαβεί την κλασική οιστρογονική απόκριση (27)(28)(29)(30) και, ως εκ τούτου, τα περισσότερα μοντέλα που αναπτύσσονται σήμερα για τη μέτρηση της ενεργοποίησης ή αναστολής των ER αφορούν ειδικά τον ERα. Οι δοκιμασίες χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των χημικών ουσιών πουενεργοποιούν (ή αναστέλλουν) τον ER μετά τη δέσμευση του προσδέματος, μετά την οποία το σύμπλοκο υποδοχέα-προσδέματος συνδέεται σε ειδικά στοιχεία απόκρισης του DNA και διενεργοποιεί ένα γονίδιο αναφοράς, με αποτέλεσμα αυξημένη κυτταρική έκφραση μιας πρωτεΐνης δείκτη. Στις δοκιμασίες αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικές αποκρίσεις γονιδίων αναφοράς. Σε συστήματα που βασίζονται στη λουσιφεράση, το ένζυμο λουσιφεράση μετασχηματίζει το υπόστρωμα λουσιφερίνη σε βιοφωταυγές προϊόν που μπορεί να μετρηθεί ποσοτικά με λουμινόμετρο. Άλλα παραδείγματα κοινών γονιδίων αναφοράς είναι η φθορίζουσα πρωτεΐνη και το γονίδιο *LacZ*, που κωδικοποιεί τη β-γαλακτοσιδάση, ένα ένζυμο που μπορεί να μετασχηματίσει το άχρωμο υπόστρωμα X-gal (5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλογαλακτοπυρανοζίτης) σε κυανό προϊόν που μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με φασματοφωτόμετρο. Τα εν λόγω γονίδια αναφοράς μπορούν να αξιολογηθούν γρήγορα και με χαμηλό κόστος με χρήση εμπορικά διαθέσιμων κιτ δοκιμής.

5. Μελέτες επικύρωσης της STTA και των δοκιμασιών VM7Luc έχουν καταδείξει την καταλληλότητα και την αξιοπιστία τους ως προς τον σκοπό για τον οποίο προορίζονται (3)(4)(5)(30). Τα πρότυπα επιδόσεων για τις δοκιμασίες ER ΤΑ με βάση τη φωταύγεια που χρησιμοποιούν κυτταρικές σειρές μαστού περιλαμβάνονται στην έκθεση αξιολόγησης μεθόδων δοκιμών ICCVAM για τη μέθοδο δοκιμών LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3). Τα εν λόγω πρότυπα επιδόσεων έχουν τροποποιηθεί με σκοπό να μπορούν να εφαρμόζονται και στις δύο δοκιμασίες ΤΑ, την STTA και τη VM7Luc (2).

6. Οι ορισμοί και οι συντομογραφίες που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

▼M8

Πεδίο εφαρμογής και περιορισμοί που σχετίζονται με τις δοκιμασίες ΤΑ

7. Οι δοκιμασίες αυτές προτείνονται για σκοπούς διαλογής και απόδοσης προτεραιότητας, αλλά μπορούν επίσης να παρέχουν πληροφορίες μηχανιστικού χαρακτήρα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο πλαίσιο προσέγγισης βάρους της απόδειξης. Αφορούν ΤΑ που επάγεται από τη δέσμευση χημικών ουσιών στους ER σε σύστημα *in vitro*. Ως εκ τούτου, τα αποτελέσματα δεν θα πρέπει να παρεκβάλλονται άμεσα στην πολύπλοκη σηματοδότηση και ρύθμιση του ακέραιου ενδοκρινικού συστήματος *in vivo*.

8. Η ΤΑ που διαμεσολαβείται από τους ER θεωρείται ένας από τους κύριους μηχανισμούς διατάραξης του ενδοκρινικού συστήματος, αν και υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί όπως i) αλληλεπιδράσεις με άλλους υποδοχείς και ενζυμικά συστήματα του ενδοκρινικού συστήματος, ii) σύνθεση ορμονών, iii) μεταβολική ενεργοποίηση και/ή αδρανοποίηση ορμονών, iv) κατανομή των ορμονών στους ιστούς στόχους, και v) απομάκρυνση των ορμονών από το σώμα. Καμία από τις δοκιμασίες στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών δεν αφορά τους συγκεκριμένους τρόπους δράσης.

9. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών αφορά την ικανότητα των χημικών ουσιών να ενεργοποιούν (δηλ. να δρουν ως αγωνιστές) καθώς επίσης και να καταστέλλουν (δηλ. να δρουν ως ανταγωνιστές) της μεταγραφής που εξαρτάται από τους ER. Ορισμένες χημικές ουσίες μπορούν να δρουν τόσο ως αγωνιστές όσο και ως ανταγωνιστές, ανάλογα με τον τύπο του εκάστοτε κυττάρου, και είναι γνωστές ως επιλεκτικοί ρυθμιστές των υποδοχέων οιστρογόνων (SERM). Πριν από την εξαγωγή συμπεράσματος περί μη δέσμευσής τους στον ER, οι χημικές ουσίες που είναι αρνητικές στις δοκιμασίες αυτές μπορούν να αξιολογούνται σε δοκιμασία δέσμευσης στον υποδοχέα. Επιπλέον, οι δοκιμασίες χρησιμεύουν στη διευκρίνιση της δράσης του γονικού μορίου μόνον εφόσον ληφθούν υπόψη οι περιορισμένες μεταβολικές ικανότητες των *in vitro* κυτταρικών συστημάτων. Δεδομένου ότι κατά την επικύρωση χρησιμοποιήθηκαν μόνο μεμονωμένες χημικές ουσίες, δεν έχει εξεταστεί η εφαρμοσιμότητα σε μείγματα δοκιμών. Η μέθοδος δοκιμών είναι πάντως θεωρητικά εφαρμόσιμη στον έλεγχο πολυσυστατικών ουσιών, UVCB και μειγμάτων. Πριν από τη χρήση της μεθόδου δοκιμών σε πολυσυστατική ουσία, UVCB ή μείγμα για την παραγωγή δεδομένων για συγκεκριμένο κανονιστικό σκοπό, θα πρέπει να εξετάζεται αν –και, εάν ναι, για ποιον λόγο– μπορεί να αποδώσει αποτελέσματα κατάλληλα για τον επιδιωκόμενο σκοπό. Τέτοια εξέταση δεν χρειάζεται όταν οι κανονιστικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τον έλεγχο του μείγματος.

10. Για λόγους πληροφόρησης, στον πίνακα 1 παρατίθενται τα αποτελέσματα δοκιμών αγωνιστών για τις 34 ουσίες που υποβλήθηκαν σε δοκιμή στο πλαίσιο αμφότερων των πλήρως επικυρωμένων μεθόδων δοκιμών αναφοράς που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών. Εξ αυτών των ουσιών, οι 26 είναι ταξινομημένες ως οριστικοί αγωνιστές ER και οι 8 ως αρνητικές με βάση δημοσιευμένες εργασίες, περιλαμβανομένων και *in vitro* δοκιμασιών για δέσμευση στους ER και για ΤΑ, και/ή της μητροτροφικής δοκιμασίας (2)(3)(18)(31)(32)(33)(34). Στον πίνακα 2 παρατίθενται τα αποτελέσματα δοκιμών ανταγωνιστών για τις 15 ουσίες που υποβλήθηκαν σε δοκιμή στο πλαίσιο αμφότερων των πλήρως επικυρωμένων μεθόδων δοκιμών αναφοράς που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών. Εξ αυτών των ουσιών, οι 4 είναι ταξινομημένες ως οριστικοί/θεωρούμενοι ανταγωνιστές ER και οι 10 ως αρνητικές με βάση δημοσιευμένες εργασίες, περιλαμβανομένων και *in vitro* δοκιμασιών για δέσμευση στους ER και για ΤΑ (2)(3)(18)(31). Όσον αφορά τα δεδομένα που παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα 1 και στον πίνακα 2, υπήρξε 100 % συμφωνία μεταξύ των δύο μεθόδων δοκιμών αναφοράς σχετικά με τις ταξινομήσεις όλων των ουσιών, με εξαίρεση μία ουσία (μιφεπριστόνη) για δοκιμασία ανταγωνιστών, και κάθε ουσία ταξινομήθηκε σωστά ως αγωνιστής/ανταγωνιστής ER ή ως αρνητική. Συμπληρωματικές πληροφορίες σχετικά με την εν λόγω ομάδα χημικών ουσιών καθώς και πρόσθετων χημικών ουσιών που υποβλήθηκαν σε δοκιμή με τις μεθόδους ER ΤΑ STTA και VM7Luc στη διάρκεια των μελετών επικύρωσης παρέχονται στα πρότυπα επιδόσεων για την ERTA (6)(7), προσάρτημα 2 (πίνακες 1, 2 και 3).

▼M8

Πίνακας 1

Επισκόπηση των αποτελεσμάτων από τις δοκιμασίες STTA και ER TA VM7Luc για ουσίες που υποβλήθηκαν σε δοκιμή και στις δύο δοκιμασίες αγωνιστών και ταξινομήθηκαν ως αγωνιστές ER (ΘΕΤ.) ή αρνητικές (APN.)

	Ουσία	CASRN	Δοκιμασία STTA [1]			Δοκιμασία ER TA VM7Luc [2]		Πηγή δεδομένων για ταξινόμηση [4]		
			Δράση TA ER	Τιμή PC_{10} (M)	Τιμή PC_{50} [β] (M)	Δράση TA ER	Τιμή EC_{50} [β], [3] (M)	Άλλες ER TA [γ]	Δέσμευση στους ER	Μητροτροφική
1	17β-Οιστραδιόλη [α]	50-28-2	ΘΕΤ.	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	ΘΕΤ.	$5{,}63 \times 10^{-12}$	ΘΕΤ. (227/227)	ΘΕΤ.	ΘΕΤ.
2	17α-Οιστραδιόλη [α]	57-91-0	ΘΕΤ.	$7{,}24 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	ΘΕΤ.	$1{,}40 \times 10^{-9}$	ΘΕΤ.(11/11)	ΘΕΤ.	ΘΕΤ.
3	17α-Αιθινυλοιστραδιόλη [α]	57-63-6	ΘΕΤ.	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	ΘΕΤ.	$7{,}31 \times 10^{-12}$	ΘΕΤ.(22/22)	ΘΕΤ.	ΘΕΤ.
4	17β-Τρενβολόνη	10161-33-8	ΘΕΤ.	$1{,}78 \times 10^{-8}$	$2{,}73 \times 10^{-7}$	ΘΕΤ.	$4{,}20 \times 10^{-8}$	ΘΕΤ. (2/2)	Δ/Ε	Δ/Ε
5	19-Νορτεστοστερόνη [α]	434-22-0	ΘΕΤ.	$9{,}64 \times 10^{-9}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	ΘΕΤ.	$1{,}80 \times 10^{-6}$	ΘΕΤ.(4/4)	ΘΕΤ.	ΘΕΤ.
6	4-Κουμυλοφαινόλη [α]	599-64-4	ΘΕΤ.	$1{,}49 \times 10^{-7}$	$1{,}60 \times 10^{-6}$	ΘΕΤ.	$3{,}20 \times 10^{-7}$	ΘΕΤ.(5/5)	ΘΕΤ.	Δ/Ε
7	4-*tert*-Οκτυλοφαινόλη [α]	140-66-9	ΘΕΤ.	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	ΘΕΤ.	$3{,}19 \times 10^{-8}$	ΘΕΤ.(21/24)	ΘΕΤ.	ΘΕΤ.
8	Απιγενίνη [α]	520-36-5	ΘΕΤ.	$1{,}31 \times 10^{-7}$	$5{,}71 \times 10^{-7}$	ΘΕΤ.	$1{,}60 \times 10^{-6}$	ΘΕΤ.(26/26)	ΘΕΤ.	Δ/Ε
9	Ατραζίνη [α]	1912-24-9	APN.	–	–	APN.	–	APN. (30/30)	APN.	Δ/Ε
10	Δισφαινόλη Α [α]	80-05-7	ΘΕΤ.	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	ΘΕΤ.	$5{,}33 \times 10^{-7}$	ΘΕΤ. (65/65)	ΘΕΤ.	ΘΕΤ.
11	Δισφαινόλη Β [α]	77-40-7	ΘΕΤ.	$2{,}36 \times 10^{-8}$	$2{,}11 \times 10^{-7}$	ΘΕΤ.	$1{,}95 \times 10^{-7}$	ΘΕΤ.(6/6)	ΘΕΤ.	ΘΕΤ.
12	Φθαλικό βουτύλιο βενζύλιο [α]	85-68-7	ΘΕΤ.	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	ΘΕΤ.	$1{,}98 \times 10^{-6}$	ΘΕΤ.(12/14)	ΘΕΤ.	APN.

▼M8

	Ουσία	CASRN	Δοκιμασία STTA [1]			Δοκιμασία ER TA VM7Luc [2]		Πηγή δεδομένων για ταξινόμηση [4]		
			Δράση TA ER	Τιμή PC_{10} (M)	Τιμή PC_{50} [β] (M)	Δράση TA ER	Τιμή EC_{50} [β], [3] (M)	Άλλες ER TA [γ]	Δέσμευση στους ER	Μητροτροφική
13	Κορτικοστερόνη [α]	50-22-6	APN.	—	—	APN.	—	APN.(6/6)	APN.	Δ/E
14	Κουμεστρόλη [α]	479-13-0	ΘΕΤ.	$1{,}23 \times 10^{-9}$	$2{,}00 \times 10^{-8}$	ΘΕΤ.	$1{,}32 \times 10^{-7}$	ΘΕΤ.(30/30)	ΘΕΤ.	Δ/E
15	Δαϊδζεΐνη [α]	486-66-8	ΘΕΤ.	$1{,}76 \times 10^{-8}$	$1{,}51 \times 10^{-7}$	ΘΕΤ.	$7{,}95 \times 10^{-7}$	ΘΕΤ.(39/39)	ΘΕΤ.	ΘΕΤ.
16	Διαιθυλοστιλβεστρόλη [α]	56-53-1	ΘΕΤ.	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	ΘΕΤ.	$3{,}34 \times 10^{-11}$	ΘΕΤ.(42/42)	ΘΕΤ.	Δ/E
17	Φθαλικό δι-n-βουτύλιο	84-74-2	ΘΕΤ.	$4{,}09 \times 10^{-6}$		ΘΕΤ.	$4{,}09 \times 10^{-6}$	ΘΕΤ.(6/11)	ΘΕΤ.	APN.
18	4-Υδροξυβενζοϊκό αιθύλιο	120-47-8	ΘΕΤ.	$5{,}00 \times 10^{-6}$	(χωρίς PC_{50})	ΘΕΤ.	$2{,}48 \times 10^{-5}$	ΘΕΤ.		Δ/E
19	Οιστρόνη [α]	53-16-7	ΘΕΤ.	$3{,}02 \times 10^{-11}$	$5{,}88 \times 10^{-10}$	ΘΕΤ.	$2{,}34 \times 10^{-10}$	ΘΕΤ.(26/28)	ΘΕΤ.	ΘΕΤ.
20	Γενιστεΐνη [α]	446-72-0	ΘΕΤ.	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	ΘΕΤ.	$2{,}71 \times 10^{-7}$	ΘΕΤ.(100/102)	ΘΕΤ.	ΘΕΤ.
21	Αλοπεριδόλη	52-86-8	APN.	—	—	APN.	—	APN. (2/2)	APN.	Δ/E
22	Καμφερόλη [α]	520-18-3	ΘΕΤ.	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	ΘΕΤ.	$3{,}99 \times 10^{-6}$	ΘΕΤ.(23/23)	ΘΕΤ.	Δ/E
23	Κεπόνη [α]	143-50-0	ΘΕΤ.	$7{,}11 \times 10^{-7}$	$7{,}68 \times 10^{-6}$	ΘΕΤ.	$4{,}91 \times 10^{-7}$	ΘΕΤ.(14/18)	ΘΕΤ.	Δ/E
24	Κετοκοναζόλη	65277-42-1	APN.	—	—	APN.	—	APN. (2/2)	APN.	Δ/E
25	Λινουρόνη [α]	330-55-2	APN.	—	—	APN.	—	APN. (8/8)	APN.	Δ/E
26	*meso*-Εξεστρόλη [α]	84-16-2	ΘΕΤ.	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	ΘΕΤ.	$1{,}65 \times 10^{-11}$	ΘΕΤ.(4/4)	ΘΕΤ.	Δ/E
27	Μεθυλοτεστοστερόνη [α]	58-18-4	ΘΕΤ.	$1{,}73 \times 10^{-7}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	ΘΕΤ.	$2{,}68 \times 10^{-6}$	ΘΕΤ.(5/6)	ΘΕΤ.	Δ/E

▼M8

	Ουσία	CASRN	Δοκιμασία STTA ([1])			Δοκιμασία ER TA VM7Luc ([2])		Πηγή δεδομένων για ταξινόμηση ([4])		
			Δράση ΤΑ ER	Τιμή PC_{10} (M)	Τιμή PC_{50} ([β]) (M)	Δράση ΤΑ ER	Τιμή EC_{50} ([β]), ([3]) (M)	Άλλες ER TA ([γ])	Δέσμευση στους ER	Μητροτροφική
28	Μορίνη	480-16-0	ΘΕΤ.	$5{,}43 \times 10^{-7}$	$4{,}16 \times 10^{-6}$	ΘΕΤ.	$2{,}37 \times 10^{-6}$	ΘΕΤ.(2/2)	ΘΕΤ.	Δ/Ε
29	Νορεθυνοδρέλη ([α])	68-23-5	ΘΕΤ.	$1{,}11 \times 10^{-11}$	$1{,}50 \times 10^{-9}$	ΘΕΤ.	$9{,}39 \times 10^{-10}$	ΘΕΤ.(5/5)	ΘΕΤ.	Δ/Ε
30	*p,p*'-Methoxychlor ([α])	72-43-5	ΘΕΤ.	$1{,}23 \times 10^{-6}$	(χωρίς PC_{50}) ([α])	ΘΕΤ.	$1{,}92 \times 10^{-6}$	ΘΕΤ.(24/27)	ΘΕΤ.	ΘΕΤ.
31	Φαινοβαρβιτάλη ([α])	57-30-7	APN.	—	—	APN.	—	APN. (2/2)	APN.	Δ/Ε
32	Ρεσερπίνη	50-55-5	APN.	—	—	APN.	—	APN. (4/4)	APN.	Δ/Ε
33	Σπειρονολακτόνη ([α])	52-01-7	APN.	—	—	APN.	—	APN. (4/4)	APN.	Δ/Ε
34	Τεστοστερόνη	58-22-0	ΘΕΤ.	$2{,}82 \times 10^{-8}$	$9{,}78 \times 10^{-6}$	ΘΕΤ.	$1{,}75 \times 10^{-5}$	ΘΕΤ.(5/10)	ΘΕΤ.	Δ/Ε

Συντμήσεις: CASRN = αριθμός μητρώου της υπηρεσίας Chemical Abstracts Service, M = γραμμομοριακή, EC_{50} = ήμισυ της μέγιστης αποτελεσματικής συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, APN. = αρνητική, ΘΕΤ. = θετική, Δ/Ε = δεν ελέγχθηκε, PC_{10} (και PC_{50}) = η συγκέντρωση υπό δοκιμή ουσίας στην οποία η απόκριση είναι το 10 % (ή το 50 % για την PC_{50}) της απόκρισης που επάγεται από τον θετικό μάρτυρα (E2, 1 nm) σε κάθε τρυβλίο.

([α]) Κοινές ουσίες που υποβλήθηκαν σε δοκιμή στις δοκιμασίες ER TA STTA και VM7Luc και οι οποίες χαρακτηρίστηκαν αγωνιστές ER ή αρνητικές και χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της ορθότητας στη μελέτη επικύρωσης ER TA VM7Luc (έκθεση αξιολόγησης ICCVAM VM7Luc ER TA, πίνακας 4-1 (3)).

([β]) Η μέγιστη συγκέντρωση που ελέγχθηκε όταν δεν υπήρχαν περιορισμοί λόγω κυτταροτοξικότητας ή αδιαλυτότητας ήταν 1×10^{-5} M (δοκιμασία STTA) και 1×10^{-3} M (δοκιμασία ER TA VM7Luc).

([γ]) Ο αριθμός σε παρένθεση αντιπροσωπεύει τα αποτελέσματα της δοκιμής που ταξινομήθηκαν ως θετικά (ΘΕΤ.) ή αρνητικά (APN.) επί του συνολικού αριθμού των αναφερόμενων μελετών.

([1]) Οι τιμές αναφέρονται στο «Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line (2)»

([2]) Έκθεση αξιολόγησης μεθόδων δοκιμών ICCVAM για τη μέθοδο δοκιμών LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): «An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists» (3)

([3]) Οι μέσες τιμές EC_{50} υπολογίστηκαν με τιμές που ανέφεραν τα εργαστήρια της μελέτης επικύρωσης ER TA VM7Luc (XDS, ECVAM και Hiyoshi) (3).

([4]) Η ταξινόμηση ως αγωνιστή ER ή αρνητική βασίστηκε στις πληροφορίες που περιλαμβάνονται στα έγγραφα επισκόπησης των διαθέσιμων δεδομένων της ICCVAM για τις μεθόδους δοκιμών δέσμευσης ER και TA (31) καθώς και σε πληροφορίες που ελήφθησαν από δημοσιευμένα έντυπα και εξετάστηκαν μετά την ολοκλήρωση των εγγράφων επισκόπησης των διαθέσιμων δεδομένων της ICCVAM (2) (3) (18) (31) (33) (34).

Σημειώσεις: Κάθε δοκιμασία στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών περιλαμβάνει διαφορετικές μετρήσεις. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ο υπολογισμός της τιμής EC_{50} δεν είναι εφικτός λόγω του ότι δεν παράγεται πλήρης καμπύλη απόκρισης. Παρότι με τη δοκιμασία STTA η τιμή PC_{10} αποτελεί βασική μέτρηση, ενδέχεται να υπάρχουν και άλλα παραδείγματα στα οποία μια τιμή PCx θα παρέχει χρήσιμες πληροφορίες.

▼M8

Πίνακας 2

Σύγκριση των αποτελεσμάτων από τις δοκιμασίες STTA και ER TA VM7Luc για ουσίες που υποβλήθηκαν σε δοκιμή και στις δύο δοκιμασίες ανταγωνιστών και ταξινομήθηκαν ως ανταγωνιστές ER (ΘΕΤ.) ή αρνητικές (APN.)

	Ουσία ([α])	CASRN	Δοκιμασία STTA ER ([1])		Δοκιμασία ER TA VM7Luc ([2])		Πιθανές επιδράσεις STTA ER ([4])	Συναινετική ταξινόμηση ([5]) ICCVAM	MeSH ([6]) Χημική κατηγορία	Κατηγορία προϊόντος ([7])
			Δράση TA ER	Τιμή IC_{50} ([β]) (M)	Δράση TA ER	Τιμή IC_{50} ([β]), ([3]) (M)				
1	4-Υδροξυταμοξιφαίνη	68047-06-3	ΘΕΤ.	$3,97 \times 10^{-9}$	ΘΕΤ.	$2,08 \times 10^{-7}$	μέτρια ΘΕΤ.	ΘΕΤ.	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός)	Φαρμακευτικό προϊόν
2	Διβενζο[a.h]ανθρακένιο	53-70-3	ΘΕΤ.	Χωρίς IC_{50}	ΘΕΤ.	Χωρίς IC_{50}	ΘΕΤ.	Θ/ΘΕΤ.	Πολυκυκλική ένωση	Εργαστηριακή χημική ουσία, φυσικό προϊόν
3	Μιφεπριστόνη	84371-65-3	ΘΕΤ.	$5,61 \times 10^{-6}$	APN.	—	ήπια ΘΕΤ.	APN.	Στεροειδές	Φαρμακευτικό προϊόν
4	Υδροχλωρική ραλοξιφαίνη	82640-04-8	ΘΕΤ.	$7,86 \times 10^{-10}$	ΘΕΤ.	$1,19 \times 10^{-9}$	μέτρια ΘΕΤ.	ΘΕΤ.	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός)	Φαρμακευτικό προϊόν
5	Ταμοξιφαίνη	10540-29-1	ΘΕΤ.	$4,91 \times 10^{-7}$	ΘΕΤ.	$8,17 \times 10^{-7}$	ΘΕΤ.	ΘΕΤ.	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός)	Φαρμακευτικό προϊόν
6	17β-Οιστραδιόλη	50-28-2	APN.	—	APN.	—	Θ/APN.	Θ/APN.	Στεροειδές	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας

▼M8

	Ουσία (α)	CASRN	Δοκιμασία STTA ER (1)		Δοκιμασία ER TA VM7Luc (2)		Πιθανές επιδράσεις STTA ER (4)	Συναινετική ταξινόμηση (5) ICCVAM	MeSH (6) Χημική κατηγορία	Κατηγορία προϊόντος (7)
			Δράση TA ER	Τιμή IC_{50} (β) (M)	Δράση TA ER	Τιμή IC_{50} (β), (3) (M)				
7	Απιγενίνη	520-36-5	APN.	—	APN.	—	APN.	APN.	Ετεροκυκλική ένωση	Χρωστική, φυσικό προϊόν, ενδιάμεση φαρμακευτική ουσία,
8	Ατραζίνη	1912-24-9	APN.	—	APN.	—	APN.	Θ/APN.	Ετεροκυκλική ένωση	Ζιζανιοκτόνο
9	Φθαλικό δι-n-βουτύλιο	84-74-2	APN.	—	APN.	—	APN.	APN.	Εστέρας, φθαλικό οξύ	Συστατικό καλλυντικών, βιομηχανική χημική ουσία, πλαστικοποιητής
10	Φεναριμόλη	60168-88-9	APN.	—	APN.	—	δεν ελέγχθηκε	Δ/Ε	Ετεροκυκλική ένωση, πυριμιδίνη	Μυκητοκτόνο
11	Φλαβόνη	525-82-6	APN.	—	APN.	—	Θ/APN.	Θ/APN.	Φλαβονοειδές, ετεροκυκλική ένωση	Φυσικό προϊόν, φαρμακευτικό προϊόν
12	Φλουταμίδη	13311-84-7	APN.	—	APN.	—	APN.	Θ/APN.	Αμίδιο	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
13	Γενιστεΐνη	446-72-0	APN.	—	APN.	—	Θ/APN.	APN.	Φλαβονοειδές, ετεροκυκλική ένωση	Φυσικό προϊόν, φαρμακευτικό προϊόν

▼M8

	Ουσία (α)	CASRN	Δοκιμασία STTA ER (1)		Δοκιμασία ER TA VM7Luc (2)		Πιθανές επιδράσεις STTA ER (4)	Συναινετική ταξινόμηση (5) ICCVAM	MeSH (6) Χημική κατηγορία	Κατηγορία προϊόντος (7)
			Δράση TA ER	Τιμή IC_{50} (β) (M)	Δράση TA ER	Τιμή IC_{50} (β), (3) (M)				
14	p-n-Εννεϋλοφαινόλη	104-40-5	APN.	—	APN.	—	δεν ελέγχθηκε	APN.	Φαινόλη	Ενδιάμεση χημική ουσία
15	Ρεσβερατρόλη	501-36-0	APN.	—	APN.	—	Θ/APN.	APN.	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός)	Φυσικό προϊόν

Συντμήσεις: CASRN = αριθμός μητρώου της υπηρεσίας Chemical Abstracts Service, M = γραμμομοριακή, IC_{50} = το ήμισυ της μέγιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, APN. = αρνητική, Θ/APN.= θεωρούμενη αρνητική, ΘΕΤ. = θετική, Θ/ΘΕΤ. = θεωρούμενη θετική.

(α) Κοινές ουσίες που υποβλήθηκαν σε δοκιμή στις δοκιμασίες ER TA STTA και VM7Luc και οι οποίες χαρακτηρίστηκαν ανταγωνιστές ER ή αρνητικές και χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της ορθότητας στη μελέτη επικύρωσης ER TA VM7Luc (2) (3).

(β) Η μέγιστη συγκέντρωση που ελέγχθηκε όταν δεν υπήρχαν περιορισμοί λόγω κυτταροτοξικότητας ή αδιαλυτότητας ήταν 1×10^{-3} M (δοκιμασία STTA) και 1×10^{-5} M (δοκιμασία ER TA VM7Luc).

(1) The Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Part B (2)

(2) Έκθεση αξιολόγησης μεθόδων δοκιμών ICCVAM για τη μέθοδο δοκιμών LUMI-CELL® ER (ER TA VM7Luc): «An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists» (3).

(3) Οι μέσες τιμές IC_{50} υπολογίστηκαν με τιμές που ανέφεραν τα εργαστήρια της μελέτης επικύρωσης ER TA VM7Luc (XDS, ECVAM και Hiyoshi) (3).

(4) Δραστηριότητα STTA ER που συνάγεται από τις αναφερόμενες επιδράσεις τους που είναι γνωστές από τα ιστορικά δεδομένα CERI της δοκιμασίας δέσμευσης υποδοχέων ER, τη μητροτροφική δοκιμασία και πληροφορίες από τη δημόσια βιβλιογραφία (2)

(5) Η ταξινόμηση ως ανταγωνιστή ER ή αρνητική βασίστηκε στις πληροφορίες που περιλαμβάνονται στα έγγραφα επισκόπησης των διαθέσιμων δεδομένων της ICCVAM για τις δοκιμασίες δέσμευσης ER και TA (31) καθώς και σε πληροφορίες που ελήφθησαν από δημοσιευμένα έντυπα και εξετάστηκαν μετά την ολοκλήρωση των εγγράφων επισκόπησης των διαθέσιμων δεδομένων της ICCVAM (2) (3) (18) (31).

(6) Οι ουσίες ταξινομήθηκαν σε μία ή περισσότερες χημικές κατηγορίες με χρήση των θεματικών επικεφαλίδων ιατρικού περιεχομένου (Medical Subject Headings, MeSH) της Εθνικής Ιατρικής Βιβλιοθήκης των ΗΠΑ, ενός διεθνώς αναγνωρισμένου, τυποποιημένου συστήματος ταξινόμησης (διατίθεται στη διεύθυνση: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

(7) Οι ουσίες ταξινομήθηκαν σε μία ή περισσότερες κατηγορίες προϊόντων με χρήση της βάσης δεδομένων επικίνδυνων ουσιών της Εθνικής Ιατρικής Βιβλιοθήκης των ΗΠΑ (διατίθεται στη διεύθυνση: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

▼M8

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ER ΤΑ

Βασικά στοιχεία της δοκιμασίας

11. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών εφαρμόζεται σε δοκιμασίες που χρησιμοποιούν σταθερώς διαμολυνθέντα ή ενδογενή υποδοχέα ERα και σταθερώς διαμολυνθέν κατασκεύασμα γονιδίου αναφοράς υπό τον έλεγχο ενός ή περισσότερων στοιχείων απόκρισης σε οιστρογόνα· ενδέχεται ωστόσο να υπάρχουν και άλλοι υποδοχείς, όπως ο ERβ. Πρόκειται για βασικά στοιχεία της δοκιμασίας.

Μάρτυρες

12. Θα πρέπει να περιγράφεται η βάση των προτεινόμενων παράλληλων προτύπων αναφοράς για καθεμία από τις δοκιμασίες αγωνιστών και ανταγωνιστών. Οι παράλληλοι μάρτυρες (αρνητικός, διαλύτης και θετικός), ανάλογα με την περίπτωση, χρησιμεύουν ως ένδειξη της λειτουργικότητας της δοκιμασίας υπό τις συνθήκες δοκιμής και παρέχουν μια βάση για συγκρίσεις μεταξύ πειραμάτων· αποτελούν συνήθως μέρος των κριτηρίων αποδοχής για συγκεκριμένο πείραμα (1).

Τυπικές διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου

13. Οι τυπικές διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου θα πρέπει να διεκπεραιώνονται σύμφωνα με τα οριζόμενα για κάθε δοκιμασία προκειμένου να διασφαλίζεται ότι η κυτταρική σειρά παραμένει σταθερή κατόπιν πολλαπλών ανακαλλιεργειών, ελεύθερη μυκοπλάσματος (δηλ. ελεύθερη βακτηριακής μόλυνσης), και διατηρεί την ικανότητα να παρέχει τις αναμενόμενες διαμεσολαβούμενες από τους ER αποκρίσεις με την πάροδο του χρόνου. Οι κυτταρικές σειρές θα πρέπει να ελέγχονται περαιτέρω ως προς την ορθότητα της ταυτότητάς τους καθώς και για άλλους παράγοντες μόλυνσης (π.χ. μύκητες, ζυμομύκητες και ιούς).

Απόδειξη της τεχνικής ικανότητας του εργαστηρίου

14. Πριν από τη διεξαγωγή δοκιμών με άγνωστες χημικές ουσίες με οποιαδήποτε εκ των δοκιμασιών στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου, κάθε εργαστήριο θα πρέπει να αποδεικνύει την τεχνική ικανότητά του ως προς τη χρήση της δοκιμασίας. Για να αποδείξει την τεχνική ικανότητά του, κάθε εργαστήριο θα πρέπει να υποβάλλει σε δοκιμή τις 14 ουσίες ελέγχου ικανότητας που απαριθμούνται στον πίνακα 3 για τη δοκιμασία αγωνιστών και τις 10 ουσίες ελέγχου ικανότητας του πίνακα 4 για τη δοκιμασία ανταγωνιστών. Οι εν λόγω δοκιμές ελέγχου τεχνικής ικανότητας θα επιβεβαιώνουν επίσης τη δυνατότητα απόκρισης του συστήματος δοκιμών. Ο κατάλογος ουσιών ελέγχου ικανότητας είναι ένα υποσύνολο των ουσιών αναφοράς που περιλαμβάνονται στα πρότυπα επιδόσεων για τις δοκιμασίες ER ΤΑ (6). Οι εν λόγω ουσίες είναι διαθέσιμες στο εμπόριο, αντιπροσωπεύουν τις κατηγορίες χημικών ουσιών που συνδέονται συνήθως με δράση αγωνιστή ή ανταγωνιστή ER, παρουσιάζουν το κατάλληλο φάσμα ισχύος που αναμένεται για τους αγωνιστές/ανταγωνιστές ER (δηλ. ισχυρές έως ασθενείς) και περιλαμβάνουν αρνητικές ουσίες. Οι δοκιμές των ουσιών ελέγχου ικανότητας θα πρέπει να επαναλαμβάνονται τουλάχιστον δύο φορές, σε διαφορετικές ημέρες. Η τεχνική ικανότητα αποδεικνύεται μέσω της ορθής ταξινόμησης (θετική/αρνητική) κάθε ουσίας ελέγχου ικανότητας. Οι δοκιμές ελέγχου ικανότητας θα πρέπει να επαναλαμβάνονται από κάθε τεχνικό κατά την εκμάθηση των δοκιμασιών. Ανάλογα με τον τύπο κυττάρων, ορισμένες από τις εν λόγω ουσίες ελέγχου τεχνικής ικανότητας μπορεί να συμπεριφέρονται ως SERM και να δρουν τόσο ως αγωνιστές όσο και ως ανταγωνιστές. Ωστόσο, οι ουσίες ελέγχου ικανότητας ταξινομούνται στους πίνακες 3 και 4 βάσει της γνωστής κύριας δράσης τους, η οποία και θα πρέπει να χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της τεχνικής ικανότητας.

15. Για να αποδείξει τις επιδόσεις του και για λόγους ποιοτικού ελέγχου, κάθε εργαστήριο θα πρέπει να δημιουργεί βάσεις ιστορικών δεδομένων για τους αγωνιστές και τους ανταγωνιστές με δεδομένα προτύπου αναφοράς (π.χ. 17β-οιστραδιόλη και ταμοξιφαίνη), χημικών ουσιών θετικού και αρνητικού μάρτυρα και μάρτυρα διαλύτη (π.χ. DMSO). Αρχικά, η βάση δεδομένων θα πρέπει να δημιουργείται από τουλάχιστον 10 ανεξάρτητες σειρές δοκιμών αγωνιστών (π.χ. 17β-οιστραδιόλη) και 10 ανεξάρτητες σειρές δοκιμών ανταγωνιστών (π.χ. ταμοξιφαίνη). Η βάση δεδομένων θα πρέπει να διευρύνεται με την προσθήκη των αποτελεσμάτων μελλοντικών αναλύσεων των εν λόγω προτύπων αναφοράς και μαρτύρων διαλύτη προκειμένου το εργαστήριο να διασφαλίζει τη διαχρονική συνοχή και τις επιδόσεις της βιοδοκιμασίας.

▼M8

Πίνακας 3

Κατάλογος (14) ουσιών ελέγχου ικανότητας για δοκιμασία αγωνιστών [1]

Αριθ. [8]	Ουσία	CASRN	Αναμενόμενη απόκριση [2]	Δοκιμασία STTA			Δοκιμασία ER TA VM7Luc		Χημική κατηγορία MeSH [6]	Κατηγορία προϊόντος [7]
				Τιμή PC_{10} (M) [3]	Τιμή PC_{50} (M) [3]	Περιοχή συγκεντρώσεων δοκιμής (M)	Τιμή VM7Luc EC_{50} (M) [4]	Υψηλότερη συγκέντρωση για τη δοκιμή προσδιορισμού εύρους (M) [5]		
14	Διαιθυλοστιλβεστρόλη	56-53-1	ΘΕΤ.	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	$10^{-14} – 10^{-8}$	$3{,}34 \times 10^{-11}$	$3{,}73 \times 10^{-4}$	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός)	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
12	17α-Οιστραδιόλη	57-91-0	ΘΕΤ.	$4{,}27 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}40 \times 10^{-9}$	$3{,}67 \times 10^{-3}$	Στεροειδές	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
15	*meso*-Εξεστρόλη	84-16-2	ΘΕΤ.	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}65 \times 10^{-11}$	$3{,}70 \times 10^{-3}$	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός), φαινόλη	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
11	4-*tert*-Οκτυλοφαινόλη	140-66-9	ΘΕΤ.	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$3{,}19 \times 10^{-8}$	$4{,}85 \times 10^{-3}$	Φαινόλη	Ενδιάμεση χημική ουσία
9	Γενιστεΐνη	446-72-0	ΘΕΤ.	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	$3{,}70 \times 10^{-4}$	Φλαβονοειδές, ετεροκυκλική ένωση	Φυσικό προϊόν, φαρμακευτικό προϊόν
6	Δισφαινόλη Α	80-05-7	ΘΕΤ.	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$5{,}33 \times 10^{-7}$	$4{,}38 \times 10^{-3}$	Φαινόλη	Ενδιάμεση χημική ουσία

▼M8

Αριθ. [8]	Ουσία	CASRN	Αναμενόμενη απόκριση [2]	Δοκιμασία STTA			Δοκιμασία ER TA VM7Luc		Χημική κατηγορία MeSH [6]	Κατηγορία προϊόντος [7]
				Τιμή PC_{10} (M) [3]	Τιμή PC_{50} (M) [3]	Περιοχή συγκεντρώσεων δοκιμής (M)	Τιμή VM7Luc EC_{50} (M) [4]	Υψηλότερη συγκέντρωση για τη δοκιμή προσδιορισμού εύρους (M) [5]		
2	Καμφερόλη	520-18-3	ΘΕΤ.	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$3{,}99 \times 10^{-6}$	$3{,}49 \times 10^{-3}$	Φλαβονοειδές, ετεροκυκλική ένωση	Φυσικό προϊόν
3	Φθαλικό βενζύλιο βουτύλιο	85-68-7	ΘΕΤ.	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}98 \times 10^{-6}$	$3{,}20 \times 10^{-4}$	Καρβοξυλικό οξύ, εστέρας, φθαλικό οξύ	Πλαστικοποιητής, βιομηχανική χημική ουσία
4	*p,p'*-Methoxychlor	72-43-5	ΘΕΤ.	$1{,}23 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}92 \times 10^{-6}$	$2{,}89 \times 10^{-3}$	Υδρογονάνθρακας (αλογονωμένος)	Φυτοφάρμακο, κτηνιατρικός παράγοντας
1	4-Υδροξυβενζοϊκό αιθύλιο	120-47-8	ΘΕΤ.	$5{,}00 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	$2{,}48 \times 10^{-5}$	$6{,}02 \times 10^{-3}$	Καρβοξυλικό οξύ, φαινόλη	Φαρμακευτικό προϊόν, συντηρητικό
17	Ατραζίνη	1912-24-9	APN.	—	—	$10^{-10} – 10^{-4}$	—	$4{,}64 \times 10^{-4}$	Ετεροκυκλική ένωση	Ζιζανιοκτόνο
20	Σπειρονολακτόνη	52-01-7	APN.	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$2{,}40 \times 10^{-3}$	Λακτόνη, στεροειδές	Φαρμακευτικό προϊόν
21	Κετοκοναζόλη	65277-42-1	APN.	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$9{,}41 \times 10^{-5}$	Ετεροκυκλική ένωση	Φαρμακευτικό προϊόν

▼M8

Αριθ. ([8])	Ουσία	CASRN	Αναμενόμενη απόκριση ([2])	Δοκιμασία STTA			Δοκιμασία ER TA VM7Luc		Χημική κατηγορία MeSH ([6])	Κατηγορία προϊόντος ([7])
				Τιμή PC_{10} (M) ([3])	Τιμή PC_{50} (M) ([3])	Περιοχή συγκεντρώσεων δοκιμής (M)	Τιμή VM7Luc EC_{50} (M) ([4])	Υψηλότερη συγκέντρωση για τη δοκιμή προσδιορισμού εύρους (M) ([5])		
22	Ρεσερπίνη	50-55-5	APN.	—	—	10^{-11} – 10^{-5}	—	$1{,}64 \times 10^{-3}$	Ετεροκυκλική ένωση, ινδόλη	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας

Συντμήσεις: CASRN = αριθμός μητρώου της υπηρεσίας Chemical Abstracts Service, EC_{50} = ήμισυ της μέγιστης αποτελεσματικής συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, APN. = αρνητική, ΘΕΤ. = θετική, PC_{10} (και PC_{50}) = η συγκέντρωση υπό δοκιμή ουσίας στην οποία η απόκριση είναι το 10 % (ή το 50 % για την PC_{50}) της απόκρισης που επάγεται από τον θετικό μάρτυρα (E2, 1 nm) σε κάθε τρυβλίο.

([1]) Η ταξινόμηση σε θετικές ή αρνητικές ως προς τη δράση αγωνιστών ER βασίστηκε στα έγγραφα επισκόπησης των διαθέσιμων δεδομένων της ICCVAM για τις δοκιμασίες δέσμευσης ER και TA (31) καθώς και σε εμπειρικά δεδομένα και άλλες πληροφορίες που ελήφθησαν από τις αναφερόμενες μελέτες που δημοσιεύτηκαν και μελετήθηκαν μετά την ολοκλήρωση των εγγράφων επισκόπησης των διαθέσιμων δεδομένων της ICCVAM (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).

([2]) Οι τιμές αναφέρονται στο «Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line (30)»

([3]) Οι μέσες τιμές EC_{50} υπολογίστηκαν με τιμές που ανέφεραν τα εργαστήρια της μελέτης επικύρωσης ER TA VM7Luc (XDS, ECVAM και Hiyoshi) (3).

([4]) Οι αναφερόμενες συγκεντρώσεις ήταν οι υψηλότερες συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν (δοκιμή προσδιορισμού του εύρους) κατά την επικύρωση της δοκιμασίας ER TA VM7Luc. Σε περίπτωση διαφορών μεταξύ συγκεντρώσεων, αναφέρεται η υψηλότερη συγκέντρωση. Βλ. πίνακα 4-10 της έκθεσης αξιολόγησης μεθόδων δοκιμών της ICCVAM· η μέθοδος δοκιμών LUMI-Cell®ER (ER TA VM7Luc): «An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3)».

([5]) Οι ουσίες ταξινομήθηκαν σε μία ή περισσότερες χημικές κατηγορίες με χρήση των θεματικών επικεφαλίδων ιατρικού περιεχομένου (Medical Subject Headings, MeSH) της Εθνικής Ιατρικής Βιβλιοθήκης των ΗΠΑ, ενός διεθνώς αναγνωρισμένου, τυποποιημένου συστήματος ταξινόμησης (διατίθεται στη διεύθυνση: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([6]) Οι ουσίες ταξινομήθηκαν σε μία ή περισσότερες κατηγορίες προϊόντων με χρήση της βάσης δεδομένων επικίνδυνων ουσιών της Εθνικής Ιατρικής Βιβλιοθήκης των ΗΠΑ (διατίθεται στη διεύθυνση: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB)

([7]) Από τον πίνακα 1 [κατάλογος χημικών ουσιών αναφοράς (22) για την αξιολόγηση της ορθότητας αγωνιστών ER] των προτύπων επιδόσεων (6)

([8]) Σε περίπτωση που μια ουσία ελέγχου ικανότητας δεν διατίθεται πλέον στο εμπόριο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ουσία με την ίδια ταξινόμηση και συγκρίσιμη ισχύ, τρόπο δράσης και χημική κατηγορία.

▼M8

Πίνακας 4

Κατάλογος (10) ουσιών ελέγχου ικανότητας για δοκιμασία ανταγωνιστών

	Ουσία ([a])	CASRN	Δοκιμασία STTA ER ([1])			Δοκιμασία ER TA VM7Luc ([2])			Πιθανές επιδράσεις STTA ER ([1])	Ταξινόμηση ([5]) συναίνεσης ICCVAM	MeSH ([6]) Χημική κατηγορία	Κατηγορία προϊόντος ([7])
			Δράση TA ER	IC_{50} (M)	Περιοχή συγκεντρώσεων δοκιμής (M)	Δράση TA ER	IC_{50} ([3]) (M)	Υψηλότερη συγκέντρωση για τη δοκιμή προσδιορισμού εύρους (M) ([4])				
1	4-Υδροξυταμοξιφαίνη	68047-06-3	ΘΕΤ.	$3,97 \times 10^{-9}$	$10^{-12} – 10^{-7}$	ΘΕΤ.	$2,08 \times 10^{-7}$	$2,58 \times 10^{-4}$	μέτρια ΘΕΤ.	ΘΕΤ.	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός)	Φαρμακευτικό προϊόν
2	Υδροχλωρική ραλοξιφαίνη	82640-04-8	ΘΕΤ.	$7,86 \times 10^{-10}$	$10^{-12} – 10^{-7}$	ΘΕΤ.	$1,19 \times 10^{-9}$	$1,96 \times 10^{-4}$	μέτρια ΘΕΤ.	ΘΕΤ.	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός)	Φαρμακευτικό προϊόν
3	Ταμοξιφαίνη	10540-29-1	ΘΕΤ.	$4,91 \times 10^{-7}$	$10^{-10} – 10^{-5}$	ΘΕΤ.	$8,17 \times 10^{-7}$	$2,69 \times 10^{-4}$	ΘΕΤ.	ΘΕΤ.	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός)	Φαρμακευτικό προϊόν
4	17β-Οιστραδιόλη	50-28-2	ΑΡΝ.	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	ΑΡΝ.	—	$3,67 \times 10^{-3}$	να είναι αρνητική (*)	Θ/ΑΡΝ.	Στεροειδές	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
5	Απιγενίνη	520-36-5	ΑΡΝ.	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	ΑΡΝ.	—	$3,70 \times 10^{-4}$	ΑΡΝ.	ΑΡΝ.	Ετεροκυκλική ένωση	Χρωστική, φυσικό προϊόν, ενδιάμεση φαρμακευτική ουσία,
6	Φθαλικό δι-n-βουτύλιο	84-74-2	ΑΡΝ.	—	$10^{-8} – 10^{-3}$	ΑΡΝ.	—	$3,59 \times 10^{-3}$	ΑΡΝ.	ΑΡΝ.	Εστέρας, φθαλικό οξύ	Συστατικό καλλυντικών, βιομηχανική χημική ουσία, πλαστικοποιητής

▼M8

	Ουσία (α)	CASRN	Δοκιμασία STTA ER (1)			Δοκιμασία ER TA VM7Luc (2)			Πιθανές επιδράσεις STTA ER (1)	Ταξινόμηση (5) συναίνεσης ICCVAM	MeSH (6) Χημική κατηγορία	Κατηγορία προϊόντος (7)
			Δράση TA ER	IC_{50} (M)	Περιοχή συγκεντρώσεων δοκιμής (M)	Δράση TA ER	IC_{50} (3) (M)	Υψηλότερη συγκέντρωση για τη δοκιμή προσδιορισμού εύρους (M) (4)				
7	Φλαβόνη	525-82-6	APN.	—	10^{-8} – 10^{-3}	APN.	—	$4{,}50 \times 10^{-4}$	να είναι αρνητική (*)	Θ/APN.	Φλαβονοειδές, ετεροκυκλική ένωση	Φυσικό προϊόν, φαρμακευτικό προϊόν
8	Γενιστεΐνη	446-72-0	APN.	—	10^{-9} – 10^{-4}	APN.	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	να είναι αρνητική (*)	APN.	Φλαβονοειδές, ετεροκυκλική ένωση	Φυσικό προϊόν, φαρμακευτικό προϊόν
9	p-n-Εννεϋλοφαινόλη	104-40-5	APN.	—	10^{-9} – 10^{-4}	APN.	—	$4{,}54 \times 10^{-4}$	δεν ελέγχθηκε	APN.	Φαινόλη	Ενδιάμεση χημική ουσία
10	Ρεσβερατρόλη	501-36-0	APN.	—	10^{-8} – 10^{-3}	APN.	—	$4{,}38 \times 10^{-4}$	να είναι αρνητική (*)	APN.	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός)	Φυσικό προϊόν

Συντμήσεις: CASRN = αριθμός μητρώου της υπηρεσίας Chemical Abstracts Service, M = γραμμομοριακή, IC_{50} = το ήμισυ της μέγιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, APN. = αρνητική, Θ/APN.= θεωρούμενη αρνητική, ΘΕΤ. = θετική.

(*) ταξινομημένη ως αρνητική σύμφωνα με επισκόπηση της βιβλιογραφίας (2).

(α) Κοινές ουσίες που υποβλήθηκαν σε δοκιμή στις δοκιμασίες ER TA STTA και VM7Luc και οι οποίες χαρακτηρίστηκαν ανταγωνιστές ER ή αρνητικές και χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της ορθότητας στη μελέτη επικύρωσης ER TA VM7Luc (2) (3).

(1) The Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Part B (2)

(2) Έκθεση αξιολόγησης μεθόδων δοκιμών ICCVAM για τη μέθοδο δοκιμών LUMI-CELL ER (ER TA VM7Luc): «An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists» (3).

(3) Οι μέσες τιμές IC_{50} υπολογίστηκαν με τιμές που ανέφεραν τα εργαστήρια της μελέτης επικύρωσης ER TA VM7Luc (XDS, ECVAM και Hiyoshi) (3).

(4) Οι αναφερόμενες συγκεντρώσεις ήταν οι υψηλότερες συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν (δοκιμή προσδιορισμού του εύρους) κατά την επικύρωση της δοκιμασίας ER TA VM7Luc. Σε περίπτωση διαφορών μεταξύ συγκεντρώσεων, αναφέρεται η υψηλότερη συγκέντρωση. Βλ. πίνακα 4-11 της έκθεσης αξιολόγησης μεθόδων δοκιμών της ICCVAM· η μέθοδος δοκιμών LUMI-Cell®ER (ER TA VM7Luc): «An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3)».

(5) Η ταξινόμηση ως ανταγωνιστή ER ή αρνητική βασίστηκε στις πληροφορίες που περιλαμβάνονται στα έγγραφα επισκόπησης των διαθέσιμων δεδομένων της ICCVAM για τις μεθόδους δοκιμών δέσμευσης ER και TA (31) καθώς και σε πληροφορίες που ελήφθησαν από δημοσιευμένα έντυπα και εξετάστηκαν μετά την ολοκλήρωση των εγγράφων επισκόπησης των διαθέσιμων δεδομένων της ICCVAM (2) (3) (18) (31).

(6) Οι ουσίες ταξινομήθηκαν σε μία ή περισσότερες χημικές κατηγορίες με χρήση των θεματικών επικεφαλίδων ιατρικού περιεχομένου (Medical Subject Headings, MeSH) της Εθνικής Ιατρικής Βιβλιοθήκης των ΗΠΑ, ενός διεθνώς αναγνωρισμένου, τυποποιημένου συστήματος ταξινόμησης (διατίθεται στη διεύθυνση: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

(7) Οι ουσίες ταξινομήθηκαν σε μία ή περισσότερες κατηγορίες προϊόντων με χρήση της βάσης δεδομένων επικίνδυνων ουσιών της Εθνικής Ιατρικής Βιβλιοθήκης των ΗΠΑ (διατίθεται στη διεύθυνση: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

▼M8

Κριτήρια αποδοχής σειρών δοκιμών

16. Η αποδοχή ή η απόρριψη μιας σειράς δοκιμών βασίζεται στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται για τα πρότυπα αναφοράς και τους μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε πείραμα. Οι τιμές των PC_{50} (EC_{50}) ή IC_{50} για τα πρότυπα αναφοράς θα πρέπει να πληρούν τα κριτήρια αποδοχής, όπως καθορίζονται για την επιλεγμένη δοκιμασία (για την STTA βλ. προσάρτημα 2, για την ER TA VM7Luc βλ. προσάρτημα 3), και όλοι οι θετικοί/αρνητικοί μάρτυρες θα πρέπει να είναι σωστά ταξινομημένοι για κάθε αποδεκτό πείραμα. Η ικανότητα συνεπούς διεξαγωγής της δοκιμασίας θα πρέπει να αποδεικνύεται μέσω της ανάπτυξης και διατήρησης βάσης ιστορικών δεδομένων για τα πρότυπα αναφοράς και τους μάρτυρες (βλ. παράγραφο 15). Ως μέτρο της εντός του εργαστηρίου αναπαραγωγιμότητας μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι τυπικές αποκλίσεις ή οι συντελεστές μεταβλητότητας για τους μέσους όρους των παραμέτρων προσαρμογής των καμπυλών προτύπων αναφοράς από πολλαπλά πειράματα. Επιπλέον, αναφορικά με τα κριτήρια αποδοχής, θα πρέπει να διασφαλίζεται η συμμόρφωση με τις ακόλουθες αρχές:

— Τα δεδομένα θα πρέπει να είναι επαρκή για την ποσοτική αξιολόγηση της ενεργοποίησης ER (για τη δοκιμασία αγωνιστών) ή της καταστολής ER (για τη δοκιμασία ανταγωνιστών) (δηλ. δραστικότητα και ισχύς).

— Η μέση δραστηριότητα των γονιδίων αναφοράς για τη συγκέντρωση αναφοράς του οιστρογόνου αναφοράς θα πρέπει να αντιστοιχεί τουλάχιστον στην ελάχιστη δραστηριότητα που καθορίζεται στη δοκιμασία σε σχέση με αυτήν του μάρτυρα (διαλύτη) φορέα προκειμένου να διασφαλίζεται επαρκής ευαισθησία. Για τις δοκιμασίες ER TA STTA και VM7Luc, πρόκειται για το τετραπλάσιο της δραστηριότητας του μέσου μάρτυρα φορέα σε κάθε τρυβλίο.

— Οι συγκεντρώσεις που ελέγχονται θα πρέπει να παραμένουν εντός του φάσματος διαλυτότητας των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και να μην εμφανίζουν κυτταροτοξικότητα.

Ανάλυση των δεδομένων

17. Για την ταξινόμηση θετικής ή αρνητικής απόκρισης, θα πρέπει να χρησιμοποιείται η καθορισμένη για κάθε δοκιμασία διαδικασία ερμηνείας.

18. Η συμμόρφωση με τα κριτήρια αποδοχής (παράγραφος 16) υποδεικνύει ότι η δοκιμασία λειτουργεί σωστά, αλλά δεν διασφαλίζει ότι οποιαδήποτε συγκεκριμένη σειρά δοκιμών θα παράξει ορθά δεδομένα. Η επανάληψη των αποτελεσμάτων της πρώτης σειράς δοκιμών αποτελεί την καλύτερη ένδειξη ότι παρήχθησαν ορθά δεδομένα. Εάν παραχθούν αναπαραγώγιμα αποτελέσματα από δύο σειρές δοκιμών (π.χ. και οι δύο σειρές δοκιμών υποδεικνύουν ως θετική μια υπό δοκιμή χημική ουσία), δεν είναι απαραίτητο να διεξαχθεί τρίτη σειρά δοκιμών.

19. Εάν από δύο σειρές δοκιμών δεν παραχθούν αναπαραγώγιμα αποτελέσματα (π.χ. μια υπό δοκιμή χημική ουσία είναι θετική σε μια σειρά δοκιμών και αρνητική στην άλλη σειρά δοκιμών), ή εάν απαιτείται υψηλότερος βαθμός βεβαιότητας όσον αφορά το αποτέλεσμα της παρούσας δοκιμασίας, θα πρέπει να διεξάγονται τουλάχιστον τρεις ανεξάρτητες σειρές δοκιμών. Σε αυτή την περίπτωση, η ταξινόμηση βασίζεται στα δύο από τα τρία αποτελέσματα που συμφωνούν μεταξύ τους.

Γενικά κριτήρια ερμηνείας των δεδομένων

20. Επί του παρόντος δεν υφίσταται καθολικά αποδεκτή μέθοδος ερμηνείας των δεδομένων ER TA. Εντούτοις, η ποιοτική (π.χ. θετική/αρνητική) και/ή η ποσοτική (π.χ. EC_{50}, PC_{50}, IC_{50}) αξιολόγηση της διαμεσολαβούμενης από τους ER δραστηριότητας θα πρέπει να βασίζεται σε εμπειρικά δεδομένα και ορθή επιστημονική κρίση. Ει δυνατόν, τα θετικά αποτελέσματα θα πρέπει να συνοδεύονται από περιγραφή τόσο του μεγέθους της επίδρασης σε σύγκριση με τον μάρτυρα φορέα (διαλύτη) ή το οιστρογόνο αναφοράς όσο και της συγκέντρωσης στην οποία εκδηλώνεται η επίδραση (π.χ. EC_{50}, PC_{50}, RPC_{max}, IC_{50} κ.λπ.).

▼**M8**

Έκθεση δοκιμής

21. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Δοκιμασία:

— χρησιμοποιηθείσα δοκιμασία,

— μάρτυρας/πρότυπο αναφοράς/υπό δοκιμή χημική ουσία,

— πηγή, αριθμός παρτίδας, καταληκτική ημερομηνία χρήσης, εφόσον υπάρχει,

— σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εάν είναι γνωστή,

— διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον διαλύτη, εάν είναι γνωστές,

— μέτρηση του pH, της ωσμωμοριακότητας και του ιζήματος του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας στο οποίο προστέθηκε η υπό δοκιμή χημική ουσία, κατά περίπτωση.

Μονοσυστατική ουσία:

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμίξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγματα:

— περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Διαλύτης/φορέας:

— χαρακτηρισμός (φύση, προμηθευτής και παρτίδα),

— αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη/φορέα,

— διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον διαλύτη/φορέα, εάν είναι γνωστές,

Κύτταρα:

— τύπος και προέλευση των κυττάρων:

  • εκφράζεται ο ER ενδογενώς; Εάν όχι, ποιος ή ποιοι υποδοχείς διαμολύνθηκαν;

  • κατασκευάσματα γονιδίων αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν (περιλαμβανομένων των ειδών προέλευσης),

  • μέθοδος διαμόλυνσης,

  • μέθοδος επιλογής για τη διατήρηση της σταθερής διαμόλυνσης (κατά περίπτωση),

  • είναι η μέθοδος διαμόλυνσης κατάλληλη για σταθερές σειρές;

— αριθμός ανακαλλιεργειών των κυττάρων (από την απόψυξη),

▼**M8**

— αριθμός ανακαλλιεργειών των κυττάρων κατά την απόψυξη,

— μέθοδοι διατήρησης των κυτταροκαλλιεργειών.

Συνθήκες δοκιμής:

— περιορισμοί διαλυτότητας,

— περιγραφή των μεθόδων αξιολόγησης της βιωσιμότητας που εφαρμόστηκαν,

— σύνθεση των θρεπτικών μέσων, συγκέντρωση CO_2,

— συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας,

— όγκος του φορέα και της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που προστέθηκε,

— θερμοκρασία και υγρασία επώασης,

— διάρκεια της αγωγής,

— πυκνότητα των κυττάρων κατά την έναρξη και κατά τη διάρκεια της αγωγής,

— θετικά και αρνητικά πρότυπα αναφοράς,

— αντιδραστήρια γονιδίων αναφοράς (όνομα προϊόντος, προμηθευτής και παρτίδα),

— κριτήρια χαρακτηρισμού των σειρών δοκιμής ως θετικών, αρνητικών ή αμφίβολων.

Έλεγχος αποδοχής:

— συντελεστές διαφοράς στην επαγωγή για κάθε τρυβλίο δοκιμασίας και κατά πόσο πληρούν τις ελάχιστες απαιτήσεις στο πλαίσιο της δοκιμασίας με βάση τους ιστορικούς μάρτυρες,

— πραγματικές τιμές για τα κριτήρια αποδοχής, π.χ. $\log_{10}EC_{50}$, $\log_{10}PC_{50}$, $\log IC_{50}$ και τιμές κλίσης Hill, για τους παράλληλους θετικούς μάρτυρες/πρότυπα αναφοράς.

Αποτελέσματα:

— ανεπεξέργαστα και κανονικοποιημένα δεδομένα,

— το μέγιστο επίπεδο πολλαπλάσιας επαγωγής,

— δεδομένα κυτταροτοξικότητας,

— η χαμηλότερη αποτελεσματική συγκέντρωση (LEC), εάν υπάρχει,

— τιμές RPC_{Max}, PC_{Max}, PC_{50}, IC_{50} και/ή EC_{50}, κατά περίπτωση,

— σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης, όπου είναι δυνατόν,

▼**M8**

— στατιστικές αναλύσεις, εάν υπάρχουν, μαζί με μια ένδειξη του βαθμού σφάλματος και του επιπέδου εμπιστοσύνης (π.χ. SEM, SD, CV ή 95 % CI) και περιγραφή του τρόπου υπολογισμού των εν λόγω τιμών.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

Συμπέρασμα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In Vit*ro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(4) Pujol P. *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer. Res., 58(23): p. 5367-73.

(5) Rogers J.M. and Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro* and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research, 13(1): p. 67-82.

(6) OECD (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455). Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 173.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) OECD (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 174.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(8) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(9) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. Climacteric, 5 Suppl 2: p. 20- 6.

(10) Welboren W.J. *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? Endocr. Relat. Cancer, 16(4): p. 1073-89.

(11) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. Pathol. Lab. Med., 135(1): p. 63- 6.

▼**M8**

(12) Jefferson W.N., *et al.* (2002). Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses, Journal of Chromatography B, 777(1-2): p. 179-189.

(13) Sonneveld E. *et al.* (2006). Comparison of I*n Vitro* and *In Vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, *Toxicol*. Sci., 89(1): p. 173-187.

(14) Takeyoshi M. *et al.* (2002). The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti- Estrogenic Effects Downstream of Receptor-Ligand Interactions, Toxicology Letters, 126(2): p. 91- 98.

(15) Combes R.D. (2000). Endocrine Disruptors: a Critical Review of *In Vitro* and *In Vivo* Testing Strategies for Assessing their Toxic Hazard to Humans, ATLA Alternatives to Laboratory Animals,28(1): p. 81-118.

(16) Escande A. *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. Pharmacol,71(10): p. 1459-69.

(17) Gray L.E. Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, *Toxicol*. Lett, 102-103, 677-680.

(18) EDSTAC (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.

(19) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(20) Gustafsson J.Ö. (1999). Estrogen Receptor ß - A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action, Journal of Endocrinology, 163(3): p. 379-383.

(21) Ogawa S. *et al.* (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor ß (hERß) and its Heterodimerization with ERα *In Vivo* and *In Vitro,* Biochemical and Biophysical Research Communications, 243(1): p. 122-126.

(22) Enmark E. *et al.* (1997). Human Estrogen Receptor ß-Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,82(12): p. 4258-4265.

(23) Ball L.J. *et al.* (2009). Cell Type- and Estrogen Receptor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Receptor Modulator Regulatory Elements, Molecular and Cellular Endocrinology, 299(2): p. 204-211.

(24) Barkhem T. *et al.* (1998). Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, Mol. Pharmacol, 54(1): p. 105-12.

(25) Deroo B.J. and Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor-ß: Mechanistic Insights from Recent Studies, Molecular Endocrinology, 24(9): p. 1703-1714.

(26) Harris D.M. *et al.* (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta- Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, Experimental Biology and Medicine, 230(8): p. 558-568.

(27) Anderson J.N. Clark J.H. and Peck E.J.Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Receptor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, Biochemical and Biophysical Research Communications, 48(6): p. 1460-1468.

▼**M8**

(28) Toft D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, Journal of Steroid Biochemistry, 3(3): p. 515-522.

(29) Gorski J. *et al.* (1968), Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, Recent Progress in Hormone Research, 24: p. 45-80.

(30) Jensen E.V. *et al.* (1967), Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale, 56(3):p. 547-569.

(31) ICCVAM (2002). Background Review Document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay. Appendix D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (No 03-4505.).

(32) Kanno J. *et al.* (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *In Vivo* Estrogenic Responses: Phase 1, Environ. Health Persp., 109:785-94.

(33) Kanno J. *et al.* (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose -Response Studies, Environ. Health Persp., 111:1530-1549.

(34) Kanno J. *et al.* (2003), The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, Environ. Health Persp., 111:1550-1558.

(35) Geisinger *et al.* (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.

(36) Baldwin *et al.* (1998) BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.

(37) Li, Y. *et al.* (2014) Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.

(38) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67-82.

▼**M8**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Κριτήρια αποδοχής: Ελάχιστα πρότυπα για τις επιδόσεις των πειραματικών ελέγχων και πρότυπα αναφοράς. Για να θεωρηθεί ένα πείραμα έγκυρο, θα πρέπει να πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής.

Ορθότητα (συμφωνία): ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί κριτήριο επιδόσεων της δοκιμασίας και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς τη «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας δοκιμασίας (1).

Αγωνιστής: ουσία που επάγει απόκριση, π.χ. μεταγραφή, όταν δεσμεύεται σε ειδικό υποδοχέα.

Ανταγωνιστής: τύπος προσδέματος υποδοχέα ή χημικής ουσίας που δεν επάγει βιολογική απόκριση καθαυτό/καθαυτή όταν δεσμεύεται σε υποδοχέα, αλλά εμποδίζει ή εξασθενεί αποκρίσεις διαμεσολαβούμενες από αγωνιστές.

Αντιοιστρογόνος δραστηριότητα: η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να καταστέλλει τη δράση της 17β-οιστραδιόλης η οποία διαμεσολαβείται από τους υποδοχείς οιστρογόνων.

Μορφολογία των κυττάρων: το σχήμα και η εμφάνιση των κυττάρων που καλλιεργούνται σε μονοστιβάδα σε μία μεμονωμένη κοιλότητα τρυβλίου ιστοκαλλιέργειας. Η μορφολογία των θνήσκοντων κυττάρων είναι συχνά μη φυσιολογική.

CF: (Conceptual Framework) το εννοιακό πλαίσιο του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση των ενδοκρινικών διαταρακτών.

Κατεργασία με ενεργό άνθρακα/δεξτράνη: κατεργασία του ορού που χρησιμοποιείται στην κυτταροκαλλιέργεια. Η κατεργασία με ενεργό άνθρακα/δεξτράνη (η οποία αναφέρεται συχνά ως «απογύμνωση») απομακρύνει τις ενδογενείς ορμόνες και τις πρωτεΐνες που δεσμεύουν τις ορμόνες.

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Κυτταροτοξικότητα: επιβλαβείς επιδράσεις στη δομή ή τη λειτουργία των κυττάρων που μπορούν να καταλήξουν στον θάνατο των κυττάρων και οι οποίες αποτυπώνονται στη μείωση του αριθμού των κυττάρων που είναι παρόντα στην κοιλότητα στο τέλος της περιόδου έκθεσης, ή στη μείωση της ικανότητας κάποιου μέτρου της κυτταρικής λειτουργίας σε σύγκριση με τον παράλληλο μάρτυρα με φορέα.

CV: συντελεστής μεταβλητότητας

DCC-FBS: βόειος εμβρυϊκός ορός που έχει υποστεί κατεργασία με ενεργό άνθρακα επιχρισμένο με δεξτράνη.

DMEM: τροποποιημένο μέσο Eagle του Dulbecco

DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο

E2: 17β-οιστραδιόλη

EC50: ήμισυ της μέγιστης αποτελεσματικής συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

ED: ενδοκρινική διαταραχή

hERα: ανθρώπινος υποδοχέας οιστρογόνων α

▼**M8**

hERβ: ανθρώπινος υποδοχέας οιστρογόνων β

EFM: μέσο ελεύθερο οιστρογόνων. Τροποποιημένο μέσο Eagle του Dulbecco (DMEM), συμπληρωμένο με 4,5 % κατεργασμένου με ενεργό άνθρακα/δεξτράνη FBS, 1,9 % L-γλουταμίνη και 0,9 % Pen-Strep.

ER: υποδοχέας οιστρογόνων

ERE: στοιχείο απόκρισης στα οιστρογόνα

Οιστρογονική δραστηριότητα: η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να μιμείται την ικανότητα της 17β-οιστραδιόλης να δεσμεύεται στους υποδοχείς οιστρογόνων και να τους ενεργοποιεί. Η μεσολαβούμενη από τον hERα οιστρογονική δράση μπορεί να ανιχνευτεί με την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

ERTA: διενεργοποίηση υποδοχέα οιστρογόνων

FBS: βόειος εμβρυϊκός ορός

HeLa: αθάνατη ανθρώπινη τραχηλική κυτταρική σειρά

HeLa9903: υποκλώνος των κυττάρων HeLa ο οποίος έχει διαμολυνθεί σταθερώς με hERα και γονίδιο αναφοράς λουσιφεράσης

IC_{50}: ήμισυ της μέγιστης αποτελεσματικής συγκέντρωσης μιας ανασταλτικής χημικής ουσίας

ICCVAM: (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) Διυπηρεσιακή Συντονιστική Επιτροπή για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (ΗΠΑ)

Διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα: μέτρο του βαθμού στον οποίο διαφορετικά ειδικευμένα εργαστήρια, που χρησιμοποιούν το ίδιο πρωτόκολλο και ελέγχουν τις ίδιες ουσίες, μπορούν να παράγουν ανάλογα αποτελέσματα από ποιοτική και ποσοτική άποψη. Η διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα προσδιορίζεται κατά τις διαδικασίες προεπικύρωσης και επικύρωσης και αποτελεί ένδειξη του κατά πόσον υπάρχει δυνατότητα επιτυχούς μεταφοράς μιας δοκιμής μεταξύ εργαστηρίων· καλείται επίσης «αναπαραγωγιμότητα μεταξύ εργαστηρίων» (1).

Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα: προσδιορισμός του βαθμού στον οποίο ειδικευμένα άτομα μπορούν να επαναλάβουν με επιτυχία τα ίδια αποτελέσματα εντός του ίδιου εργαστηρίου, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένο πρωτόκολλο σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Καλείται επίσης «αναπαραγωγιμότητα εντός εργαστηρίου» (1).

LEC: (lowest effective concentration) η χαμηλότερη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που επάγει απόκριση (δηλαδή η χαμηλότερη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην οποία η πολλαπλάσια επαγωγή είναι στατιστικά διαφορετική από τον παράλληλο μάρτυρα με φορέα).

Δοκιμή παρόμοιου τύπου («me-too»): έκφραση της καθομιλουμένης που παραπέμπει σε δοκιμασία η οποία είναι δομικά και λειτουργικά ανάλογη με επικυρωμένη και εγκεκριμένη μέθοδο δοκιμών αναφοράς. Ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς την «παρεμφερή μέθοδο δοκιμών».

MT: μεταλλοθειονίνη

MMTV: ιός καρκίνου του μαστού του ποντικού

OHT: 4-υδροξυταμοξιφαίνη

PBTG: κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών με βάση τις επιδόσεις

▼**M8**

PC (θετικός μάρτυρας): ισχυρά δραστική ουσία, κατά προτίμηση 17β-οιστραδιόλη, που περιλαμβάνεται σε όλες τις δοκιμές με σκοπό τη διασφάλιση της ορθής λειτουργίας της δοκιμασίας.

PC_{10}: η συγκέντρωση υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην οποία η μετρούμενη δραστηριότητα σε δοκιμασία αγωνιστών αντιστοιχεί στο 10 % της μέγιστης δραστηριότητας που επάγεται από τον θετικό μάρτυρα (E2 σε 1 nM για τη δοκιμασία STTA) σε κάθε τρυβλίο.

PC_{50}: η συγκέντρωση υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην οποία η μετρούμενη δραστηριότητα σε δοκιμασία αγωνιστών αντιστοιχεί στο 50 % της μέγιστης δραστηριότητας που επάγεται από τον θετικό μάρτυρα (E2 σε 1 nM για τη δοκιμασία STTA) σε κάθε τρυβλίο.

PC_{Max}: η συγκέντρωση υπό δοκιμή χημικής ουσίας που επάγει την RPCMax

Πρότυπα επιδόσεων: πρότυπα που βασίζονται σε επικυρωμένη δοκιμασία και παρέχουν τη βάση για την αξιολόγηση της συγκρισιμότητας προτεινόμενης δοκιμασίας η οποία είναι μηχανιστικά και λειτουργικά παρεμφερής. Στα πρότυπα επιδόσεων περιλαμβάνονται 1) τα βασικά στοιχεία της δοκιμασίας, 2) κατάλογος ελάχιστων ουσιών αναφοράς, οι οποίες έχουν επιλεγεί μεταξύ των χημικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για την απόδειξη των αποδεκτών επιδόσεων της επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς, και 3) τα συγκρίσιμα επίπεδα ορθότητας και αξιοπιστίας, που βασίζονται στα επιτευχθέντα για την επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών και τα οποία πρέπει να επιδεικνύει η προτεινόμενη δοκιμασία όταν αξιολογείται με χρήση του καταλόγου ελαχίστων ουσιών αναφοράς (1).

Ουσίες ελέγχου ικανότητας: υποσύνολο των ουσιών αναφοράς που περιλαμβάνονται στα πρότυπα επιδόσεων και οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιούνται από τα εργαστήρια για να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα στη διεξαγωγή τυποποιημένης μεθόδου δοκιμών. Τα κριτήρια επιλογής για τις εν λόγω ουσίες είναι συνήθως τα εξής: αντιπροσωπεύουν όλο το φάσμα αποκρίσεων, διατίθενται στο εμπόριο και συνοδεύονται από διαθέσιμα δεδομένα αναφοράς υψηλής ποιότητας.

Τεχνική ικανότητα: η αποδεδειγμένη ικανότητα ορθής διεξαγωγής δοκιμασίας, πριν από τη διεξαγωγή δοκιμών με άγνωστες ουσίες.

Οιστρογόνο αναφοράς (θετικός μάρτυρας, PC): 17β-οιστραδιόλη (E2, CAS 50-28-2).

Πρότυπο αναφοράς: ουσία αναφοράς που χρησιμοποιείται για την κατάδειξη της επάρκειας μιας δοκιμασίας. Η 17β-οιστραδιόλη είναι το πρότυπο αναφοράς για τις δοκιμασίες ER TA STTA και VM7Luc.

Μέθοδοι δοκιμών αναφοράς: Οι δοκιμές στις οποίες βασίζεται η PBTG 455.

Καταλληλότητα: περιγραφή της σχέσης μιας δοκιμασίας με την υπό μελέτη επίδραση και του κατά πόσον είναι κατάλληλη και χρήσιμη για συγκεκριμένο σκοπό. Πρόκειται για τον βαθμό στον οποίο η δοκιμασία μετρά ή προβλέπει σωστά τη βιολογική επίδραση υπό μελέτη. Η καταλληλότητα εμπεριέχει συνεκτίμηση της ορθότητας (συμφωνίας) μιας δοκιμασίας (1).

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια δοκιμασία μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας.

RLU: (Relative Light Units) σχετικές μονάδες φωτός

RNA: ριβονουκλεϊκό οξύ

RPC_{Max}: το μέγιστο επίπεδο απόκρισης που επάγεται από υπό δοκιμή χημική ουσία, εκφραζόμενο ως ποσοστό της απόκρισης που επάγεται από 1 nM E2 στο ίδιο τρυβλίο

▼M8

RPMI: θρεπτικό μέσο RPMI 1 640 που συμπληρώνεται με 0,9 % Pen-Strep και 8,0 % βόειου εμβρυϊκού ορού (FBS)

Σειρά δοκιμών: μεμονωμένο πείραμα βάσει του οποίου εκτιμάται η χημική δράση στο βιολογικό αποτέλεσμα της δοκιμασίας. Κάθε σειρά δοκιμών αποτελεί ένα πλήρες πείραμα που διεξάγεται σε πανομοιότυπες κοιλότητες ταυτόχρονα επιστρωμένων κυττάρων που προέρχονται από κοινό απόθεμα κυττάρων.

Ανεξάρτητη σειρά δοκιμών: χωριστό, ανεξάρτητο πείραμα διά του οποίου εκτιμάται η χημική δράση στο βιολογικό αποτέλεσμα της δοκιμασίας, με χρήση κυττάρων από διαφορετικό απόθεμα και πρόσφατα αραιωμένων χημικών ουσιών, και το οποίο διεξάγεται σε διαφορετικές ημέρες ή την ίδια ημέρα από άλλο προσωπικό.

SD: τυπική απόκλιση

Ευαισθησία: το ποσοστό του συνόλου των θετικών/δραστικών χημικών ουσιών που ταξινομούνται σωστά με τη δοκιμασία. Αποτελεί μέτρο ορθότητας μιας δοκιμασίας με την οποία λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας της δοκιμασίας (1).

Ειδικότητα: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών/αδρανών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο ορθότητας μιας δοκιμασίας με την οποία λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας της δοκιμασίας (1).

Σταθερή διαμόλυνση: η διαμόλυνση καλλιεργημένων κυττάρων με DNA κατά τρόπον ώστε να επιτυγχάνεται η σταθερή ενσωμάτωσή του στο γονιδίωμα των κυττάρων, με αποτέλεσμα τη σταθερή έκφραση των διαμολυνθέντων γονιδίων. Οι κλώνοι σταθερώς διαμολυθέντων κυττάρων επιλέγονται με σταθερούς δείκτες (π.χ. αντοχή στο G418).

Δοκιμασία STTA: δοκιμασία διενεργοποίησης σταθερώς διαμολυνθέντων κυττάρων, η δοκιμασία μεταγραφικής ενεργοποίησης ERα με χρήση της κυτταρικής σειράς HeLa 9 903.

Μελέτη: Το πλήρες φάσμα πειραματικών εργασιών που εκτελείται για την αξιολόγηση μιας μεμονωμένης, συγκεκριμένης ουσίας με χρήση συγκεκριμένης δοκιμασίας. Μια μελέτη περιλαμβάνει όλα τα στάδια, δηλ. δοκιμές αραίωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, προκαταρκτικές σειρές δοκιμών προσδιορισμού εύρους τιμών, όλες τις απαραίτητες ολοκληρωμένες σειρές δοκιμών, αναλύσεις δεδομένων, διασφάλιση ποιότητας, αξιολογήσεις κυτταροτοξικότητας, κ.λπ. Η ολοκλήρωση μιας μελέτης επιτρέπει την ταξινόμηση της δραστηριότητας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας επί του στόχου της τοξικότητας (δραστική, αδρανής ή αβέβαιη), η οποία εκτιμάται από τη χρησιμοποιούμενη δοκιμασία, καθώς και μια εκτίμηση της ισχύος σε σχέση με τη θετική χημική ουσία αναφοράς.

Ουσία: σύμφωνα με τον κανονισμό REACH ([1]), μια ουσία ορίζεται ως ένα χημικό στοιχείο και οι ενώσεις του σε φυσική κατάσταση ή όπως λαμβάνονται από οποιαδήποτε διεργασία παρασκευής, συμπεριλαμβανομένου κάθε προσθέτου που είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της σταθερότητάς της και κάθε πρόσμειξης που προέρχεται από τη χρησιμοποιούμενη διεργασία, αποκλειόμενου κάθε διαλύτη που μπορεί να διαχωρισθεί, χωρίς να επηρεάσει τη σταθερότητα της ουσίας ή να μεταβάλει τη σύνθεσή της. Ένας παρόμοιος ορισμός χρησιμοποιείται και στο GHS του ΟΗΕ (1).

ΤΑ (διενεργοποίηση): η έναρξη της σύνθεσης mRNA ως απόκριση σε ειδικό χημικό σήμα, όπως η δέσμευση οιστρογόνου στον υποδοχέα οιστρογόνων

([1]) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 18ης Δεκεμβρίου 2006, για την καταχώριση, την αξιολόγηση, την αδειοδότηση και τους περιορισμούς των χημικών προϊόντων (REACH) και για την ίδρυση του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Χημικών Προϊόντων καθώς και για την τροποποίηση της οδηγίας 1999/45/ΕΚ και για κατάργηση του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 793/93 του Συμβουλίου και του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1488/94 της Επιτροπής καθώς και της οδηγίας 76/769/ΕΟΚ του Συμβουλίου και των οδηγιών της Επιτροπής 91/155/ΕΟΚ, 93/67/ΕΟΚ, 93/105/ΕΚ και 2000/21/ΕΚ (ΕΕ L 304 της 22.11.2007, σ. 1).

▼**M8**

Δοκιμασία: στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών, μια δοκιμασία είναι μία από τις μεθοδολογίες που θεωρείται ότι πληρούν τα περιγραφόμενα κριτήρια επιδόσεων. Μεταξύ των στοιχείων της δοκιμασίας περιλαμβάνεται, για παράδειγμα, η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά με τις σχετικές συνθήκες ανάπτυξης, το συγκεκριμένο μέσο στο οποίο διεξάγεται η δοκιμή, οι συνθήκες προετοιμασίας των τρυβλίων, η διάταξη και οι αραιώσεις των υπό δοκιμή χημικών ουσιών μαζί με τυχόν άλλα μέτρα ελέγχου της ποιότητας και σχετικά στάδια αξιολόγησης δεδομένων.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Μεταγραφή: σύνθεση mRNA

UVCB: ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, προϊόντα πολύπλοκων αντιδράσεων και βιολογικά υλικά:

Επικυρωμένη μέθοδος δοκιμών: δοκιμασία για την οποία έχουν ολοκληρωθεί μελέτες επικύρωσης προκειμένου να προσδιοριστούν η καταλληλότητα (συμπεριλαμβανομένης της ορθότητας) και η αξιοπιστία της για συγκεκριμένο σκοπό. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι επιδόσεις επικυρωμένης μεθόδου δοκιμών από πλευράς ορθότητας και αξιοπιστίας ενδέχεται να μην επαρκούν για να κριθεί αποδεκτή για τον προτεινόμενο σκοπό (1).

Επικύρωση: η διαδικασία διά της οποίας διακριβώνεται η αξιοπιστία και η καταλληλότητα μιας συγκεκριμένης προσέγγισης, μεθόδου, δοκιμασίας, διεργασίας ή αξιολόγησης για καθορισμένο σκοπό (1).

VC (μάρτυρας με φορέα): ο διαλύτης που χρησιμοποιείται για τη διάλυση των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των χημικών ουσιών μαρτύρων υποβάλλεται σε δοκιμή αποκλειστικά ως φορέας, χωρίς διαλυμένη χημική ουσία.

VM7: αθανατοποιημένο κύτταρο αδενοκαρκινώματος που εκφράζει ενδογενώς τον υποδοχέα οιστρογόνων.

VM7Luc4E2: η κυτταρική σειρά VM7Luc4E2 προήλθε από αθανατοποιημένα ανθρώπινα κύτταρα αδενοκαρκινώματος VM7 που εκφράζουν ενδογενώς και τις δύο μορφές του υποδοχέα οιστρογόνων (ERα και ERβ) και τα οποία έχουν διαμολυνθεί σταθερώς με το πλασμίδιο pGudLuc7.ERE. Το πλασμίδιο αυτό περιέχει τέσσερα αντίγραφα ενός συνθετικού ολιγονουκλεοτιδίου που περιλαμβάνει το στοιχείο απόκρισης στα οιστρογόνα ανάντη του υποκινητή του ιού καρκίνου του μαστού του ποντικού (MMTV) και το γονίδιο λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας.

Ασθενής θετικός μάρτυρας: ασθενώς δραστική ουσία που επιλέγεται από τον κατάλογο χημικών ουσιών αναφοράς που περιλαμβάνεται σε όλες τις δοκιμές με σκοπό τη διασφάλιση της ορθής λειτουργίας της δοκιμασίας.

▼**M8**

Προσάρτημα 2

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΔΙΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΑΘΕΡΩΣ ΔΙΑΜΟΛΥΝΘΕΝΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ Α ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΩΣ ΑΓΩΝΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ HERA-HELA-9903

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ (ΒΛ. ΕΠΙΣΗΣ ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ)

1. Στην παρούσα δοκιμασία διενεργοποίησης (ΤΑ) χρησιμοποιείται η κυτταρική σειρά hERα-HeLa-9903 για την ανίχνευση της δράσης αγωνιστών οιστρογόνων που μεσολαβείται από τον ανθρώπινο υποδοχέα οιστρογόνων α (hERα). Στη μελέτη επικύρωσης της δοκιμασίας διενεργοποίησης σταθερά διαμολυνθέντων κυττάρων (STTA) που διενήργησε το ιαπωνικό Ινστιτούτο Αξιολόγησης και Έρευνας Χημικών Ουσιών (CERI) με χρήση της κυτταρικής σειράς hERα-HeLa-9903 για την ανίχνευση της δράσης αγωνιστών και ανταγωνιστών οιστρογόνων που μεσολαβείται από τον ανθρώπινο υποδοχέα οιστρογόνων α (hERα), κατεδείχθη η καταλληλότητα και η αξιοπιστία της δοκιμασίας για τον προβλεπόμενο σκοπό (1).

2. Η παρούσα δοκιμασία έχει σχεδιαστεί ειδικά για την ανίχνευση της μεσολαβούμενης από τον hERα ΤΑ μέσω μέτρησης της χημειοφωταύγειας ως παραμέτρου. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί σήματα φωταύγειας που δεν μεσολαβούνται από υποδοχείς σε συγκεντρώσεις φυτοοιστρογόνων υψηλότερες του 1 μM, λόγω υπερενεργοποίησης του γονιδίου αναφοράς λουσιφεράσης (2) (3). Παρότι η καμπύλη δόσης-απόκρισης υποδεικνύει ότι η πραγματική ενεργοποίηση του συστήματος ER λαμβάνει χώρα σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, η έκφραση της λουσιφεράσης που επιτυγχάνεται σε υψηλές συγκεντρώσεις φυτοοιστρογόνων ή ανάλογων ενώσεων για τις οποίες υπάρχουν υπόνοιες ότι επάγουν ανάλογη με τα φυτοοιστρογόνα υπερενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς λουσιφεράσης πρέπει να εξετάζεται προσεκτικά σε συστήματα δοκιμασίας ER ΤΑ σταθερώς διαμολυνθέντων κυττάρων (προσάρτημα 1).

3. Πριν από τη χρήση της παρούσας δοκιμασίας για κανονιστικούς σκοπούς, θα πρέπει να μελετηθούν οι ενότητες «ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ» και «ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ER ΤΑ». Οι ορισμοί και οι συντομογραφίες που χρησιμοποιούνται στην παρούσα κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών παρατίθενται στο προσάρτημα 2.1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ (ΒΛΕΠΕ ΕΠΙΣΗΣ ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ)

4. Η δοκιμασία χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της σύνδεσης του υποδοχέα οιστρογόνων με πρόσδεμα. Μετά τη δέσμευση του προσδέματος, το σύμπλοκο υποδοχέα-προσδέματος μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου δεσμεύει ειδικά στοιχεία απόκρισης του DNA και διενεργοποιεί ένα γονίδιο αναφοράς λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας, με αποτέλεσμα την αύξηση της κυτταρικής έκφρασης του ενζύμου λουσιφεράση. Η λουσιφερίνη είναι υπόστρωμα που μετασχηματίζεται από το ένζυμο λουσιφεράση σε βιοφωταυγές προϊόν που μπορεί να μετρηθεί ποσοτικά με λουμινόμετρο. Η δραστηριότητα της λουσιφεράσης μπορεί να αξιολογηθεί γρήγορα και με χαμηλό κόστος με χρήση διαφόρων κιτ δοκιμής του εμπορίου.

5. Το σύστημα δοκιμής χρησιμοποιεί την κυτταρική σειρά hERα-HeLa-9903, η οποία προέρχεται από όγκο ανθρώπινου τραχήλου, με δύο σταθερώς εντεθειμένα κατασκευάσματα: i) το κατασκεύασμα έκφρασης του hERα (που κωδικοποιεί τον ανθρώπινο υποδοχέα πλήρους μήκους), και ii) ένα κατασκεύασμα γονιδίου αναφοράς λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας που φέρει πέντε διαδοχικές επαναλήψεις στοιχείου απόκρισης στα οιστρογόνα (ERE) λεκιθογενίνης που υποκινείται από ένα στοιχείο TATA υποκινητή μεταλλοθειονίνης ποντικού (MT). Το κατασκεύασμα TATA MT ποντικού έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζει τις βέλτιστες επιδόσεις και, ως εκ τούτου, χρησιμοποιείται ευρέως. Κατά συνέπεια, η εν λόγω κυτταρική σειρά hERα-HeLa-9903 μπορεί να μετρά την ικανότητα μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας να επάγει τη μεσολαβούμενη από τον hERα διενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου λουσιφεράσης.

▼M8

6. Στην περίπτωση της δοκιμασίας αγωνιστών ER, η ερμηνεία των δεδομένων βασίζεται στο κατά πόσον το μέγιστο επίπεδο απόκρισης που επάγεται από υπό δοκιμή χημική ουσία ισοδυναμεί ή υπερβαίνει απόκριση αγωνιστών ίση με το 10 % της απόκρισης που επάγεται από συγκέντρωση που επάγει τη μέγιστη απόκριση (1 nM) του θετικού μάρτυρα (PC) 17β-οιστραδιόλη (E2) (δηλ. την PC10). Στην περίπτωση δοκιμασίας ανταγωνιστών ER, η ερμηνεία των δεδομένων βασίζεται στο κατά πόσον η απόκριση εμφανίζει κατά 30 % τουλάχιστον μείωση δραστηριότητας σε σχέση με την απόκριση που επάγεται από τον εμβολιασμένο μάρτυρα (25 pM E2) χωρίς κυτταροτοξικότητα. Η ανάλυση και η ερμηνεία των δεδομένων εξετάζονται αναλυτικά στις παραγράφους 34 - 48.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Κυτταρικές σειρές

7. Για τη δοκιμασία θα πρέπει να χρησιμοποιείται η σταθερώς διαμολυνθείσα κυτταρική σειρά hERα-HeLa-9903. Η κυτταρική σειρά μπορεί να ληφθεί από την τράπεζα κυττάρων της Ιαπωνικής Συλλογής Ερευνητικών Βιολογικών Πόρων (JCRB) ([1]), μετά από την υπογραφή συμφωνίας μεταφοράς υλικού.

8. Κατά τη διεξαγωγή δοκιμών θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο κύτταρα που έχει διαπιστωθεί ότι είναι ελεύθερα μυκοπλάσματος. Η RT-PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου) είναι η προτιμώμενη μέθοδος ευαίσθητης ανίχνευσης μόλυνσης από μυκόπλασμα (4) (5) (6).

Σταθερότητα της κυτταρικής σειράς

9. Για την παρακολούθηση της σταθερότητας της κυτταρικής σειράς, ως πρότυπα αναφοράς για τη δοκιμασία αγωνιστών θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οι E2, 17α-οιστραδιόλη, 17α-μεθυλοτεστοστερόνη και κορτικοστερόνη, και θα πρέπει να μετράται μια πλήρης καμπύλη συγκέντρωσης-απόκρισης στην περιοχή συγκεντρώσεων δοκιμής που παρατίθεται στον πίνακα 1 τουλάχιστον μία φορά σε κάθε διεξαγωγή της δοκιμασίας, ενώ τα αποτελέσματα θα πρέπει να συμφωνούν με τα αποτελέσματα που παρέχονται στον πίνακα 1.

10. Στην περίπτωση δοκιμασίας ανταγωνιστών, θα πρέπει να μετρώνται ταυτόχρονα με κάθε σειρά δοκιμών πλήρεις καμπύλες συγκέντρωσης για δύο πρότυπα αναφοράς, την ταμοξιφαίνη και τη φλουταμίδη. Θα πρέπει να παρακολουθείται η ορθότητα της ταξινόμησης των δύο χημικών ουσιών ως θετικών ή αρνητικών.

Συνθήκες καλλιέργειας και επίστρωσης κυττάρων

11. Τα κύτταρα θα πρέπει να διατηρούνται σε θρεπτικό μέσο ελάχιστων τροφικών απαιτήσεων Eagle (EMEM) χωρίς ερυθρό της φαινόλης, συμπληρούμενο με 60 mg/l του αντιβιοτικού καναμυκίνη και 10 % βόειου εμβρυϊκού ορού κατεργασμένου με επιχρισμένο με δεξτράνη ενεργό άνθρακα (DCC-FBS), σε επωαστήρα CO_2 (5 % CO_2) στους 37±1°C. Μετά την επίτευξη συρροής 75–90 %, τα κύτταρα μπορούν να ανακαλλιεργηθούν σε 10 ml 0,4 x 10^5 – 1 x 10^5 κυττάρων/ml για τρυβλίο κυτταροκαλλιέργειας των 100 mm. Τα κύτταρα θα πρέπει να εναιωρούνται με 10 % FBS-EMEM (που είναι το ίδιο με το EMEM με DCC-FBS) και, κατόπιν, να επιστρώνονται σε κοιλότητες τρυβλίου μικροτιτλοδότησης σε πυκνότητα 1 x 10^4 κυττάρων/(100 μl x κοιλότητα). Στη συνέχεια, τα κύτταρα θα πρέπει να προεπωάζονται σε επωαστήρα 5 % CO_2 στους 37°±1°C επί 3 ώρες, πριν από την έκθεση στη χημική ουσία. Ο πλαστικός εξοπλισμός θα πρέπει να είναι ελεύθερος οιστρογονικής δραστηριότητας.

12. Για τη διατήρηση της ακεραιότητας της απόκρισης, τα κύτταρα θα πρέπει να καλλιεργούνται για περισσότερες από μία ανακαλλιέργειες από το κατεψυγμένο απόθεμα στα εγκλιματισμένα θρεπτικά μέσα, ενώ δεν θα πρέπει να καλλιεργούνται για περισσότερες από 40 ανακαλλιέργειες. Για την κυτταρική σειρά hERα-HeLa-9903, αυτό δεν υπερβαίνει τους τρεις μήνες. Ωστόσο, η καλλιέργεια των κυττάρων υπό ακατάλληλες συνθήκες ενδέχεται να έχει ως συνέπεια τη μείωση των επιδόσεών τους.

([1]) JCRB Cell Bank: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Ιαπωνία. Αρ. φαξ: +81-72-641-9812

▼M8

13. Το DCC-FBS μπορεί να παρασκευάζεται σύμφωνα με τα όσα περιγράφονται στο προσάρτημα 2.2, ή να λαμβάνεται από το εμπόριο.

Κριτήρια αποδοχής

Θετικά και αρνητικά πρότυπα αναφοράς για τη δοκιμασία αγωνιστών ER

14. Πριν και κατά τη διάρκεια της μελέτης, θα πρέπει να επαληθεύεται η αποκρισιμότητα του συστήματος δοκιμής με χρήση των κατάλληλων συγκεντρώσεων ενός ισχυρού οιστρογόνου (της E2), ενός ασθενούς οιστρογόνου (17α-οιστραδιόλη), ενός ιδιαίτερα ασθενούς αγωνιστή (17α-μεθυλοτεστοστερόνη) και μιας αρνητικής ουσίας (κορτικοστερόνη). Στον πίνακα 1 φαίνονται οι αποδεκτές τιμές εύρους που προέκυψαν από τη μελέτη επικύρωσης (1). Τα εν λόγω 4 παράλληλα πρότυπα αναφοράς θα πρέπει να περιλαμβάνονται σε κάθε πείραμα και τα αποτελέσματα θα πρέπει να εμπίπτουν εντός των καθορισμένων αποδεκτών ορίων. Σε διαφορετική περίπτωση, θα πρέπει να προσδιορίζεται η αιτία μη συμμόρφωσης με τα κριτήρια αποδοχής (π.χ. χειρισμοί των κυττάρων, και ορός και αντιβιοτικά για την ποιότητα και συγκέντρωση) και να επαναλαμβάνεται η δοκιμασία. Εφόσον επιτευχθεί η συμμόρφωση με τα κριτήρια αποδοχής, είναι απολύτως απαραίτητη συνεπής χρήση των υλικών για τις καλλιέργειες των κυττάρων, προκειμένου να διασφαλίζεται ο περιορισμός στο ελάχιστο της μεταβλητότητας των τιμών EC_{50}, PC_{50} και PC_{10}. Τα τέσσερα παράλληλα πρότυπα αναφοράς, που πρέπει να περιλαμβάνονται σε κάθε πείραμα (το οποίο διεξάγεται υπό τις ίδιες συνθήκες, περιλαμβανομένων των υλικών, του επιπέδου ανακαλλιέργειας των κυττάρων και του τεχνικού προσωπικού), μπορούν να διασφαλίζουν την ευαισθησία της δοκιμασίας, δεδομένου ότι οι τιμές PC_{10} των τριών θετικών προτύπων αναφοράς θα πρέπει να περιλαμβάνονται εντός του αποδεκτού εύρους, όπως και οι τιμές PC_{50} και EC_{50}, εφόσον μπορούν να υπολογιστούν (βλ. πίνακα 1).

Πίνακας 1

Αποδεκτές τιμές εύρους των τεσσάρων προτύπων αναφοράς για τη δοκιμασία αγωνιστών ER

Ονομασία	$logPC_{50}$	$logPC_{10}$	$logEC_{50}$	Κλίση Hill	Εύρος δοκιμής
17β-οιστραδιόλη (E2) Αριθ. CAS: 50-28-2	-11,4~-10,1	<-11	-11,3~-10,1	0,7~1,5	10^{-14}~10^{-8}M
17α-οιστραδιόλη Αριθ. CAS: 57-91-0	-9,6~-8,1	-10,7~-9,3	-9,6~-8,4	0,9~2,0	10^{-12}~10^{-6}M
Κορτικοστερόνη Αριθ. CAS: 50-22-6	—	—	—	—	10^{-10}~10^{-4}M
17α-μεθυλοτεστοστερόνη Αριθ. CAS: 58-18-4	-6,0~-5,1	-8,0~-6,2	—	—	10^{-11}~10^{-5}M

Θετικά και αρνητικά πρότυπα αναφοράς για τη δοκιμασία ανταγωνιστών ER

15. Πριν και κατά τη διάρκεια της μελέτης, θα πρέπει να επαληθεύεται η αποκρισιμότητα του συστήματος δοκιμής με χρήση των κατάλληλων συγκεντρώσεων θετικής ουσίας (ταμοξιφαίνη) και αρνητικής ουσίας (φλουταμίδη). Στον πίνακα 2 φαίνονται οι αποδεκτές τιμές εύρους που προέκυψαν από τη μελέτη επικύρωσης (1). Τα εν λόγω δύο παράλληλα πρότυπα αναφοράς θα πρέπει να περιλαμβάνονται σε κάθε πείραμα και τα αποτελέσματα θα πρέπει να κρίνονται ορθά, όπως ορίζεται στα κριτήρια. Σε διαφορετική περίπτωση, θα πρέπει να προσδιορίζεται η αιτία μη συμμόρφωσης με τα κριτήρια αποδοχής (π.χ. χειρισμοί των κυττάρων, και ορός και αντιβιοτικά για την ποιότητα και συγκέντρωση) και να επαναλαμβάνεται η δοκιμασία. Επιπλέον, θα πρέπει να υπολογίζονται οι τιμές IC_{50} για θετική ουσία (ταμοξιφαίνη) και τα αποτελέσματα θα πρέπει να περιλαμβάνονται εντός των καθορισμένων αποδεκτών ορίων. Εφόσον επιτευχθεί η συμμόρφωση με τα κριτήρια αποδοχής, είναι απολύτως απαραίτητη η συνεπής χρήση των υλικών για τις καλλιέργειες των κυττάρων, προκειμένου να διασφαλίζεται ο περιορισμός στο ελάχιστο της μεταβλητότητας των τιμών IC50. Τα δύο παράλληλα πρότυπα αναφοράς, που πρέπει να περιλαμβάνονται σε κάθε πείραμα (το οποίο διεξάγεται υπό τις ίδιες συνθήκες, περιλαμβανομένων των υλικών, του επιπέδου ανακαλλιέργειας των κυττάρων και του τεχνικού προσωπικού), μπορούν να διασφαλίζουν την ευαισθησία της δοκιμασίας (βλ. πίνακα 2).

▼M8

Πίνακας 2

Κριτήρια και αποδεκτές τιμές εύρους των δύο προτύπων αναφοράς για τη δοκιμασία ανταγωνιστών ER

Ονομασία	Κριτήρια	$LogIC_{50}$	Εύρος δοκιμής
Ταμοξιφαίνη Αριθ. CAS: 10540-29-1	Θετική: Θα πρέπει να υπολογιστεί το IC50	-5,942~-7,596	10^{-10}~10^{-5}M
Φλουταμίδη Αριθ. CAS: 13311-84-7	Αρνητική: Δεν θα πρέπει να υπολογιστεί το IC30	—	10^{-10}~10^{-5}M

Θετικοί μάρτυρες και μάρτυρες με φορέα

16. Ο θετικός μάρτυρας (PC) για τη δοκιμασία αγωνιστών ER (1 nM E2) και για τη δοκιμασία ανταγωνιστών ER (10 μM TAM) θα πρέπει να ελέγχεται τουλάχιστον τρεις φορές σε κάθε τρυβλίο. Ο φορέας που χρησιμοποιείται για τη διάλυση μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να ελέγχεται ως μάρτυρας με φορέα τουλάχιστον τρεις φορές σε κάθε τρυβλίο. Πέραν του εν λόγω μάρτυρα με φορέα, εάν ο θετικός μάρτυρας χρησιμοποιεί διαφορετικό φορέα από ό,τι η υπό δοκιμή χημική ουσία, θα πρέπει να ελέγχεται και άλλος μάρτυρας με φορέα τουλάχιστον τρεις φορές στο ίδιο τρυβλίο με τον θετικό μάρτυρα.

Κριτήρια ποιότητας για τη δοκιμασία αγωνιστών ER

17. Η μέση δραστηριότητα της λουσιφεράσης του θετικού μάρτυρα (1 nM E2) θα πρέπει να είναι τουλάχιστον τετραπλάσια σε σχέση με τη μέση τιμή του μάρτυρα με φορέα σε κάθε τρυβλίο. Το κριτήριο αυτό διαμορφώνεται βάσει της αξιοπιστίας των τιμών παραμέτρου που προέκυψαν από τη μελέτη επικύρωσης (ιστορικά, η δραστικότητα αυτή είναι πολλαπλάσια κατά τέσσερις έως τριάντα φορές).

18. Όσον αφορά τον ποιοτικό έλεγχο της δοκιμασίας, η πολλαπλάσια επαγωγή που αντιστοιχεί στην τιμή του PC10 του παράλληλου θετικού μάρτυρα (1 nM E2) θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 1+2SD της τιμής πολλαπλάσιας επαγωγής (=1) του παράλληλου μάρτυρα με φορέα. Για λόγους ιεράρχησης προτεραιοτήτων, η τιμή του θετικού μάρτυρα PC10 μπορεί να είναι χρήσιμη για την απλούστευση της απαιτούμενης ανάλυσης δεδομένων σε σύγκριση με τη στατιστική ανάλυση. Παρότι η στατιστική ανάλυση παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη σημαντικότητα, δεν αποτελεί ποσοτική παράμετρο όσον αφορά το δυναμικό με βάση τη συγκέντρωση και, ως εκ τούτου, είναι λιγότερο χρήσιμη για τους σκοπούς της ιεράρχησης προτεραιοτήτων.

Κριτήρια ποιότητας για τη δοκιμασία ανταγωνιστών ER

19. Η μέση δραστηριότητα της λουσιφεράσης του εμβολιασμένου μάρτυρα (25 pM E2) θα πρέπει να είναι τουλάχιστον τετραπλάσια σε σχέση με τη μέση τιμή του μάρτυρα με φορέα σε κάθε τρυβλίο. Το κριτήριο αυτό διαμορφώνεται βάσει της αξιοπιστίας των τιμών παραμέτρου που προέκυψαν από τη μελέτη επικύρωσης.

20. Όσον αφορά τον ποιοτικό έλεγχο της δοκιμασίας, η σχετική μεταγραφική ενεργοποίηση (RTA) της E2 1 nM θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 100 %, ενώ η RTA 1 μM 4-υδροξυταμοξιφαίνης (OHT) θα πρέπει να είναι μικρότερη από 40,6 % και η RTA 100 μM διγιτονίνης (Dig) θα πρέπει να είναι μικρότερη από 0 %.

Απόδειξη της τεχνικής ικανότητας του εργαστηρίου (βλ. παράγραφο 14 και πίνακες 3 και 4 στην ενότητα «ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ER ΤΑ» της παρούσας μεθόδου δοκιμών)

Φορέας

21. Ως παράλληλος μάρτυρας με φορέα θα πρέπει να χρησιμοποιείται το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), ή κατάλληλος διαλύτης, στην ίδια συγκέντρωση που χρησιμοποιείται για τους διάφορους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες και τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να διαλύονται σε διαλύτη που διαλύει τη συγκεκριμένη υπό δοκιμή χημική ουσία και που αναμειγνύεται με το θρεπτικό μέσο των κυττάρων. Κατάλληλοι φορείς είναι το νερό, η αιθανόλη (καθαρότητας 95 % έως 100 %) και το DMSO. Εάν χρησιμοποιηθεί το DMSO, το επίπεδο δεν πρέπει να υπερβαίνει το 0,1 % κ.ό. Για οποιονδήποτε φορέα, θα πρέπει να καταδεικνύεται ότι ο μέγιστος όγκος που χρησιμοποιήθηκε δεν είναι κυτταροτοξικός και δεν επηρεάζει τις επιδόσεις της δοκιμασίας.

▼M8

Παρασκευή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών

22. Γενικά, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να διαλύονται σε DMSO ή άλλο κατάλληλο διαλύτη και να αραιώνονται διαδοχικά με τον ίδιο διαλύτη σε κοινή αναλογία 1:10 προκειμένου να παρασκευάζονται τα διαλύματα για αραίωση με το θρεπτικό μέσο.

Διαλυτότητα και κυτταροτοξικότητα: ζητήματα σχετικά με τον προσδιορισμό εύρους

23. Θα πρέπει να διεξάγεται προκαταρκτική δοκιμή για να προσδιορίζεται το κατάλληλο εύρος συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και να διαπιστώνονται τυχόν προβλήματα διαλυτότητας και κυτταροτοξικότητας. Αρχικά, οι χημικές ουσίες ελέγχονται έως τη μέγιστη συγκέντρωση του 1 μl/ml, 1 mg/ml, ή 1 mM, όποιο από τα τρία είναι χαμηλότερο. Με βάση τον βαθμό κυτταροτοξικότητας ή αδιαλυτότητας που παρατηρείται κατά την προκαταρκτική δοκιμή, κατά την πρώτη οριστική σειρά δοκιμών η χημική ουσία θα πρέπει να ελέγχεται σε λογαριθμικές διαδοχικές αραιώσεις ξεκινώντας από τη μέγιστη αποδεκτή συγκέντρωση (π.χ. 1 mM, 100 μM, 10 μM, κ.λπ.) και να καταγράφεται η παρουσία θολερότητας ή ο σχηματισμός ιζήματος ή η κυτταροτοξικότητα. Οι συγκεντρώσεις στη δεύτερη και, εάν είναι απαραίτητο, στην τρίτη σειρά δοκιμών θα πρέπει να προσαρμόζονται αναλόγως προκειμένου να χαρακτηρίζεται καλύτερα η καμπύλη συγκέντρωσης-απόκρισης και να αποφεύγονται συγκεντρώσεις που διαπιστώνεται ότι είναι μη διαλυτές ή επάγουν υπερβάλλουσα κυτταροτοξικότητα.

24. Όσον αφορά τους αγωνιστές και ανταγωνιστές ER, η παρουσία αυξανόμενων επιπέδων κυτταροτοξικότητας μπορεί να αλλοιώσει σε σημαντικό βαθμό ή να εξαλείψει την τυπική σιγμοειδή απόκριση και θα πρέπει να συνεκτιμάται κατά την ερμηνεία των δεδομένων. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μέθοδοι δοκιμών κυτταροτοξικότητας που μπορούν να παράσχουν πληροφορίες σχετικά με το 80 % της κυτταρικής βιωσιμότητας, με χρήση κατάλληλης δοκιμασίας βάσει της εμπειρίας του εργαστηρίου.

25. Σε περίπτωση που τα αποτελέσματα της δοκιμής κυτταροτοξικότητας δείχνουν ότι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του πλήθους των κυττάρων κατά 20 % ή περισσότερο, η εν λόγω συγκέντρωση θα πρέπει να θεωρείται κυτταρροτοξική, και οι συγκεντρώσεις που είναι ισοδύναμες ή υπερβαίνουν την κυτταροτοξική συγκέντρωση θα πρέπει να αποκλείονται από την αξιολόγηση.

Έκθεση σε χημικές ουσίες και οργάνωση τρυβλίων της δοκιμασίας

26. Η διαδικασία για τις αραιώσεις των χημικών ουσιών (στάδια 1 και 2) και την έκθεση των κυττάρων (στάδιο 3) μπορεί να διενεργηθεί ως εξής:

Στάδιο 1: Κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να αραιώνεται διαδοχικά σε DMSO, ή κατάλληλο διαλύτη, και να προστίθεται στις κοιλότητες τρυβλίου μικροτιτλοδότησης έτσι ώστε να προκύπτουν οι τελικές διαδοχικές συγκεντρώσεις που έχουν καθοριστεί βάσει της προκαταρκτικής δοκιμής προσδιορισμού εύρους (κατά κανόνα, μια σειρά π.χ. 1 mM, 100 μM, 10 μM, 1μM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM και 10 pM (10^{-3}-10^{-11} M)) για δοκιμές εις τριπλούν.

Στάδιο 2: Αραίωση χημικής ουσίας: Αραιώνονται πρώτα 1,5 μl της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε διαλύτη μέχρις όγκου 500 μl θρεπτικού μέσου.

Στάδιο 3: Έκθεση των κυττάρων στη χημική ουσία: Προστίθενται 50 μl αραίωσης με θρεπτικό μέσο (που παρασκευάστηκε κατά το στάδιο 2) σε κοιλότητα της δοκιμασίας που περιέχει 10^4 κύτταρα/100 μl/κοιλότητα.

Ο συνιστώμενος τελικός όγκος μέσου που πρέπει να υπάρχει σε κάθε κοιλότητα είναι 150 μl. Τα δείγματα και τα πρότυπα αναφοράς της δοκιμής μπορούν να κατανεμηθούν όπως φαίνεται στους πίνακες 3 και 4.

▼**M8**

Πίνακας 3

Παράδειγμα κατανομής συγκεντρώσεων τρυβλίου των προτύπων αναφοράς στο τρυβλίο δοκιμασίας αγωνιστών ER

Σειρά	17α-Μεθυλοτεστοστερόνη			Κορτικοστερόνη			17α-Οιστραδιόλη			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	συγκ. 1 (10 μM)	→	→	100 μM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	συγκ. 2 (1 μM)	→	→	10 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
Γ	συγκ. 3 (100 nM)	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
Δ	συγκ. 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	συγκ. 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
ΣΤ	συγκ. 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
Z	συγκ. 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Μάρτυρας με φορέα (0,1 % DMSO), PC: Θετικός μάρτυρας (1 nM E2)

27. Τα πρότυπα αναφοράς (E2, 17α-οιστραδιόλη, 17α-μεθυλοτεστοστερόνη και κορτικοστερόνη) θα πρέπει να ελέγχονται σε κάθε σειρά δοκιμών (πίνακας 3). Σε κάθε τρυβλίο δοκιμασίας της δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται μόνο οι κοιλότητες θετικού μάρτυρα με 1 nM E2 που μπορούν να προκαλέσουν μέγιστη επαγωγή E2 και οι κοιλότητες μάρτυρα με φορέα που έχουν υποστεί κατεργασία με DMSO (ή κατάλληλο διαλύτη) (πίνακας 4). Σε περίπτωση που στο ίδιο πείραμα χρησιμοποιούνται κύτταρα διαφορετικής προέλευσης (π.χ. διαφορετικού αριθμού ανακαλλιέργειας, διαφορετικής παρτίδας κ.λπ.), τα πρότυπα αναφοράς θα πρέπει να ελέγχονται για τα κύτταρα όλων των προελεύσεων.

Πίνακας 4

Παράδειγμα κατανομής συγκεντρώσεων τρυβλίου των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των χημικών ουσιών μαρτύρων τρυβλίου στο τρυβλίο δοκιμασίας αγωνιστών ER

Σειρά	Υπό δοκιμή χημική ουσία 1			Υπό δοκιμή χημική ουσία 2			Υπό δοκιμή χημική ουσία 3			Υπό δοκιμή χημική ουσία 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	συγκ. 1 (10 μM)	→	→	1 mM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	συγκ. 2 (1 μM)	→	→	100 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
Γ	συγκ. 3 (100 nM)	→	→	10 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→

▼**M8**

Σειρά	Υπό δοκιμή χημική ουσία 1			Υπό δοκιμή χημική ουσία 2			Υπό δοκιμή χημική ουσία 3			Υπό δοκιμή χημική ουσία 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Δ	συγκ. 4 (10 nM)	→	→	1 μM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	συγκ. 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
ΣΤ	συγκ. 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
Z	συγκ. 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Μάρτυρας με φορέα (0,1 % DMSO), PC: Θετικός μάρτυρας (1 nM E2)

Πίνακας 5

Παράδειγμα κατανομής συγκεντρώσεων τρυβλίου των προτύπων αναφοράς στο τρυβλίο δοκιμασίας ανταγωνιστών ER

Σειρά	**Ταμοξιφαίνη**			**Φλουταμίδη**			**Υπό δοκιμή χημική ουσία 1**			**Υπό δοκιμή χημική ουσία 2**		
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	**συγκ. 1 (10 μM)**	→	→	**10 μM**	→	→	**10 μM**	→	→	**10 μM**	→	→
B	**συγκ. 2 (1 μM)**	→	→	**1 μM**	→	→	**1 μM**	→	→	**1 μM**	→	→
Γ	**συγκ. 3 (100 nM)**	→	→	**100 nM**	→	→	**100 nM**	→	→	**100 nM**	→	→
Δ	**συγκ. 4 (10 nM)**	→	→	**10 nM**	→	→	**10 nM**	→	→	**10 nM**	→	→
E	**συγκ. 5 (1 nM)**	→	→	**1 nM**	→	→	**1 nM**	→	→	**1 nM**	→	→
ΣΤ	**συγκ. 6 (100 pM)**	→	→	**100 pM**	→	→	**100 pM**	→	→	**100 pM**	→	→
Z	**0,1 % DMSO**	→	→	→	→	→	**1 μM OHT**	→	→	**100 μM Dig**	→	→
H	**VC**	→	→	→	→	→	**PC**	→	→	→	→	→

VC: μάρτυρας με φορέα (0,1% DMSO), PC: θετικός μάρτυρας (1 nM E2), OHT: 4-υδροξυταμοξιφαίνη, Dig: διγιτονίνη.

= εμβολιασμένη με 25 pM E2

28. Για την αξιολόγηση της ανταγωνιστικής δραστηριότητας των χημικών ουσιών, οι κοιλότητες δοκιμασίας στις σειρές A έως Z θα πρέπει να εμβολιάζονται με 25 pM E2. Τα πρότυπα αναφοράς (ταμοξιφαίνη και φλουταμίδη) θα πρέπει να ελέγχονται σε κάθε σειρά δοκιμών. Σε κάθε τρυβλίο δοκιμασίας της δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται οι κοιλότητες θετικού μάρτυρα που υποβάλλονται σε κατεργασία με 1 nM E2 και οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιούνται για σκοπούς ποιοτικού ελέγχου της κυτταρικής σειράς hERα-HeLa-9903, οι κοιλότητες μάρτυρα με φορέα που υποβάλλονται σε κατεργασία με DMSO (ή κατάλληλο διαλύτη), οι κοιλότητες 0,1 % DMSO που υποβάλλονται σε κατεργασία με προσθήκη DMSO στην εμβολιασθείσα E2 και που αντιστοιχούν στον εμβολιασμένο μάρτυρα, οι κοιλότητες που υποβάλλονται σε κατεργασία με τελική συγκέντρωση 1 μM OHT και οι κοιλότητες που υποβάλλονται σε κατεργασία με 100 μM Dig (πίνακας 5). Το επακόλουθο τρυβλίο δοκιμασίας θα πρέπει να έχει την ίδια διάταξη τρυβλίου χωρίς τις κοιλότητες προτύπων αναφοράς (πίνακας 6). Σε περίπτωση που στο ίδιο πείραμα χρησιμοποιούνται κύτταρα διαφορετικής προέλευσης (π.χ. διαφορετικού αριθμού ανακαλλιέργειας, διαφορετικής παρτίδας κ.λπ.), τα πρότυπα αναφοράς θα πρέπει να ελέγχονται για τα κύτταρα όλων των προελεύσεων.

▼M8

Πίνακας 6

Παράδειγμα κατανομής συγκεντρώσεων τρυβλίου των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των χημικών ουσιών μαρτύρων τρυβλίου στο τρυβλίο δοκιμασίας ανταγωνιστών ER

Σειρά	Υπό δοκιμή χημική ουσία 1			Υπό δοκιμή χημική ουσία 2			Υπό δοκιμή χημική ουσία 3			Υπό δοκιμή χημική ουσία 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	συγκ. 1 (10 μM)	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→
B	συγκ. 2 (1 μM)	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→
Γ	συγκ. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
Δ	συγκ. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	συγκ. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
ΣΤ	συγκ. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
Z	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 μM OHT	→	→	100μM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: μάρτυρας με φορέα (0,1% DMSO), PC: θετικός μάρτυρας (1 nM E2), OHT: 4-υδροξυταμοξιφαίνη, Dig: διγιτονίνη.

: εμβολιασμένη με 25 pM E2

29. Θα πρέπει να επιβεβαιώνεται η έλλειψη φαινομένων άκρου (edge effects), όπου απαιτείται, και εάν υπάρχουν υπόνοιες για τέτοια φαινόμενα θα πρέπει να τροποποιείται η διάταξη του τρυβλίου με σκοπό την αποφυγή τους. Για παράδειγμα, μπορεί να εφαρμόζεται διάταξη τρυβλίου στην οποία αποκλείονται οι κοιλότητες των άκρων.

30. Μετά την προσθήκη των χημικών ουσιών, τα τρυβλία δοκιμασίας θα πρέπει να επωάζονται σε επωαστήρα 5 % CO_2 στους 37±1°C επί 20-24 ώρες με σκοπό την επαγωγή των προϊόντων γονιδίου αναφοράς.

31. Ειδική μέριμνα θα πρέπει να λαμβάνεται για τις ενώσεις υψηλής πτητικότητας. Σε αυτές τις περιπτώσεις, μια παρακείμενη κοιλότητα μάρτυρα μπορεί να οδηγήσει στη λήψη ψευδοθετικού αποτελέσματος, ενδεχόμενο που θα πρέπει να συνεκτιμάται με βάση τις αναμενόμενες τιμές και τις τιμές ιστορικών μαρτύρων. Στις λίγες περιπτώσεις στις οποίες η πτητικότητα μπορεί να αποτελεί πρόβλημα, συνιστάται η χρήση καλυμμάτων σφράγισης των τρυβλίων καθώς μπορεί να βοηθήσει στην αποτελεσματική απομόνωση των κοιλοτήτων κατά τη διάρκεια των δοκιμών.

32. Προκειμένου να διασφαλίζεται η ανεξαρτησία, θα πρέπει να διεξάγονται επαναλαμβανόμενες οριστικές δοκιμές για την ίδια χημική ουσία σε διαφορετικές ημέρες.

Δοκιμασία λουσιφεράσης

33. Για τη δοκιμασία μπορεί να χρησιμοποιείται αντιδραστήριο δοκιμασίας λουσιφεράσης του εμπορίου [π.χ. Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, E2510, ή ισοδύναμο)] ή τυποποιημένο σύστημα δοκιμασίας λουσιφεράσης (π.χ. Promega, E1500, ή ισοδύναμο), εφόσον πληρούνται τα κριτήρια αποδοχής. Τα αντιδραστήρια της δοκιμασίας θα πρέπει να επιλέγονται με βάση την ευαισθησία του λουμινόμετρου που θα χρησιμοποιηθεί. Όταν χρησιμοποιείται το τυποποιημένο σύστημα δοκιμασίας λουσιφεράσης, πριν από την προσθήκη του υποστρώματος θα πρέπει να χρησιμοποιείται αντιδραστήριο λύσης κυτταροκαλλιέργειας (π.χ. Promega, E1531, ή ισοδύναμο). Η εφαρμογή του αντιδραστηρίου λουσιφεράσης θα πρέπει να πραγματοποιείται με βάση τις οδηγίες του παρασκευαστή.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Δοκιμασία αγωνιστών ER

34. Στην περίπτωση δοκιμασίας αγωνιστών ER, για τη μέτρηση της σχετικής μεταγραφικής δραστηριότητας στον θετικό μάρτυρα PC (1 nM E2) μπορούν να αναλύονται τα σήματα φωταύγειας από το ίδιο τρυβλίο με βάση τα ακόλουθα στάδια (άλλες ισοδύναμες μαθηματικές διαδικασίες είναι επίσης αποδεκτές):

Στάδιο 1: Υπολογισμός της μέσης τιμής για τον μάρτυρα με φορέα.

▼**M8**

Στάδιο 2: Αφαίρεση της μέσης τιμής του μάρτυρα με φορέα από κάθε κοιλότητα με σκοπό την κανονικοποίηση των δεδομένων.

Στάδιο 3: Υπολογισμός της μέσης τιμής του κανονικοποιημένου θετικού μάρτυρα.

Στάδιο 4: Διαίρεση της κανονικοποιημένης τιμής κάθε κοιλότητας του τρυβλίου διά της μέσης τιμής του κανονικοποιημένου θετικού μάρτυρα (PC=100 %).

Η τελική τιμή κάθε κοιλότητας είναι η σχετική μεταγραφική δραστηριότητα για τη συγκεκριμένη κοιλότητα σε σύγκριση με την απόκριση θετικού μάρτυρα.

Στάδιο 5: Υπολογισμός της μέσης τιμής της σχετικής μεταγραφικής δραστηριότητας για κάθε ομάδα συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Η απόκριση περιλαμβάνει δύο διαστάσεις: τη μέση μεταγραφική δραστηριότητα (απόκριση) και τη συγκέντρωση στην οποία εμφανίζεται η απόκριση (βλ. επόμενη ενότητα).

Παράμετροι επαγωγής EC_{50}, PC_{50} και PC_{10}

35. Για τον υπολογισμό της EC50 είναι απαραίτητη η πλήρης καμπύλη συγκέντρωσης-απόκρισης, χωρίς ωστόσο αυτό να είναι πάντοτε εφικτό ή χρήσιμο στην πράξη λόγω των περιορισμών του εύρους συγκεντρώσεων της δοκιμής (π.χ. λόγω προβλημάτων κυτταροτοξικότητας ή διαλυτότητας). Εντούτοις, καθώς η EC50 και το μέγιστο επίπεδο επαγωγής (που αντιστοιχεί στην ανώτατη τιμή της εξίσωσης Hill) είναι διαφωτιστικές παράμετροι, θα πρέπει να αναφέρονται, όταν αυτό είναι εφικτό. Για τον υπολογισμό της EC50 και του μέγιστου επιπέδου επαγωγής, θα πρέπει να χρησιμοποιείται κατάλληλο λογισμικό στατιστικής ανάλυσης (π.χ. το λογισμικό στατιστικής ανάλυσης Graphpad Prism). Εάν η λογιστική εξίσωση Hill είναι εφαρμοστέα στα δεδομένα απόκρισης συγκέντρωσης, η EC50 θα πρέπει να υπολογίζεται βάσει της ακόλουθης εξίσωσης (7):

Y= ελάχιστη απόκριση + (μέγιστη απόκριση – ελάχιστη απόκριση) / (1+10 exp ((log EC50 -X) x κλίση Hill)), όπου:

X είναι ο λογάριθμος της συγκέντρωσης και

Y είναι η απόκριση, και η Y ξεκινά από την ελάχιστη απόκριση και καταλήγει στη μέγιστη απόκριση ακολουθώντας πορεία σιγμοειδούς καμπύλης. Στη λογιστική εξίσωση Hill, η ελάχιστη απόκριση είναι καθορισμένη σε τιμή μηδέν.

36. Για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία, θα πρέπει να παρέχονται τα ακόλουθα:

η RPCMax, η οποία είναι το μέγιστο επίπεδο απόκρισης που επάγεται από υπό δοκιμή χημική ουσία, εκφραζόμενη ως ποσοστό της απόκρισης που επάγεται από 1 nM E2 στο ίδιο τρυβλίο, καθώς και η PC_{Max} (η συγκέντρωση που συνδέεται με την RPCMax), και

για τις θετικές χημικές ουσίες, οι συγκεντρώσεις που επάγουν την PC10 και, κατά περίπτωση, την PC50.

37. Η τιμή PCx μπορεί να υπολογιστεί μέσω παρεκβολής μεταξύ 2 σημείων των συντεταγμένων X-Y, ένα αμέσως υψηλότερο και ένα αμέσως χαμηλότερο από μια τιμή PCx. Αν τα σημεία δεδομένων που βρίσκονται αμέσως υψηλότερα και αμέσως χαμηλότερα από την τιμή PCx έχουν ως συντεταγμένες τις (a,b) και (c,d) αντίστοιχα, τότε η τιμή PCx μπορεί να υπολογιστεί βάσει της ακόλουθης εξίσωσης:

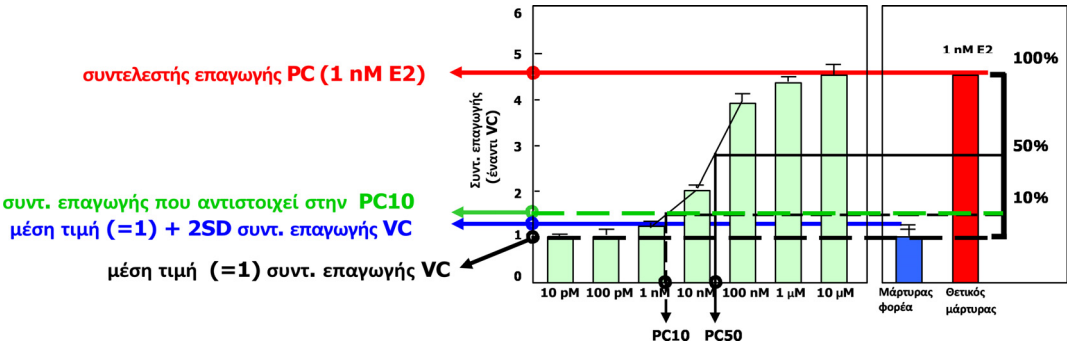
$$\log[PCx] = \log[c]+(x-d)/(d-b)$$

▼M8

38. Στο σχήμα 1 παρακάτω παρέχονται περιγραφές των τιμών θετικού μάρτυρα (PC).

Σχήμα 1

Παράδειγμα υπολογισμού τιμών θετικού μάρτυρα (PC). Ο PC (1 nM E2) περιλαμβάνεται σε κάθε τρυβλίο δοκιμασίας



Δοκιμασία ανταγωνιστών ER

39. Στην περίπτωση δοκιμασίας ανταγωνιστών ER, για τη μέτρηση της σχετικής μεταγραφικής δραστηριότητας (RTA) στον εμβολιασμένο μάρτυρα PC (25 pM E2) μπορούν να αναλύονται τα σήματα φωταύγειας από το ίδιο τρυβλίο με βάση τα ακόλουθα στάδια (άλλες ισοδύναμες μαθηματικές διαδικασίες είναι επίσης αποδεκτές):

Στάδιο 1: Υπολογισμός της μέσης τιμής για τον μάρτυρα με φορέα.

Στάδιο 2: Αφαίρεση της μέσης τιμής του μάρτυρα με φορέα από κάθε κοιλότητα με σκοπό την κανονικοποίηση των δεδομένων. Στάδιο 3: Υπολογισμός της μέσης τιμής του κανονικοποιημένου εμβολιασμένου μάρτυρα.

Στάδιο 4: Διαίρεση της κανονικοποιημένης τιμής κάθε κοιλότητας του τρυβλίου διά της μέσης τιμής του κανονικοποιημένου εμβολιασμένου μάρτυρα (εμβολιασμένος μάρτυρας = 100 %).

Η τελική τιμή κάθε κοιλότητας είναι η σχετική μεταγραφική δραστηριότητα για τη συγκεκριμένη κοιλότητα σε σύγκριση με την απόκριση εμβολιασμένου μάρτυρα.

Στάδιο 5: Υπολογισμός της μέσης τιμής της σχετικής μεταγραφικής δραστηριότητας για κάθε αγωγή.

Παράμετροι επαγωγής IC_{30} και IC_{50}

40. Για τις θετικές χημικές ουσίες, θα πρέπει να παρέχονται οι συγκεντρώσεις που επάγουν την IC30 και, κατά περίπτωση, την IC50.

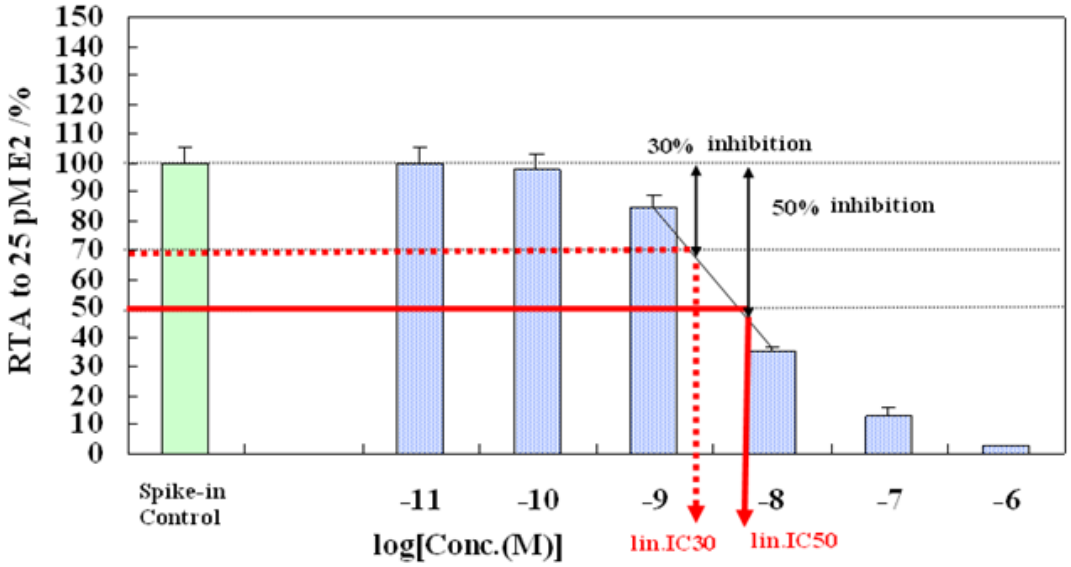
41. Η τιμή ICx μπορεί να υπολογιστεί μέσω παρεκβολής μεταξύ 2 σημείων των συντεταγμένων X-Y, ένα αμέσως υψηλότερο και ένα αμέσως χαμηλότερο από μια τιμή ICx. Αν τα σημεία δεδομένων που βρίσκονται αμέσως υψηλότερα και αμέσως χαμηλότερα από την τιμή ICx έχουν ως συντεταγμένες τις (c,d) και (a,b) αντίστοιχα, τότε η τιμή ICx μπορεί να υπολογιστεί βάσει της ακόλουθης εξίσωσης:

lin ICx = a-(b-(100-x)) (a-c)/(b-d)

▼M8

Σχήμα 2

Παράδειγμα υπολογισμού τιμών IC. Ο εμβολιασμένος μάρτυρας (25 pM E2) περιλαμβάνεται σε κάθε τρυβλίο δοκιμασίας



RTA: σχετική μεταγραφική δραστηριότητα

42. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να βασίζονται σε δύο (ή τρεις) ανεξάρτητες σειρές δοκιμών. Σε περίπτωση που από δύο σειρές δοκιμών προκύπτουν συγκρίσιμα και, ως εκ τούτου, αναπαραγώγιμα αποτελέσματα, δεν είναι απαραίτητη η διεξαγωγή τρίτης σειράς δοκιμών. Για να είναι αποδεκτά, τα αποτελέσματα θα πρέπει να πληρούν τις ακόλουθες προϋποθέσεις:

— να πληρούν τα κριτήρια αποδοχής (βλ. κριτήρια αποδοχής, παράγραφοι 14-20),

— να είναι αναπαραγώγιμα.

Κριτήρια ερμηνείας των δεδομένων

Πίνακας 7

Κριτήρια λήψης απόφασης χαρακτηρισμού του αποτελέσματος ως θετικού ή αρνητικού στη δοκιμασία αγωνιστών ER

Θετικό	Εάν προκύψει RPCMax που ισοδυναμεί ή υπερβαίνει το 10 % της απόκρισης του θετικού μάρτυρα σε τουλάχιστον δύο από δύο ή δύο από τρεις σειρές δοκιμών.
Αρνητικό	Εάν η RPCMax δεν αντιστοιχεί σε τουλάχιστον 10 % της απόκρισης του θετικού μάρτυρα σε δύο από δύο ή δύο από τρεις σειρές δοκιμών.

Πίνακας 8

Κριτήρια λήψης απόφασης χαρακτηρισμού του αποτελέσματος ως θετικού ή αρνητικού στη δοκιμασία ανταγωνιστών ER

Θετικό	Εάν υπολογίζεται η IC30 σε τουλάχιστον δύο από δύο ή δύο από τρεις σειρές δοκιμών.
Αρνητικό	Εάν δεν μπορεί να υπολογιστεί η IC30 σε δύο από δύο ή δύο από τρεις σειρές δοκιμών.

▼**M8**

43. Τα κριτήρια ερμηνείας των δεδομένων φαίνονται στους πίνακες 7 και 8. Για τα θετικά αποτελέσματα θα πρέπει να αναφέρεται τόσο το μέγεθος της επίδρασης όσο και η συγκέντρωση στην οποία εμφανίζεται η επίδραση. Και τα δύο αυτά επιτυγχάνονται όταν τα αποτελέσματα εκφράζονται ως συγκέντρωση στην οποία επιτυγχάνεται το 50 % (PC50) ή το 10 % (PC10) των τιμών θετικού μάρτυρα (PC) για τη δοκιμασία αγωνιστών, και ως συγκέντρωση στην οποία αναστέλλεται το 50 % (IC50) ή το 30 % (IC30) της τιμής του εμβολιασμένου μάρτυρα για τη δοκιμασία ανταγωνιστών. Ωστόσο, μια υπό δοκιμή χημική ουσία χαρακτηρίζεται θετική εάν η μέγιστη απόκριση που επάγει (RPCMax) είναι ίση ή υπερβαίνει το 10 % της απόκρισης του θετικού μάρτυρα σε τουλάχιστον δύο από δύο ή δύο από τρεις σειρές δοκιμών, ενώ θεωρείται αρνητική εάν η RPCMax δεν αντιστοιχεί στο 10 % τουλάχιστον της απόκρισης του θετικού μάρτυρα σε δύο από δύο ή δύο από τρεις σειρές δοκιμών.

44. Οι τιμές των PC10, PC50 και PCMax στη δοκιμασία αγωνιστών ER και οι τιμές των IC30 και IC50 στη δοκιμασία ανταγωνιστών ER μπορούν να υπολογιστούν με χρήση υπολογιστικού φύλλου που διατίθεται με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών στον δημόσιο δικτυακό τόπο του ΟΟΣΑ ([1]).

45. Ο υπολογισμός των τιμών PC10 ή PC50 και IC30 ή IC50 τουλάχιστον δύο φορές αναμένεται ότι θα είναι επαρκής. Εντούτοις, σε περίπτωση που η προκύπτουσα γραμμή βάσης για τα δεδομένα στο ίδιο εύρος συγκεντρώσεων εμφανίζει μεταβλητότητα με απαράδεκτα υψηλό συντελεστή μεταβλητότητας (CV, %), τα δεδομένα δεν μπορούν να θεωρηθούν αξιόπιστα και θα πρέπει να προσδιορίζεται η αιτία της υψηλής μεταβλητότητας. Ο συντελεστής μεταβλητότητας των τριπλών ανεπεξέργαστων δεδομένων (δηλ. τα δεδομένα έντασης φωταύγειας) των σημείων δεδομένων που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό του PC10 θα πρέπει να μην υπερβαίνει το 20 %.

46. Η συμμόρφωση με τα κριτήρια αποδοχής υποδεικνύει ότι το σύστημα δοκιμασίας λειτουργεί σωστά, αλλά δεν διασφαλίζει ότι οποιαδήποτε συγκεκριμένη σειρά δοκιμών θα παράξει ορθά δεδομένα. Η επανάληψη των αποτελεσμάτων της πρώτης σειράς δοκιμών είναι ο καλύτερος τρόπος να επιβεβαιώνεται ότι παρήχθησαν ορθά δεδομένα.

47. Σε περίπτωση δοκιμασίας αγωνιστών ER, όταν απαιτούνται περισσότερες πληροφορίες για τις θετικές υπό δοκιμή χημικές ουσίες, για σκοπούς πέρα από τη διαλογή και την ιεράρχηση προτεραιοτήτων της παρούσας κατευθυντήριας γραμμής δοκιμών, ιδίως για τις χημικές ουσίες PC10-PC49 και για τις χημικές ουσίες για τις οποίες υπάρχουν υπόνοιες ότι υπερενεργοποιούν τη λουσιφεράση, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ανταγωνιστής του ERα για να επιβεβαιωθεί ότι η παρατηρούμενη δραστηριότητα λουσιφεράσης αποτελεί αποκλειστικά και μόνο απόκριση που σχετίζεται με τον ERα (βλ. προσάρτημα 2.1).

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

48. Βλ. παράγραφο 20 της ενότητας «ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ER ΤΑ».

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1 459-1 469.

(3) Kuiper G.G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinol.,* 139, 4 252-4 263.

([1]) http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼**M8**

(4) Spaepen M., *et al.* (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, FEMS Microbiol. Lett., 78(1), 89-94.

(5) Kobayashi H., *et al.* (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, J. Vet. Med. Sci., 57(4), 769- 71.

(6) Dussurget O. and Roulland-Dussoix D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, *Appl.* Environ. *Microbiol*., 60(3), 953-9.

(7) De Lean A., Munson P.J. and Rodbard D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, Am. J. *Physiol*., 235, E97-El02.

▼**M8**

Προσάρτημα 2.1

ΨΕΥΔΟΘΕΤΙΚΕΣ ΕΚΒΑΣΕΙΣ: ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΣΗΜΑΤΩΝ ΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ ΠΟΥ ΔΕΝ ΜΕΣΟΛΑΒΟΥΝΤΑΙ ΑΠΟ ΥΠΟΔΟΧΕΑ

1. Οι ψευδοθετικές εκβάσεις στη δοκιμασία αγωνιστών ER μπορεί να οφείλονται σε ενεργοποίηση του γονιδίου λουσιφεράσης χωρίς μεσολάβηση ER ή σε άμεση ενεργοποίηση του γονιδιακού προϊόντος ή σε φθορισμό από άσχετη πηγή. Τέτοιες επιδράσεις αναγνωρίζονται από ατελή ή ασυνήθη καμπύλη δόσης-απόκρισης. Σε περίπτωση που υπάρχουν υπόνοιες για παρόμοιες επιδράσεις, θα πρέπει να εξετάζεται η επίδραση ενός ανταγωνιστή ER [π.χ. 4-υδροξυταμοξιφαίνη (OHT) σε μη τοξική συγκέντρωση] επί της απόκρισης. Ο καθαρός ανταγωνιστής ICI 1827 80 μπορεί να μην είναι κατάλληλος για αυτόν τον σκοπό, δεδομένου ότι επαρκής συγκέντρωση ICI 1827 80 μπορεί να μειώσει την τιμή του μάρτυρα με φορέα (VC), με αποτέλεσμα να επηρεαστεί η ανάλυση δεδομένων.

2. Για να διασφαλίζεται η εγκυρότητα της προσέγγισης, θα πρέπει να ελέγχονται τα ακόλουθα στο ίδιο τρυβλίο:

   — αγωνιστική δραστικότητα της άγνωστης χημικής ουσίας με/χωρίς 10 μM OHT

   — VC (εις τριπλούν)

   — OHT (εις τριπλούν)

   — 1 nM E2 (εις τριπλούν) ως θετικός μάρτυρας αγωνιστή

   — 1 nM E2 + OHT (εις τριπλούν)

Κριτήρια ερμηνείας των δεδομένων

Σημείωση: όλες οι κοιλότητες θα πρέπει να υποβάλλονται σε αγωγή με την ίδια συγκέντρωση του φορέα.

— Εάν η αγωνιστική δραστικότητα της άγνωστης χημικής ουσίας ΔΕΝ επηρεάζεται από την αγωγή με τον ανταγωνιστή ER, ταξινομείται ως «αρνητική».

— Εάν η αγωνιστική δραστικότητα της άγνωστης χημικής ουσίας αναστέλλεται πλήρως, εφαρμόστε τα κριτήρια λήψης απόφασης.

— Εάν η αγωνιστική δραστικότητα στη χαμηλότερη συγκέντρωση ισούται με ή υπερβαίνει την απόκριση PC10, η άγνωστη χημική ουσία αναστέλλεται σε ποσοστό ίσο ή μεγαλύτερο από αυτόν της απόκρισης PC10. Υπολογίζεται η διαφορά στις αποκρίσεις μεταξύ των κοιλοτήτων που δεν υποβλήθηκαν σε αγωγή και των κοιλοτήτων που υποβλήθηκαν σε αγωγή με τον ανταγωνιστή ER, και αυτή η διαφορά θα πρέπει να θεωρείται η πραγματική απόκριση και να χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των κατάλληλων παραμέτρων για τη λήψη απόφασης περί της ταξινόμησης.

Ανάλυση δεδομένων

Έλεγχος του προτύπου επιδόσεων.

Έλεγχος του συντελεστή μεταβλητότητας (CV) μεταξύ των κοιλοτήτων που υποβλήθηκαν σε αγωγή υπό τις ίδιες συνθήκες.

1. Υπολογισμός της μέσης τιμής του μάρτυρα με φορέα (VC)

2. Αφαίρεση της μέσης τιμής μάρτυρα με φορέα από την τιμή κάθε κοιλότητας που **δεν** υποβλήθηκε σε αγωγή με OHT

3. Υπολογισμός της μέσης τιμής OHT

4. Αφαίρεση της μέσης τιμής μάρτυρα με φορέα από την τιμή κάθε κοιλότητας που υποβλήθηκε σε αγωγή με OHT

5. Υπολογισμός της μέσης τιμής θετικού μάρτυρα

6. Υπολογισμός της σχετικής μεταγραφικής δραστικότητας όλων των υπόλοιπων κοιλοτήτων σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα.

▼**M8**

Προσάρτημα 2.2

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΟΡΟΥ ΠΟΥ ΥΠΟΒΑΛΛΕΤΑΙ ΣΕ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΕΠΙΧΡΙΣΜΕΝΟ ΜΕ ΔΕΞΤΡΑΝΗ ΕΝΕΡΓΟ ΑΝΘΡΑΚΑ (DCC)

1. Η κατεργασία ορού με επιχρισμένο με δεξτράνη ενεργό άνθρακα (DCC) αποτελεί γενική μέθοδο απομάκρυνσης των οιστρογονικών ενώσεων από τον ορό που προστίθεται στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων, με σκοπό τον αποκλεισμό της εσφαλμένης απόκρισης που συνδέεται με κατάλοιπα οιστρογόνων στον ορό. Με τη διαδικασία αυτή μπορούν να υποβληθούν σε κατεργασία 500 ml βόειου εμβρυϊκού ορού (FBS).

Στοιχεία

2. Θα χρειαστούν τα ακόλουθα υλικά και εξοπλισμός:

Υλικά

Ενεργός άνθρακας

Δεξτράνη

Εξάνυδρο χλωριούχο μαγνήσιο ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)

Σακχαρόζη

Ρυθμιστικό διάλυμα HEPES 1 M (pH 7,4)

Υπερκαθαρό νερό από σύστημα φίλτρων

Εξοπλισμός

Αποστειρωμένος σε αυτόκαυστο γυάλινος περιέκτης (το μέγεθός του θα πρέπει να προσαρμόζεται κατάλληλα) Φυγόκεντρος εργαστηρίου γενικής χρήσης (που μπορεί να ρυθμιστεί σε θερμοκρασία 4 °C)

Διαδικασία

3. Η ακόλουθη διαδικασία έχει προσαρμοστεί για τη χρήση σωλήνων φυγοκέντρου 50 ml:

[Ημέρα 1] Παρασκευή εναιωρήματος επιχρισμένου με δεξτράνη ενεργού άνθρακα με 1 L υπερκαθαρού νερού που περιέχει 1,5 mM $MgCl_2$, 0,25 M σακχαρόζης, 2,5 g ενεργού άνθρακα, 0,25 g δεξτράνης και 5 mM HEPES και ολονύχτια ανάδευση στους 4 °C.

[Ημέρα 2] Μετάγγιση του εναιωρήματος σε σωλήνες φυγοκέντρου των 50 ml και φυγοκέντρηση στις 10 000 σ.α.λ. στους 4 °C επί 10 λεπτά. Αφαίρεση του υπερκείμενου υγρού και φύλαξη του μισού ιζήματος ενεργού άνθρακα στους 4 °C για χρήση την ημέρα 3. Εναιώρηση του υπόλοιπου μισού ενεργού άνθρακα με FBS που έχει αποψυχθεί με ήπιο τρόπο ώστε να αποφευχθεί η καθίζηση, αδρανοποίηση σε θερμοκρασία 56 °C επί 30 λεπτά και, κατόπιν, μεταφορά σε αποστειρωμένο γυάλινο περιέκτη, π.χ. φιάλη Erlenmeyer. Ολονύχτια ανάδευση του εναιωρήματος στους 4 °C.

[Ημέρα 3] Μετάγγιση του εναιωρήματος με το FBS σε σωλήνες φυγοκέντρου και φυγοκέντρηση στις 10 000 σ.α.λ. στους 4 °C επί 10 λεπτά. Συλλογή του FBS και μεταφορά στο νέο ίζημα ενεργού άνθρακα που έχει παρασκευαστεί και φυλαχθεί την ημέρα 2. Εναιώρηση του ιζήματος ενεργού άνθρακα και ολονύχτια ήπια ανάδευση του εναιωρήματος σε αποστειρωμένο γυάλινο περιέκτη στους 4 °C.

[Ημέρα 4] Μετάγγιση του εναιωρήματος για φυγοκέντρηση στις 10 000 σ.α.λ. στους 4 °C επί 10 λεπτά και αποστείρωση του υπερκείμενου υγρού με διήθηση μέσα από στείρο φίλτρο 0,2 μm. Αυτός ο ορός FBS που έχει υποβληθεί σε κατεργασία με DCC θα πρέπει να φυλάσσεται στους -20 °C και μπορεί να χρησιμοποιηθεί εντός διαστήματος ενός έτους το πολύ.

▼**M8**

Προσαρτημα 3

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΔΙΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ VM7LUC ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΑΓΩΝΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ (ΒΛ. ΕΠΙΣΗΣ ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ)

1. Η παρούσα δοκιμασία χρησιμοποιεί την κυτταρική σειρά VM7Luc4E2 ([1]). Έχει επικυρωθεί από το National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), και την Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) (Διυπηρεσιακή Συντονιστική Επιτροπή για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων) (1). Οι κυτταρικές σειρές VM7Luc εκφράζουν κατά κύριο λόγο ενδογενή ERα και μικρή ποσότητα ERβ (2) (3) (4).

2. Η παρούσα δοκιμασία εφαρμόζεται σε ευρύ φάσμα ουσιών, υπό την προϋπόθεση ότι μπορούν να διαλυθούν σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO, CASRN 67-68-5), δεν αντιδρούν με το DMSO ή το μέσο κυτταροκαλλιέργειας και δεν είναι κυτταροτοξικές στις υπό δοκιμή συγκεντρώσεις. Σε περίπτωση που δεν είναι εφικτή η χρήση DMSO, μπορεί να χρησιμοποιείται άλλος φορέας όπως η αιθανόλη ή το νερό (βλ. παράγραφο 12). Οι καταδειχθείσες επιδόσεις της δοκιμασίας (αντ-)αγωνιστών VM7Luc ER TA υποδεικνύουν ότι η εν λόγω δοκιμασία μπορεί να παρέχει διαφωτιστικά δεδομένα σχετικά με τους μηχανισμούς δράσης που μεσολαβούνται από τους ER, τα οποία μπορούν να λαμβάνονται υπόψη για την κατά προτεραιότητα ιεράρχηση των ουσιών προς διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών.

3. Η παρούσα δοκιμασία έχει σχεδιαστεί ειδικά για την ανίχνευση της μεσολαβούμενης από τον hERα και τον hERβ TA μέσω μέτρησης της χημειοφωταύγειας ως παραμέτρου. Η χρήση της χημειοφωταύγειας στις βιοδοκιμασίες αποτελεί ευρέως διαδεδομένη πρακτική διότι η φωταύγεια έχει υψηλή αναλογία σήματος προς υπόβαθρο. Εντούτοις, ουσίες που αναστέλλουν το ένζυμο λουσιφεράση μπορούν να προκαλέσουν σύγχυση ως προς τη δραστικότητα της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας σε κυτταρικές δοκιμασίες, προκαλώντας είτε φαινομενική αναστολή είτε αυξημένη φωταύγεια λόγω σταθεροποίησης πρωτεϊνών. Επιπλέον, σε ορισμένες δοκιμασίες γονιδίου αναφοράς ER που χρησιμοποιούν τη λουσιφεράση, έχουν αναφερθεί σήματα φωταύγειας που δεν μεσολαβούνται από υποδοχείς σε συγκεντρώσεις φυτοοιστρογόνων υψηλότερες του 1 μM λόγω υπερενεργοποίησης του γονιδίου αναφοράς λουσιφεράσης (9) (11). Παρότι η καμπύλη δόσης-απόκρισης υποδεικνύει ότι η πραγματική ενεργοποίηση του συστήματος ER λαμβάνει χώρα σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, η έκφραση της λουσιφεράσης που επιτυγχάνεται σε υψηλές συγκεντρώσεις φυτοοιστρογόνων ή ανάλογων ενώσεων για τις οποίες υπάρχουν υπόνοιες ότι επάγουν ανάλογη με τα φυτοοιστρογόνα υπερενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς λουσιφεράσης πρέπει να εξετάζεται προσεκτικά σε συστήματα δοκιμασίας ER TA σταθερώς διαμολυνθέντων κυττάρων (βλ. προσάρτημα 2).

4. Πριν από τη χρήση της παρούσας δοκιμασίας για κανονιστικούς σκοπούς, θα πρέπει να μελετηθούν οι ενότητες «ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ» και «ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ER TA». Οι ορισμοί και οι συντομογραφίες που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

([1]) Πριν από τον Ιούνιο του 2016 αυτή η κυτταρική σειρά ονομαζόταν BG1Luc. Τα κύτταρα BG-1 περιγράφηκαν αρχικά από τους Geisinger et al. (1998) (12) και χαρακτηρίστηκαν αργότερα από ερευνητές του Εθνικού Ινστιτούτου Περιβαλλοντικών Επιστημών Υγείας των ΗΠΑ (NIEHS) (13). Σχετικά πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι υπάρχουν δύο διαφορετικές παραλλαγές των κυττάρων BG-1 που χρησιμοποιούνται από τους ερευνητές, τα κύτταρα BG-1 Fr και BG-1 NIEHS. Εις βάθος ανάλυση, που περιλάμβανε και αναλύσεις DNA, αυτών των δύο παραλλαγών της κυτταρικής σειράς BG-1, που διενήργησαν οι Li και συνεργάτες (2014) (14), κατέδειξε ότι η BG-1 Fr ήταν μοναδική και ότι η BG-1 NIEHS, δηλαδή η αρχική κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη της δοκιμασίας, δεν ήταν η κυτταρική σειρά καρκινώματος των ωοθηκών του ανθρώπου BG1 αλλά μια παραλλαγή της κυτταρικής σειράς καρκίνου του μαστού του ανθρώπου MCF7. Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε στη δοκιμασία, η οποία ονομαζόταν αρχικά BG1Luc4E2 (15), θα ονομάζεται στο εξής VM7Luc4E2 («V» = παραλλαγή· «M7» = κύτταρα MCF7). Αντίστοιχα, η δοκιμασία θα ονομάζεται στο εξής ER TA VM7Luc. Παρότι, με βάση τα παραπάνω, αλλάζει η προέλευση της κυτταρικής σειράς στην οποία βασίζεται η δοκιμασία, δεν επηρεάζονται οι δημοσιευμένες μελέτες επικύρωσης ούτε η χρησιμότητα και η εφαρμογή της εν λόγω δοκιμασίας για τη διαλογή των χημικών ουσιών με οιστρογόνο/αντιοιστρογόνο δράση.

▼M8

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ (ΒΛ. ΕΠΙΣΗΣ ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ)

5. Η δοκιμασία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της δέσμευσης προσδεμάτων στον ER, την οποία ακολουθεί η μετατόπιση του συμπλόκου υποδοχέα-προσδέματος στον πυρήνα. Στον πυρήνα, το σύμπλοκο υποδοχέα-προσδέματος δεσμεύεται σε ειδικά στοιχεία απόκρισης του DNA και διενεργοποιεί το γονίδιο αναφοράς (*luc*), με αποτέλεσμα την παραγωγή λουσιφεράσης και την επακόλουθη εκπομπή φωτός, η οποία μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με χρήση λουμινόμετρου. Η δραστηριότητα της λουσιφεράσης μπορεί να αξιολογηθεί γρήγορα και με χαμηλό κόστος με χρήση διαφόρων κιτ δοκιμής του εμπορίου. Η ER TA VM7Luc χρησιμοποιεί μια ανθρώπινη κυτταρική σειρά αδενοκαρκινώματος του μαστού που αποκρίνεται στον ER, τη VM7, η οποία έχει διαμολυνθεί σταθερά με κατασκεύασμα γονιδίου αναφοράς *luc* της πυγολαμπίδας υπό τον έλεγχο τεσσάρων στοιχείων απόκρισης σε οιστρογόνα που βρίσκονται ανάντη του υποκινητή ιούκαρκίνου του μαστού του ποντικού (MMTV), για την ανίχνευση ουσιών με *in vitro* δραστικότητα αγωνιστή ή ανταγωνιστή για τον ER. Ο εν λόγω υποκινητής MMTV παρουσιάζει περιορισμένη μόνο διασταυρούμενη αντίδραση σε άλλες στεροειδείς και μη στεροειδείς ορμόνες (8). Τα κριτήρια για την ερμηνεία των δεδομένων περιγράφονται αναλυτικά στην παράγραφο 41. Εν συντομία, η θετική απόκριση προσδιορίζεται βάσει καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης που περιέχει τουλάχιστον τρία σημεία με μη επικαλυπτόμενες ράβδους σφάλματος (μέση τιμή ± SD), καθώς και βάσει της μεταβολής του πλάτους [κανονικοποιημένη σχετική μονάδα φωτός (RLU)] κατά τουλάχιστον 20 % της μέγιστης τιμής του προτύπου αναφοράς (17β-οιστραδιόλη [E2, CASRN 50-28-2] για τη δοκιμασία αγωνιστών, υδροχλωρική ραλοξιφαίνη [Ral, CASRN 84 449-90-1]/E2 για τη δοκιμασία ανταγωνιστών).

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Κυτταρική σειρά

6. Για τη δοκιμασία θα πρέπει να χρησιμοποιείται η σταθερώς διαμολυνθείσα κυτταρική σειρά VM7Luc4E2. Προς το παρόν η κυτταρική σειρά διατίθεται μόνο κατόπιν σύναψης συμφωνίας άδειας τεχνικής συνδρομής με το πανεπιστήμιο της Καλιφόρνια (Davis, Καλιφόρνια, ΗΠΑ) ([1]) και τη Xenobiotic Detection Systems Inc. (Durham, Βόρεια Καρολίνα, ΗΠΑ) ([2]).

Σταθερότητα της κυτταρικής σειράς

7. Για τη διατήρηση της σταθερότητας και της ακεραιότητας της κυτταρικής σειράς, τα κύτταρα θα πρέπει να καλλιεργούνται για περισσότερες από μία ανακαλλιέργειες από το κατεψυγμένο απόθεμα σε θρεπτικά μέσα συντήρησης κυττάρων (βλ. παράγραφο 9). Τα κύτταρα δεν θα πρέπει να καλλιεργούνται για περισσότερες από 30 ανακαλλιέργειες. Για την κυτταρική σειρά VM7Luc4E2, οι 30 ανακαλλιέργειες διαρκούν περίπου τρεις μήνες.

Συνθήκες καλλιέργειας και επίστρωσης κυττάρων

8. Για τη διασφάλιση της ποιότητας όλων των υλικών και των μεθόδων, με σκοπό τη διαφύλαξη της ακεραιότητας, της εγκυρότητας και της αναπαραγωγιμότητας κάθε εκτελούμενης εργασίας, θα πρέπει να ακολουθούνται οι διαδικασίες που περιγράφονται στο υλικό καθοδήγησης σχετικά με την ορθή πρακτική καλλιέργειας κυττάρων (5) (6).

9. Τα κύτταρα VM7Luc4E2 συντηρούνται σε θρεπτικό μέσο RPMI 1 640 που έχει συμπληρωθεί με 0,9 % Pen-Strep και 8,0 % βόειου εμβρυϊκού ορού (FBS) σε επωαστήρα καλλιέργειας ιστών αποκλειστικής χρήσης, σε θερμοκρασία 37°C ± 1°C, υγρασία 90 % ± 5 % και 5,0 % ± 1 % CO_2/αέρα.

10. Μετά την επίτευξη συρροής ~80 %, τα κύτταρα VM7Luc4E2 ανακαλλιεργούνται και εγκλιματίζονται σε περιβάλλον ελεύθερο οιστρογόνων επί 48 ώρες, προτού επιστρωθούν σε τρυβλία 96 κοιλοτήτων με σκοπό την έκθεσή τους στις υπό δοκιμή χημικές ουσίες και την ανάλυση της επαγόμενης από

([1]) Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, E: msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649

([2]) Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, email: info@dioxins.com, αρ. τηλεφώνου: 919/-688-4804, αρ. φαξ: 919-688-4404

▼M8

τα οιστρογόνα δραστικότητας λουσιφεράσης. Το ελεύθερο οιστρογόνων μέσο (EFM) περιέχει τροποποιημένο μέσο Eagle του Dulbecco (DMEM) χωρίς ερυθρό της φαινόλης, συμπληρωμένο με 4,5 % κατεργασμένου με ενεργό άνθρακα/δεξτράνη FBS, 1,9 % L-γλουταμίνη, και 0,9 % Pen-Strep. Ο πλαστικός εξοπλισμός θα πρέπει να είναι στο σύνολό του ελεύθερος οιστρογονικής δραστικότητας [βλ. αναλυτικό πρωτόκολλο (7)].

Κριτήρια αποδοχής

11. Η αποδοχή ή απόρριψη μιας δοκιμής εξαρτάται από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των προτύπων αναφοράς και των μαρτύρων κάθε πειράματος που διεξήχθη σε τρυβλίο 96 κοιλοτήτων. Κάθε πρότυπο αναφοράς ελέγχεται σε πολλές συγκεντρώσεις και λαμβάνονται πολλαπλά δείγματα από κάθε συγκέντρωση αναφοράς και μάρτυρα. Ταποτελέσματα συγκρίνονται με τους ποιοτικούς ελέγχους (QC) για τις εν λόγω παραμέτρους που έχουν ληφθεί από τις βάσεις ιστορικών δεδομένων αγωνιστών και ανταγωνιστών που δημιουργεί κάθε εργαστήριο στο πλαίσιο της διαδικασίας απόδειξης της τεχνικής ικανότητας. Οι βάσεις ιστορικών δεδομένων επικαιροποιούνται διαρκώς με τις τιμές προτύπων αναφοράς και μαρτύρων. Οι αλλαγές στον εξοπλισμό ή τις εργαστηριακές συνθήκες ενδέχεται να επιβάλουν την επικαιροποίηση των βάσεων ιστορικών δεδομένων.

Δοκιμή αγωνιστών

Δοκιμή προσδιορισμού εύρους

- Επαγωγή: Η επαγωγή των τρυβλίων θα πρέπει να μετράται με διαίρεση της μέσης ανώτατης τιμής σχετικής μονάδας φωτός των προτύπων αναφοράς E2 (RLU) διά της μέσης τιμής RLU των μαρτύρων DMSO. Συνήθως επιτυγχάνεται πενταπλάσια επαγωγή αλλά, για σκοπούς ελέγχου αποδοχής, η επαγωγή θα πρέπει να είναι τετραπλάσια ή μεγαλύτερη.

- Αποτελέσματα μάρτυρα DMSO: Οι τιμές RLU των μαρτύρων με διαλύτη δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν κατά περισσότερο από 2,5 φορές την τυπική απόκλιση της μέσης τιμής RLU των ιστορικών μαρτύρων με διαλύτη.

- Σε περίπτωση που ένα πείραμα δεν πληροί οποιοδήποτε από τα δύο κριτήρια αποδοχής, θα πρέπει να απορρίπτεται και να επαναλαμβάνεται.

Συνολική δοκιμή

Περιλαμβάνει τα κριτήρια αποδοχής της δοκιμής προσδιορισμού εύρους αγωνιστών και τα ακόλουθα κριτήρια:

- Αποτελέσματα προτύπων αναφοράς: Η πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης-απόκρισης προτύπων αναφοράς E2 θα πρέπει να είναι σιγμοειδούς σχήματος και να περιλαμβάνει τουλάχιστον τρεις τιμές εντός του γραμμικού τμήματός της.

- Αποτελέσματα θετικού μάρτυρα: Οι τιμές RLU του μάρτυρα methoxychlor θα πρέπει να υπερβαίνουν τη μέση τιμή του DMSO συν τρεις φορές την τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή του DMSO.

- Σε περίπτωση που ένα πείραμα δεν πληροί οποιοδήποτε από τα κριτήρια αποδοχής, θα πρέπει να απορρίπτεται και να επαναλαμβάνεται.

Δοκιμή ανταγωνιστών

Δοκιμή προσδιορισμού εύρους

- Μείωση: Η μείωση στα τρυβλία θα πρέπει να μετράται με διαίρεση της μέσης ανώτατης τιμής RLU των προτύπων αναφοράς Ral/E2 διά της μέσης τιμής RLU των μαρτύρων DMSO. Συνήθως επιτυγχάνεται πενταπλάσια μείωση αλλά, για σκοπούς ελέγχου αποδοχής, η μείωση θα πρέπει να είναι τριπλάσια ή μεγαλύτερη.

- Αποτελέσματα μαρτύρων E2: Οι τιμές RLU των μαρτύρων E2 δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν κατά περισσότερο από 2,5 φορές την τυπική απόκλιση της μέσης τιμής RLU των ιστορικών μαρτύρων E2.

▼**M8**

- Αποτελέσματα μαρτύρων DMSO: Οι τιμές RLU των μαρτύρων DMSO δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν κατά περισσότερο από 2,5 φορές την τυπική απόκλιση της μέσης τιμής RLU των ιστορικών μαρτύρων με διαλύτη.

- Σε περίπτωση που ένα πείραμα δεν πληροί οποιοδήποτε από τα κριτήρια αποδοχής, θα απορρίπτεται και θα επαναλαμβάνεται.

Συνολική δοκιμή

Περιλαμβάνει τα κριτήρια αποδοχής της δοκιμής προσδιορισμού εύρους ανταγωνιστών και τα ακόλουθα κριτήρια:

- Αποτελέσματα προτύπων αναφοράς: Η πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης-απόκρισης προτύπων αναφοράς Ral/E2 θα πρέπει να είναι σιγμοειδούς σχήματος και να περιλαμβάνει τουλάχιστον τρεις τιμές εντός του γραμμικού τμήματός της.

- Αποτελέσματα θετικού μάρτυρα: Οι τιμές RLU του μάρτυρα ταμοξιφαίνης/E2 δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν τη μέση τιμή μάρτυρα E2 μείον τρεις φορές την τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή μάρτυρα E2.

- Σε περίπτωση που ένα πείραμα δεν πληροί οποιοδήποτε από τα κριτήρια αποδοχής, θα απορρίπτεται και θα επαναλαμβάνεται.

Πρότυπα αναφοράς, θετικοί μάρτυρες και μάρτυρες με φορέα

Μάρτυρας με φορέα (δοκιμασίες αγωνιστών και ανταγωνιστών)

12. Ο φορέας που χρησιμοποιείται για τη διάλυση των υπό δοκιμή χημικών ουσιών θα πρέπει να ελέγχεται ως μάρτυρας με φορέα. Ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε κατά την επικύρωση της δοκιμασίας ER TA VM7Luc ήταν 1 % κ.ό. διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO, CASRN 67-68-5) (βλ. παράγραφο 24). Σε περίπτωση που χρησιμοποιείται φορέας διαφορετικός από το DMSO, όλα τα πρότυπα αναφοράς, οι μάρτυρες και οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να ελέγχονται στον ίδιο φορέα, ανάλογα με την περίπτωση.

Πρότυπο αναφοράς (προσδιορισμός εύρους αγωνιστών)

13. Το πρότυπο αναφοράς είναι η E2 (CASRN 50-28-2). Για δοκιμές προσδιορισμού του εύρους, το πρότυπο αναφοράς περιλαμβάνει τέσσερις συγκεντρώσεις E2 από διαδοχικές αραιώσεις (1,84 x 10^{-10}, 4,59 x 10^{-11}, 1,15 x 10^{-11} και 2,87 x 10^{-12} M), με κάθε συγκέντρωση να ελέγχεται σε διπλές κοιλότητες.

Πρότυπο αναφοράς (ολοκληρωμένη δοκιμή αγωνιστών)

14. Η E2 για ολοκληρωμένες δοκιμές περιλαμβάνει 11 συγκεντρώσεις E2 από διαδοχικές αραιώσεις 1:2 (από 3,67 x 10^{-10} έως 3,59 x 10^{-13} M) σε διπλές κοιλότητες.

Πρότυπο αναφοράς (προσδιορισμός εύρους ανταγωνιστών)

15. Το πρότυπο αναφοράς αποτελεί συνδυασμό Ral (CASRN 84 449-90-1) και E2 (CASRN 50-28-2). Τα πρότυπα Ral/E2 για δοκιμές προσδιορισμού εύρους περιλαμβάνουν τρεις συγκεντρώσεις Ral από διαδοχικές αραιώσεις (3,06 x 10^{-9}, 7,67 x 10^{-10} και 1,92 x 10^{-10} M) συν καθορισμένη συγκέντρωση (9,18 × 10^{-11} M) E2 σε διπλές κοιλότητες.

Πρότυπο αναφοράς (ολοκληρωμένη δοκιμή ανταγωνιστών)

16. Τα πρότυπα Ral/E2 για ολοκληρωμένες δοκιμές περιλαμβάνουν διαδοχικές αραιώσεις Ral 1:2 (από 2,45 x 10^{-8} έως 9,57 x 10^{-11}M) συν καθορισμένη συγκέντρωση (9,18 × 10^{-11} M) E2 που περιλαμβάνει εννέα συγκεντρώσεις Ral/E2 σε διπλές κοιλότητες.

Ασθενής θετικός μάρτυρας (αγωνιστών)

17. Ο ασθενής θετικός μάρτυρας είναι 9,06 x 10^{-6} M *p,p'*-methoxychlor (methoxychlor, CASRN 72-43-5) σε EFM.

▼**M8**

Ασθενής θετικός μάρτυρας (ανταγωνιστών)

18. Ο ασθενής θετικός μάρτυρας είναι ταμοξιφαίνη (CASRN 10 540-29-1) 3,36 x 10^{-6} M με 9,18 × 10^{-11} M E2 σε EFM.

Μάρτυρας E2 (μόνο για δοκιμασία ανταγωνιστών)

19. Ο μάρτυρας E2 είναι 9,18 × 10^{-11} M E2 σε EFM και χρησιμοποιείται ως αρνητικός μάρτυρας γραμμής βάσης.

Πολλαπλάσια επαγωγή (αγωνιστές)

20. Η επαγωγή δραστικότητας λουσιφεράσης του προτύπου αναφοράς (E2) μετράται με διαίρεση της μέσης ανώτατης τιμής RLU του προτύπου αναφοράς E2 διά της μέσης τιμής RLU του μάρτυρα DMSO, και το αποτέλεσμα θα πρέπει να είναι μεγαλύτερο από τετραπλάσιο.

Πολλαπλάσια μείωση (ανταγωνιστές)

21. Η μέση δραστικότητα λουσιφεράσης του προτύπου αναφοράς (Ral/E2) μετράται με διαίρεση της μέσης ανώτατης τιμής RLU του προτύπου αναφοράς Ral/E2 διά της μέσης τιμής RLU του μάρτυρα DMSO, και το αποτέλεσμα θα πρέπει να είναι μεγαλύτερο από τριπλάσιο.

Απόδειξη της τεχνικής ικανότητας του εργαστηρίου (βλ. παράγραφο 14 και πίνακες 3 και 4 στην ενότητα «ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ER TA» της παρούσας μεθόδου δοκιμών)

Φορέας

22. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να διαλύονται σε διαλύτη που διαλύει την υπό δοκιμή χημική ουσία και που αναμειγνύεται με το θρεπτικό μέσο των κυττάρων. Κατάλληλοι φορείς είναι το νερό, η αιθανόλη (καθαρότητας 95 % έως 100 %) και το DMSO. Εάν χρησιμοποιηθεί το DMSO, το επίπεδο δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1 % κ.ό. Για οποιονδήποτε φορέα, θα πρέπει να καταδεικνύεται ότι ο μέγιστος όγκος που χρησιμοποιήθηκε δεν είναι κυτταροτοξικός και δεν επηρεάζει τις επιδόσεις της δοκιμασίας. Τα πρότυπα αναφοράς και οι μάρτυρες διαλύονται σε 100 % διαλύτη και κατόπιν αραιώνονται σε κατάλληλες συγκεντρώσεις με EFM.

Προετοιμασία των υπό δοκιμή χημικών ουσιών

23. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες διαλύονται σε 100 % DMSO και κατόπιν αραιώνονται σε κατάλληλες συγκεντρώσεις με EFM. Πριν από τη διάλυση και την αραίωσή τους, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε όλες οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες να ισορροπούν σε θερμοκρασία δωματίου. Τα διαλύματα των υπό δοκιμή χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται σε κάθε πείραμα θα πρέπει να έχουν παρασκευαστεί πρόσφατα. Τα διαλύματα δεν θα πρέπει να εμφανίζουν εμφανές ίζημα ή θολερότητα. Τα αποθέματα προτύπων αναφοράς και μαρτύρων μπορούν να παρασκευάζονται μαζικά, ωστόσο το τελικό πρότυπο αναφοράς, οι αραιώσεις των μαρτύρων και οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται σε κάθε πείραμα θα πρέπει να έχουν παρασκευαστεί πρόσφατα και να χρησιμοποιούνται εντός 24 ωρών από την παρασκευή τους.

Διαλυτότητα και κυτταροτοξικότητα: ζητήματα σχετικά με τον προσδιορισμό εύρους

24. Οι δοκιμές προσδιορισμού εύρους περιλαμβάνουν διαδοχικές αραιώσεις 1:10 επτά σημείων που εκτελούνται εις διπλούν. Αρχικά, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες ελέγχονται στη μέγιστη συγκέντρωση 1 mg/ml (~1 mM) για τις δοκιμές αγωνιστών και 20 μg/ml (~10 μM) για τις δοκιμές ανταγωνιστών. Τα πειράματα προσδιορισμού εύρους χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των ακόλουθων στοιχείων:

— αρχικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που θα χρησιμοποιηθούν στις ολοκληρωμένες δοκιμές

— αραιώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (1:2 ή 1:5) που θα χρησιμοποιηθούν στις ολοκληρωμένες δοκιμές

▼M8

25. Στα πρωτόκολλα των δοκιμασιών αγωνιστών και ανταγωνιστών περιλαμβάνεται αξιολόγηση της βιωσιμότητας των κυττάρων / της κυτταροτοξικότητας (7), η οποία εντάσσεται στις δοκιμές προσδιορισμού εύρους και τις ολοκληρωμένες δοκιμές. Η μέθοδος κυτταροτοξικότητας που χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της βιωσιμότητας των κυττάρων κατά την επικύρωση της ER TA VM7Luc (1) ήταν διαβαθμισμένη ποιοτική μέθοδος οπτικής παρατήρησης· ωστόσο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ποσοτική μέθοδος για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικότητας (βλ. πρωτόκολλο (7)). Δεδομένα από συγκεντρώσεις υπό δοκιμή χημικών ουσιών που επάγουν μείωση της βιωσιμότητας άνω του 20 % δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν.

Έκθεση σε υπό δοκιμή χημικές ουσίες και οργάνωση τρυβλίου της δοκιμασίας

26. Τα κύτταρα καταμετρώνται και επιστρώνονται σε τρυβλία καλλιέργειας ιστών 96 κοιλοτήτων (2 x 10^5 κύτταρα ανά κοιλότητα) σε EFM και επωάζονται επί 24 ώρες προκειμένου να προσκολληθούν στο τρυβλίο. Το EFM αφαιρείται και αντικαθίσταται από τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες και τις χημικές ουσίες αναφοράς σε EFM, και επωάζεται επί 19-24 ώρες. Ειδική μέριμνα θα πρέπει να λαμβάνεται για τις εξαιρετικά πτητικές ουσίες, καθότι από τις διπλανές κοιλότητες μάρτυρα μπορεί να προκύψουν ψευδοθετικές εκβάσεις. Σε αυτές τις περιπτώσεις συνιστάται η χρήση καλυμμάτων σφράγισης καθώς μπορεί να βοηθήσει στην αποτελεσματική απομόνωση μεμονωμένων κοιλοτήτων κατά τη διάρκεια των δοκιμών.

Δοκιμές προσδιορισμού εύρους

27. Κατά τις δοκιμές προσδιορισμού εύρους χρησιμοποιούνται όλες οι κοιλότητες του τρυβλίου 96 κοιλοτήτων για τον εις διπλούν έλεγχο έως έξι υπό δοκιμή χημικών ουσιών υπό μορφή διαδοχικών αραιώσεων 1:10 επτά σημείων (βλ. σχήματα 1 και 2).

— Στο πλαίσιο των δοκιμών προσδιορισμού εύρους *αγωνιστών* χρησιμοποιούνται τέσσερις εις διπλούν συγκεντρώσεις E2 ως πρότυπο αναφοράς και τέσσερις πανομοιότυπες κοιλότητες για τον μάρτυρα DMSO.

— Στο πλαίσιο των δοκιμών προσδιορισμού εύρους *ανταγωνιστών* χρησιμοποιούνται τρεις ες διπλούν συγκεντρώσεις Ral/E2 με 9,18 × 10^{-11} M E2 ως πρότυπο αναφοράς, και τρεις πανομοιότυπες κοιλότητες για τους μάρτυρες E2 και DMSO.

Σχήμα 1

Διάταξη τρυβλίου 96 κοιλοτήτων δοκιμής προσδιορισμού εύρους αγωνιστών

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
Γ	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
Δ	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
ΣΤ	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
Z	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	VC	VC	VC	VC	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Συντομογραφίες: E2-1 έως E2-4 = συγκεντρώσεις του προτύπου αναφοράς E2 (από τις υψηλές στις χαμηλές)· TC1-1 έως TC1-7 = συγκεντρώσεις (από τις υψηλές στις χαμηλές) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας 1 (TC1)· TC2-1 έως TC2-7 = συγκεντρώσεις (από τις υψηλές στις χαμηλές) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας 2 (TC2)· TC3-1 έως TC3-7 = συγκεντρώσεις (από τις υψηλές στις χαμηλές) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας 3 (TC3)· TC4-1 έως TC4-7 = συγκεντρώσεις (από τις υψηλές στις χαμηλές) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας 4 (TC4)· TC5-1 έως TC5-7 = συγκεντρώσεις (από τις υψηλές στις χαμηλές) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας 5 (TC5)· TC6-1 έως TC6-7 = συγκεντρώσεις (από τις υψηλές στις χαμηλές) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας 6 (TC6)· VC = μάρτυρας με φορέα [DMSO (1 % κ.ό. EFM.)].

▼M8

Σχήμα 2

Διάταξη τρυβλίου 96 κοιλοτήτων δοκιμής προσδιορισμού εύρους ανταγωνιστών

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
Γ	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
Δ	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
ΣΤ	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
Z	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	VC	VC	VC	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Συντομογραφίες: E2 = μάρτυρας E2· Ral-1 έως Ral-3 = συγκεντρώσεις του προτύπου αναφοράς ραλοξιφαίνη/E2 (από τις υψηλές στις χαμηλές)· TC1-1 έως TC1-7 = συγκεντρώσεις (από τις υψηλές στις χαμηλές) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας 1 (TC1)· TC2-1 έως TC2-7 = συγκεντρώσεις (από τις υψηλές στις χαμηλές) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας 2 (TC2)· TC3-1 έως TC3-7 = συγκεντρώσεις (από τις υψηλές στις χαμηλές) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας 3 (TC3)· TC4-1 έως TC4-7 = συγκεντρώσεις (από τις υψηλές στις χαμηλές) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας 4 (TC4)· TC5-1 έως TC5-7 = συγκεντρώσεις (από τις υψηλές στις χαμηλές) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας 5 (TC5)· TC6-1 έως TC6-7 = συγκεντρώσεις (από τις υψηλές στις χαμηλές) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας 6 (TC6)· VC = μάρτυρας με φορέα [DMSO (1 % κ.ό. EFM.)].

Σημείωση: Όλες οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες ελέγχονται παρουσία $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2.

28. Ο συνιστώμενος τελικός όγκος μέσου που πρέπει να υπάρχει σε κάθε κοιλότητα είναι 200 μl. Χρησιμοποιείτε μόνο τρυβλία δοκιμής στα οποία η βιωσιμότητα των κυττάρων στο σύνολο των κοιλοτήτων είναι 80 % και άνω.

29. Ο προσδιορισμός των αρχικών συγκεντρώσεων για τις ολοκληρωμένες δοκιμές ***αγωνιστών*** περιγράφεται διεξοδικά στο πρωτόκολλο αγωνιστών (7). Εν συντομία, χρησιμοποιούνται τα ακόλουθα κριτήρια:

— Εάν στην καμπύλη συγκέντρωσης της υπό δοκιμής χημικής ουσίας δεν υπάρχουν σημεία που υπερβαίνουν τη μέση τιμή συν τρεις φορές την τυπική απόκλιση του μάρτυρα DMSO, οι ολοκληρωμένες δοκιμές θα διεξάγονται με χρήση διαδοχικής αραίωσης 1:211 σημείων, ξεκινώντας από τη μέγιστη διαλυτή συγκέντρωση.

— Εάν στην καμπύλη συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας υπάρχουν σημεία που υπερβαίνουν τη μέση τιμή συν τρεις φορές την τυπική απόκλιση του μάρτυρα DMSO, η αρχική συγκέντρωση που θα χρησιμοποιηθεί για το πρόγραμμα αραιώσεων 11 σημείων στο πλαίσιο των ολοκληρωμένων δοκιμών θα πρέπει να είναι κατά έναν λογάριθμο υψηλότερη από τη συγκέντρωση από την οποία προκύπτει η υψηλότερη προσαρμοσμένη τιμή RLU στο πλαίσιο του προσδιορισμού εύρους. Το πρόγραμμα αραιώσεων 11 σημείων θα βασίζεται σε αραιώσεις είτε 1:2 είτε 1:5, σύμφωνα με τα ακόλουθα κριτήρια:

Θα πρέπει να χρησιμοποιείται διαδοχική αραίωση 1:211 σημείων εάν το προκύπτον εύρος συγκέντρωσης περιλαμβάνει το πλήρες εύρος των αποκρίσεων βάσει της καμπύλης απόκρισης συγκέντρωσης που προέκυψε κατά τη δοκιμή προσδιορισμού εύρους. Διαφορετικά, χρησιμοποιήστε αραίωση 1:5.

▼M8

— Εάν μια υπό δοκιμή χημική ουσία εμφανίζει διφασική καμπύλη συγκέντρωσης απόκρισης κατά τη δοκιμή προσδιορισμού εύρους, θα πρέπει να εξακριβώνονται και οι δύο φάσεις στο πλαίσιο των ολοκληρωμένων δοκιμών.

30. Ο προσδιορισμός των αρχικών συγκεντρώσεων για τις ολοκληρωμένες δοκιμές ***ανταγωνιστών*** περιγράφεται διεξοδικά στο πρωτόκολλο ανταγωνιστών (7). Εν συντομία, χρησιμοποιούνται τα ακόλουθα κριτήρια:

— Εάν στην καμπύλη συγκέντρωσης της υπό δοκιμής χημικής ουσίας δεν υπάρχουν σημεία που είναι μικρότερα από τη μέση τιμή μείον τρεις φορές την τυπική απόκλιση του μάρτυρα E2, οι ολοκληρωμένες δοκιμές θα διεξάγονται με χρήση διαδοχικής αραίωσης 1:211 σημείων, ξεκινώντας από τη μέγιστη διαλυτή συγκέντρωση.

— Εάν στην καμπύλη συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας υπάρχουν σημεία που είναι μικρότερα από τη μέση τιμή μείον τρεις φορές την τυπική απόκλιση του μάρτυρα E2, η αρχική συγκέντρωση που θα χρησιμοποιηθεί για το πρόγραμμα αραιώσεων 11 σημείων στο πλαίσιο των ολοκληρωμένων δοκιμών θα πρέπει να είναι μία από τις ακόλουθες.

• Η συγκέντρωση από την οποία προκύπτει η χαμηλότερη προσαρμοσμένη τιμή RLU στο πλαίσιο του προσδιορισμού εύρους

• Η μέγιστη διαλυτή συγκέντρωση (βλ. πρωτόκολλο ανταγωνιστών (7), σχήμα 14-2)

• Η χαμηλότερη κυτταροτοξική συγκέντρωση (για σχετικό παράδειγμα, βλέπε πρωτόκολλο ανταγωνιστών (7), σχήμα 14-3)

— Το πρόγραμμα αραιώσεων 11 σημείων θα βασίζεται είτε σε αραιώσεις 1:2 είτε σε αραιώσεις 1:5, σύμφωνα με τα ακόλουθα κριτήρια:

Θα πρέπει να χρησιμοποιείται διαδοχική αραίωση 1:211 σημείων εάν το προκύπτον εύρος συγκέντρωσης περιλαμβάνει το πλήρες εύρος των αποκρίσεων βάσει της καμπύλης απόκρισης συγκέντρωσης που προέκυψε κατά τη δοκιμή προσδιορισμού εύρους. Διαφορετικά, θα πρέπει να χρησιμοποιείται αραίωση 1:5.

Συνολικές δοκιμές

31. Οι ολοκληρωμένες δοκιμές περιλαμβάνουν διαδοχικές αραιώσεις 11 σημείων (διαδοχικές αραιώσεις είτε 1:2 είτε 1:5 βάσει της αρχικής συγκέντρωσης για τα κριτήρια των ολοκληρωμένων δοκιμών), με κάθε συγκέντρωση να ελέγχεται σε τριπλές κοιλότητες του τρυβλίου 96 κοιλοτήτων (βλ. σχήματα 3 και 4).

— Στις ολοκληρωμένες δοκιμές *αγωνιστών*, ως πρότυπο αναφοράς χρησιμοποιούνται 11 συγκεντρώσεις E2 εις διπλούν. Σε κάθε τρυβλίο περιλαμβάνονται τέσσερις πανομοιότυπες κοιλότητες για τον μάρτυρα DMSO και τέσσερις πανομοιότυπες κοιλότητες για τον μάρτυρα methoxychlor (9,06 x 10^{-6} M).

— Στις ολοκληρωμένες δοκιμές *ανταγωνιστών*, ως πρότυπο αναφοράς χρησιμοποιούνται εννέα συγκεντρώσεις Ral/E2 με 9,18 × 10^{-11} M E2 εις διπλούν, με τέσσερις πανομοιότυπες κοιλότητες για τον μάρτυρα E2 9,18 x 10^{-11} M, τέσσερις πανομοιότυπες κοιλότητες για τους μάρτυρες DMSO, και τέσσερις πανομοιότυπες κοιλότητες για την ταμοξιφαίνη 3,36 x 10^{-6} M.

▼**M8**

Σχήμα 3

Διάταξη τρυβλίου 96 κοιλοτήτων ολοκληρωμένων δοκιμών αγωνιστών

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
Γ	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
Δ	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
ΣΤ	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
Z	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth

Συντομογραφίες: TC1-1 έως TC1-11 = συγκεντρώσεις (από τις υψηλές στις χαμηλές) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας 1· TC2-1 έως TC2-11 = συγκεντρώσεις (από τις υψηλές στις χαμηλές) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας 2· E2-1 έως E2-11 = συγκεντρώσεις του προτύπου αναφοράς E2 (από τις υψηλές στις χαμηλές)· Meth = ασθενής θετικός μάρτυρας *p,p'*-methoxychlor· VC = μάρτυρας με φορέα EFM DMSO (1 % κ.ό.)

Σχήμα 4

Διάταξη τρυβλίου 96 κοιλοτήτων ολοκληρωμένων δοκιμών ανταγωνιστών

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
Γ	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
Δ	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
ΣΤ	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
Z	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

Συντομογραφίες: E2 = μάρτυρας E2· Ral-1 έως Ral-9 = συγκεντρώσεις του προτύπου αναφοράς ραλοξιφαίνη/E2 (από τις υψηλές στις χαμηλές)· Tam = ασθενής θετικός μάρτυρας ταμοξιφαίνη/E2· TC1-1 έως TC1-11 = συγκεντρώσεις (από τις υψηλές στις χαμηλές) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας 1 (TC1)· TC2-1 έως TC2-11 = συγκεντρώσεις (από τις υψηλές στις χαμηλές) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας 2 (TC2)· VC = μάρτυρας με φορέα [DMSO (1 % κ.ό. EFM.)].

Σημείωση: Όπως επισημάνθηκε, όλες οι κοιλότητες αναφοράς και δοκιμής περιέχουν καθορισμένη συγκέντρωση E2 (9,18 x 10^{-11} M)

32. Προκειμένου να διασφαλίζεται η ανεξαρτησία, θα πρέπει να διεξάγονται επαναλαμβανόμενες ολοκληρωμένες δοκιμές για την ίδια χημική ουσία σε διαφορετικές ημέρες. Θα πρέπει να διεξάγονται τουλάχιστον δύο ολοκληρωμένες δοκιμές. Εάν τα αποτελέσματα των δοκιμών είναι αντιφατικά μεταξύ τους (π.χ. μία δοκιμή είναι θετική και η άλλη αρνητική), ή εάν μία από τις δοκιμές είναι ανεπαρκής, θα πρέπει να διεξάγεται τρίτη, συμπληρωματική δοκιμή.

Μέτρηση φωταύγειας

33. Η φωταύγεια μετράται στο φάσμα από 300 έως 650 nm, με χρήση λουμινόμετρου έγχυσης και λογισμικού που ελέγχει τον όγκο έγχυσης και το μεσοδιάστημα μετρήσεων (7). Η εκπομπή φωτός από κάθε κοιλότητα εκφράζεται ως RLU ανά κοιλότητα.

▼M8

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Προσδιορισμός της EC_{50}/IC_{50}

34. Η τιμή της EC_{50} [ήμισυ της μέγιστης αποτελεσματικής συγκέντρωσης υπό δοκιμή χημικής ουσίας (αγωνιστές)] και η τιμή της IC_{50} [ήμισυ της μέγιστης συγκέντρωσης αναστολής υπό δοκιμή χημικής ουσίας (ανταγωνιστές)] προσδιορίζονται από τα δεδομένα συγκέντρωσης-απόκρισης. Όσον αφορά υπό δοκιμή χημικές ουσίες που είναι θετικές σε μία ή περισσότερες συγκεντρώσεις, η συγκέντρωση που επάγει τη μισή μέγιστη απόκριση (IC_{50} ή EC_{50}) υπολογίζεται με χρήση ανάλυσης συνάρτησης Hill ή κατάλληλου εναλλακτικού τρόπου. Η συνάρτηση Hill είναι ένα λογιστικό μαθηματικό μοντέλο τεσσάρων παραμέτρων που συσχετίζει τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας με την απόκριση (ακολουθώντας, τυπικά, σιγμοειδή καμπύλη) με χρήση της ακόλουθης εξίσωσης:

$$Y = ελάχιστη + \frac{(μέγιστη - ελάχιστη)}{1 + 10(lgEC_{50} - X)κλίση\ Hill}$$

όπου:

Y = απόκριση (δηλ. RLU),

X = ο λογάριθμος συγκέντρωσης,

ελάχιστη = η ελάχιστη απόκριση,

μέγιστη = η μέγιστη απόκριση,

lg EC_{50} (ή lg IC_{50}) = ο λογάριθμος του X ως η ενδιάμεση απόκριση μεταξύ μέγιστης και ελάχιστης,

κλίση Hill = η κλίση της καμπύλης.

Με το μοντέλο υπολογίζονται οι βέλτιστες αρμόζουσες τιμές στις παραμέτρους μέγιστης απόκρισης, ελάχιστης απόκρισης, κλίσης Hill, και IC_{50} και EC_{50}. Για τον υπολογισμό των τιμών EC_{50} και IC_{50} θα πρέπει να χρησιμοποιείται το κατάλληλο λογισμικό στατιστικής ανάλυσης (π.χ. το λογισμικό Graphpad Prism®).

Προσδιορισμός έκτοπων τιμών

35. Για την εξαγωγή ορθού στατιστικού συμπεράσματος μπορεί να είναι χρήσιμη η συμπερίληψη (ενδεικτικά) του ελέγχου Q-test [βλ. πρωτόκολλα αγωνιστών και ανταγωνιστών (7)] για τον προσδιορισμό των «μη χρησιμοποιήσιμων» κοιλοτήτων που θα αποκλειστούν από την ανάλυση των δεδομένων.

36. Όσον αφορά τα πανομοιότυπα δείγματα προτύπου αναφοράς E2 (μέγεθος δείγματος: δύο), κάθε προσαρμοσμένη τιμή RLU για δείγμα με καθορισμένη συγκέντρωση E2 θεωρείται έκτοπη εάν υπερβαίνει ή υπολείπεται κατά 20 % της προσαρμοσμένης τιμής RLU για τη συγκεκριμένη συγκέντρωση στη βάση ιστορικών δεδομένων.

Συλλογή και προσαρμογή των δεδομένων λουμινόμετρου για δοκιμές προσδιορισμού εύρους

37. Τα ανεπεξέργαστα δεδομένα του λουμινόμετρου θα πρέπει να καταχωρίζονται σε υπόδειγμα υπολογιστικού φύλλου ειδικά σχεδιασμένου για τη δοκιμασία. Θα πρέπει να προσδιορίζεται κατά πόσον υπάρχουν σημεία δεδομένων έκτοπων τιμών που πρέπει να αφαιρεθούν. (Για τις παραμέτρους που προσδιορίζονται στις αναλύσεις, βλέπε κριτήρια αποδοχής δοκιμής). Θα πρέπει να εκτελούνται οι ακόλουθοι υπολογισμοί:

Αγωνιστής

Στάδιο 1 Υπολογισμός της μέσης τιμής για τον μάρτυρα με φορέα (VC) DMSO.

Στάδιο 2 Αφαίρεση της μέσης τιμής του μάρτυρα με φορέα DMSO από κάθε κοιλότητα με σκοπό την κανονικοποίηση των δεδομένων.

▼M8

Στάδιο 3 Υπολογισμός της μέσης πολλαπλάσιας επαγωγής για το πρότυπο αναφοράς (E2).

Στάδιο 4 Υπολογισμός της μέσης τιμής EC_{50} για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες.

Ανταγωνιστής

Στάδιο 1 Υπολογισμός της μέσης τιμής για τον μάρτυρα με φορέα (VC) DMSO.

Στάδιο 2 Αφαίρεση της μέσης τιμής του μάρτυρα με φορέα DMSO από κάθε κοιλότητα με σκοπό την κανονικοποίηση των δεδομένων.

Στάδιο 3 Υπολογισμός της μέσης πολλαπλάσιας μείωσης για το πρότυπο αναφοράς (Ral/E2).

Στάδιο 4 Υπολογισμός της μέσης τιμής για το πρότυπο αναφοράς E2.

Στάδιο 5 Υπολογισμός της μέσης τιμής IC50 για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες.

Συλλογή και προσαρμογή των δεδομένων λουμινόμετρου για ολοκληρωμένες δοκιμές

38. Τα ανεπεξέργαστα δεδομένα του λουμινόμετρου θα πρέπει να καταχωρίζονται σε υπόδειγμα υπολογιστικού φύλλου ειδικά σχεδιασμένου για τη δοκιμασία. Θα πρέπει να προσδιορίζεται κατά πόσον υπάρχουν σημεία δεδομένων έκτοπων τιμών που πρέπει να αφαιρεθούν. (Για τις παραμέτρους που προσδιορίζονται στις αναλύσεις, βλέπε κριτήρια αποδοχής δοκιμής). Εκτελούνται οι ακόλουθοι υπολογισμοί:

Αγωνιστής

Στάδιο 1 Υπολογισμός της μέσης τιμής για τον μάρτυρα με φορέα (VC) DMSO.

Στάδιο 2 Αφαίρεση της μέσης τιμής του μάρτυρα με φορέα DMSO από κάθε κοιλότητα με σκοπό την κανονικοποίηση των δεδομένων.

Στάδιο 3 Υπολογισμός της μέσης πολλαπλάσιας επαγωγής για το πρότυπο αναφοράς (E2).

Στάδιο 4 Υπολογισμός της μέσης τιμής EC_{50} για το E2 και τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες.

Στάδιο 5 Υπολογισμός της μέσης προσαρμοσμένης τιμής RLU για το methoxychlor.

Ανταγωνιστής

Στάδιο 1 Υπολογισμός της μέσης τιμής για τον μάρτυρα με φορέα (VC) DMSO.

Στάδιο 2 Αφαίρεση της μέσης τιμής του μάρτυρα με φορέα DMSO από κάθε κοιλότητα με σκοπό την κανονικοποίηση των δεδομένων.

Στάδιο 3 Υπολογισμός της μέσης πολλαπλάσιας επαγωγής για το πρότυπο αναφοράς (Ral/E2).

Στάδιο 4 Υπολογισμός της μέσης τιμής IC_{50} για το Ral/E2 και τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες.

Στάδιο 5 Υπολογισμός της μέσης προσαρμοσμένης τιμής RLU για την ταμοξιφαίνη.

Στάδιο 6 Υπολογισμός της μέσης τιμής για το πρότυπο αναφοράς E2.

▼**M8**

Κριτήρια ερμηνείας των δεδομένων

39. Η ER TA VM7Luc προορίζεται για χρήση στο πλαίσιο προσέγγισης βάρους της απόδειξης με σκοπό τη διευκόλυνση της κατά προτεραιότητα ιεράρχησης των ουσιών για τη διεξαγωγή *in vivo* δοκιμών ED. Μέρος της εν λόγω διαδικασίας ιεράρχησης προτεραιοτήτων θα είναι η ταξινόμηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ως θετικής ή αρνητικής όσον αφορά τη δραστικότητα είτε αγωνιστή είτε ανταγωνιστή για τον ER. Στον πίνακα 1 περιγράφονται τα κριτήρια λήψης απόφασης περί θετικής ή αρνητικής ουσίας που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη επικύρωσης ER TA VM7Luc.

Πίνακας 1

Κριτήρια λήψης απόφασης περί θετικής ή αρνητικής ουσίας

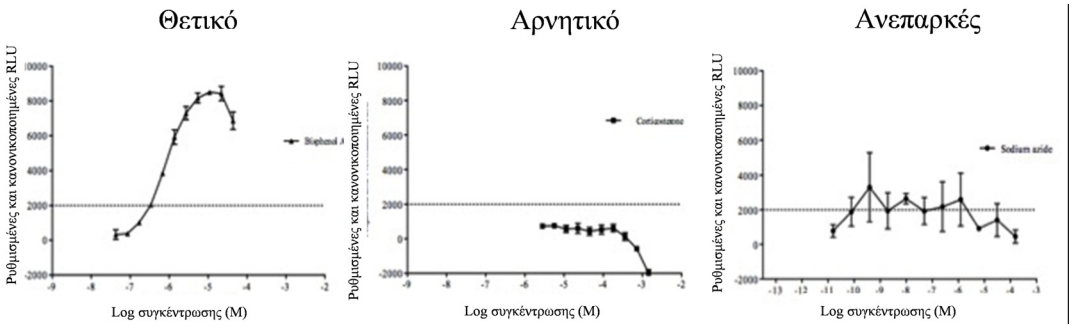
ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΑΓΩΝΙΣΤΗ	
Θετικά	— Όλες οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που ταξινομούνται ως *θετικές* ως προς τη δραστικότητα αγωνιστή για τον ER θα πρέπει να έχουν καμπύλη συγκέντρωσης-απόκρισης που περιλαμβάνει μια γραμμή βάσης, ακολουθούμενη από θετική κλίση, και η οποία καταλήγει σε πλατώ ή σε κορυφή. Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορούν να προσδιορίζονται μόνο δύο από τα εν λόγω χαρακτηριστικά (γραμμή βάσης–κλίση ή κλίση–κορυφή). — Η γραμμή που καθορίζει τη θετική κλίση θα πρέπει να περιέχει τουλάχιστον τρία σημεία με μη επικαλυπτόμενες ράβδους σφάλματος (μέση τιμή ± SD). Τα σημεία που σχηματίζουν τη γραμμή βάσης αποκλείονται, αλλά το γραμμικό τμήμα της καμπύλης μπορεί να περιλαμβάνει την κορυφή ή το πρώτο σημείο του πλατώ της καμπύλης. — Για την ταξινόμηση μιας ουσίας ως θετικής απαιτείται πλάτος απόκρισης, δηλ. της διαφοράς μεταξύ γραμμής βάσης και κορυφής, που αντιστοιχεί στο 20 % τουλάχιστον της μέγιστης τιμής για το πρότυπο αναφοράς E2 [δηλ. 2 000 RLU ή περισσότερο, όταν η μέγιστη τιμή απόκρισης των προτύπων αναφοράς (E2) είναι προσαρμοσμένη στις 10 000 RLU]. — Ει δυνατόν, θα πρέπει να υπολογίζεται μια τιμή EC_{50} για κάθε θετική υπό δοκιμή χημική ουσία.
Αρνητικά	Η μέση προσαρμοσμένη RLU για καθορισμένη συγκέντρωση ισούται ή είναι μικρότερη της μέσης τιμής RLU μάρτυρα DMSO συν τρεις φορές την τυπική απόκλιση της RLU DMSO.
Ανεπαρκή	Δεδομένα που δεν μπορούν να θεωρηθούν έγκυρα για την κατάδειξη είτε της παρουσίας είτε της απουσίας δραστικότητας, λόγω σημαντικών ποιοτικών ή ποσοτικών περιορισμών, θεωρούνται ανεπαρκή και δεν μπορούν να χρησιμοποιούνται για να προσδιοριστεί κατά πόσον η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι θετική ή αρνητική. Οι χημικές ουσίες θα πρέπει να υποβάλλονται εκ νέου σε δοκιμή.
ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΗ	
Θετικά	— Από τα δεδομένα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας προκύπτει καμπύλη συγκέντρωσης-απόκρισης που περιλαμβάνει μια γραμμή βάσης, ακολουθούμενη από αρνητική κλίση. — Η γραμμή που καθορίζει την αρνητική κλίση θα πρέπει να περιέχει τουλάχιστον τρία σημεία με μη επικαλυπτόμενες ράβδους σφάλματος. Τα σημεία που σχηματίζουν τη γραμμή βάσης αποκλείονται, αλλά το γραμμικό τμήμα της καμπύλης μπορεί να περιλαμβάνει το πρώτο σημείο του πλατώ της καμπύλης. — Θα πρέπει να διαπιστώνεται τουλάχιστον 20 % μείωση της δραστικότητας σε σχέση με τη μέγιστη τιμή για το πρότυπο αναφοράς Ral/E2 (δηλ. 8 000 RLU ή λιγότερες όταν η μέγιστη τιμή απόκρισης του προτύπου αναφοράς [Ral/E2] προσαρμόζεται στις 10 000 RLU). — Οι υψηλότερες μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να είναι μικρότερες ή ίσες προς $1x10^{-5}$ M. — Ει δυνατόν, θα πρέπει να υπολογίζεται μια τιμή IC_{50} για κάθε θετική υπό δοκιμή χημική ουσία.
Αρνητικά	Όλα τα σημεία δεδομένων υπερβαίνουν την τιμή EC_{80} (80 % της απόκρισης E2, ή 8 000 RLU), σε συγκεντρώσεις μικρότερες από $1,0 \times 10^{-5}$ M.
Ανεπαρκή	Δεδομένα που δεν μπορούν να θεωρηθούν έγκυρα για την κατάδειξη είτε της παρουσίας είτε της απουσίας δραστικότητας, λόγω σημαντικών ποιοτικών ή ποσοτικών περιορισμών, θεωρούνται ανεπαρκή και δεν μπορούν να χρησιμοποιούνται για να προσδιοριστεί κατά πόσον η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι θετική ή αρνητική. Η χημική ουσία θα πρέπει να υποβάλλεται εκ νέου σε δοκιμή.

▼**M8**

40. Ει δυνατόν, για τα θετικά αποτελέσματα θα πρέπει να αναφέρεται τόσο το μέγεθος της επίδρασης όσο και η συγκέντρωση στην οποία εμφανίζεται η επίδραση. Στα σχήματα 5 και 6 φαίνονται παραδείγματα θετικών, αρνητικών και ανεπαρκών δεδομένων.

Σχήμα 5

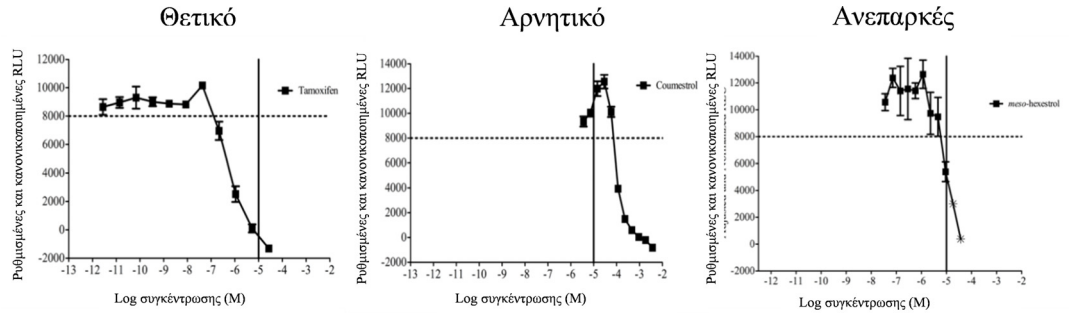
Παραδείγματα αγωνιστών: θετικά, αρνητικά και ανεπαρκή δεδομένα



Η διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύει το 20 % της απόκρισης E2, 2000 προσαρμοσμένες και κανονικοποιημένες RLU.

Σχήμα 6

Παραδείγματα ανταγωνιστών: θετικά, αρνητικά και ανεπαρκή δεδομένα



Η διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύει το 80 % της απόκρισης Ral/E2, 8 000 προσαρμοσμένες και κανονικοποιημένες RLU.

Η συνεχής γραμμή υποδεικνύει 1,00 x 10^{-5} M. Για να θεωρηθεί μια απόκριση θετική, θα πρέπει να είναι κάτω από τη γραμμή 8 000 RLU, και σε συγκεντρώσεις κάτω του 1,00 x 10^{-5} M.

Οι συγκεντρώσεις που επισημαίνονται με αστερίσκους στο διάγραμμα της meso-εξεστρόλης υποδεικνύουν βαθμολογίες βιωσιμότητας 2 ή μεγαλύτερες.

Τα αποτελέσματα δοκιμών για τη meso-εξεστρόλη θεωρούνται ανεπαρκή δεδομένα διότι η μόνη απόκριση που είναι κάτω από 8 000 RLU εμφανίζεται στα 1,00 x 10^{-5} M.

41. Οι τιμές των EC_{50} και IC_{50} μπορούν να υπολογίζονται με χρήση συνάρτησης Hill τεσσάρων παραμέτρων [για περισσότερες λεπτομέρειες, βλέπε πρωτόκολλο αγωνιστών και πρωτόκολλο ανταγωνιστών (7)]. Η συμμόρφωση με τα κριτήρια αποδοχής υποδεικνύει ότι το σύστημα λειτουργεί σωστά, αλλά δεν διασφαλίζει ότι οποιαδήποτε συγκεκριμένη σειρά δοκιμών θα παράξει ορθά δεδομένα. Η επανάληψη των αποτελεσμάτων της πρώτης σειράς δοκιμών αποτελεί τον βέλτιστο τρόπο να επιβεβαιώνεται ότι παρήχθησαν ορθά δεδομένα (βλ. παράγραφο 19 της ενότητας «ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ER TA»).

▼**M8**

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

42. Βλ. παράγραφο 20 της ενότητας «ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ER TA».

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) ICCVAM. (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(2) Monje P., Boland R. (2001). Subcellular Distribution of Native Estrogen Receptor α and β Isoforms in Rabbit Uterus and Ovary, J. Cell Biochem., 82(3): 467-479.

(3) Pujol P., *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer Res., 58(23): 5 367-5 373.

(4) Weihua Z., *et al.* (2000). Estrogen Receptor (ER) β, a Modulator of ERα in the Uterus, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(11): 936-5 941.

(5) Balls M., *et al.* (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), ALTEX, 23(Suppl): p. 270-273.

(6) Coecke S., *et al.* (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, Alternatives to Laboratory Animals, 33: p. 261-287.

(7) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication No 11-7 850.

(8) Rogers J.M., Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals*, In Vitro* Mol. *Toxicol*.,13(1):67-82.

(9) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. *Pharmacol*., 71(10):1 459-69.

(10) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology,17(6):646-57.

(11) Kuiper G.G, *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, Endocrinology,139(10):4 252-63.

(12) Geisinger, *et al.* (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.

(13) Baldwin, *et al.* (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.

(14) Li, Y., *et al.* (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.

(15) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors:development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenicand anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67-82.

▼**M8**

Προσαρτημα 4

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΔΙΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΑΘΕΡΩΣ ΔΙΑΜΟΛΥΝΘΕΝΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ Α ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΩΣ ΑΓΩΝΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ ERA CALUX

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ (ΒΛΕΠΕ ΕΠΙΣΗΣ ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ)

1. Στη δοκιμασία διενεργοποίησης ERα CALUX χρησιμοποιείται η ανθρώπινη κυτταρική σειρά U2OS για την ανίχνευση της δραστικότητας αγωνιστή ή ανταγωνιστή οιστρογόνων που μεσολαβείται από τον ανθρώπινο υποδοχέα οιστρογόνων α (hERα). Η μελέτη επικύρωσης της βιοδοκιμασίας σταθερώς διαμολυνθέντων ανθρώπινων κυττάρων ERα CALUX της BioDetection Systems BV (Άμστερνταμ, Κάτω Χώρες) κατέδειξε την καταλληλότητα και την αξιοπιστία της δοκιμασίας για τον σκοπό για τον οποίο προορίζεται (1). Η κυτταρική σειρά ERα CALUX εκφράζει μόνο τον ανθρώπινο ERα (2) (3).

2. Η παρούσα δοκιμασία έχει σχεδιαστεί ειδικά για την ανίχνευση της μεσολαβούμενης από τον hERα διενεργοποίησης μέσω μέτρησης της βιοφωταύγειας ως παραμέτρου. Η χρήση βιοφωταύγειας είναι ευρέως διαδεδομένη στις βιοδοκιμασίες λόγω του υψηλού λόγου σήματος προς θόρυβο (4).

3. Έχει αναφερθεί ότι συγκεντρώσεις φυτοοιστρογόνων υψηλότερες του 1 μM υπερενεργοποιούν το γονίδιο αναφοράς λουσιφεράσης, με αποτέλεσμα φωταύγεια που δεν μεσολαβείται από υποδοχέα (5) (6) (7). Ως εκ τούτου, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις φυτοοιστρογόνων ή άλλων ανάλογων ενώσεων που μπορούν να υπερενεργοποιούν την έκφραση λουσιφεράσης πρέπει να εξετάζονται προσεκτικά στο πλαίσιο των δοκιμασιών διενεργοποίησης ER σταθερώς διαμολυνθέντων κυττάρων (βλ. προσάρτημα 2).

4. Πριν από τη χρήση της παρούσας δοκιμασίας για κανονιστικούς σκοπούς, θα πρέπει να μελετηθούν οι ενότητες «ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ» και «ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ER ΤΑ». Οι ορισμοί και οι συντομογραφίες που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ (ΒΛ. ΕΠΙΣΗΣ ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ)

5. Η βιοδοκιμασία χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της δέσμευσης προσδεμάτων στον ER, την οποία ακολουθεί η μετατόπιση του συμπλόκου υποδοχέα-προσδέματος στον πυρήνα. Στον πυρήνα, το σύμπλοκο υποδοχέα-προσδέματος δεσμεύει ειδικά στοιχεία απόκρισης του DNA και διενεργοποιεί ένα γονίδιο αναφοράς λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας, με αποτέλεσμα την αύξηση της κυτταρικής έκφρασης του ενζύμου λουσιφεράση. Μετά την προσθήκη λουσιφερίνης, του υποστρώματος της λουσιφεράσης, η λουσιφερίνη μετασχηματίζεται σε βιοφωταυγές προϊόν. Το φως που προκύπτει μπορεί να ανιχνευτεί και να προσδιοριστεί ποσοτικά εύκολα με χρήση λουμινόμετρου.

6. Το σύστημα δοκιμής χρησιμοποιεί σταθερώς διαμολυνθέντα κύτταρα ERα CALUX. Τα κύτταρα ERα CALUX προήλθαν από την κυτταρική σειρά U2OS οστεοβλαστικού οστεοσαρκώματος του ανθρώπου. Τα ανθρώπινα κύτταρα U2OS διαμολύνθηκαν σταθερά με 3xHRE-TATA-Luc και pSG5-neo-hERα, με χρήση της μεθόδου συγκατακρήμνισης με φωσφορικό ασβέστιο. Η κυτταρική σειρά U2OS προτιμήθηκε ως η βέλτιστη επιλογή για χρήση ως κυτταρική σειρά γονιδίου αναφοράς που αποκρίνεται στα οιστρογόνα (και σε άλλες στεροειδείς ορμόνες), καθώς παρατηρήθηκε ότι εμφανίζει περιορισμένη ή καθόλου ενδογενή δραστικότητα υποδοχέων. Η απουσία ενδογενών υποδοχέων αξιολογήθηκε με χρήση μόνο πλασμιδίων γονιδίου αναφοράς λουσιφεράσης, ενώ δεν παρατηρείται καθόλου δραστικότητα μετά την προσθήκη προσδεμάτων υποδοχέων. Επιπλέον, η εν λόγω κυτταρική σειρά υποστήριζε ισχυρές μεσολαβούμενες από ορμόνες αποκρίσεις όταν εισάγονταν παροδικά σύστοιχοι υποδοχείς (2) (3) (8).

7. Οι δοκιμές χημικών ουσιών για οιστρογόνο ή αντιοιστρογόνο δραστικότητα με χρήση της κυτταρικής σειράς ERα CALUX περιλαμβάνουν μια σειρά δοκιμών προδιαλογής και σειρές ολοκληρωμένων δοκιμών. Κατά τη σειρά δοκιμών προδιαλογής, προσδιορίζεται η διαλυτότητα, η κυτταροτοξικότητα και ένα επεξεργασμένο φάσμα συγκεντρώσεων των υπό δοκιμή χημικών

▼M8

ουσιών για ολοκληρωμένες δοκιμές. Στη διάρκεια των σειρών ολοκληρωμένων δοκιμών, τα επεξεργασμένα φάσματα συγκεντρώσεων των υπό δοκιμή χημικών ουσιών ελέγχονται στο πλαίσιο των βιοδοκιμασιών ERα CALUX, ενώ, στη συνέχεια, ακολουθεί η ταξινόμηση των υπό δοκιμή χημικών ουσιών ως προς την αγωνιστική ή ανταγωνιστική δράση.

8. Τα κριτήρια για την ερμηνεία των δεδομένων περιγράφονται αναλυτικά στην παράγραφο 59. Εν συντομία, μια υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται θετική ως προς την αγωνιστική δράση εφόσον τουλάχιστον δύο διαδοχικές συγκεντρώσεις της εμφανίζουν απόκριση ίση ή υψηλότερη από το 10 % της μέγιστης απόκρισης του προτύπου αναφοράς 17β-οιστραδιόλη (PC_{10}). Μια υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται θετική ως προς την ανταγωνιστική δράση εφόσον τουλάχιστον δύο διαδοχικές συγκεντρώσεις της εμφανίζουν απόκριση ίση ή χαμηλότερη από το 80 % της μέγιστης απόκρισης του προτύπου αναφοράς ταμοξιφαίνη (PC_{80}).

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Κυτταρικές σειρές

9. Για τη δοκιμασία θα πρέπει να χρησιμοποιείται η σταθερώς διαμολυνθείσα κυτταρική σειρά ERα CALUX U2OS. Η κυτταρική σειρά μπορεί να ληφθεί από την BioDetection Systems BV (Άμστερνταμ, Κάτω Χώρες), μέσω σύναψης συμφωνίας αδείας τεχνικής συνδρομής.

10. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο κυτταρικές σειρές που είναι ελεύθερες μυκοπλάσματος. Οι χρησιμοποιούμενες παρτίδες κυττάρων θα πρέπει είτε να είναι πιστοποιημένα αρνητικές ως προς τη μόλυνση από μυκόπλασμα είτε να εξετάζονται για παρουσία μυκοπλάσματος πριν τη χρήση. Για την ευαίσθητη ανίχνευση μόλυνσης από μυκόπλασμα, θα πρέπει να χρησιμοποιείται η RT-PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου) (9).

Σταθερότητα της κυτταρικής σειράς

11. Για τη διατήρηση της σταθερότητας και της ακεραιότητάς τους, τα κύτταρα CALUX θα πρέπει να φυλάσσονται σε υγρό άζωτο (-80°C). Μετά την απόψυξη των κυττάρων για την έναρξη νέας καλλιέργειας, τα κύτταρα θα πρέπει να ανακαλλιεργούνται τουλάχιστον δύο φορές προτού χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση της δραστικότητας αγωνιστή και ανταγωνιστή οιστρογόνου. Τα κύτταρα δεν θα πρέπει να ανακαλλιεργούνται περισσότερες από 30 φορές.

12. Προκειμένου να διασφαλίζεται η παρακολούθηση της σταθερότητας της κυτταρικής σειράς με την πάροδο του χρόνου, θα πρέπει να επαληθεύεται η αποκρισιμότητα του συστήματος δοκιμής αγωνιστικής και ανταγωνιστικής δράσης, μέσω της αξιολόγησης της EC_{50} ή της IC_{50} του προτύπου αναφοράς. Επιπλέον, θα πρέπει να παρακολουθείται η σχετική επαγωγή του δείγματος θετικού μάρτυρα (PC) και του δείγματος αρνητικού μάρτυρα (NC). Τα αποτελέσματα θα πρέπει να συμμορφώνονται με τα κριτήρια αποδοχής για την αγωνιστική (πίνακας 3Γ) ή την ανταγωνιστική (πίνακας 4Γ) βιοδοκιμασία ERα CALUX. Τα πρότυπα αναφοράς, οι θετικοί και οι αρνητικοί μάρτυρες παρατίθενται στους πίνακες 1 και 2 για την αγωνιστική και την ανταγωνιστική δράση αντίστοιχα.

Συνθήκες καλλιέργειας και επίστρωσης κυττάρων

13. Τα κύτταρα U2OS θα πρέπει να καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο [θρεπτικό μέσο DMEM/F12 (1:1) με ερυθρό φαινόλης ως δείκτη pH, συμπληρούμενο με βόειο εμβρυϊκό ορό (7,5 %), μη απαραίτητα αμινοξέα (1 %), 10 μονάδες/ml πενικιλίνης, στρεπτομυκίνης και γενετισίνης (G-418) ως δείκτη επιλογής]. Τα κύτταρα θα πρέπει να τοποθετούνται σε επωαστήρα CO_2 (5 % CO_2) σε θερμοκρασία 37°C και υγρασία 100 %. Όταν επιτευχθεί συρροή κυττάρων 85-95 %, τα κύτταρα θα πρέπει είτε να ανακαλλιεργούνται είτε να προετοιμάζονται για εμβολιασμό σε τρυβλία μικροτιτλοδότησης 96 κοιλοτήτων. Στην τελευταία περίπτωση, τα κύτταρα θα πρέπει να εναιωρούνται εκ νέου με πυκνότητα $1x10^5$ κύτταρα/ml σε θρεπτικό μέσο δοκιμασίας ελεύθερο οιστρογόνων (DMEM/F12 (1:1) χωρίς ερυθρό φαινόλης, συμπληρωμένο με βόειο εμβρυϊκό ορό που έχει υποβληθεί σε κατεργασία με επιχρισμένο με δεξτράνη ενεργό άνθρακα (5 % κ.ό.), μη απαραίτητα αμινοξέα (1 % κ.ό.), 10 μονάδες/ml πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης), και να επιστρώνονται στις κοιλότητες των τρυβλίων μικροτιτλοδότησης 96 κοιλοτήτων (100 μl ομογενοποιημένου κυτταρικού εναιωρήματος). Τα κύτταρα θα πρέπει να προεπωάζονται σε επωαστήρα CO_2 (5 % CO_2, 37°C, 100 % υγρασία) επί 24 ώρες πριν από την έκθεση. Ο πλαστικός εξοπλισμός θα πρέπει να ελεύθερος οιστρογόνων.

▼M8

Κριτήρια αποδοχής

14. Η αγωνιστική και ανταγωνιστική δράση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ελέγχεται σε σειρές δοκιμών. Μια σειρά δοκιμών περιλαμβάνει έως 6 τρυβλία μικροτιτλοδότησης. Κάθε σειρά δοκιμών περιλαμβάνει τουλάχιστον 1 πλήρη σειρά αραιώσεων ενός προτύπου αναφοράς, ενός δείγματος θετικού μάρτυρα, ενός δείγματος αρνητικού μάρτυρα και μαρτύρων με διαλύτη. Στα σχήματα 1 και 2 παρατίθεται η διάταξη τρυβλίου για τις σειρές δοκιμών αγωνιστικής και ανταγωνιστικής δράσης.

15. Κάθε αραίωση των προτύπων αναφοράς, των υπό δοκιμή χημικών ουσιών, όλων των μαρτύρων με διαλύτη, και των θετικών και αρνητικών μαρτύρων θα πρέπει να αναλύεται εις τριπλούν. Καθεμιά από τις τριπλές αναλύσεις θα πρέπει να συμμορφώνεται με τις απαιτήσεις που παρατίθενται στον πίνακα 3Α και στον πίνακα 4Α.

16. Στο πρώτο τρυβλίο κάθε σειράς δοκιμών μετράται μια πλήρης σειρά αραιώσεων του προτύπου αναφοράς (17β-οιστραδιόλη για την αγωνιστική δράση, ταμοξιφαίνη για την ανταγωνιστική δράση). Για να είναι εφικτή η σύγκριση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης των υπόλοιπων 5 τρυβλίων μικροτιτλοδότησης με το πρώτο τρυβλίο μικροτιτλοδότησης που περιέχει την πλήρη καμπύλη συγκέντρωσης-απόκρισης του προτύπου αναφοράς, όλα τα τρυβλία θα πρέπει να περιέχουν 3 δείγματα μάρτυρες: τον μάρτυρα με διαλύτη, τη μέγιστη συγκέντρωση του ελεγχθέντος προτύπου αναφοράς, και την κατά προσέγγιση συγκέντρωση EC_{50} (αγωνιστική δράση) ή IC_{50} (ανταγωνιστική δράση) του προτύπου αναφοράς. Ο λόγος των μέσων δειγμάτων μαρτύρων στο πρώτο τρυβλίο και των υπόλοιπων 5 τρυβλίων θα πρέπει να συμμορφώνεται με τις απαιτήσεις που παρατίθενται στον πίνακα 3Γ (αγωνιστική δράση) ή τον πίνακα 4Γ (ανταγωνιστική δράση).

17. Για καθένα από τα τρυβλία μικροτιτλοδότησης μιας σειράς δοκιμών, υπολογίζεται ο συντελεστής z (10). Ο συντελεστής z θα πρέπει να υπολογίζεται με χρήση των αποκρίσεων στην υψηλότερη και τη χαμηλότερη συγκέντρωση του προτύπου αναφοράς. Ένα τρυβλίο μικροτιτλοδότησης θεωρείται έγκυρο εφόσον συμμορφώνεται με τις απαιτήσεις που αναφέρονται στον πίνακα 3Γ (αγωνιστική δράση) ή τον πίνακα 4Γ (ανταγωνιστική δράση).

18. Το πρότυπο αναφοράς θα πρέπει να εμφανίζει σιγμοειδή καμπύλη δόσης-απόκρισης. Η EC_{50} ή η IC_{50} που προκύπτει από την απόκριση της σειράς αραιώσεων του προτύπου αναφοράς θα πρέπει να ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις που παρατίθενται στον πίνακα 3Γ (αγωνιστική δράση) ή τον πίνακα 4Γ (ανταγωνιστική δράση).

19. Κάθε σειρά δοκιμών θα πρέπει να περιλαμβάνει ένα δείγμα θετικού μάρτυρα και ένα δείγμα αρνητικού μάρτυρα. Η υπολογισθείσα σχετική επαγωγή αμφότερων των δειγμάτων θετικού και αρνητικού μάρτυρα θα πρέπει να ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις που παρατίθενται στον πίνακα 3Γ (αγωνιστική δράση) και τον πίνακα 4Γ (ανταγωνιστική δράση).

20. Στη διάρκεια όλων των μετρήσεων, ο συντελεστής επαγωγής της υψηλότερης συγκέντρωσης του προτύπου αναφοράς θα πρέπει να μετράται μέσω διαίρεσης της μέσης απόκρισης σε σχετικές μονάδες φωτός (RLU) του υψηλότερου προτύπου αναφοράς 17β-οιστραδιόλης διά της μέσης απόκρισης RLU μάρτυρα με διαλύτη αναφοράς. Ο συντελεστής επαγωγής θα πρέπει να συμμορφώνεται με τις ελάχιστες απαιτήσεις για την πολλαπλάσια επαγωγή που παρατίθενται στον πίνακα 3Γ (αγωνιστική δράση) ή τον πίνακα 4Γ (ανταγωνιστική δράση).

21. Μόνο τα τρυβλία μικροτιτλοδότησης που πληρούν όλα τα προαναφερθέντα κριτήρια αποδοχής θεωρούνται έγκυρα και μπορούν να χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της απόκρισης των υπό δοκιμή χημικών ουσιών.

22. Τα κριτήρια αποδοχής εφαρμόζονται σε αμφότερες τις σειρές δοκιμών προδιαλογής και τις σειρές ολοκληρωμένων δοκιμών.

▼M8

Πίνακας 1

Συγκεντρώσεις προτύπου αναφοράς, θετικού μάρτυρα (PC) και αρνητικού μάρτυρα (NC) για τη βιοδοκιμασία CALUX αγωνιστικής δράσης

	Ουσία	Αριθμός CAS	Εύρος δοκιμής (M)
Πρότυπο αναφοράς	17β-οιστραδιόλη	50-28-2	$1*10^{-13}$ – $1*10^{-10}$
Θετικός μάρτυρας (PC)	17α-μεθυλοτεστοστερόνη	58-18-4	$3*10^{-6}$
Αρνητικός μάρτυρας (NC):	κορτικοστερόνη	50-22-6	$1*10^{-8}$

Πίνακας 2

Συγκεντρώσεις προτύπου αναφοράς, θετικού μάρτυρα (PC) και αρνητικού μάρτυρα (NC) για τη βιοδοκιμασία CALUX ανταγωνιστικής δράσης

	Ουσία	Αριθμός CAS	Εύρος δοκιμής (M)
Πρότυπο αναφοράς	ταμοξιφαίνη	10540-29-1	$3*10^{-9}$ – $1*10^{-5}$
Θετικός μάρτυρας (PC)	4-υδροξυταμοξιφαίνη	68047-06-3	$1*10^{-9}$
Αρνητικός μάρτυρας (NC):	ρεσβερατρόλη	501-36-0	$1*10^{-5}$

Πίνακας 3

Κριτήρια αποδοχής για τη βιοδοκιμασία ERα CALUX αγωνιστικής δράσης

	Α - μεμονωμένα δείγματα σε τρυβλίο	**Κριτήριο**
1	Μέγιστο %SD τριπλών κοιλοτήτων (για NC, PC, κάθε αραίωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και το πρότυπο αναφοράς, εκτός του C0)	< 15 %
2	Μέγιστο %SD τριπλών κοιλοτήτων [για τους μάρτυρες με διαλύτη προτύπου αναφοράς και τους μάρτυρες με διαλύτη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (C0, SC)]	< 30 %
3	Μέγιστη διαρροή LDH, ως μέτρο κυτταροτοξικότητας	< 120 %
	Β - εντός μεμονωμένου τρυβλίου μικροτιτλοδότησης	
4	Λόγος του μάρτυρα με διαλύτη προτύπου αναφοράς (C0, τρυβλίο 1) και του μάρτυρα με διαλύτη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (SC, τρυβλία 2 έως x)	0,5 έως 2,0
5	Λόγος της κατά προσέγγιση EC50 και των υψηλότερων συγκεντρώσεων προτύπου αναφοράς στο τρυβλίο 1 και της κατά προσέγγιση EC50 και των υψηλότερων συγκεντρώσεων προτύπου αναφοράς στα τρυβλία 2 έως x (C4, C8)	0,70 έως 1,30
6	Συντελεστής z για κάθε τρυβλίο	>0,6
	Γ - σε μεμονωμένη σειρά αναλύσεων (όλα τα τρυβλία σε μεμονωμένη σειρά)	
7	Σιγμοειδής καμπύλη προτύπου αναφοράς	Ναι (17β-οιστραδιόλη)
8	Πρότυπο αναφοράς εύρους EC50 17β-οιστραδιόλη	$4*10^{-12}$ – $4*10^{-11}$ M
9	Ελάχιστη πολλαπλάσια επαγωγή της υψηλότερης συγκέντρωσης 17β-οιστραδιόλης, σε σχέση με τον μάρτυρα με διαλύτη προτύπου αναφοράς	5
10	Σχετική επαγωγή (%) θετικού μάρτυρα	> 30 %
11	Σχετική επαγωγή (%) αρνητικού μάρτυρα	< 10 %

▼M8

PC: θετικός μάρτυρας, NC: αρνητικός μάρτυρας, SC: μάρτυρας με διαλύτη υπό δοκιμή χημικής ουσίας, C0: μάρτυρας με διαλύτη προτύπου αναφοράς, SD: τυπική απόκλιση, LDH: γαλακτική αφυδρογονάση

Πίνακας 4

Κριτήρια αποδοχής για τη βιοδοκιμασία ERα CALUX αγωνιστικής δράσης

Α - μεμονωμένα δείγματα σε τρυβλίο		**Κριτήριο**
1	Μέγιστο %SD τριπλών κοιλοτήτων [για NC, PC, κάθε αραίωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και το πρότυπο αναφοράς, μάρτυρα με διαλύτη (C0)]	< 15 %
2	Μέγιστο %SD τριπλών κοιλοτήτων [για μάρτυρα με φορέα (VC) και υψηλότερη συγκέντρωση προτύπου αναφοράς (C8)]	< 30 %
3	Μέγιστη διαρροή LDH, ως μέτρο κυτταροτοξικότητας	< 120 %
Β - εντός μεμονωμένου τρυβλίου μικροτιτλοδότησης		
4	Λόγος του μάρτυρα με διαλύτη προτύπου αναφοράς (C0, τρυβλίο 1) και του μάρτυρα με διαλύτη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (SC, τρυβλία 2 έως x)	0,70 έως 1,30
5	Λόγος των κατά προσέγγιση συγκεντρώσεων προτύπου αναφοράς IC50 τρυβλίο 1 και των κατά προσέγγιση συγκεντρώσεων προτύπου αναφοράς IC50 στα τρυβλία 2 έως x (C4)	0,70 έως 1,30
6	Λόγος των υψηλότερων συγκεντρώσεων προτύπου αναφοράς στο τρυβλίο 1 και των υψηλότερων συγκεντρώσεων προτύπου αναφοράς στα τρυβλία 2 έως x (C8)	0,50 έως 2,0
7	Συντελεστής z για κάθε τρυβλίο	>0,6
Γ - σε μεμονωμένη σειρά αναλύσεων (όλα τα τρυβλία σε μεμονωμένη σειρά)		
8	Σιγμοειδής καμπύλη προτύπου αναφοράς	Ναι (ταμοξιφαίνη)
9	Πρότυπο αναφοράς εύρους IC50 (ταμοξιφαίνη)	$1*10^{-8}$ - $1*10^{-7}$ M
10	Ελάχιστη πολλαπλάσια επαγωγή του μάρτυρα με διαλύτη προτύπου αναφοράς, σε σχέση με την υψηλότερη συγκέντρωση ταμοξιφαίνης	2.5
11	Σχετική επαγωγή (%) θετικού μάρτυρα	< 70 %
12	Σχετική επαγωγή (%) αρνητικού μάρτυρα	>85 %

PC: θετικός μάρτυρας, NC: αρνητικός μάρτυρας, VC: μάρτυρας με φορέα (μάρτυρας με διαλύτη χωρίς καθορισμένη συγκέντρωση του προτύπου αναφοράς αγωνιστών), SC: μάρτυρας με διαλύτη υπό δοκιμή χημικής ουσίας, C0: μάρτυρας με διαλύτη προτύπου αναφοράς, SD: τυπική απόκλιση, LDH: γαλακτική αφυδρογονάση

Μάρτυρας με διαλύτη/φορέα, πρότυπα αναφοράς, θετικοί μάρτυρες, αρνητικοί μάρτυρες

23. Τόσο για τη σειρά δοκιμών προδιαλογής όσο και για τις σειρές ολοκληρωμένων δοκιμών, θα πρέπει να χρησιμοποιείται ο ίδιος μάρτυρας με διαλύτη/φορέα, πρότυπα αναφοράς, θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες. Επιπλέον, θα πρέπει να χρησιμοποιείται η ίδια συγκέντρωση προτύπων αναφοράς, θετικών και αρνητικών μαρτύρων.

▼M8

Μάρτυρας με διαλύτη

24. Ο διαλύτης που χρησιμοποιείται για τη διάλυση των υπό δοκιμή χημικών ουσιών θα πρέπει να ελέγχεται ως μάρτυρας με διαλύτη. Ως φορέας κατά την επικύρωση της βιοδοκιμασίας ERα CALUX χρησιμοποιήθηκε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO, 1 % κ.ό., CASRN 67-68-5). Σε περίπτωση που χρησιμοποιείται διαλύτης άλλος από το DMSO, όλα τα πρότυπα αναφοράς, οι μάρτυρες και οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να ελέγχονται στον ίδιο φορέα. Επισημαίνεται ότι ο μάρτυρας με διαλύτη για τις μελέτες ανταγωνιστικής δράσης περιέχει καθορισμένη συγκέντρωση του προτύπου αναφοράς αγωνιστών 17β-οιστραδιόλη (κατά προσέγγιση συγκέντρωση EC_{50}). Για τον έλεγχο του διαλύτη που χρησιμοποιείται για τις μελέτες ανταγωνιστικής δράσης, θα πρέπει να παρασκευάζεται και να ελέγχεται μάρτυρας με φορέα.

Μάρτυρας με φορέα (ανταγωνιστική δράση)

25. Για τις δοκιμές ανταγωνιστικής δράσης, το θρεπτικό μέσο της δοκιμασίας συμπληρώνεται με καθορισμένη συγκέντρωση του προτύπου αναφοράς αγωνιστών 17β-οιστραδιόλη (κατά προσέγγιση συγκέντρωση EC_{50}). Για τον έλεγχο του διαλύτη που χρησιμοποιείται για τη διάλυση των υπό δοκιμή χημικών ουσιών που θα ελεγχθούν ως προς την ανταγωνιστική δράση, θα πρέπει να παρασκευάζεται καθορισμένη συγκέντρωση του προτύπου αναφοράς αγωνιστών 17β-οιστραδιόλη. Το εν λόγω δείγμα μάρτυρα υποδεικνύεται ως ο μάρτυρας με φορέα. Ως φορέας κατά την επικύρωση της βιοδοκιμασίας ERα CALUX χρησιμοποιήθηκε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO, 1 % κ.ό., CASRN 67-68-5). Σε περίπτωση που χρησιμοποιείται διαλύτης άλλος από το DMSO, όλα τα πρότυπα αναφοράς, οι μάρτυρες και οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να ελέγχονται στον ίδιο φορέα.

Πρότυπα αναφοράς

26. Το πρότυπο αναφοράς αγωνιστικής δράσης είναι η 17β-οιστραδιόλη (πίνακας 1). Τα πρότυπα αναφοράς φέρονται σε σειρά αραιώσεων οκτώ συγκεντρώσεων 17β-οιστραδιόλης ($1*10^{-13}$, $3*10^{-13}$, $1*10^{-12}$, $3*10^{-12}$, $6*10^{-12}$, $1*10^{-11}$, $3*10^{-11}$, $1*10^{-10}$ M).

27. Το πρότυπο αναφοράς αγωνιστικής δράσης είναι η ταμοξιφαίνη (πίνακας 2). Τα πρότυπα αναφοράς φέρονται σε σειρά αραιώσεων οκτώ συγκεντρώσεων ταμοξιφαίνης ($3*10^{-9}$, $1*10^{-8}$, $3*10^{-8}$, $1*10^{-7}$, $3*10^{-7}$, $1*10^{-6}$, $3*10^{-6}$, $1*10^{-5}$ M). Καθεμία εκ των συγκεντρώσεων του προτύπου αναφοράς ανταγωνιστικής δράσης συνεπωάζεται με καθορισμένη συγκέντρωση του προτύπου αναφοράς αγωνιστικής δράσης 17β-οιστραδιόλη ($3*10^{-12}$ M).

Θετικός μάρτυρας

28. Ο θετικός μάρτυρας για τις μελέτες αγωνιστικής δράσης είναι η 17α-μεθυλοτεστοστερόνη (πίνακας 1).

29. Ο θετικός μάρτυρας για τις μελέτες ανταγωνιστικής δράσης είναι η 4-υδροξυταμοξιφαίνη (πίνακας 2). Ο θετικός μάρτυρας ανταγωνιστικής δράσης συνεπωάζεται με καθορισμένη συγκέντρωση του προτύπου αναφοράς αγωνιστικής δράσης 17β-οιστραδιόλη ($3*10^{-12}$ M).

Αρνητικός μάρτυρας

30. Ο αρνητικός μάρτυρας για τις μελέτες αγωνιστικής δράσης είναι η κορτικοστερόνη (πίνακας 1).

31. Ο αρνητικός μάρτυρας για τις μελέτες ανταγωνιστικής δράσης είναι η ρεσβερατρόλη (πίνακας 2). Ο αρνητικός μάρτυρας ανταγωνιστικής δράσης συνεπωάζεται με καθορισμένη συγκέντρωση του προτύπου αναφοράς αγωνιστικής δράσης 17β-οιστραδιόλη ($3*10^{-12}$ M).

▼M8

Απόδειξη της τεχνικής ικανότητας του εργαστηρίου (βλ. παράγραφο 14 και πίνακες 3 και 4 στην ενότητα «ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ER ΤΑ» της παρούσας μεθόδου δοκιμών)

Φορέας

32. Ο διαλύτης που χρησιμοποιείται για τη διάλυση των υπό δοκιμή χημικών ουσιών θα πρέπει να διαλύει πλήρως την υπό δοκιμή χημική ουσία και θα πρέπει να αναμειγνύεται με το θρεπτικό μέσο κυτταροκαλλιέργειας. Κατάλληλοι διαλύτες είναι το DMSO, το νερό και η αιθανόλη (καθαρότητας 95 % έως 100 %). Σε περίπτωση που ως διαλύτης χρησιμοποιείται το DMSO, η μέγιστη συγκέντρωση του DMSO κατά την επώαση δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 1 % κ.ό. Πριν από τη χρήση, ο διαλύτης θα πρέπει να ελέγχεται προκειμένου να διαπιστώνεται ότι δεν είναι κυτταροτοξικός και δεν παρεμποδίζει τις επιδόσεις της δοκιμασίας.

Προετοιμασία των προτύπων αναφοράς, των θετικών μαρτύρων, των αρνητικών μαρτύρων και των υπό δοκιμή χημικών ουσιών

33. Τα πρότυπα αναφοράς, οι θετικοί μάρτυρες, οι αρνητικοί μάρτυρες και οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες διαλύονται σε 100 % DMSO (ή σε κατάλληλο διαλύτη). Στη συνέχεια παρασκευάζονται κατάλληλες (διαδοχικές) αραιώσεις στον ίδιο διαλύτη. Πριν από τη διάλυση, όλες οι ουσίες θα πρέπει να αφήνονται να ισορροπήσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Τα πρόσφατα παρασκευασθέντα διαλύματα αποθέματος προτύπων αναφοράς, θετικών μαρτύρων, αρνητικών μαρτύρων και υπό δοκιμή χημικών ουσιών δεν θα πρέπει να περιέχουν εμφανές ίζημα ή θολερότητα. Τα αποθέματα προτύπων αναφοράς και μαρτύρων μπορούν να παρασκευάζονται μαζικά. Πριν από κάθε πείραμα, θα πρέπει να εξασφαλίζεται η ύπαρξη πρόσφατα παρασκευασθέντων διαλυμάτων αποθέματος των υπό δοκιμή χημικών ουσιών. Οι τελικές αραιώσεις προτύπων αναφοράς, θετικών μαρτύρων, αρνητικών μαρτύρων και υπό δοκιμή χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται σε κάθε πείραμα θα πρέπει να έχουν παρασκευαστεί πρόσφατα και να χρησιμοποιούνται εντός 24 ωρών από την παρασκευή τους.

Διαλυτότητα, κυτταροτοξικότητα και προσδιορισμός εύρους

34. Κατά τη σειρά δοκιμών προδιαλογής, προσδιορίζεται η διαλυτότητα των υπό δοκιμή χημικών ουσιών στον επιλεγμένο διαλύτη. Παρασκευάζεται μέγιστη συγκέντρωση αποθέματος 0,1 M. Σε περίπτωση που η συγκεκριμένη συγκέντρωση παρουσιάζει προβλήματα διαλυτότητας, θα πρέπει να παρασκευάζονται διαλύματα μικρότερης συγκέντρωσης μέχρις ότου διαλυθούν πλήρως οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες. Κατά τη σειρά δοκιμών προδιαλογής, ελέγχονται διαδοχικές αραιώσεις 1:10 της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Η μέγιστη συγκέντρωση δοκιμασίας για τις δοκιμές αγωνιστών ή ανταγωνιστών είναι 1 mM. Μετά την προδιαλογή, υπολογίζεται ένα κατάλληλο επεξεργασμένο εύρος συγκεντρώσεων για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες, το οποίο θα πρέπει να ελέγχεται κατά τις σειρές ολοκληρωμένων δοκιμών. Οι αραιώσεις που χρησιμοποιούνται για τις ολοκληρωμένες δοκιμές θα πρέπει να είναι 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1000x και 3000x.

35. Στο πρωτόκολλο δοκιμασίας αγωνιστών και ανταγωνιστών περιλαμβάνονται δοκιμές κυτταροτοξικότητας (11). Οι δοκιμές κυτταροτοξικότητας είναι ενσωματωμένες τόσο στη σειρά δοκιμών προδιαλογής όσο και στις σειρές ολοκληρωμένων δοκιμών. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας κατά την επικύρωση της βιοδοκιμασίας ERα CALUX ήταν η δοκιμή διαρροής γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH), σε συνδυασμό με την ποιοτική οπτική επιθεώρηση των κυττάρων (βλ. προσάρτημα 4.1) μετά από έκθεση στις υπό δοκιμή χημικές ουσίες. Ωστόσο, για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικότητας μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες ποσοτικές μέθοδοι [π.χ. η χρωματομετρική δοκιμασία με βάση το τετραζόλιο (MTT) ή η βιοδοκιμασία κυτταροτοξικότητας CALUX]. Σε γενικές γραμμές, οι συγκεντρώσεις υπό δοκιμή χημικών ουσιών που εμφανίζουν μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας μεγαλύτερη του 20 % θεωρούνται κυτταροτοξικές και, ως εκ τούτου, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση δεδομένων. Όσον αφορά τη δοκιμασία διαρροής LDH, η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θεωρείται κυτταροτοξική όταν το ποσοστό της διαρροής LDH υπερβαίνει το 120 %.

▼**M8**

Έκθεση σε υπό δοκιμή χημικές ουσίες και οργάνωση τρυβλίου της δοκιμασίας

36. Μετά από θρυψινισμό μιας φιάλης καλλιέργειας με πλήρη συρροή κυττάρων, τα κύτταρα εναιωρούνται εκ νέου σε $1x10^5$ κύτταρα/ml σε ελεύθερο οιστρογόνων θρεπτικό μέσο δοκιμασίας. Στις εσωτερικές κοιλότητες τρυβλίου μικροτιτλοδότησης 96 κοιλοτήτων επιστρώνονται 100 μl επαναιωρηθέντων κυττάρων. Οι εξωτερικές κοιλότητες πληρούνται με 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων (PBS) (βλ. σχήματα 1 και 2). Τα επιστρωμένα κύτταρα προεπωάζονται επί 24 ώρες σε επωαστήρα CO_2 (5 % CO_2, 37 °C, 100 % υγρασία).

37. Μετά την προεπώαση, τα τρυβλία επιθεωρούνται οπτικά για τυχόν κυτταροτοξικότητα (βλ. προσάρτημα 4.1) ή μόλυνση και ως προς τη συρροή. Στις δοκιμές χρησιμοποιούνται μόνο τα τρυβλία που δεν εμφανίζουν καθόλου ορατή κυτταροτοξικότητα ή μόλυνση και παρουσιάζουν συρροή σε ποσοστό τουλάχιστον 85 %. Το θρεπτικό μέσο αφαιρείται προσεκτικά από τις εσωτερικές κοιλότητες και αντικαθίσταται από 200 μl ελεύθερου οιστρογόνων θρεπτικού μέσου δοκιμασίας που περιέχει κατάλληλες διαδοχικές αραιώσεις των προτύπων αναφοράς, των υπό δοκιμή χημικών ουσιών, των θετικών μαρτύρων,των αρνητικών μαρτύρων και των μαρτύρων με διαλύτη (πίνακας 5: μελέτες αγωνιστών· πίνακας 6: μελέτες ανταγωνιστών). Όλα τα πρότυπα αναφοράς, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες, οι θετικοί μάρτυρες, οι αρνητικοί μάρτυρες και οι μάρτυρες με διαλύτη ελέγχονται εις τριπλούν. Στο σχήμα 1 παρέχεται η διάταξη του τρυβλίου για τις δοκιμές αγωνιστών. Στο σχήμα 2 παρέχεται η διάταξη του τρυβλίου για τις δοκιμές ανταγωνιστών. Η διάταξη του τρυβλίου για τις δοκιμές προδιαλογής είναι πανομοιότυπη με την αντίστοιχη διάταξη για τις ολοκληρωμένες δοκιμές. Όσον αφορά τις δοκιμές ανταγωνιστών, όλες οι εσωτερικές κοιλότητες, εκτός των κοιλοτήτων μάρτυρα με φορέα (VC), περιέχουν επίσης καθορισμένη συγκέντρωση του προτύπου αναφοράς αγωνιστικής δράσης 17β-οιστραδιόλη ($3*10^{-12}$ M). Επισημαίνεται ότι τα πρότυπα αναφοράς C8 και C4 θα πρέπει να προστίθενται σε κάθε τρυβλίο TC.

38. Μετά την έκθεση των κυττάρων σε όλες τις χημικές ουσίες, τα τρυβλία μικροτιτλοδότησης 96 κοιλοτήτων θα πρέπει να επωάζονται για 24 ακόμη ώρες σε επωαστήρα CO_2 (5 % CO_2, 37 °C, 100 % υγρασία).

Σχήμα 1

Διάταξη των τρυβλίων μικροτιτλοδότησης 96 κοιλοτήτων για προδιαλογή και αξιολόγηση της αγωνιστικής δράσης

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
Γ		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
Δ		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
E		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
ΣΤ		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
Z		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
H												

Επακόλουθα τρυβλία

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
Γ		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
Δ		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
ΣΤ		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
Z		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
H												

C0 = διαλύτης προτύπου αναφοράς.

C(1-8) = σειρά αραιώσεων (1-8, χαμηλές προς υψηλές συγκεντρώσεις) προτύπου αναφοράς.

▼**M8**

PC = θετικός μάρτυρας.

NC = αρνητικός μάρτυρας.

TCx-(1-8) = αραιώσεις (1-8, χαμηλές προς υψηλές συγκεντρώσεις) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας για τη σειρά δοκιμών προδιαλογής και την αξιολόγηση της αγωνιστικής δράσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας x.

SC = μάρτυρας με διαλύτη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (ιδανικά ο ίδιος διαλύτης με το C0, αλλά πιθανώς από άλλη παρτίδα).

Σκιασμένα κελιά: = Εξωτερικές κοιλότητες, με έως 200 μl PBS.

Σχήμα 2

Διάταξη τρυβλίων μικροτιτλοδότησης 96 κοιλοτήτων για την προδιαλογή ανταγωνιστικής δράσης και την αξιολόγηση της ανταγωνιστικής επίδρασης

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
Γ		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
Δ		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
E		NC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	PC	
ΣΤ		NC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	PC	
Z		NC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	PC	
H												

Επακόλουθα τρυβλία

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
Γ		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
Δ		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
ΣΤ		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
Z		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
H												

C0 = διαλύτης προτύπου αναφοράς.

C(1-8) = σειρά αραιώσεων (1-8, χαμηλές προς υψηλές συγκεντρώσεις) προτύπου αναφοράς.

NC = αρνητικός μάρτυρας.

PC = θετικός μάρτυρας.

TCx-(1-8) = αραιώσεις (1-8, χαμηλές προς υψηλές συγκεντρώσεις) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας για τη σειρά δοκιμών προδιαλογής και την αξιολόγηση της αγωνιστικής δράσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας x.

SC = μάρτυρας με διαλύτη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (ιδανικά ο ίδιος διαλύτης με το C0, αλλά πιθανώς από άλλη παρτίδα).

VC = μάρτυρας με φορέα (μάρτυρας με διαλύτη χωρίς καθορισμένη συγκέντρωση του προτύπου αναφοράς αγωνιστών 17β-οιστραδιόλη).

Σκιασμένα κελιά: = Εξωτερικές κοιλότητες, με έως 200 μl PBS.

Σημείωση: όλες οι εσωτερικές κοιλότητες, εκτός των κοιλοτήτων μάρτυρα με φορέα (VC), περιέχουν επίσης καθορισμένη συγκέντρωση προτύπου αναφοράς αγωνιστών 17β-οιστραδιόλη ($3{,}0*10^{-12}$ M)

Μέτρηση της φωταύγειας

39. Η μέτρηση της φωταύγειας περιγράφεται αναλυτικά στο πρωτόκολλο δοκιμασίας αγωνιστών και ανταγωνιστών (10). Το θρεπτικό μέσο θα πρέπει να αφαιρείται από τις κοιλότητες και τα κύτταρα θα πρέπει να λύονται μετά από 24 ώρες επώασης προκειμένου να ανοιχτεί η κυτταρική μεμβράνη και να μετρηθεί η δραστικότητα λουσιφεράσης.

▼M8

40. Για τη διαδικασία μέτρησης της φωταύγειας απαιτείται λουμινόμετρο με 2 εγχυτές. Η αντίδραση της λουσιφεράσης εκκινείται μέσω έγχυσης του υποστρώματος λουσιφερίνη. Η αντίδραση διακόπτεται με προσθήκη 0,2 M NaOH. Η αντίδραση διακόπτεται για την αποτροπή της μεταφοράς φωταύγειας από μία κοιλότητα σε άλλη.

41. Το φως που εκπέμπεται από κάθε κοιλότητα εκφράζεται υπό μορφή σχετικών μονάδων φωτός (RLU) ανά κοιλότητα.

Σειρά δοκιμών προδιαλογής

42. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης προδιαλογής χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό ενός επεξεργασμένου εύρους συγκεντρώσεων των υπό δοκιμή χημικών ουσιών για τη διεξαγωγή ολοκληρωμένων δοκιμών. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων ανάλυσης προδιαλογής και ο προσδιορισμός του επεξεργασμένου εύρους των υπό δοκιμή χημικών ουσιών για τη διεξαγωγή ολοκληρωμένων δοκιμών περιγράφονται εις βάθος στο πρωτόκολλο δοκιμασίας αγωνιστών και ανταγωνιστών (10). Εδώ δίνεται μια συνοπτική παρουσίαση των διαδικασιών προσδιορισμού του εύρους συγκεντρώσεων των υπό δοκιμή χημικών ουσιών για τη διεξαγωγή δοκιμών αγωνιστών και ανταγωνιστών. Για καθοδήγηση σχετικά με τον σχεδιασμό των διαδοχικών αραιώσεων, βλέπε πίνακες 5 και 6.

Επιλογή συγκεντρώσεων για την αξιολόγηση των αγωνιστικών επιδράσεων

43. Κατά τη σειρά δοκιμών προδιαλογής, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να ελέγχονται με χρήση των διαδοχικών αραιώσεων που φαίνονται στους πίνακες 5 (αγωνιστική δράση) και 6 (ανταγωνιστική δράση). Όλες οι συγκεντρώσεις θα πρέπει να ελέγχονται σε τριπλές κοιλότητες, σύμφωνα με τη διάταξη τρυβλίου που φαίνεται στο σχήμα 1 (αγωνιστική δράση) ή 2 (ανταγωνιστική δράση).

44. Μόνο τα αποτελέσματα ανάλυσης που πληρούν τα κριτήρια αποδοχής (πίνακας 3) θεωρούνται έγκυρα και μπορούν να χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της απόκρισης των υπό δοκιμή χημικών ουσιών. Σε περίπτωση που ένα ή περισσότερα τρυβλία μικροτιτλοδότησης σε μια σειρά ανάλυσης δεν πληροί τα κριτήρια αποδοχής, τα αντίστοιχα τρυβλία μικροτιτλοδότησης θα πρέπει να αναλύονται εκ νέου. Σε περίπτωση που το πρώτο τρυβλίο που περιέχει την πλήρη σειρά αραιώσεων του προτύπου αναφοράς δεν πληροί τα κριτήρια αποδοχής, ολόκληρη η σειρά δοκιμών (6 τρυβλία) θα πρέπει να αναλύεται εκ νέου.

45. Τα αρχικά εύρη συγκεντρώσεων των υπό δοκιμή χημικών ουσιών θα πρέπει να προσαρμόζονται και η σειρά δοκιμών προδιαλογής θα πρέπει να επαναλαμβάνεται εάν

— παρατηρηθεί κυτταροτοξικότητα. Η διαδικασία προδιαλογής θα πρέπει να επαναλαμβάνεται με χαμηλότερες μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

— κατά την προδιαλογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας δεν εμφανίζεται πλήρης καμπύλη δόσης-απόκρισης, διότι από τις ελεγχθείσες συγκεντρώσεις προκύπτει μέγιστη επαγωγή. Η σειρά δοκιμών προδιαλογής θα πρέπει να επαναλαμβάνεται με χρήση χαμηλότερων συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

46. Όταν παρατηρείται έγκυρη απόκριση που σχετίζεται με τη δόση, θα πρέπει να επιλέγεται η (χαμηλότερη) συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται μέγιστη επαγωγή χωρίς κυτταροτοξικότητα. Η υψηλότερη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που θα ελεγχθεί στις ολοκληρωμένες δοκιμές θα πρέπει να είναι τριπλάσια της εν λόγω επιλεγμένης συγκέντρωσης.

47. Θα πρέπει να προετοιμάζεται πλήρης, επεξεργασμένη σειρά αραιώσεων με τα στάδια αραίωσης που φαίνονται στον πίνακα 5, ξεκινώντας από την υψηλότερη συγκέντρωση, όπως προσδιορίστηκε ανωτέρω.

▼**M8**

48. Υπό δοκιμή χημική ουσία που δεν επάγει αγωνιστική επίδραση θα πρέπει να ελέγχεται στο πλαίσιο των σειρών ολοκληρωμένων δοκιμών, αρχής γενομένης από την υψηλότερη, μη κυτταροτοξική συγκέντρωση που προσδιορίζεται κατά την προδιαλογή.

Επιλογή συγκεντρώσεων για την αξιολόγηση των ανταγωνιστικών επιδράσεων

49. Μόνο τα αποτελέσματα ανάλυσης που πληρούν τα κριτήρια αποδοχής (πίνακας 4) θεωρούνται έγκυρα και μπορούν να χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της απόκρισης των υπό δοκιμή χημικών ουσιών. Σε περίπτωση που ένα ή περισσότερα τρυβλία μικροτιτλοδότησης σε μια σειρά ανάλυσης δεν πληροί τα κριτήρια αποδοχής, τα αντίστοιχα τρυβλία μικροτιτλοδότησης θα πρέπει να αναλύονται εκ νέου. Σε περίπτωση που το πρώτο τρυβλίο που περιέχει την πλήρη σειρά αραιώσεων του προτύπου αναφοράς δεν πληροί τα κριτήρια αποδοχής, ολόκληρη η σειρά δοκιμών (6 τρυβλία) θα πρέπει να αναλύεται εκ νέου.

50. Τα αρχικά εύρη συγκεντρώσεων των υπό δοκιμή χημικών ουσιών θα πρέπει να προσαρμόζονται και η σειρά δοκιμών προδιαλογής θα πρέπει να επαναλαμβάνεται εάν

— παρατηρηθεί κυτταροτοξικότητα. Η διαδικασία προδιαλογής θα πρέπει να επαναλαμβάνεται με χαμηλότερες μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

— κατά την προδιαλογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας δεν εμφανίζεται πλήρης καμπύλη δόσης-απόκρισης, διότι από τις ελεγχθείσες συγκεντρώσεις προκύπτει μέγιστη αναστολή. Η προδιαλογή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται με χρήση χαμηλότερων συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

51. Όταν διαπιστώνεται έγκυρη απόκριση που σχετίζεται με τη δόση, θα πρέπει να επιλέγεται η (χαμηλότερη) συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται μέγιστη αναστολή χωρίς κυτταροτοξικότητα. Η υψηλότερη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που θα ελεγχθεί στις ολοκληρωμένες δοκιμές θα πρέπει να είναι τριπλάσια της εν λόγω επιλεγμένης συγκέντρωσης.

52. Θα πρέπει να προετοιμάζεται πλήρης, επεξεργασμένη σειρά αραιώσεων με τα στάδια αραίωσης που φαίνονται στον πίνακα 6, ξεκινώντας από την υψηλότερη συγκέντρωση, όπως προσδιορίστηκε ανωτέρω.

53. Υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν επάγουν ανταγωνιστικές επιδράσεις θα πρέπει να ελέγχονται στο πλαίσιο των σειρών ολοκληρωμένων δοκιμών, αρχής γενομένης από την υψηλότερη, μη κυτταροτοξική συγκέντρωση που προσδιορίζεται κατά την προδιαλογή.

Σειρές ολοκληρωμένων δοκιμών

54. Μετά την επιλογή των επεξεργασμένων ευρών συγκεντρώσεων, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να ελέγχονται ολοκληρωμένα με χρήση των διαδοχικών αραιώσεων που φαίνονται στους πίνακες 5 (αγωνιστική δράση) και 6 (ανταγωνιστική δράση). Όλες οι συγκεντρώσεις θα πρέπει να ελέγχονται σε τριπλές κοιλότητες, σύμφωνα με τη διάταξη τρυβλίου που φαίνεται στο σχήμα 1 (αγωνιστική δράση) ή 2 (ανταγωνιστική δράση).

55. Μόνο τα αποτελέσματα ανάλυσης που πληρούν τα κριτήρια αποδοχής (πίνακες 3 και 4) θεωρούνται έγκυρα και μπορούν να χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της απόκρισης των υπό δοκιμή χημικών ουσιών. Σε περίπτωση που ένα ή περισσότερα τρυβλία μικροτιτλοδότησης σε μια σειρά ανάλυσης δεν πληροί τα κριτήρια αποδοχής, τα αντίστοιχα τρυβλία μικροτιτλοδότησης θα πρέπει να αναλύονται εκ νέου. Σε περίπτωση που το πρώτο τρυβλίο που περιέχει την πλήρη σειρά αραιώσεων του προτύπου αναφοράς δεν πληροί τα κριτήρια αποδοχής, ολόκληρη η σειρά δοκιμών (6 τρυβλία) θα πρέπει να αναλύεται εκ νέου.

▼**M8**

Πίνακας 5

Συγκέντρωση και αραιώσεις των προτύπων αναφοράς, των μαρτύρων και των υπό δοκιμή χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται στις δοκιμές αγωνιστών

Πρότυπο αναφοράς 17β-οιστραδιόλη		TCx - συγκέντρωση αραίωσης		TCx - συγκέντρωση αραίωσης		Μάρτυρες	
συγκ. (M)		σειράς δοκιμών προδιαλογής		σειρών ολοκληρωμένων δοκιμών		συγκ. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	$3*10^{-6}$
C1	$1*10^{-13}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	$1*10^{-8}$
C2	$3*10^{-13}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$1*10^{-12}$	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$3*10^{-12}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	$6*10^{-12}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	$1*10^{-11}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	$3*10^{-11}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	$1*10^{-10}$						

TCx - υπό δοκιμή χημική ουσία x
PC - θετικός μάρτυρας (17α-μεθυλοτεστοστερόνη)
NC - αρνητικός μάρτυρας (κορτικοστερόνη)
C0 - μάρτυρας με διαλύτη προτύπου αναφοράς
SC - μάρτυρας με διαλύτη υπό δοκιμή χημικής ουσίας

▼**M8**

Πίνακας 6

Συγκέντρωση και αραιώσεις των προτύπων αναφοράς, των μαρτύρων και των υπό δοκιμή χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται στις δοκιμές ανταγωνιστών

Πρότυπο αναφοράς ταμοξιφαίνη		TCx - συγκέντρωση αραίωσης		TCx - συγκέντρωση αραίωσης		Μάρτυρες	
συγκ. (M)		σειράς δοκιμών προδιαλογής		σειρών ολοκληρωμένων δοκιμών		συγκ. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	$1*10^{-9}$
C1	$3*10^{-9}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	$1*10^{-5}$
C2	$1*10^{-8}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$3*10^{-8}$	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$1*10^{-7}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	$3*10^{-7}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x	**Συμπλήρωμα αγωνιστών**	
C6	$1*10^{-6}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x	**συγκ. (M)**	
C7	$3*10^{-6}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17β-οιστραδιόλη	$3*10^{-12}$
C8	$1*10^{-5}$						

TCx - υπό δοκιμή χημική ουσία x
PC - θετικός μάρτυρας (4-υδροξυταμοξιφαίνη)
NC - αρνητικός μάρτυρας (ρεσβερατρόλη)
C0 - μάρτυρας με διαλύτη προτύπου αναφοράς
SC - μάρτυρας με διαλύτη υπό δοκιμή χημικής ουσίας
VC - μάρτυρας με φορέα (δεν περιέχει καθορισμένη συγκέντρωση του προτύπου αναφοράς αγωνιστικής δράσης 17β-οιστραδιόλη ($3,0*10^{-12}$ M)

▼M8

Συλλογή και ανάλυση δεδομένων

56. Μετά τη σειρά δοκιμών προδιαλογής και τις σειρές ολοκληρωμένων δοκιμών, οι EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50} και η μέγιστη επαγωγή (TCx_{max}) θα πρέπει να προσδιορίζονται για τη διεξαγωγή δοκιμών αγωνιστικής δράσης. Όσον αφορά τις δοκιμές ανταγωνιστικής δράσης, θα πρέπει να υπολογίζονται οι IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50} και η ελάχιστη επαγωγή (TCx_{min}). Στο σχήμα 3 (αγωνιστική δράση) και 4 (ανταγωνιστική δράση) παρέχεται γραφική αναπαράσταση των εν λόγω παραμέτρων. Οι απαιτούμενες παράμετροι υπολογίζονται με βάση τη σχετική επαγωγή κάθε υπό δοκιμή χημικής ουσίας [σε σχέση με τη μέγιστη επαγωγή του προτύπου αναφοράς (=100 %)]. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται μη γραμμική παλινδρόμηση (μεταβαλλόμενη κλίση, 4 παράμετροι) για την αξιολόγηση των δεδομένων σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

$$Y = ελάχιστη + \frac{(μέγιστη - ελάχιστη)}{1 + 10(logEC_{50} - X)κλίση\ Hill}$$

όπου:

X = λογάριθμος δόσης ή συγκέντρωσης

Y = απόκριση [σχετική επαγωγή (%)]

μέγιστη = μέγιστη επαγωγή (%)

ελάχιστη = ελάχιστη επαγωγή (%)

$logEC_{50}$ = λογάριθμος συγκέντρωσης στην οποία παρατηρείται το 50 % της μέγιστης απόκρισης

κλίση Hill = συντελεστής κλίσης ή κλίση Hill

57. Τα ανεπεξέργαστα δεδομένα από το λουμινόμετρο, εκφραζόμενα ως σχετικές μονάδες φωτός (RLU), θα πρέπει να μεταφέρονται στο υπολογιστικό φύλλο ανάλυσης δεδομένων που έχει σχεδιαστεί ειδικά για τη σειρά δοκιμών προδιαλογής και τις σειρές ολοκληρωμένων δοκιμών. Τα ανεπεξέργαστα δεδομένα θα πρέπει να πληρούν τα κριτήρια αποδοχής που εμφαίνονται στους πίνακες 3Α και 3Β (αγωνιστική δράση) ή 4Α και 4Β (ανταγωνιστική δράση). Σε περίπτωση που τα ανεπεξέργαστα δεδομένα πληρούν τα κριτήρια αποδοχής, εκτελούνται τα ακόλουθα στάδια υπολογισμού προκειμένου να προσδιοριστούν οι απαιτούμενες παράμετροι:

Αγωνιστική δράση

— Αφαίρεση της μέσης RLU του μάρτυρα με διαλύτη προτύπου αναφοράς από καθένα από τα ανεπεξέργαστα δεδομένα ανάλυσης των προτύπων αναφοράς.

— Αφαίρεση της μέσης RLU για τον μάρτυρα με διαλύτη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας από καθένα από τα ανεπεξέργαστα δεδομένα ανάλυσης των υπό δοκιμή χημικών ουσιών.

— Υπολογισμός της σχετικής επαγωγής κάθε συγκέντρωσης του προτύπου αναφοράς. Ορισμός της επαγωγής της υψηλότερης συγκέντρωσης του προτύπου αναφοράς σε 100 %.

— Υπολογισμός της σχετικής επαγωγής κάθε συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε σύγκριση με την υψηλότερη συγκέντρωση του προτύπου αναφοράς ως 100 %.

— Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων ανάλυσης μετά από μη γραμμική παλινδρόμηση (μεταβαλλόμενη κλίση, 4 παράμετροι).

▼M8

— Προσδιορισμός των EC_{50} και EC_{10} του προτύπου αναφοράς.

— Προσδιορισμός των EC_{50} και EC_{10} των υπό δοκιμή χημικών ουσιών.

— Προσδιορισμός της μέγιστης σχετικής επαγωγής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (TC_{max}).

— Προσδιορισμός των PC_{10} και PC_{50} των υπό δοκιμή χημικών ουσιών.

Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορεί να μην είναι πάντοτε εφικτή η επίτευξη πλήρους καμπύλης δόσης-απόκρισης λόγω, π.χ., προβλημάτων κυτταροτοξικότητας ή διαλυτότητας. Συνεπώς, οι EC_{50}, EC_{10} και PC_{50} δεν μπορούν να προσδιοριστούν. Σε αυτή την περίπτωση, μπορούν να προσδιορίζονται μόνο οι PC_{10} και TC_{max}.

Ανταγωνιστική δράση

— Αφαίρεση της μέσης RLU της υψηλότερης συγκέντρωσης προτύπου αναφοράς από καθένα από τα ανεπεξέργαστα δεδομένα ανάλυσης των προτύπων αναφοράς.

— Αφαίρεση της μέσης RLU της υψηλότερης συγκέντρωσης προτύπου αναφοράς από καθένα από τα ανεπεξέργαστα δεδομένα ανάλυσης των υπό δοκιμή χημικών ουσιών.

— Υπολογισμός της σχετικής επαγωγής κάθε συγκέντρωσης του προτύπου αναφοράς. Ορισμός της επαγωγής της χαμηλότερης συγκέντρωσης του προτύπου αναφοράς σε 100 %.

— Υπολογισμός της σχετικής επαγωγής κάθε συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε σύγκριση με τη χαμηλότερη συγκέντρωση του προτύπου αναφοράς ως 100 %.

— Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων ανάλυσης μετά από μη γραμμική παλινδρόμηση (μεταβαλλόμενη κλίση, 4 παράμετροι).

— Προσδιορισμός των IC_{50} και IC_{20} του προτύπου αναφοράς.

— Προσδιορισμός των IC_{50} και IC_{20} των υπό δοκιμή χημικών ουσιών.

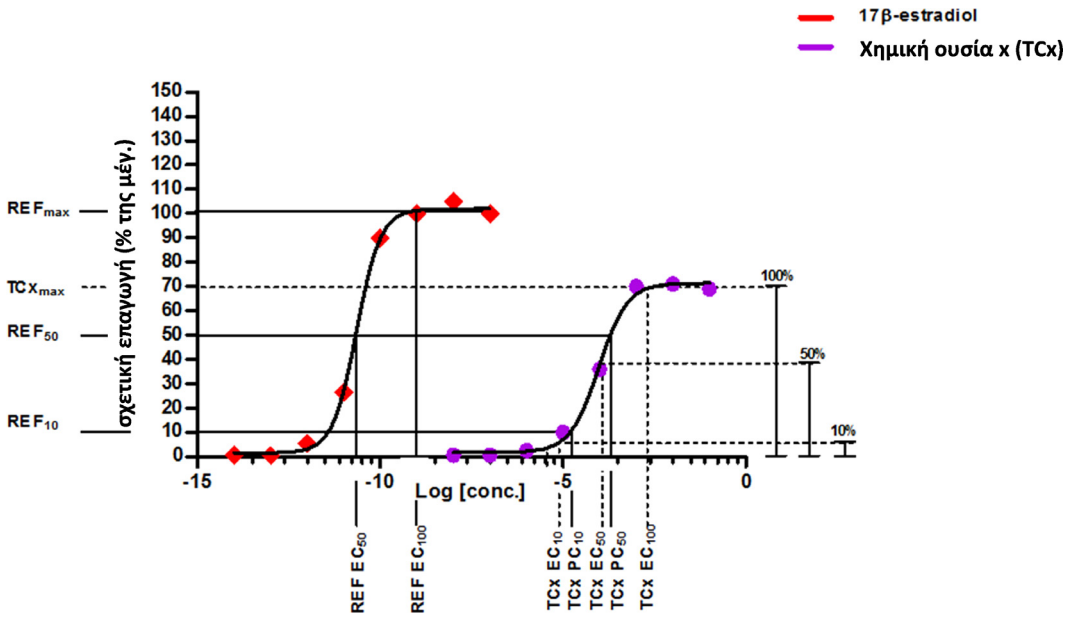
— Προσδιορισμός της ελάχιστης σχετικής επαγωγής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (TC_{min}).

— Προσδιορισμός των PC_{80} και PC_{50} των υπό δοκιμή χημικών ουσιών.

▼M8

Σχήμα 3

Επισκόπηση των παραμέτρων που προσδιορίζονται στη δοκιμασία αγωνιστών



EC_{10} = συγκέντρωση ουσίας στην οποία παρατηρείται το 10 % της μέγιστης απόκρισής της.

EC_{50} = συγκέντρωση ουσίας στην οποία παρατηρείται το 50 % της μέγιστης απόκρισής της.

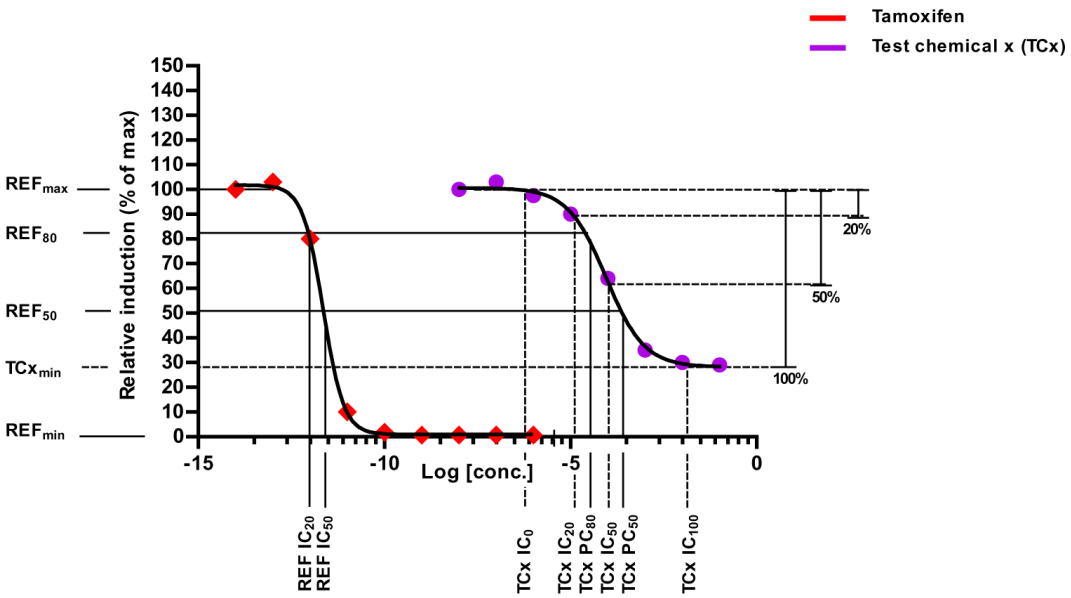
PC_{10} = συγκέντρωση υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην οποία η απόκρισή της είναι ίση με την EC_{10} του προτύπου αναφοράς.

PC_{50} = συγκέντρωση υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην οποία η απόκρισή της είναι ίση με την EC_{50} του προτύπου αναφοράς.

TCx_{max} = μέγιστη σχετική επαγωγή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Σχήμα 4

Επισκόπηση των παραμέτρων που προσδιορίζονται στη δοκιμασία ανταγωνιστών



IC20 = συγκέντρωση ουσίας στην οποία παρατηρείται το 80 % της μέγιστης απόκρισής της (20 % αναστολή).

▼M8

IC50 = συγκέντρωση ουσίας στην οποία παρατηρείται το 50 % της μέγιστης απόκρισής της (50 % αναστολή).

PC80 = συγκέντρωση υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην οποία η απόκρισή της είναι ίση με την IC20 του προτύπου αναφοράς.

PC50 = συγκέντρωση υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην οποία η απόκρισή της είναι ίση με την IC50 του προτύπου αναφοράς.

TCxmin = ελάχιστη σχετική επαγωγή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορεί να μην είναι πάντοτε εφικτή η επίτευξη πλήρους καμπύλης δόσης-απόκρισης λόγω, π.χ., προβλημάτων κυτταροτοξικότητας ή διαλυτότητας. Συνεπώς, οι IC_{50}, IC_{20} και PC_{50} δεν μπορούν να προσδιοριστούν. Σε αυτή την περίπτωση, μπορούν να προσδιορίζονται μόνο οι PC_{20} και TC_{min}.

58. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να βασίζονται σε δύο (ή τρεις) ανεξάρτητες σειρές δοκιμών. Σε περίπτωση που από δύο σειρές δοκιμών προκύπτουν συγκρίσιμα και, ως εκ τούτου, αναπαραγώγιμα αποτελέσματα, δεν είναι απαραίτητη η διεξαγωγή τρίτης σειράς δοκιμών. Για να είναι αποδεκτά, τα αποτελέσματα θα πρέπει να πληρούν τις ακόλουθες προϋποθέσεις:

— να πληρούν τα κριτήρια αποδοχής (βλ. κριτήρια αποδοχής, παράγραφοι 14-22),

— να είναι αναπαραγώγιμα.

Κριτήρια ερμηνείας των δεδομένων

59. Για την ερμηνεία των δεδομένων και τη λήψη απόφασης σχετικά με το κατά πόσον μια υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται θετική ή αρνητική, πρέπει να χρησιμοποιούνται τα ακόλουθα κριτήρια:

Αγωνιστική δράση

Για κάθε σειρά ολοκληρωμένων δοκιμών, μια υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται **θετική** εφόσον:

1 Η TC_{max} είναι ίση ή υπερβαίνει το 10 % της μέγιστης απόκρισης του προτύπου αναφοράς (REF_{10}).

2 Τουλάχιστον 2 διαδοχικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας είναι ίσες ή υπερβαίνουν το REF_{10}.

Για κάθε σειρά ολοκληρωμένων δοκιμών, μια υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται **αρνητική** εφόσον:

1 Η TC_{max} δεν υπερβαίνει το 10 % της μέγιστης απόκρισης του προτύπου αναφοράς (REF_{10}).

2 Λιγότερες από 2 συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας είναι ίσες ή υπερβαίνουν το REF_{10}.

Ανταγωνιστική δράση

Για κάθε σειρά ολοκληρωμένων δοκιμών, μια υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται **θετική** εφόσον:

1 Η TC_{min} είναι ίση ή χαμηλότερη από το 80 % της μέγιστης απόκρισης του προτύπου αναφοράς (REF_{80} = 20 % αναστολή).

2 Τουλάχιστον 2 διαδοχικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας είναι ίσες ή χαμηλότερες από το REF_{80}.

▼**M8**

Για κάθε σειρά ολοκληρωμένων δοκιμών, μια υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται **αρνητική** εφόσον:

1 Η TC_{min} υπερβαίνει το 80 % της μέγιστης απόκρισης του προτύπου αναφοράς (REF_{80} = 20 % αναστολή).

2 Λιγότερες από 2 συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας είναι ίσες ή χαμηλότερες από το REF_{80}.

60. Για την εκτίμηση του δυναμικού θετικής απόκρισης μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας, θα πρέπει να αναφέρεται το μέγεθος της επίδρασης (αγωνιστική δράση: TC_{max}, ανταγωνιστική δράση: TC_{min}) και η συγκέντρωση στην οποία εμφανίζεται η επίδραση (αγωνιστική δράση: EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50}, ανταγωνιστική δράση: IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50}).

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

61. Βλ. παράγραφο 20 της ενότητας «ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ER TA»

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2016). Draft Validation report of the (anti-) ERα CALUX bioassay - transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 240). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

(2) Sonneveld E, Jansen HJ, Riteco JA, Brouwer A, van der Burg B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci.* 83(1), 136-148.

(3) Quaedackers ME, van den Brink CE, Wissink S, Schreurs RHMM, Gustafsson JA, van der Saag PT, and van der Burg B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER)α and not through ERβ. *Endocrinology* 142(3), 1156-1166.

(4) Thorne N, Inglese J and Auld DS. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology17(6):646-57.

(5) Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, Nicolas JC, Cavaillès V and Balaguer P. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1459-1469.

(6) Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B and Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.,* 139, 4252-4263.

(7) Sotoca AM, Bovee TFH, Brand W, Velikova N, Boeren S, Murk AJ, Vervoort J, Rietjens IMCM. (2010). Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.,* 122, 204–211.

(8) Sonneveld E, Riteco JAC, Jansen HJ, Pieterse B, Brouwer A, Schoonen WG, and van der Burg B. (2006). Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.,* 89(1), 173–187.

▼**M8**

(9) Kobayashi H, Yamamoto K, Eguchi M, Kubo M, Nakagami S, Wakisaka S, Kaizuka M and Ishii H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.,* 57(4), 769-771.

(10) Zhang J-H, Chung TDY, and Oldenburg KR. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throuphut screening assays. J. Biomol. Scr., 4, 67-73

(11) Besselink H, Middelhof I, and Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ERα CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, the Netherlands.

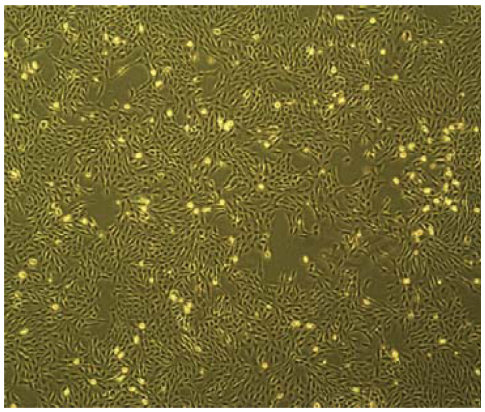
▼**M8**

Προσάρτημα 4.1

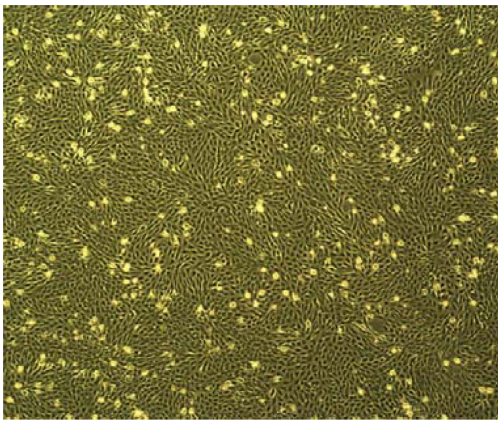
ΟΠΤΙΚΗ ΕΠΙΘΕΩΡΗΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ



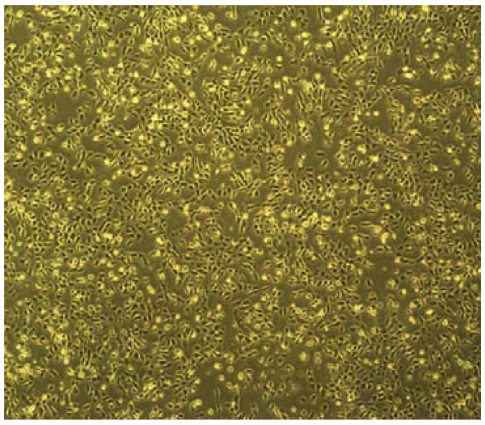
<5 % συρροή. Τα κύτταρα έχουν μόλις εμβολιαστεί. 100 % κυτταρική βιωσιμότητα. Ταξινόμηση: «καμία κυτταροτοξικότητα»



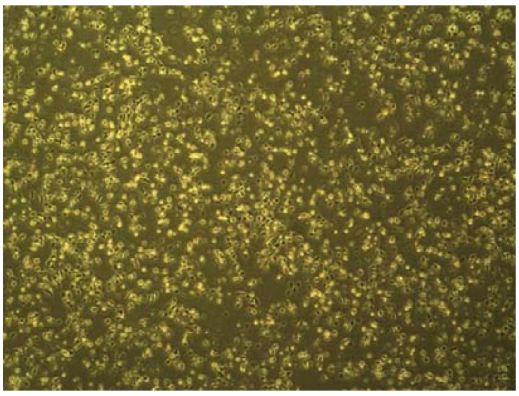
> 85 % συρροή. Σε αυτό το στάδιο, τα κύτταρα εκτίθενται στις υπό δοκιμή χημικές ουσίες. > 95 % κυτταρική βιωσιμότητα.
Ταξινόμηση: «καμία κυτταροτοξικότητα»



> 95 % συρροή. Τα κύτταρα είναι πυκνά συμπιεσμένα και αρχίζουν να αναπτύσσονται υπερβολικά. > 95 % κυτταρική βιωσιμότητα.
Ταξινόμηση: «καμία κυτταροτοξικότητα»



< 25 % κυτταρική βιωσιμότητα. Τα κύτταρα αποκολλώνται και η μεταξύ τους επαφή μειώνεται. Τα κύτταρα λαμβάνουν στρογγυλό σχήμα. Ταξινόμηση: «κυτταροτοξικότητα»



< 5 % κυτταρική βιωσιμότητα. Τα κύτταρα αποκολλώνται πλήρως και δεν εφάπτονται καθόλου μεταξύ τους. Τα κύτταρα λαμβάνουν στρογγυλό σχήμα. Ταξινόμηση: «κυτταροτοξικότητα»

▼M8

Β.67 *IN VITRO* ΔΟΚΙΜΕΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΘΥΜΙΔΙΝΟΚΙΝΑΣΗΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 490 του ΟΟΣΑ (2016). Οι μέθοδοι δοκιμών επανεξετάζονται και αναθεωρούνται κατά περιόδους υπό το φως των επιστημονικών εξελίξεων, των μεταβαλλόμενων κανονιστικών αναγκών και της καλής μεταχείρισης των ζώων. Η δοκιμασία λεμφώματος ποντικών (MLA) και η δοκιμή TK6 με χρήση του γενετικού τόπου της θυμιδινοκινάσης (TK) περιλαμβάνονταν αρχικά στη μέθοδο δοκιμών Β.17. Αργότερα, η διεθνής ομάδα εργασίας εμπειρογνωμόνων MLA της διεθνούς ημερίδας για τις δοκιμές γονιδιοτοξικότητας (IWGT) ανέπτυξε διεθνώς εναρμονισμένες συστάσεις για κριτήρια αποδοχής δοκιμασιών και την ερμηνεία δεδομένων για την MLA (1)(2)(3)(4)(5), οι οποίες ενσωματώθηκαν στην παρούσα νέα μέθοδο δοκιμών Β.67. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών έχει συνταχθεί για την MLA και, λόγω του ότι χρησιμοποιεί επίσης τον γενετικό τόπο TK, τη δοκιμή TK6. Ενώ η MLA χρησιμοποιείται ευρέως για κανονιστικούς σκοπούς, η χρήση της TK6 είναι πολύ πιο σπάνια. Πρέπει να επισημανθεί ότι παρά την ομοιότητα μεταξύ των παραμέτρων, οι δύο κυτταρικές σειρές δεν μπορούν να υποκαταστήσουν η μία την άλλη και, ως εκ τούτου, στο πλαίσιο κανονιστικών προγραμμάτων μπορεί ευλόγως να προτιμάται η μία εκ των δύο για συγκεκριμένη κανονιστική χρήση. Για παράδειγμα, η επικύρωση της MLA κατέδειξε την καταλληλότητά της για την ανίχνευση όχι μόνο γονιδιακών μεταλλάξεων αλλά και της ικανότητας μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας να επάγει δομικές χρωμοσωμικές βλάβες. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών αποτελεί μέρος μιας σειράς μεθόδων δοκιμών γενετικής τοξικολογίας. Ο ΟΟΣΑ έχει συντάξει ένα έγγραφο με συνοπτικές πληροφορίες για τις δοκιμές γενετικής τοξικολογίας και μια επισκόπηση των πρόσφατων αλλαγών που έγιναν στις κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών γενετικής τοξικότητας του ΟΟΣΑ (6).

2. Ο σκοπός των *in vitro* δοκιμών γονιδιακής μετάλλαξης σε κύτταρα θηλαστικών είναι η ανίχνευση γονιδιακών μεταλλάξεων που προκαλούνται από χημικές ουσίες. Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται στις εν λόγω δοκιμές μετρούν τις εξελικτικές μεταλλάξεις σε γονίδια αναφοράς, συγκεκριμένα στο ενδογενές γονίδιο της θυμιδινοκινάσης (*TK* για τα ανθρώπινα κύτταρα και *Tk* για τα κύτταρα τρωκτικών, καλούμενα αμφότερα *TK* στην παρούσα μέθοδο δοκιμών). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών προορίζεται για χρήση με δύο κυτταρικές σειρές: την κυτταρική σειρά λεμφώματος ποντικού $TK^{+/-}$-3.7.2C L5178Y (γενικά καλούμενη L5178Y) και την ανθρώπινη λεμφοβλαστοειδή κυτταρική σειρά TK6 (γενικά καλούμενη TK6). Παρότι οι δύο κυτταρικές σειρές διαφέρουν λόγω της προέλευσής τους, της κυτταρικής ανάπτυξης, της κατάστασης ως προς το p53 και άλλα σημεία, οι δοκιμές γονιδιακών μεταλλάξεων *TK* μπορούν να διεξάγονται με ανάλογο τρόπο και στους δύο τύπους κυττάρων, όπως περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών.

3. Η αυτοσωμική και ετερόζυγη φύση του γονιδίου της θυμιδινοκινάσης επιτρέπει την ανίχνευση βιώσιμων αποικιών από κύτταρα που δεν διαθέτουν θυμιδινοκινάση λόγω μετάλλαξης της $TK^{+/-}$ σε $TK^{-/-}$. Η έλλειψη αυτή μπορεί να είναι το αποτέλεσμα γενετικών συμβάντων που επηρεάζουν το γονίδιο *TK*, περιλαμβανομένων των γονιδιακών μεταλλάξεων (σημειακές μεταλλάξεις, μεταλλάξεις μετατόπισης αναγνωστικού πλαισίου, μικρές απαλείψεις κ.λπ.) και των χρωμοσωμικών συμβάντων (μεγάλες απαλείψεις, χρωμοσωμικές αναδιατάξεις και μιτωτικός ανασυνδυασμός). Τα τελευταία συμβάντα εκφράζονται ως απώλεια ετεροζυγωτικότητας, η οποία αποτελεί συνήθη γενετική αλλοίωση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων στην ανθρώπινη ογκογένεση. Θεωρητικά, η απώλεια ολόκληρου του χρωμοσώματος που φέρει το γονίδιο *TK* λόγω εξασθένησης της ατράκτου και/ή μιτωτικού μη διαχωρισμού μπορεί να ανιχνευθεί με την MLA. Πράγματι, ένας συνδυασμός κυτταρογενετικής και μοριακής ανάλυσης καταδεικνύει με σαφήνεια ότι ορισμένα προϊόντα μετάλλαξης TK MLA είναι αποτέλεσμα μη διαχωρισμού. Ωστόσο, η προσέγγιση βάρους της απόδειξης δείχνει ότι οι δοκιμές γονιδιακής μετάλλαξης *TK* δεν μπορούν να ανιχνεύσουν αξιόπιστα τις ανευπλοειδογόνες ουσίες όταν εφαρμόζονται τα τυποποιημένα κριτήρια κυτταροτοξικότητας (όπως περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών) και, ως εκ τούτου, είναι ακατάλληλες για την ανίχνευση ανευπλοειδογόνων ουσιών (7)(8)(9).

▼M8

4. Στις δοκιμές γονιδιακής μετάλλαξης *ΤΚ* παράγονται δύο διακριτές φαινοτυπικές κατηγορίες προϊόντων μετάλλαξης *ΤΚ*· τα φυσιολογικώς αναπτυσσόμενα προϊόντα μετάλλαξης που αναπτύσσονται με τον ίδιο ρυθμό με τα ετερόζυγα κύτταρα ΤΚ, και τα βραδέως αναπτυσσόμενα προϊόντα μετάλλαξης που αναπτύσσονται με παρατεταμένους χρόνους διπλασιασμού. Τα φυσιολογικώς αναπτυσσόμενα και τα βραδέως αναπτυσσόμενα προϊόντα μετάλλαξης αναγνωρίζονται ως προϊόντα μετάλλαξης μεγάλων και μικρών αποικιών στην MLA και ως προϊόντα μετάλλαξης πρώιμα και όψιμα εμφανιζόμενων αποικιών στην ΤΚ6. Η μοριακή και κυτταρογενετική φύση των προϊόντων μετάλλαξης μικρών και μεγάλων αποικιών MLA έχει μελετηθεί λεπτομερώς (8)(10)(11)(12)(13). Η μοριακή και κυτταρογενετική φύση των πρώιμα εμφανιζόμενων και των όψιμα εμφανιζόμενων προϊόντων μετάλλαξης ΤΚ6 έχει επίσης μελετηθεί λεπτομερώς (14)(15)(16)(17). Τα βραδέως αναπτυσσόμενα προϊόντα μετάλλαξης έχουν υποστεί γενετικές βλάβες που προϋποθέτουν τη θεωρητική ύπαρξη γονιδίου/-ων ρύθμισης της ανάπτυξης εγγύς του γενετικού τόπου *ΤΚ*, με αποτέλεσμα παρατεταμένους χρόνους διπλασιασμού και τον σχηματισμό όψιμα εμφανιζόμενων ή μικρών αποικιών (18). Η επαγωγή βραδέως αναπτυσσόμενων προϊόντων μετάλλαξης έχει συνδεθεί με χημικές ουσίες που επάγουν μακροσκοπικές δομικές αλλαγές στο χρωμοσωμικό επίπεδο. Τα κύτταρα των οποίων οι βλάβες δεν προϋποθέτουν τα θεωρητικά ρυθμιστικά γονίδια κοντά στον γενετικό τόπο ΤΚ αναπτύσσονται με ρυθμούς παρόμοιους με τα γονικά κύτταρα και εξελίσσονται σε φυσιολογικώς αναπτυσσόμενα προϊόντα μετάλλαξης. Η επαγωγή κυρίως φυσιολογικώς αναπτυσσόμενων προϊόντων μετάλλαξης συνδέεται με χημικές ουσίες που δρουν κυρίως ως μεταλλαξιγόνα σημειακών μεταλλάξεων. Κατά συνέπεια, είναι απαραίτητη η καταμέτρηση και των βραδέως αναπτυσσόμενων και των φυσιολογικώς αναπτυσσόμενων προϊόντων μετάλλαξης προκειμένου να ανακτώνται όλα τα προϊόντα μετάλλαξης και να διαπιστώνεται, σε έναν βαθμό, ο τύπος βλαβών (μεταλλαξιγόνα έναντι κλαστογόνων) που επάγει η υπό δοκιμή χημική ουσία (10)(12)(18)(19).

5. Η μέθοδος δοκιμών έχει οργανωθεί κατά τρόπον ώστε να παρέχει γενικές πληροφορίες που εφαρμόζονται τόσο στην MLA όσο και στην ΤΚ6, καθώς και εξειδικευμένη καθοδήγηση για τις μεμονωμένες δοκιμές.

6. Οι χρησιμοποιούμενοι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

7. Στις δοκιμές που διεξάγονται *in vitro* απαιτείται εν γένει η χρήση εξωγενούς πηγής μεταβολικής ενεργοποίησης. Το εξωγενές σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης δεν μιμείται απόλυτα τις συνθήκες που επικρατούν *in vivo*.

8. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγονται συνθήκες που μπορούν να οδηγήσουν σε τεχνητά θετικά αποτελέσματα (δηλ. πιθανή αλληλεπίδραση με το σύστημα δοκιμής) που δεν προκύπτουν από την αλληλεπίδραση μεταξύ της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και του γενετικού υλικού του κυττάρου· τέτοιες συνθήκες είναι οι μεταβολές του pH ή της ωσμωμοριακότητας, η αλληλεπίδραση με τα συστατικά του θρεπτικού μέσου (20)(21) και τα υπέρμετρα επίπεδα κυτταροτοξικότητας (22)(23)(24). Η κυτταροτοξικότητα που υπερβαίνει τα συνιστώμενα μέγιστα επίπεδα κυτταροτοξικότητας, όπως ορίζονται στην παράγραφο 28, θεωρείται υπέρμετρη για την MLA και την ΤΚ6. Επιπλέον, θα πρέπει να επισημανθεί ότι οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που είναι ανάλογα θυμιδίνης ή συμπεριφέρονται σαν ανάλογα θυμιδίνης μπορούν να αυξήσουν τη συχνότητα των προϊόντων μετάλλαξης μέσω επιλεκτικής ανάπτυξης των αυθόρμητων προϊόντων μετάλλαξης υποβάθρου κατά την αγωγή των κυττάρων και απαιτούν πρόσθετες μεθόδους δοκιμών για την επαρκή αξιολόγησή τους (25).

9. Για τα βιομηχανικά νανοϋλικά, ενδέχεται να χρειάζονται ειδικές προσαρμογές της παρούσας μεθόδου δοκιμών, οι οποίες όμως δεν περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών.

10. Πριν από τη χρήση της μεθόδου δοκιμών για τη διεξαγωγή δοκιμών σε μείγμα για την παραγωγή δεδομένων για συγκεκριμένο κανονιστικό σκοπό, θα πρέπει να εξετάζεται αν –και, εάν ναι, για ποιον λόγο– μπορεί να αποδώσει επαρκή αποτελέσματα για τον επιδιωκόμενο σκοπό. Τέτοια εξέταση δεν χρειάζεται όταν οι κανονιστικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τον έλεγχο του μείγματος.

▼M8

11. Τα μεταλλαγμένα κύτταρα που παρουσιάζουν έλλειψη δραστικότητας του ενζύμου θυμιδινοκινάση λόγω μετάλλαξης του *TK*$^{+/-}$ σε *TK*$^{-/-}$ παρουσιάζουν αντοχή στην κυτταροστατική δράση του πυριμιδινικού αναλόγου τριφθοροθυμιδίνη (TFT). Τα κύτταρα με *TK* είναι ευαίσθητα στην TFT, η οποία εμποδίζει τον κυτταρικό μεταβολισμό και σταματά την περαιτέρω κυτταρική διαίρεση. Έτσι, τα μεταλλαγμένα κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιάζονται παρουσία TFT και να σχηματίζουν ορατές αποικίες, ενώ τα κύτταρα που περιέχουν το ένζυμο TK δεν μπορούν.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

12. Τα εναιωρημένα κύτταρα εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία, με και χωρίς εξωγενή πηγή μεταβολικής ενεργοποίησης (βλ. παράγραφο 19), για κατάλληλο χρονικό διάστημα (βλ. παράγραφο 33), και κατόπιν ανακαλλιεργούνται για να προσδιοριστεί η κυτταροτοξικότητα και για να επιτραπεί η φαινοτυπική έκφραση πριν από την επιλογή των προϊόντων μετάλλαξης. Η κυτταροτοξικότητα προσδιορίζεται βάσει της σχετικής συνολικής ανάπτυξης (RTG, βλ. παράγραφο 25) για την MLA και βάσει της σχετικής επιβίωσης (RS, βλ. παράγραφο 26) για την TK6. Οι καλλιέργειες υπό αγωγή διατηρούνται σε θρεπτικό μέσο για ικανό χρονικό διάστημα που είναι χαρακτηριστικό για κάθε κυτταρικό τύπο (βλ. παράγραφο 37), ώστε να μπορέσει να επιτευχθεί η βέλτιστη δυνατή φαινοτυπική έκφραση των προκληθεισών μεταλλάξεων. Μετά τη φαινοτυπική έκφραση, προσδιορίζεται η συχνότητα των προϊόντων μετάλλαξης με ανακαλλιέργεια γνωστού αριθμού κυττάρων σε θρεπτικό μέσο που περιέχει τον παράγοντα επιλογής για την ανίχνευση αποικιών μεταλλαγμένων κυττάρων και σε θρεπτικό μέσο χωρίς παράγοντα επιλογής για τον προσδιορισμό της απόδοσης κλωνοποίησης (βιωσιμότητα). Έπειτα από κατάλληλο χρόνο επώασης, μετρούνται οι αποικίες. Η συχνότητα των προϊόντων μετάλλαξης υπολογίζεται βάσει του αριθμού μεταλλαγμένων αποικιών, διορθωμένου ως προς την απόδοση κλωνοποίησης κατά τη χρονική στιγμή της επιλογής των προϊόντων μετάλλαξης.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Προετοιμασίες

Κύτταρα

13. Για την MLA: Λόγω του ότι η MLA αναπτύχθηκε και χαρακτηρίστηκε με χρήση της υποσειράς *TK*$^{+/-}$ -3.7.2C των κυττάρων L5178Y, για την MLA θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί η συγκεκριμένη υποσειρά. Η κυτταρική σειρά L5178Y προήλθε από προκληθέν από μεθυλοχολανθρένιο θυμικό λέμφωμα από ποντικό DBA-2 (26). Οι Clive και συνεργάτες υπέβαλαν σε αγωγή κύτταρα L5178Y (καλούμενα από τον Clive TK$^{+/+}$ -3) με μεθανοσουλφονικό αιθύλιο και απομόνωσαν έναν κλώνο TK$^{-/-}$ (καλούμενο TK$^{-/-}$ -3.7) με χρήση βρωμοδεσοξυουριδίνης ως παράγοντα επιλογής. Από τον κλώνο TK$^{-/-}$ απομονώθηκε ένας αυθόρμητος κλώνος TK$^{+/-}$ (καλούμενος TK$^{+/-}$ -3.7.2.) και ένας υποκλώνος (καλούμενος TK$^{+/-}$-3.7.2C), οι οποίοι χαρακτηρίστηκαν για χρήση στην MLA (27). Ο καρυότυπος της κυτταρικής σειράς έχει δημοσιευτεί (28)(29)(30)(31). Ο χαρακτηριστικός αριθμός χρωμοσωμάτων είναι 40. Υπάρχει ένα μετακεντρικό χρωμόσωμα (t12,13) που πρέπει να μετράται ωςένα χρωμόσωμα. Ο γενετικός τόπος της *TK* βρίσκεται στο περιφερικό άκρο του χρωμοσώματος 11. Η κυτταρική σειρά L5178Y *TK*$^{+/-}$ -3.7.2C έχει μεταλλάξεις και στα δύο αλληλόμορφα p53 και παράγει μεταλλαγμένη πρωτεΐνη p53 (32) (33). Η ικανότητα της δοκιμής να ανιχνεύει μεγάλης κλίμακας βλάβες πιθανότατα οφείλεται στην κατάσταση του p53 της κυτταρικής σειράς TK$^{+/-}$-3.7.2C (17).

14. Για την TK6: Η TK6 είναι μια ανθρώπινη λεμφοβλαστοειδής κυτταρική σειρά. Η γονική κυτταρική σειρά είναι μια κυτταρική σειρά μετασχηματισμένη από τον ιό Epstein-Barr, η WI-L2, η οποία προήλθε αρχικά από ένα αγόρι ηλικίας 5 ετών με κληρονομική σφαιροκυττάρωση. Ο πρώτος κλώνος που απονώθηκε, ο HH4, υπέστη μεταλλαξιγένεση με ICR191 και παρήχθη μια ετερόζυγη κυτταρική σειρά *TK*, η TK6 (34). Τα κύτταρα TK6 είναι σχεδόν διπλοειδή και ο αντιπροσωπευτικός καρυότυπος είναι 47, XY, 13+, t(14, 20), t(3, 21) (35). Ο γενετικός τόπος *TK* στον άνθρωπο βρίσκεται στον μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 17. Η TK6 είναι μια κυτταρική σειρά με λειτουργικό p53, διότι διαθέτει αλληλουχία p53 αγρίου τύπου και στα δύο αλληλόμορφα και εκφράζει μόνο την πρωτεΐνη p53 αγρίου τύπου (36).

▼M8

15. Για αμφότερες τις MLA και TK6, την πρώτη φορά που δημιουργείται ή ανανεώνεται μια κύρια αποθεματική καλλιέργεια, συνιστάται το εργαστήριο δοκιμών να βεβαιώνεται για την απουσία μόλυνσης από μυκόπλασμα, να προσδιορίζει τον καρυότυπο των κυττάρων ή να χρωματίζει τα χρωμοσώματα που φέρουν τον γενετικό τόπο*TK* και να ελέγχει τους χρόνους διπλασιασμού των πληθυσμών. Η φυσιολογική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο δοκιμών θα πρέπει να καθορίζεται και να συμφωνεί με τα δημοσιευμένα χαρακτηριστικά των κυττάρων (16)(19)(37). Η κύρια αποθεματική καλλιέργεια θα πρέπει να φυλάσσεται σε θερμοκρασία -150° C ή χαμηλότερη και να χρησιμοποιείται για την παρασκευή όλων των κυτταρικών αποθεμάτων εργασίας.

16. Είτε πριν από τη δημιουργία μεγάλου αριθμού κρυοσυντηρούμενων αποθεμάτων εργασίας είτε ακριβώς πριν από τη χρήση σε πείραμα, η καλλιέργεια ενδέχεται να χρειάζεται να καθαριστεί από προϋπάρχοντα μεταλλαγμένα κύτταρα [εκτός εάν η συχνότητα προϊόντων μετάλλαξης (MF) του μάρτυρα με διαλύτη εμπίπτει ήδη εντός του αποδεκτού εύρους – βλ. πίνακα 2 για την MLA)]. Αυτό επιτυγχάνεται με χρήση μεθοτρεξάτης (αμινοπτερίνη) για την αρνητική επιλογή ενάντια στα κύτταρα με έλλειψη TK, και την προσθήκη θυμιδίνης, υποξανθίνης και γλυκίνης (L5178Y) ή 2'-δεοξυκυτιδίνης (TK6) στην καλλιέργεια προκειμένου να διασφαλίζεται η βέλτιστη ανάπτυξη των κυττάρων με λειτουργική TK (19)(38)(39), και (40) για την TK6. Γενικές συμβουλές σχετικά με την ορθή πρακτική για τη συντήρηση των κυτταροκαλλιεργειών καθώς και ειδικές συμβουλές για τα κύτταρα L5178Y και TK6 παρέχονται στις παραπομπές (19)(31)(37)(39)(41). Για τα εργαστήρια που χρειάζονται κύριες αποθεματικές κυτταροκαλλιέργειες για να ξεκινήσουν την MLA ή την TK6, και για την προμήθεια νέων κύριων αποθεματικών κυτταροκαλλιεργειών, διατίθεται αποθετήριο καλά χαρακτηρισμένων κυττάρων (37).

Θρεπτικά μέσα και συνθήκες καλλιέργειας

17. Για τη διατήρηση των καλλιεργειών στο πλαίσιο αμφότερων των δοκιμών θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλο θρεπτικό μέσο και κατάλληλες συνθήκες επώασης (δοχεία καλλιέργειας, ατμόσφαιρα με ύγρανση και 5 % CO_2, θερμοκρασία επώασης 37 °C). Οι κυτταρικές καλλιέργειες θα πρέπει πάντοτε να διατηρούνται υπό συνθήκες που διασφαλίζουν ότι αναπτύσσονται κατά τη λογαριθμική φάση. Παίζει σημαντικό ρόλο το θρεπτικό μέσο και οι συνθήκες καλλιέργειας να επιλέγονται έτσι ώστε να διασφαλίζεται η άριστη ανάπτυξη των κυττάρων κατά τη διάρκεια της περιόδου έκφρασης και η κλωνοποίηση μεταλλαγμένων και μη κυττάρων. Όσον αφορά τόσο την MLA όσο και την TK6, είναι εξίσου σημαντικό οι συνθήκες καλλιέργειας να διασφαλίζουν την άριστη ανάπτυξη τόσο των προϊόντων μετάλλαξης TK μεγάλων αποικιών/πρώιμης εμφάνισης όσο και των προϊόντων μετάλλαξης μικρών αποικιών/όψιμης εμφάνισης Περισσότερες λεπτομέρειες για τις καλλιέργειες, περιλαμβανομένης της ανάγκης κατάλληλης θερμικής αδρανοποίησης ορού αλόγου, σε περίπτωση που κατά την επιλογή προϊόντων μετάλλαξης χρησιμοποιείται το θρεπτικό μέσο RPMI, παρέχονται στις παραπομπές (19)(31)(38)(39)(40)(42).

Παρασκευή των καλλιεργειών

18. Τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται από αποθεματικές καλλιέργειες, εμβολιαζόμενα σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας σε πυκνότητα τέτοια ώστε οι εναιωρημένες καλλιέργειες να εξακολουθούν να αναπτύσσονται εκθετικά κατά τις περιόδους αγωγής και έκφρασης.

Μεταβολική ενεργοποίηση

19. Όταν χρησιμοποιούνται κύτταρα L5178Y και TK6, που έχουν ανεπαρκή ενδογενή μεταβολική ικανότητα, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται και εξωγενή συστήματα μεταβολισμού. Το συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο σύστημα, που συνιστάται εκτός αν ειδικοί λόγοι υπαγορεύουν διαφορετικά, είναι ένα μεταμιτοχονδριακό κλάσμα εμπλουτισμένο με συμπαράγοντα (S9), που παρασκευάζεται από ήπαρ τρωκτικών (κατά κανόνα επιμύων) και το οποίο έχει υποβληθεί σε κατεργασία με ενζυμοεπαγωγικούς παράγοντες όπως το Aroclor 1254 (43)(44)(45) ή ο συνδυασμός φαινοβαρβιτάλης και β-ναφθοφλαβόνης (46)(47)(48)(49)(50)(51). Ο συνδυασμός αυτός δεν αντιβαίνει στη σύμβαση της Στοκχόλμης για τους έμμονους οργανικούς ρύπους

▼M8

(52) και έχει αποδειχθεί εξίσου αποτελεσματικός με το Aroclor 1254 στην επαγωγή οξειδασώνμεικτής λειτουργίας (45)(46)(47)(48)(49). Το κλάσμα S9 χρησιμοποιείται συνήθως σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 1 έως 2 %, αλλά οι οποίες επιτρέπεται να αυξηθούν σε 10 % κ.ό. στο τελικό θρεπτικό μέσο της δοκιμής. Η επιλογή του τύπου και της συγκέντρωσης του χρησιμοποιούμενου εξωγενούς συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης ή μεταβολικού επαγωγέα μπορεί να επηρεαστεί από την κατηγορία των υπό δοκιμή χημικών ουσιών.

Σκευάσματα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας

20. Οι στερεές υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να διαλύονται σε κατάλληλους διαλύτες και να αραιώνονται, εφόσον χρειάζεται, πριν από την αγωγή των κυττάρων (βλ. παράγραφο 21). Οι υγρές υπό δοκιμή χημικές ουσίες επιτρέπεται να προστίθενται κατευθείαν στο σύστημα δοκιμής και/ή να αραιώνονται πριν από την αγωγή του συστήματος δοκιμής. Οι αέριες ή πτητικές υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να υποβάλλονται στη δοκιμή με κατάλληλες τροποποιήσεις των τυποποιημένων πρωτοκόλλων, π.χ. αγωγή σε σφραγισμένα δοχεία καλλιέργειας (53) (54) (55). Τα σκευάσματα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να ετοιμάζονται ακριβώς πριν από την αγωγή, εκτός αν τα στοιχεία σχετικά με τη σταθερότητα της ουσίας αποδεικνύουν ότι είναι αποδεκτή η φύλαξη.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Διαλύτες

21. Θα πρέπει να επιλέγεται διαλύτης που να προσφέρει τη μεγαλύτερη διαλυτότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, χωρίς να επηρεάζει δυσμενώς τη διεξαγωγή της δοκιμής, π.χ. μεταβάλλοντας την ανάπτυξη των κυττάρων, αλλοιώνοντας την υπό δοκιμή χημική ουσία, αντιδρώντας με τα δοχεία καλλιέργειας ή αποδυναμώνοντας το σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης. Συνιστάται να εξετάζεται πρώτα, στο μέτρο του δυνατού, αν μπορεί να χρησιμοποιηθεί υδατικός διαλύτης (ή θρεπτικό μέσο καλλιέργειας). Καθιερωμένοι διαλύτες είναι το νερό και το διμεθυλοσουλφοξείδιο. Η συγκέντρωση του διαλύτη στο τελικό θρεπτικό μέσο αγωγής δεν θα πρέπει να υπερβαίνει γενικά το 1 % κ.ό., προκειμένου για οργανικούς διαλύτες, ή το 10 % κ.ό. στην περίπτωση των υδατικών διαλυτών (αλατούχο διάλυμα ή νερό). Εάν χρησιμοποιούνται άλλοι πλην των καθιερωμένων διαλυτών (π.χ. αιθανόλη ή ακετόνη), η χρήση τους θα πρέπει να τεκμηριώνεται με στοιχεία που αποδεικνύουν τη συμβατότητά τους με τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες και με το σύστημα δοκιμής, καθώς και την απουσία γενετικής τοξικότητας στη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση. Εάν δεν υπάρχουν αυτά τα στοιχεία, είναι σημαντικό να προστίθενται μάρτυρες που δεν υποβάλλονται σε αγωγή (βλ. προσάρτημα 1, Ορισμοί) για να αποδεικνύεται ότι ο επιλεγμένος διαλύτης δεν επάγει επιβλαβείς ή μεταλλαξιγόνες επιδράσεις.

ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΕΠΙΛΟΓΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΑΓΩΓΗΣ

22. Κατά τον καθορισμό της υψηλότερης συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να αποφεύγονται οι συγκεντρώσεις που μπορούν να οδηγήσουν σε τεχνητά θετικές αποκρίσεις, όπως εκείνες που προκαλούν υπέρμετρη κυτταροτοξικότητα (βλ. παράγραφο 28), καθίζηση στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (βλ. παράγραφο 29) ή έντονες μεταβολές του pH ή της ωσμωμοριακότητας (βλ. παράγραφο 8). Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία προκαλεί έντονη μεταβολή του pH του θρεπτικού μέσου κατά την προσθήκη της, το pH μπορεί να ρυθμίζεται με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος στο τελικό θρεπτικό μέσο αγωγής, με σκοπό να αποφεύγονται τα τεχνητά θετικά αποτελέσματα και να διατηρούνται κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας.

23. Η επιλογή συγκεντρώσεων βασίζεται στην κυτταροτοξικότητα και άλλες παραμέτρους (βλ. παραγράφους 27-30). Μολονότι η αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας σε αρχική δοκιμή μπορεί να είναι χρήσιμη για τον ακριβέστερο καθορισμό των συγκεντρώσεων που θα χρησιμοποιηθούν στο κύριο πείραμα, δεν είναι υποχρεωτική η διεξαγωγή αρχικής δοκιμής. Ακόμη και εάν διενεργηθεί αρχική αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας, εξακολουθεί να απαιτείται η μέτρηση της κυτταροτοξικότητας για κάθε καλλιέργεια στο κύριο πείραμα. Σε περίπτωση διεξαγωγής πειράματος προσδιορισμού εύρους, αυτό θα πρέπει να καλύπτει ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων και μπορεί είτε να τερματίζεται την 1η ημέρα μετά την αγωγή είτε να συνεχίζεται για χρονικό διάστημα έκφρασης 2 ημερών έως την επιλογή των προϊόντων μετάλλαξης (εφόσον φαίνεται ότι οι χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις είναι οι κατάλληλες).

▼**M8**

24. Η κυτταροτοξικότητα θα πρέπει να προσδιορίζεται για κάθε επιμέρους καλλιέργεια δοκιμής και καλλιέργεια μάρτυρα: οι μέθοδοι για την MLA (2) και την TK6 (15) καθορίζονται βάσει της διεθνώς αποδεκτής πρακτικής.

25. Όσον αφορά τόσο την έκδοση με άγαρ όσο και την έκδοση μικροτιτλοδότησης της MLA: η κυτταροτοξικότητα θα πρέπει να αξιολογείται με χρήση της σχετικής συνολικής ανάπτυξης (RTG), η οποία ορίστηκε για πρώτη φορά από τους Clive και Spector το 1975 (2). Αυτό το μέτρο περιλαμβάνει τη σχετική ανάπτυξη εναιωρήματος (RSG: καλλιέργεια δοκιμής έναντι μάρτυρα με διαλύτη) κατά την αγωγή των κυττάρων, τον χρόνο έκφρασης και τη σχετική απόδοση κλωνοποίησης (RCE: καλλιέργεια δοκιμής έναντι μάρτυρα με διαλύτη) κατά τη χρονική στιγμή επιλογής των προϊόντων μετάλλαξης (2). Θα πρέπει να επισημανθεί ότι η RSG περιλαμβάνει τυχόν απώλεια κυττάρων στην καλλιέργεια δοκιμής στη διάρκεια της αγωγής (βλ. προσάρτημα 2 για τους τύπους).

26. Για την TK6: η κυτταροτοξικότητα θα πρέπει να αξιολογείται με χρήση της σχετικής επιβίωσης (RS), δηλαδή της απόδοσης κλωνοποίησης κυττάρων επιστρωμένων αμέσως μετά την αγωγή, προσαρμοσμένης ως προς τυχόν απώλεια κυττάρων κατά τη διάρκεια της αγωγής, βάσει του καταμετρούμενου αριθμού κυττάρων, σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα (στον οποίο έχει αποδοθεί επιβίωση 100 %) (βλ. προσάρτημα 2 για τον τύπο).

27. Θα πρέπει να αξιολογούνται τουλάχιστον τέσσερις συγκεντρώσεις δοκιμής (χωρίς τον διαλύτη και τους θετικούς μάρτυρες) που πληρούν τα κριτήρια αποδοχής (ενδεδειγμένη κυτταροτοξικότητα, αριθμός κυττάρων κ.λπ.). Αν και συνιστάται η χρήση διπλών καλλιεργειών, μπορούν να χρησιμοποιούνται σε κάθε συγκέντρωση δοκιμής είτε πολλαπλές πανομοιότυπες καλλιέργειες είτε μοναδικές καλλιέργειες. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις πανομοιότυπες καλλιέργειες σε δεδομένη συγκέντρωση θα πρέπει να αναφέρονται χωριστά αλλά μπορούν να συνενώνονται για την ανάλυση δεδομένων (55). Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες με ελάχιστη ή μηδενική κυτταροτοξικότητα, κατάλληλες είναι συνήθως οι συγκεντρώσεις που απέχουν μεταξύ τους κατά παράγοντα ίσο με 2 ή 3 περίπου. Σε περίπτωση κυτταροτοξικότητας, οι επιλεγόμενες συγκεντρώσεις θα πρέπει να καλύπτουν το φάσμα τιμών κυτταροτοξικότητας που κυμαίνεται από τη συγκέντρωση που προκαλεί την κυτταροτοξικότητα η οποία περιγράφεται στην παράγραφο 28 μέχρι τις συγκεντρώσεις στις οποίες παρατηρείται μέτρια και ελάχιστη ή μηδενική κυτταροτοξικότητα. Πολλές υπό δοκιμή χημικές ουσίες παρουσιάζουν καμπύλες συγκέντρωσης-απόκρισης με μεγάλη κλίση και, για να καλυφθεί το συνολικό φάσμα τιμών κυτταροτοξικότητας ή για να μελετηθεί λεπτομερώς η σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης, μπορεί να είναι αναγκαία η χρήση συγκεντρώσεων με μικρότερα διαστήματα μεταξύ τους και περισσότερων από τέσσερις συγκεντρώσεις, ιδίως σε περιπτώσεις όπου απαιτείται επανάληψη του πειράματος (βλ. παράγραφο 70). Η χρήση περισσότερων από 4 συγκεντρώσεις μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντική όταν χρησιμοποιούνται μονές καλλιέργειες.

28. Εάν η μέγιστη συγκέντρωση βασίζεται στην κυτταροτοξικότητα, η υψηλότερη συγκέντρωση θα πρέπει να αποσκοπεί στην επίτευξη μεταξύ 20 και 10 % RTG για την MLA, και μεταξύ 20 και 10 % RS για την TK6 (παράγραφος 67).

29. Για δυσδιάλυτες υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν είναι κυτταροτοξικές σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από τη συγκέντρωση μέγιστης διαλυτότητας, η αναλυόμενη μέγιστη συγκέντρωση θα πρέπει να επιφέρει θολερότητα ή ίζημα ορατό με γυμνό οφθαλμό ή με τη βοήθεια ανεστραμμένου μικροσκοπίου στο τέλος της αγωγής με την υπό δοκιμή χημική ουσία. Ακόμη και αν εμφανίζεται κυτταροτοξικότητα σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από τη συγκέντρωση μέγιστης διαλυτότητας, συνιστάται να διεξάγεται η δοκιμή σε μία μόνο συγκέντρωση που επιφέρει θολερότητα ή ορατό ίζημα, διότι μπορεί να προκύψουν τεχνητές επιδράσεις από το ίζημα. Λόγω του ότι στις MLA και TK6 χρησιμοποιούνται καλλιέργειες σε εναιώρημα, θα πρέπει να λαμβάνεται ιδιαίτερα μέριμνα ώστε να διασφαλίζεται ότι το ίζημα δεν παρεμποδίζει τη διεξαγωγή της δοκιμής. Ο προσδιορισμός της διαλυτότητας στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας πριν από το πείραμα μπορεί επίσης να είναι χρήσιμος.

▼M8

30. Εάν δεν παρατηρηθεί ίζημα ούτε περιοριστική κυτταροτοξικότητα, η ανώτατη συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να αντιστοιχεί στη μικρότερη από τις τιμές 10 mM, 2 mg/ml ή 2 μl/ml (57)(58). Όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν έχει καθορισμένη σύνθεση, π.χ. ουσία άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, προϊόντα πολύπλοκων αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά [δηλ. χημικές ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης (UVCB)], εκχυλίσματα από το περιβάλλον κ.λπ., η ανώτατη συγκέντρωση θα πρέπει ενδεχομένως να είναι υψηλότερη (π.χ. 5 mg/ml), ελλείψει επαρκούς κυτταροτοξικότητας, προκειμένου να αυξηθεί η συγκέντρωση του κάθε συστατικού. Επισημαίνεται, ωστόσο, ότι οι απαιτήσεις αυτές μπορεί να διαφέρουν για τα φαρμακευτικά προϊόντα για τον άνθρωπο (59).

Μάρτυρες

31. Για κάθε συνθήκη του πειράματος, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες (βλ. παράγραφο 21), αποτελούμενοι μόνο από τον διαλύτη στο θρεπτικό μέσο της αγωγής και υποβαλλόμενοι στην ίδια μεταχείριση όπως και οι καλλιέργειες.

32. Απαιτούνται παράλληλοι θετικοί μάρτυρες για να αποδεικνύεται αφενός η ικανότητα του εργαστηρίου να αναγνωρίζει τα μεταλλαξιγόνα υπό τις συνθήκες του χρησιμοποιούμενου πρωτοκόλλου δοκιμής και, αφετέρου, η αποτελεσματικότητα του εξωγενούς συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης (κατά περίπτωση), και να αποδεικνύεται η επαρκής ανίχνευση αμφότερων των προϊόντων μετάλλαξης *TK* μικρών αποικιών/όψιμης εμφάνισης και μεγάλων αποικιών/πρώιμης εμφάνισης. Παραδείγματα θετικών μαρτύρων παρέχονται κατωτέρω στον πίνακα 1. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικές θετικές ουσίες μάρτυρες, εφόσον η χρήση τους αιτιολογείται. Επειδή οι *in vitro* δοκιμές γενετικής τοξικότητας σε κύτταρα θηλαστικών είναι επαρκώς τυποποιημένες για βραχυχρόνιες αγωγές (3-4 ωρών) που πραγματοποιούνται ταυτόχρονα με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση με την ίδια διάρκεια αγωγής, η χρήση θετικών μαρτύρων μπορεί να περιορίζεται σε μια μεταλλαξιγόνο ουσία που απαιτεί μεταβολική ενεργοποίηση. Στην περίπτωση αυτή, αυτή η μοναδική απόκριση στον θετικό μάρτυρα θα καταδείξει τόσο τη δραστηριότητα του συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης όσο και την αποκρισιμότητα του συστήματος δοκιμής. Ωστόσο, σε περίπτωση μακροχρόνιας αγωγής (δηλ. 24 ωρών χωρίς S9) θα πρέπει να προβλέπεται χωριστός θετικός μάρτυρας, διότι η διάρκεια της αγωγής διαφέρει από αυτήν της δοκιμής με μεταβολική ενεργοποίηση. Κάθε θετικός μάρτυρας θα πρέπει να χρησιμοποιείται σε μία ή περισσότερες συγκεντρώσεις που αναμένεται να έχουν ως αποτέλεσμα αναπαραγώγιμη και ανιχνεύσιμη αύξηση σε σχέση με την τιμή υποβάθρου, για να καταδεικνύεται η ευαισθησία του συστήματος δοκιμής, και η απόκριση δεν θα πρέπει να διακυβεύεται εξαιτίας κυτταροτοξικότητας που υπερβαίνει τα όρια που προβλέπονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών (βλ. παράγραφο 28).

Πίνακας 1

Συνιστώμενες ουσίες αναφοράς για την αξιολόγηση της τεχνικής ικανότητας του εργαστηρίου και την επιλογή θετικών μαρτύρων

Κατηγορία	Ουσία	CASRN
1. Μεταλλαξιγόνα που δρουν χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση		
Μεθανοσουλφονικός μεθυλεστέρας		66-27-3
Μιτομυκίνη C		50-07-7
4-Νιτροκινολιν-Ν-οξείδιο		56-57-5
2. Μεταλλαξιγόνα που απαιτούν μεταβολική ενεργοποίηση		
Βενζο(α)πυρένιο		50-32-8
Κυκλοφωσφαμίδιο, μονοένυδρο		50-18-0 (6055-19-2)
7,12-Διμεθυλοβενζανθρακένιο		57-97-6
3-Μεθυλοχολανθρένιο		56-49-5

▼M8

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία

33. Πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα υποβάλλονται σε αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία με και χωρίς σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης. Η έκθεση θα πρέπει να διαρκεί για κατάλληλο χρονικό διάστημα (συνήθως 3 έως 4 ώρες αρκούν). Επισημαίνεται, ωστόσο, ότι οι απαιτήσεις αυτές μπορεί να διαφέρουν για τα φαρμακευτικά προϊόντα για τον άνθρωπο (59). Όσον αφορά την MLA, σε περιπτώσεις όπου η βραχυχρόνια αγωγή αποδίδει αρνητικά αποτελέσματα και υπάρχουν πληροφορίες που υποδεικνύουν την ανάγκη πιο μακροχρόνιας αγωγής [π.χ. ανάλογα νουκλεοσιδίων, δυσδιάλυτες χημικές ουσίες (5)(59)], θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο διεξαγωγής της δοκιμής με μεγαλύτερο χρονικό διάστημα αγωγής, δηλαδή 24 ώρες χωρίς S9.

34. Ο ελάχιστος αριθμός χρησιμοποιούμενων κυττάρων για κάθε καλλιέργεια δοκιμής (μάρτυρα και αγωγής) σε κάθε στάδιο της δοκιμής θα πρέπει να βασίζεται στην αυθόρμητη συχνότητα προϊόντων μετάλλαξης. Μια γενική υπόδειξη είναι η αγωγή και ανακαλλιέργεια επαρκών κυττάρων σε κάθε πειραματική καλλιέργεια ώστε να διατηρούνται τουλάχιστον 10, αλλά ιδανικά 100, αυθόρμητα προϊόντα μετάλλαξης σε όλες τις φάσεις της δοκιμής (αγωγή, φαινοτυπική έκφραση και επιλογή προϊόντων μετάλλαξης) (56).

35. Όσον αφορά την MLA, η συνιστώμενη αποδεκτή συχνότητα αυθόρμητων προϊόντων μετάλλαξης κυμαίνεται μεταξύ 35-140 × 10^{-6} (έκδοση με άγαρ) και 50-170 × 10^{-6} (έκδοση μικροτιτλοδότησης) (βλ. πίνακα 2). Για να διατηρούνται τουλάχιστον 10, και ιδανικά 100, αυθόρμητα προϊόντα μετάλλαξης που επιβιώνουν της αγωγής για κάθε καλλιέργεια δοκιμής, πρέπει να υποβάλλονται σε αγωγή τουλάχιστον 6 × 10^{6} κύτταρα. Με αγωγή αυτού του αριθμού κυττάρων και τη διατήρηση επαρκών κυττάρων κατά την έκφραση και την κλωνοποίηση για επιλογή προϊόντων μετάλλαξης, εξασφαλίζεται επαρκής αριθμός προϊόντων μετάλλαξης (10 ή περισσότερα) σε όλες τις φάσεις του πειράματος, ακόμη και για τις καλλιέργειες που υποβάλλονται σε αγωγή σε συγκεντρώσεις που επάγουν 90 % κυτταροτοξικότητα (όπως μετριέται βάσει RTG 10 %) (19)(38)(39).

36. Στην TK6, η συχνότητα αυθόρμητων προϊόντων μετάλλαξης κυμαίνεται κατά κανόνα μεταξύ 2 και 10 × 10^{-6}. Για να επιβιώνουν τουλάχιστον 10 αυθόρμητα προϊόντα μετάλλαξης σε κάθε καλλιέργεια, πρέπει να υποβάλλονται σε αγωγή τουλάχιστον 20 × 10^{6} κύτταρα. Με αγωγή αυτού του αριθμού κυττάρων εξασφαλίζεται επαρκής αριθμός αυθόρμητων προϊόντων μετάλλαξης (10 ή περισσότερα), ακόμη και για καλλιέργειες που υποβάλλονται σε αγωγή σε συγκεντρώσεις που επάγουν 90 % κυτταροτοξικότητα (10 % RS). Επιπλέον, επαρκής αριθμός κυττάρων πρέπει να καλλιεργείται κατά το χρονικό διάστημα έκφρασης και να επιστρώνεται για επιλογή προϊόντων μετάλλαξης (60).

Χρόνος φαινοτυπικής έκφρασης και μέτρηση της συχνότητας προϊόντων μετάλλαξης

37. Στο τέλος της περιόδου αγωγής, τα κύτταρα καλλιεργούνται για καθορισμένο χρονικό διάστημα ώστε να επιτυγχάνεται σχεδόν βέλτιστη φαινοτυπική έκφραση των πρόσφατα προκληθέντων προϊόντων μετάλλαξης για καθεμία κυτταρική σειρά χωριστά. Στην MLA, το χρονικό διάστημα φαινοτυπικής έκφρασης είναι 2 ημέρες. Στην TK6, το χρονικό διάστημα φαινοτυπικής έκφρασης είναι 3-4 ημέρες. Εάν χρησιμοποιείται αγωγή διάρκειας 24 ωρών, το χρονικό διάστημα έκφρασης ξεκινά μετά το πέρας της αγωγής.

38. Στη διάρκεια του χρονικού διαστήματος φαινοτυπικής έκφρασης, τα κύτταρα καταμετρώνται καθημερινά. Στην MLA, οι καθημερινές καταμετρήσεις κυττάρων χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της ημερήσιας ανάπτυξης του εναιωρήματος (SG). Μετά την περίοδο έκφρασης διάρκειας 2 ημερών, τα κύτταρα εναιωρούνται σε θρεπτικό μέσο με και χωρίς παράγοντα επιλογής με σκοπό τον προσδιορισμό των αριθμών των προϊόντων μετάλλαξης (τρυβλία επιλογής) και της απόδοσης της κλωνοποίησης (τρυβλία βιωσιμότητας) αντίστοιχα. Όσον αφορά την MLA, υπάρχουν δύο εξίσου αποδεκτές μέθοδοι κλωνοποίησης επιλογής προϊόντων μετάλλαξης· μία στην οποία χρησιμοποιείται άγαρ και μία άλλη στην οποία χρησιμοποιείται υγρό θρεπτικό μέσο σε τρυβλία 96 κοιλοτήτων (19) (38) (39). Η κλωνοποίηση στην TK6 διεξάγεται με χρήση υγρού μέσου και τρυβλίων 96 κοιλοτήτων (16).

▼M8

39. Η τριφθοροθυμιδίνη (TFT) είναι ο μόνος συνιστώμενος παράγοντας επιλογής για τα προϊόντα μετάλλαξης *TK* (61).

40. Στην MLA, τα τρυβλία με άγαρ και τα τρυβλία μικροτιτλοδότησης καταμετρώνται μετά από επώαση διάρκειας 10-12 ημερών. Στην TK6, οι αποικίες των τρυβλίων μικροτιτλοδότησης βαθμολογούνται μετά από 10-14 ημέρες για τα πρώιμα εμφανιζόμενα προϊόντα μετάλλαξης. Για τη μέτρηση των βραδέως αναπτυσσόμενων (όψιμα εμφανιζόμενων) προϊόντων μετάλλαξης TK6 χρειάζεται εκ νέου τροφοδότηση των κυττάρων με θρεπτικό μέσο και TFT, μετά την καταμέτρηση των πρώιμα εμφανιζόμενων προϊόντων μετάλλαξης, και, στη συνέχεια, επώαση των τρυβλίων για επιπλέον χρονικό διάστημα 7-10 ημερών (62). Για την εξέταση του ζητήματος της καταμέτρησης των βραδέως και των φυσιολογικώς αναπτυσσόμενων προϊόντων μετάλλαξης *TK*, ανατρέξτε στις παραγράφους 42 και 44.

41. Οι κατάλληλοι υπολογισμοί για τις δύο δοκιμές, περιλαμβανομένων των δύο μεθόδων (με άγαρ και μικροτιτλοδότηση) για την MLA, περιλαμβάνονται στο προσάρτημα 2. Στη μέθοδο με άγαρ της MLA, καταμετρώνται οι αποικίες και ο αριθμός των αποικιών με προϊόντα μετάλλαξης προσαρμόζεται βάσει της απόδοσης κλωνοποίησης προκειμένου να υπολογιστεί η συχνότητα προϊόντων μετάλλαξης (MF). Στην έκδοση μικροτιτλοδότησης της MLA και την TK6, η απόδοση κλωνοποίησης προσδιορίζεται και για τα τρυβλία επιλογής και για τα τρυβλία απόδοσης κλωνοποίησης, σύμφωνα με την κατανομή Poisson (63). Η MF υπολογίζεται με βάση τις εν λόγω δύο αποδόσεις κλωνοποίησης.

Χαρακτηρισμός αποικιών προϊόντων μετάλλαξης

42. Στην MLA, εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι θετική (βλ. παραγράφους 62-63), θα πρέπει να πραγματοποιείται χαρακτηρισμός των αποικιών βάσει του μεγέθους ή της ανάπτυξής τους για τουλάχιστον μία από τις καλλιέργειες δοκιμής (κατά κανόνα στην υψηλότερη αποδεκτή θετική συγκέντρωση) και για τους αρνητικούς και τους θετικούς μάρτυρες. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι αρνητική (βλ. παράγραφο 64), θα πρέπει να πραγματοποιείται χαρακτηρισμός των αποικιών προϊόντων μετάλλαξης για τους αρνητικούς και τους θετικούς μάρτυρες. Στη μέθοδο μικροτιτλοδότησης της MLA, τα προϊόντα μετάλλαξης μικρών αποικιών ορίζονται ως εκείνα που καλύπτουν λιγότερο από το 25 % της διαμέτρου της κοιλότητας, και τα προϊόντα μετάλλαξης μεγάλων αποικιών ως εκείνα που καλύπτουν περισσότερο από το 25 % της διαμέτρου της κοιλότητας. Στη μέθοδο με άγαρ χρησιμοποιείται αυτόματος μετρητής αποικιών για την καταμέτρηση των αποικιών προϊόντων μετάλλαξης και την εκτίμηση του μεγέθους τους. Οι προσεγγίσεις αναφορικά με την εκτίμηση του μεγέθους των αποικιών περιγράφονται αναλυτικά στη βιβλιογραφία (19)(38)(40). Ο χαρακτηρισμός των αποικιών του αρνητικού και του θετικού μάρτυρα είναι απαραίτητος προκειμένου να αποδεικνύεται η ορθή διεξαγωγή των μελετών.

43. Η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν μπορεί να χαρακτηριστεί αρνητική εάν δεν ανιχνευτούν ικανοποιητικά προϊόντα μετάλλαξης μεγάλων και μικρών αποικιών στον θετικό μάρτυρα. Ο χαρακτηρισμός των αποικιών μπορεί να χρησιμοποιείται για την παροχή γενικών πληροφοριών αναφορικά με την ικανότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας να επάγει σημειακές μεταλλάξεις και/ή χρωμοσωμικά συμβάντα (παράγραφος 4).

44. TK6: Τα φυσιολογικώς αναπτυσσόμενα και τα βραδέως αναπτυσσόμενα προϊόντα μετάλλαξης διαφοροποιούνται βάσει του διαφορετικού χρόνου επώασης (βλ. παράγραφο 40). Στην TK6, γενικά, τόσο τα πρώιμα εμφανιζόμενα όσο και τα όψιμα εμφανιζόμενα προϊόντα μετάλλαξης βαθμολογούνται για όλες τις καλλιέργειες, περιλαμβανομένων των αρνητικών και των θετικών μαρτύρων. Ο χαρακτηρισμός των αποικιών του αρνητικού και του θετικού μάρτυρα είναι απαραίτητος προκειμένου να αποδεικνύεται η ορθή διεξαγωγή των μελετών. Η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν μπορεί να χαρακτηριστεί αρνητική εάν δεν ανιχνευτούν ικανοποιητικά πρώιμα εμφανιζόμενα και όψιμα εμφανιζόμενα προϊόντα μετάλλαξης στον θετικό μάρτυρα. Ο χαρακτηρισμός των αποικιών μπορεί να χρησιμοποιείται για την παροχή γενικών πληροφοριών αναφορικά με την ικανότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας να επάγει σημειακές μεταλλάξεις και/ή χρωμοσωμικά συμβάντα (παράγραφος 4).

▼M8

Τεχνική ικανότητα του εργαστηρίου

45. Για να αποδείξει ότι διαθέτει επαρκή εμπειρία στη διεξαγωγή της δοκιμής πριν την εντάξει στην τρέχουσα πρακτική του, το εργαστήριο θα πρέπει να έχει πραγματοποιήσει σειρά πειραμάτων με θετικές χημικές ουσίες αναφοράς που δρουν μέσω διαφόρων μηχανισμών (τουλάχιστον μία που δρα με και μία που δρα χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση, επιλεγμένες μεταξύ των χημικών ουσιών που απαριθμούνται στον πίνακα 1) και διάφορους αρνητικούς μάρτυρες (περιλαμβανομένων καλλιεργειών χωρίς αγωγή και διαφόρων διαλυτών/φορέων). Οι αποκρίσεις των εν λόγω θετικών και αρνητικών μαρτύρων θα πρέπει να συμφωνούν με τη βιβλιογραφία. Αυτό δεν ισχύει για τα εργαστήρια που έχουν πείρα, δηλ. διαθέτουν βάση ιστορικών δεδομένων, όπως ορίζεται στις παραγράφους 47-50. Στην MLA, οι τιμές που λαμβάνονται για τους θετικούς και τους αρνητικούς μάρτυρες θα πρέπει να συμφωνούν με τις συστάσεις IWGT (βλ. πίνακα 2).

46. Θα πρέπει να διερευνάται ένα σύνολο επιλεγμένων ουσιών που χρησιμοποιούνται ως θετικοί μάρτυρες (βλ. πίνακα 1) με βραχυχρόνιες και μακροχρόνιες αγωγές (εάν χρησιμοποιούνται μακροχρόνιες αγωγές) απουσία μεταβολικής ενεργοποίησης, καθώς επίσης και με βραχυχρόνια αγωγή παρουσία μεταβολικής ενεργοποίησης, προκειμένου να καταδεικνύεται η τεχνική ικανότητα ανίχνευσης μεταλλαξιγόνων χημικών ουσιών, να διαπιστώνεται η αποτελεσματικότητα του συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης και να καταδεικνύεται η καταλληλότητα των συνθηκών ανάπτυξης κυττάρων στη διάρκεια της αγωγής, της φαινοτυπικής έκφρασης και της επιλογής προϊόντων μετάλλαξης και των διαδικασιών καταμέτρησης. Θα πρέπει να επιλέγεται ένα φάσμα συγκεντρώσεων των επιλεγμένων χημικών ουσιών που να επιφέρουν αναπαραγώγιμες και σχετιζόμενες με τη συγκέντρωση αυξήσεις σε σχέση με τις τιμές υποβάθρου, για να αποδεικνύονται η ευαισθησία και το δυναμικό εύρος του συστήματος δοκιμής.

Ιστορικά δεδομένα για μάρτυρες

47. Το εργαστήριο θα πρέπει να καθορίζει:

— εύρος και κατανομή ιστορικών δεδομένων για θετικούς μάρτυρες,

— εύρος και κατανομή ιστορικών δεδομένων για αρνητικούς μάρτυρες (χωρίς αγωγή, με διαλύτη).

48. Κατά την αρχική συγκέντρωση δεδομένων για ιστορική κατανομή όσον αφορά τους αρνητικούς μάρτυρες, οι παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες θα πρέπει να συμφωνούν με τα δημοσιευμένα δεδομένα για αρνητικούς μάρτυρες. Καθώς θα προστίθενται περισσότερα πειραματικά δεδομένα στην κατανομή των μαρτύρων, οι παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες θα πρέπει, στην ιδανική περίπτωση, να βρίσκονται εντός των ορίων ελέγχου 95 % της εν λόγω κατανομής (64)(65).

49. Η βάση ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για αρνητικούς μάρτυρες θα πρέπει αρχικά να δημιουργείται με δεδομένα από τουλάχιστον 10 πειράματα, αν και είναι προτιμότερο να αποτελείται από τουλάχιστον 20 πειράματα που έχουν εκτελεστεί σε συγκρίσιμες πειραματικές συνθήκες. Τα εργαστήρια θα πρέπει να χρησιμοποιούν μεθόδους ποιοτικού ελέγχου, όπως διαγράμματα ελέγχου [π.χ. διαγράμματα C ή X-bar (65)], για να προσδιορίζουν τη μεταβλητότητα των δεδομένων τους που αφορούν τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες και να αποδεικνύουν ότι έχουν τη μεθοδολογία υπό έλεγχο (66). Περαιτέρω λεπτομέρειες και συστάσεις σχετικά με τον τρόπο δημιουργίας και χρήσης των ιστορικών δεδομένων διατίθενται στη βιβλιογραφία (64).

50. Τα δεδομένα για αρνητικούς μάρτυρες θα πρέπει να αποτελούνται από τις συχνότητες προϊόντων μετάλλαξης από μονές καλλιέργειες ή, κατά προτίμηση, από πανομοιότυπες καλλιέργειες, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 27. Οι παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες θα πρέπει, στην ιδανική περίπτωση, να βρίσκονται εντός των ορίων ελέγχου 95 % της κατανομής της βάσης ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για αρνητικούς μάρτυρες. Όταν τα δεδομένα για αρνητικούς μάρτυρες δεν βρίσκονται εντός του ορίου ελέγχου 95 %, μπορεί να είναι αποδεκτή η προσθήκη τους στην ιστορική κατανομή μαρτύρων εφόσον τα εν λόγω δεδομένα δεν είναι ακραίες έκτοπες τιμές και υπάρχουν στοιχεία που αποδεικνύουν ότι το σύστημα δοκιμής είναι υπό έλεγχο (βλ. παράγραφο 49) και ότι δεν πρόκειται για τεχνικό ή ανθρώπινο σφάλμα.

▼M8

51. Κάθε αλλαγή του πειραματικού πρωτοκόλλου θα πρέπει να εξετάζεται υπό το πρίσμα της συμφωνίας των δεδομένων με τις υφιστάμενες βάσεις ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για μάρτυρες. Τυχόν σημαντικές ανακολουθίες θα πρέπει να έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία νέας βάσης ιστορικών δεδομένων για μάρτυρες.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Παρουσίαση των αποτελεσμάτων

52. Στην παρουσίαση των δεδομένων για αμφότερες τις MLA και TK6 θα πρέπει να περιλαμβάνονται, και για τις καλλιέργειες που υποβλήθηκαν σε αγωγή και για τις καλλιέργειες μαρτύρων, τα δεδομένα που απαιτούνται για τον υπολογισμό της κυτταροτοξικότητας (RTG ή RS αντίστοιχα) και τις συχνότητες προϊόντων μετάλλαξης, όπως περιγράφεται κατωτέρω.

53. Για την MLA, θα πρέπει να παρέχονται για κάθε καλλιέργεια δεδομένα για την RSG, την RTG, την απόδοση κλωνοποίησης κατά τη χρονική στιγμή της επιλογής προϊόντων μετάλλαξης και τον αριθμό των αποικιών προϊόντων μετάλλαξης (για την έκδοση με άγαρ) ή τον αριθμό των κενών κοιλοτήτων (για την έκδοση μικροτιτλοδότησης). Η συχνότητα προϊόντων μετάλλαξης (MF) θα πρέπει να εκφράζεται ως ο αριθμός των μεταλλαγμένων κυττάρων ανά εκατομμύριο κυττάρων που επιβιώνουν. Εάν η απόκριση είναι θετική, θα πρέπει να παρέχονται οι MF (και/ή το ποσοστό της συνολικής MF) των μικρών και των μεγάλων αποικιών για τουλάχιστον μία συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (κατά κανόνα η υψηλότερη θετική συγκέντρωση) και για τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες. Σε περίπτωση αρνητικής απόκρισης, θα πρέπει να παρέχεται η MF των μικρών και των μεγάλων αποικιών για τον αρνητικό και τον θετικό μάρτυρα.

54. Για την TK6, θα πρέπει να παρέχονται για κάθε καλλιέργεια δεδομένα για την RS, την απόδοση κλωνοποίησης κατά τη χρονική στιγμή επιλογής των προϊόντων μετάλλαξης και τον αριθμό των κενών κοιλοτήτων για τα πρώιμα εμφανιζόμενα και τα όψιμα εμφανιζόμενα προϊόντα μετάλλαξης. Η MF θα πρέπει να εκφράζεται ως ο αριθμός μεταλλαγμένων κυττάρων ανά πλήθος κυττάρων που επιβιώνουν, ενώ θα πρέπει να περιλαμβάνεται η συνολική MF καθώς και η MF (και/ή το ποσοστό της συνολικής MF) των πρώιμα εμφανιζόμενων και των όψιμα εμφανιζόμενων προϊόντων μετάλλαξης.

Κριτήρια αποδοχής

55. Για αμφότερες τις MLA και TK6, πριν από την εξαγωγή τελικών αποτελεσμάτων για συγκεκριμένη υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια:

— να έχουν εφαρμοστεί δύο πειραματικές συνθήκες (βραχυχρόνια αγωγή με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση - βλ. παράγραφο 33), εκτός εάν από τη μία προκύψουν θετικά αποτελέσματα,

— να υπάρχει η δυνατότητα ανάλυσης επαρκούς αριθμού κυττάρων και συγκεντρώσεων (βλ. παραγράφους 27, 34-36),

— τα κριτήρια επιλογής της ανώτατης συγκέντρωσης είναι σύμφωνα με αυτά που περιγράφονται στις παραγράφους 28-30.

Κριτήρια αποδοχής για τους αρνητικούς και τους θετικούς μάρτυρες

56. Η ανάλυση που διεξήγαγε η ομάδα εργασίας εμπειρογνωμόνων MLA της IWGT σε μεγάλο πλήθος δεδομένων MLA οδήγησε σε διαμόρφωση συναίνεσης σε διεθνές επίπεδο όσον αφορά τα συγκεκριμένα κριτήρια αποδοχής για την MLA (1)(2)(3)(4)(5). Ως εκ τούτου, η παρούσα μέθοδος δοκιμών περιλαμβάνει συγκεκριμένες συστάσεις για τον προσδιορισμό της δυνατότητας αποδοχής των αρνητικών και των θετικών μαρτύρων, και για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων για κάθε επιμέρους ουσία στην MLA. Η βάση δεδομένων για την TK6 είναι πολύ μικρότερη και δεν έχει αξιολογηθεί από ομάδα εργασίας.

▼**M8**

57. Για την MLA, κάθε πείραμα θα πρέπει να αξιολογείται ως προς το κατά πόσον ο μάρτυρας χωρίς αγωγή / μάρτυρας με διαλύτη πληροί τα κριτήρια αποδοχής της ομάδας εργασίας MLA της IWGT [(4) και πίνακας 2 παρακάτω] σε σχέση με τις ακόλουθες παραμέτρους: 1) την MF (επισημαίνεται ότι οι αποδεκτές βάσει της IWGT συχνότητες προϊόντων μετάλλαξης είναι διαφορετικές για την έκδοση με άγαρ και την έκδοση μικροτιτλοδότησης της MLA), 2) την απόδοση κλωνοποίησης (CE) κατά τη χρονική στιγμή επιλογής των προϊόντων μετάλλαξης, και 3) την ανάπτυξη εναιωρήματος (SG) για τον μάρτυρα με διαλύτη (βλ. προσάρτημα 2 για τους τύπους).

Πίνακας 2

Κριτήρια αποδοχής για την MLA

Παράμετρος	Μέθοδος μαλακού άγαρ	Μέθοδος μικροτιτλοδότησης
Συχνότητα προϊόντων μετάλλαξης	$35 – 140 \times 10^{-6}$	$50 – 170 \times 10^{-6}$
Απόδοση κλωνοποίησης	65 – 120 %	65 – 120 %
Ανάπτυξη εναιωρήματος	πολλαπλάσια κατά 8 – 32 φορές (αγωγή 3-4 ωρών) πολλαπλάσια κατά 32 – 180 φορές (αγωγή 24 ωρών, εφόσον διεξαχθεί)	πολλαπλάσια κατά 8 – 32 φορές (αγωγή 3-4 ωρών) πολλαπλάσια κατά 32 – 180 φορές (αγωγή 24 ωρών, εφόσον διεξαχθεί)

58. Για την MLA, κάθε δοκιμή θα πρέπει επίσης να αξιολογείται ως προς το κατά πόσον ο θετικός μάρτυρας/-ες πληροί τουλάχιστον ένα από τα ακόλουθα δύο κριτήρια αποδοχής που ανέπτυξε η ομάδα εργασίας της IWGT:

— ο θετικός μάρτυρας θα πρέπει να παρουσιάζει απόλυτη αύξηση της συνολικής συχνότητας προϊόντων μετάλλαξης (MF), ήτοι αύξηση που υπερβαίνει την αυθόρμητη MF υποβάθρου [επαγόμενη MF (IMF)] τουλάχιστον 300×10^{-6}. Τουλάχιστον το 40 % της IMF θα πρέπει να αποτυπώνεται στην MF των μικρών αποικιών,

— ο θετικός μάρτυρας παρουσιάζει αύξηση στην MF μικρών αποικιών κατά τουλάχιστον 150×10^{-6} πάνω από την αύξηση που παρατηρείται στον παράλληλο μάρτυρα χωρίς αγωγή / μάρτυρα με διαλύτη (IMF μικρών αποικιών 150×10^{-6}).

59. Για την TK6, μια δοκιμή είναι αποδεκτή εάν θεωρείται αποδεκτή η προσθήκη του παράλληλου αρνητικού μάρτυρα στη βάση δεδομένων του εργαστηρίου για ιστορικούς αρνητικούς μάρτυρες, όπως περιγράφεται στις παραγράφους 48-49. Επιπλέον, οι παράλληλοι θετικοί μάρτυρες (βλ. παράγραφο 32) θα πρέπει να επάγουν αποκρίσεις συμβατές με εκείνες που έχουν καταχωριστεί στη βάση ιστορικών δεδομένων για θετικούς μάρτυρες και να επιφέρουν στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα.

60. Σε αμφότερες τις δοκιμές, το ανώτατο όριο κυτταροτοξικότητας που παρατηρείται στην καλλιέργεια που χρησιμεύει ως θετικός μάρτυρας θα πρέπει να είναι το ίδιο με αυτό των πειραματικών καλλιεργειών. Δηλαδή η RTG/RS δεν θα πρέπει να είναι μικρότερη από το 10 %. Για να αποδειχθεί ότι πληρούνται τα κριτήρια για τον θετικό μάρτυρα, αρκεί η χρήση μιας μονής καλλιέργειας (ή μιας από τις συγκεντρώσεις των καλλιεργειών θετικού μάρτυρα, εάν χρησιμοποιούνται περισσότερες από μία συγκεντρώσεις). Επιπλέον, η MF του θετικού μάρτυρα θα πρέπει να περιλαμβάνεται εντός του αποδεκτού εύρους τιμών που έχει καθοριστεί για το εργαστήριο.

Αξιολόγηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

61. Για την MLA, σημαντικό έργο σχετικά με τη βιολογική σημασία και τα κριτήρια για μια θετική απόκριση έχει πραγματοποιήσει η ομάδα εργασίας εμπειρογνωμόνων λεμφώματος ποντικού της IWGT (4). Ως εκ τούτου, η παρούσα μέθοδος δοκιμών περιλαμβάνει συγκεκριμένες συστάσεις για την

▼M8

ερμηνεία των αποτελεσμάτων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που προκύπτουν από την MLA (βλ. παραγράφους 62-64). Η βάση δεδομένων για την TK6 είναι πολύ μικρότερη και δεν έχει αξιολογηθεί από ομάδα εργασίας. Συνεπώς, οι παρεχόμενες συστάσεις για την ερμηνεία των δεδομένων για την TK6 είναι γενικότερου χαρακτήρα (βλ. παραγράφους 65-66). Για τις δύο δοκιμές ισχύουν πρόσθετες απαιτήσεις (βλ. παραγράφους 67-71).

MLA

62. Για τη διασφάλιση της βιολογικής σημασίας της αυξημένης MF, συνιστάται η υιοθέτηση μιας προσέγγισης στην οποία ορίζονται οι θετικές και οι αρνητικές αποκρίσεις. Αντί της στατιστικής ανάλυσης που χρησιμοποιείται συνήθως για άλλες δοκιμές, αυτή η προσέγγιση βασίζεται στη χρήση προκαθορισμένης επαγόμενης συχνότητας προϊόντων μετάλλαξης (δηλ. αύξηση της MF πάνω από τον παράλληλο μάρτυρα), η οποία καλείται Global Evaluation Factor (καθολικός παράγοντας αξιολόγησης - GEF) και η οποία βασίζεται στην ανάλυση της κατανομής των δεδομένων MF αρνητικού μάρτυρα από συμμετέχοντα εργαστήρια (4). Για την έκδοση με άγαρ της MLA ο GEF είναι 90×10^{-6}, ενώ για την έκδοση μικροτιτλοδότησης της MLA ο GEF είναι 126×10^{-6}.

63. Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούται το σύνολο των κριτηρίων αποδοχής, μια υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται σαφώς θετική εάν, σε οποιαδήποτε από τις πειραματικές συνθήκες που εξετάστηκαν (βλ. παράγραφο 33), η αύξηση της MF πάνω από το παράλληλο υπόβαθρο υπερβαίνει τον GEF και η αύξηση συνδέεται με τη συγκέντρωση (π.χ. με χρήση ελέγχου τάσης). Θεωρείται τότε ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι ικανή να επάγει μεταλλάξεις σε αυτό το σύστημα δοκιμής.

64. Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούται το σύνολο των κριτηρίων αποδοχής, μια υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται σαφώς αρνητική εάν, σε οποιαδήποτε από τις πειραματικές συνθήκες που εξετάστηκαν (βλ. παράγραφο 33), δεν προκύπτει απόκριση που να συνδέεται με τη συγκέντρωση ή, εάν υπάρχει αύξηση της MF, αυτή δεν υπερβαίνει τον GEF. Θεωρείται τότε ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν είναι ικανή να επάγει μεταλλάξεις σε αυτό το σύστημα δοκιμής.

TK6

65. Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται σαφώς θετική εάν, σε οποιαδήποτε από τις πειραματικές συνθήκες που εξετάστηκαν (βλ. παράγραφο 33):

— τουλάχιστον σε μία από τις συγκεντρώσεις δοκιμής εμφανίζεται στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα

— η αύξηση σχετίζεται με τη συγκέντρωση, όταν αξιολογείται με κατάλληλο έλεγχο τάσης (βλ. παράγραφο 33)

— κάποιο από τα αποτελέσματα βρίσκεται εκτός της κατανομής των ιστορικών δεδομένων για αρνητικούς μάρτυρες (π.χ. όριο ελέγχου σε επίπεδο 95 % με βάση την κατανομή Poisson· βλ. παράγραφο 48).

Όταν πληρούνται όλα αυτά τα κριτήρια, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται ικανή να επάγει μεταλλάξεις σε αυτό το σύστημα δοκιμής. Συστάσεις για τις πλέον κατάλληλες στατιστικές μεθόδους έχουν διατυπωθεί στη βιβλιογραφία (66)(67).

66. Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται σαφώς αρνητική εάν, σε όλες τις πειραματικές συνθήκες που εξετάστηκαν (βλ. παράγραφο 33):

— σε καμία από τις συγκεντρώσεις δοκιμής δεν εμφανίζεται στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα

— δεν παρατηρείται σχετιζόμενη με τη συγκέντρωση αύξηση, όταν αξιολογείται με κατάλληλο έλεγχο τάσης

▼**M8**

— όλα τα αποτελέσματα βρίσκονται εντός της κατανομής των ιστορικών δεδομένων για αρνητικούς μάρτυρες (π.χ. όριο ελέγχου σε επίπεδο 95 % με βάση την κατανομή Poisson· βλ. παράγραφο 48).

Θεωρείται τότε ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν είναι ικανή να επάγει μεταλλάξεις σε αυτό το σύστημα δοκιμής.

Για αμφότερες τις δοκιμές MLA και TK6:

67. Εάν η μέγιστη συγκέντρωση βασίζεται στην κυτταροτοξικότητα, θα πρέπει να επιδιώκεται η επίτευξη ανώτατης συγκέντρωσης μεταξύ 20 και 10 % RTG/RS. Είναι κοινά αποδεκτό ότι τα θετικά αποτελέσματα που βρίσκονται μόνο μεταξύ 20 και 10 % RTG/RS θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή, καθώς και ότι ένα αποτέλεσμα δεν θα θεωρείται θετικό σε περίπτωση που παρατηρήθηκε αύξηση της MF μόνο στο 10 % ή σε μικρότερο ποσοστό RTG/RS (εφόσον αξιολογήθηκε) (2)(59).

68. Υπάρχουν ορισμένες καταστάσεις στις οποίες η συλλογή πρόσθετων πληροφοριών ενδέχεται να συμβάλει στο να χαρακτηριστεί μια υπό δοκιμή χημική ουσία μη μεταλλαξιγόνος, όταν δεν υπάρχει καλλιέργεια που να παρουσιάζει τιμή RTG μεταξύ 10-20 % RTG/RS. Οι καταστάσεις αυτές περιγράφονται συνοπτικά ακολούθως: 1) δεν υπάρχουν ενδείξεις μεταλλαξιγένεσης (π.χ. δεν υπάρχει απόκριση δόσης, ούτε συχνότητες προϊόντων μετάλλαξης που να υπερβαίνουν εκείνες που παρατηρούνται στον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα ή στα ιστορικά εύρη υποβάθρου κ.λπ.) σε σειρά σημείων δεδομένων εντός της κλίμακας 100 % έως 20 % RTG/RS, και υπάρχει τουλάχιστον ένα σημείο δεδομένων εντός της κλίμακας 20 και 25 % RTG/RS, 2) δεν υπάρχουν ενδείξεις μεταλλαξιγένεσης (π.χ. δεν υπάρχει απόκριση δόσης, ούτε συχνότητες προϊόντων μετάλλαξης που να υπερβαίνουν όσες παρατηρούνται στον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα ή στα ιστορικά εύρη υποβάθρου κ.λπ.) σε σειρά σημείων δεδομένων εντός της κλίμακας 100 % έως 25 % RTG/RS, και υπάρχει επίσης ένα αρνητικό σημείο δεδομένων ελαφρώς κάτω του 10 % RTG/RS. Και στις δύο αυτές καταστάσεις, η υπό δοκιμή χημική ουσία μπορεί να θεωρηθεί οριστικά αρνητική.

69. Δεν απαιτείται επαλήθευση των σαφώς θετικών ή αρνητικών αποκρίσεων.

70. Όταν η απόκριση δεν είναι ούτε σαφώς αρνητική ούτε σαφώς θετική, όπως περιγράφεται ανωτέρω, και/ή για να διαπιστωθεί η βιολογική σημασία ενός αποτελέσματος, τα δεδομένα θα πρέπει να αξιολογούνται με βάση την κρίση των ειδικών και/ή περαιτέρω διερεύνηση. Η επανάληψη του πειράματος, ενδεχομένως με χρήση διαφορετικών πειραματικών συνθηκών [π.χ. διαστήματα μεταξύ των συγκεντρώσεων για την αύξηση της πιθανότητας επίτευξης σημείων δεδομένων εντός της κλίμακας 10-20 % RTG/RS, χρήση άλλων συνθηκών μεταβολικής ενεργοποίησης (δηλ. συγκέντρωση S9 ή προέλευση S9) και διάρκεια αγωγής] μπορεί να είναι χρήσιμη.

71. Σε σπάνιες περιπτώσεις, ακόμη και μετά από περαιτέρω διερεύνηση, το σύνολο δεδομένων δεν επιτρέπει να συναχθούν θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα. Κατά συνέπεια, η απόκριση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να κρίνεται αμφίβολη (να ερμηνεύεται ως εξίσου δυνάμενη να είναι είτε θετική είτε αρνητική).

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

72. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

— πηγή, αριθμός παρτίδας, καταληκτική ημερομηνία χρήσης, εφόσον υπάρχει,

— σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εάν είναι γνωστή,

— διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον διαλύτη, εάν είναι γνωστές,

▼**M8**

— μέτρηση του pH, της ωσμωμοριακότητας και του ιζήματος του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας στο οποίο προστέθηκε η υπό δοκιμή χημική ουσία, κατά περίπτωση.

Μονοσυστατική ουσία:

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμίξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγματα:

— περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Διαλύτης:

— αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη,

— εκατοστιαία αναλογία του διαλύτη στο τελικό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας.

Κύτταρα:

Για κύριες εργαστηριακές καλλιέργειες:

— τύπος και προέλευση των κυττάρων, και ιστορικό στο εργαστήριο δοκιμών,

— χαρακτηριστικά καρυότυπου και/ή χαρακτηριστικός αριθμός χρωμοσωμάτων,

— μέθοδοι διατήρησης των κυτταροκαλλιεργειών,

— απουσία μυκοπλάσματος,

— χρόνοι διπλασιασμού των κυττάρων.

Συνθήκες δοκιμής:

— αιτιολόγηση της επιλογής των συγκεντρώσεων και του αριθμού των κυτταρικών καλλιεργειών, περιλαμβανομένων π.χ. των δεδομένων κυτταροτοξικότητας και των περιορισμών διαλυτότητας,

— σύνθεση των θρεπτικών μέσων, συγκέντρωση CO_2, επίπεδο υγρασίας,

— συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εκφραζόμενη ως τελική συγκέντρωση στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (π.χ. μg ή mg/mL ή mM θρεπτικού μέσου καλλιέργειας),

— συγκέντρωση (και/ή όγκος) του διαλύτη και της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που προστέθηκαν στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας,

— θερμοκρασία επώασης,

— χρόνος επώασης,

— διάρκεια της αγωγής,

— πυκνότητα των κυττάρων κατά την αγωγή,

▼**M8**

— τύπος και σύσταση του συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης (προέλευση του S9, μέθοδος παρασκευής του μείγματος S9, συγκέντρωση ή όγκος του μείγματος S9 και του S9 στο τελικό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, ποιοτικοί έλεγχοι του S9),

— χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες, τελικές συγκεντρώσεις για κάθε συνθήκη αγωγής,

— διάρκεια της περιόδου έκφρασης (συμπεριλαμβανομένου του αριθμού των ανακαλλιεργηθέντων κυττάρων και των χρονοδιαγραμμάτων ανακαλλιέργειας και τροφοδοσίας, κατά περίπτωση),

— ταυτότητα του παράγοντα επιλογής και συγκέντρωσή του,

— για την MLA, θα πρέπει να αναφέρεται η χρησιμοποιηθείσα έκδοση (άγαρ ή μικροτιτλοδότηση),

— κριτήρια αποδοχής των δοκιμών,

— μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την καταγραφή του αριθμού των βιώσιμων και των μεταλλαγμένων κυττάρων,

— μέθοδοι μέτρησης της κυτταροτοξικότητας,

— τυχόν συμπληρωματικές πληροφορίες που αφορούν την κυτταροτοξικότητα και τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε,

— διάρκεια των χρόνων επώασης μετά την επίστρωση,

— ορισμός των αποικιών σχετικά με το μέγεθος και τον τύπο τους (συμπεριλαμβανομένων των κριτηρίων κατάταξης σε «μικρές» και «μεγάλες» αποικίες, όπου απαιτείται),

— κριτήρια χαρακτηρισμού των μελετών ως θετικών, αρνητικών ή αμφίβολων,

— μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό του pH, της ωσμωμοριακότητας, εφόσον προσδιορίζεται, και της καθίζησης, εάν χρειάζεται.

Αποτελέσματα:

— αριθμός κυττάρων που υποβλήθηκαν σε αγωγή και αριθμός κυττάρων ανακαλλιέργειας για κάθε καλλιέργεια,

— παράμετροι τοξικότητας (RTG για την MLA και RS για την TK6),

— σημεία καθίζησης και χρόνος προσδιορισμού,

— αριθμός κυττάρων που επιστρώθηκαν σε επιλεκτικό και μη επιλεκτικό μέσο,

— αριθμός αποικιών σε μη επιλεκτικό μέσο και αριθμός ανθεκτικών αποικιών σε επιλεκτικό μέσο, και αντίστοιχες συχνότητες προϊόντων μετάλλαξης,

— μέγεθος αποικιών για τους αρνητικούς και τους θετικούς μάρτυρες και, εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι θετική, τουλάχιστον μία συγκέντρωση, και σχετικές συχνότητες προϊόντων μετάλλαξης,

— σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης, όπου είναι δυνατόν,

— δεδομένα για παράλληλους αρνητικούς μάρτυρες (με διαλύτη) και θετικούς μάρτυρες (συγκεντρώσεις και διαλύτες),

— δεδομένα για τους ιστορικούς αρνητικούς (με διαλύτη) και θετικούς μάρτυρες (συγκεντρώσεις και διαλύτες), με εύρη τιμών, μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις· αριθμός δοκιμών στις οποίες βασίζονται οι ιστορικοί μάρτυρες,

▼**M8**

— στατιστικές αναλύσεις (για μεμονωμένες καλλιέργειες και συγκεντρωτικές πανομοιότυπες καλλιέργειες, ανάλογα με την περίπτωση), και τιμές p, εάν υπάρχουν· και για την MLA, η αξιολόγηση GEF.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

Συμπέρασμα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Moore, M.M., Honma, M. Clements, J. (Rapporteur), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, Environ. Mol. Mutagen., 35 (3): 185-190.

(2) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (April 2000), Environ. Mol. Mutagen., 40 (4): 292-299.

(3) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, Mutation Res., 540: 127-140.

(4) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, Environ. Mol. Mutagen., 47 (1): 1-5.

(5) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur A.K. and Van Goethem, F. (2007). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment, Mutation. Res., 627 (1): 36-40.

(6) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.

(7) Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. and O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. Mutation, Res., 746 (1): 21-28.

(8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. Mutation Res., 493 (1-2): 101-114.

▼**M8**

(9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. and Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol*. Sci.., 109 (1): 96-105.

(10) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc. National. Academy. Sci. USA, 87 (1): 51-55.

(11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. and Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/$TK^{+/-}$ Leads to $TK^{-/-}$ Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, Mutation Res., 84 (1): 169-181.

(12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. and Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y $TK^{-/-}$ Mutants Early in their Clonal History, Mutation Res., 147 (5): 237-242.

(13) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151 (1): 161-174.

(14) Liber H.L., Call K.M. and Little J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. Mutation Res., 178 (1): 143-153.

(15) Li C.Y., Yandell D.W. and Little J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. Somat. Cell Mol. Genet., 18 (1): 77-87.

(16) Honma M., Hayashi M. and Sofuni T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. Mutation. Res., 374 (1): 89-98.

(17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. Mol. Carcinogen., 28 (4): 203-14.

(18) Amundson S.A. and Liber H.L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. Mutation Res., 267 (1): 89-95.

(19) Schisler M.R., Moore M.M. and Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C) Forward Mutation Assay. In Protocols in Genotoxicity Assessment A. Dhawan and M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press: 27-50.

(20) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. and Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634 (1-2): 177-183.

(21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. and Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutagen., 49 (6): 439-452.

(22) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. Environ. Mutagen., 8 (6): 879-886.

(23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268 (2): 297-305.

▼**M8**

(24) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr, Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257: 147-204.

(25) Wang J., Heflich R.H. and Moore M.M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. Mutation Res., 626 (1-2): 185-190.

(26) Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. Ann. N.Y. Academy Sci., 76: 673-680.

(27) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/– Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutation Res., 59(1): 61-108.

(28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. and Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 147 (5): 243-253.

(29) Sawyer J.R., Moore M.M. and Hozier J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 214 (2): 181-193.

(30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. and Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Environ. Mol. Mutagen., 47 (2): 127-131.

(31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. and Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, Environ. Mol. Mutagen., 55 (1): 35-42.

(32) Storer, R.D., Jraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. and DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y $TK^{+/-}$ Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. Mutation. Res., 373 (2): 157-165.

(33) Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. and Moore, M.M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. Mutagen., 19 (4): 263-268.

(34) Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. and Thilly, W.G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. Biochem. Biophys. Res. Commun., 84 (2): 411-416.

(35) Honma M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 45 (2-3): 162-176.

(36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. and Liber, H.L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. Cancer. Res., 55 (1): 12-15.

▼**M8**

(37) Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, A. Sutter, D.J. Kirkland (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Χειρόγραφο υπό επεξεργασία).

(38) Lloyd M. and Kidd D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ed. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35-54.

(39) Mei N., Guo X. and Moore M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. Στο: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan Z and Caldwell(Eds) , 2nd Edition, GW· Humana Press, Totowa, NJ.

(40) Liber H.L. and Thilly W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts. Mutation Res., 94 (2): 467-485.

(41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, OW., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. and Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. ATLA, 33 (3): 261-287.

(42) Moore M.M. and Howard B.E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, Mutation Res., 104 (4-5): 287-294.

(43) Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31 (6): 347-364.

(44) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113 (3-4): 173-215.

(45) Natarajan, A.T., Tates, A.D, Van Buul, P.P.W., Meijers, M. and De Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37 (1): 83-90.

(46) Matsuoka A., Hayashi M. and Ishidate M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. Mutation Res., 66 (3): 277-290.

(47) Ong T.M., *et al.* (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. *Pathol*. *Toxicol*., 4 (1): 55-65

(48) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen., 7 (3): 175-177.

(49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. Στο: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres F.J., *et al.* (Eds, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

▼**M8**

(50) Galloway S.M., *et al.* (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. Mutation Res., 312 (3): 241-261.

(51) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28 (1): 51-59.

(52) UNEP (2001). Σύμβαση της Στοκχόλμης για τους έμμονους οργανικούς ρύπους, Πρόγραμμα των Ηνωμένων Εθνών για το Περιβάλλον (UNEP).

(53) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. Στο: Genotoxic Effects of Airborne Agents Tice R.R., Costa D.L.and Schaich K.M. (Eds.). New York, Plenum, pp. 91-103.

(54) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen., 5 (6): 795-801.

(55) Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. and Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. Mutation Res., 652 (2): 122-130.

(56) Arlett C.F., *et al.* (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. Στο: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), CambridgeUniversity Press, pp. 66-101.

(57) Morita T., Honma M. and Morikawa K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. Mutation Res., 741 (1-2): 32-56.

(58) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. Environ. Mol. Mutagen., 54 (1): 36-43.

(59) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: [https://www.federalregister.gov/a/2012-13774].

(60) Honma M. and Hayashi M. (2011). Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 52 (5): 373-384.

(61) Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. and Johnson, K.O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient ($TK^{-/-}$) Mutants from L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells, Mutation Res., 85 (5): 363-378.

(62) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. Mutation Res., 216 (1): 9-17.

(63) Furth E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. and Rand, W.M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. Anal. Biochem., 110 (1): 1-8.

(64) Hayashi, M, Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation Res., 723 (2): 87-90.

▼**M8**

(65) Ryan T.P. (2000). Statistical Methods for Quality Improvement. John Wiley and Sons, New York 2nd Edition.

(66) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 199.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(67) Fleiss J.L., Levin B. and Paik M.C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

▼**M8**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ανευπλοειδογόνος ουσία: κάθε χημική ουσία ή διεργασία που προκαλεί ανευπλοειδία σε κύτταρα ή οργανισμούς, μέσω της αντίδρασής της με τα συστατικά του κυτταρικού κύκλου μιτωτικής και μειωτικής διαίρεσης.

Ανευπλοειδία: κάθε απόκλιση από τον φυσιολογικό διπλοειδή (ή απλοειδή) αριθμό χρωμοσωμάτων κατά ένα ή περισσότερα χρωμοσώματα, όχι όμως κατά πλήρεις σειρές χρωμοσωμάτων (πολυπλοειδία).

Μεταλλαξιγόνα υποκατάστασης ζευγών βάσεων: χημικές ουσίες που προκαλούν υποκατάσταση ζευγών βάσεων στο DNA.

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Απόδοση κλωνοποίησης: το ποσοστό των κυττάρων που επιστρώνονται σε χαμηλή πυκνότητα και μπορούν να αναπτυχθούν σε καταμετρήσιμη αποικία.

Κλαστογόνο: κάθε χημική ουσία ή διεργασία που προκαλεί δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές σε πληθυσμούς κυττάρων ή οργανισμούς.

Κυτταροτοξικότητα: για τις δοκιμασίες που καλύπτονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, η κυτταροτοξικότητα ορίζεται ως μείωση της σχετικής συνολικής ανάπτυξης (RTG) ή της σχετικής επιβίωσης (RS) για τις δοκιμές MLA και TK6 αντίστοιχα.

Εξελικτική μετάλλαξη: γονιδιακή μετάλλαξη από τον γονικό τύπο προς το προϊόν μετάλλαξης, που προκαλεί τροποποίηση ή απώλεια της ενζυμικής δραστηριότητας ή της λειτουργίας της κωδικοποιούμενης πρωτεΐνης.

Μεταλλαξιγόνα μετατόπισης αναγνωστικού πλαισίου: χημικές ουσίες που προκαλούν προσθήκη ή απάλειψη ενός ή πολλών ζευγών βάσεων στο μόριο DNA.

Γονιδιοτοξικός: γενικός όρος που καλύπτει όλα τα είδη βλαβών του DNA ή των χρωμοσωμάτων, μεταξύ των οποίων τις ρήξεις, τις προσθήκες, τις αναδιατάξεις, τις μεταλλάξεις, τις χρωμοσωμικές εκτροπές και την ανευπλοειδία. Δεν προκαλούν όλα τα είδη γονιδιοτοξικών επιδράσεων μεταλλάξεις ή μόνιμη χρωμοσωμική βλάβη.

Μιτωτικός ανασυνδυασμός: στη διάρκεια της μίτωσης, ο ανασυνδυασμός μεταξύ ομόλογων χρωματίδων που μπορεί να οδηγήσει σε επαγωγή δίκλωνων ρήξεων του DNA ή απώλεια ετεροζυγωτικότητας.

Μεταλλαξιγόνο: παράγοντας που προκαλεί κληρονομήσιμη μεταβολή μίας ή περισσότερων αλληλουχιών ζευγών βάσεων του DNA σε γονίδια ή της δομής των χρωμοσωμάτων (χρωμοσωμικές εκτροπές).

Συχνότητα προϊόντων μετάλλαξης (mutant frequency, MF): ο αριθμός των παρατηρουμένων μεταλλαγμένων κυττάρων διά του αριθμού βιώσιμων κυττάρων.

Χρόνος φαινοτυπικής έκφρασης: περίοδος μετά την αγωγή κατά την οποία η γενετική αλλοίωση εγκαθίσταται στο γονιδίωμα και τυχόν προϋπάρχοντα γονιδιακά προϊόντα μειώνονται σε βαθμό τέτοιο ώστε να αλλοιώνεται το φαινοτυπικό χαρακτηριστικό.

Σχετική επιβίωση (relative survival, RS): η RS χρησιμοποιείται ως το μέτρο της σχετιζόμενης με την αγωγή κυτταροτοξικότητας στην TK6. Είναι η σχετική απόδοση κλωνοποίησης (CE) των κυττάρων που επιστρώνονται αμέσως μετά την αγωγή, διορθωμένη ως προς τυχόν απώλεια κυττάρων κατά την αγωγή, σε σύγκριση με την απόδοση κλωνοποίησης του αρνητικού μάρτυρα.

▼M8

Σχετική ανάπτυξη εναιωρήματος (relative suspension growth, RSG): στην MLA, η σχετική συνολική ανάπτυξη εναιωρήματος δύο ημερών της καλλιέργειας δοκιμής σε σύγκριση με τη συνολική ανάπτυξη εναιωρήματος δύο ημερών του αρνητικού μάρτυρα/μάρτυρα με διαλύτη (Clive and Spector, 1975). Η RSG θα πρέπει να περιλαμβάνει τη σχετική ανάπτυξη της καλλιέργειας δοκιμής σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα/μάρτυρα με διαλύτη κατά τη διάρκεια της περιόδου αγωγής.

Σχετική συνολική ανάπτυξη (relative total growth, RTG): η RTG χρησιμοποιείται ως το μέτρο της σχετιζόμενης με την αγωγή κυτταροτοξικότητας στην MLA. Αποτελεί μέτρο της σχετικής (ως προς τον μάρτυρα με φορέα) ανάπτυξης των καλλιεργειών δοκιμής κατά τη φάση της αγωγής, της έκφρασης δύο ημερών και της επιλογής προϊόντων μετάλλαξης της δοκιμής. Η RSG κάθε καλλιέργειας δοκιμής πολλαπλασιάζεται με τη σχετική απόδοση κλωνοποίησης της καλλιέργειας δοκιμής κατά τη χρονική στιγμή της επιλογής προϊόντων μετάλλαξης και εκφράζεται σε σχέση με την απόδοση κλωνοποίησης του αρνητικού μάρτυρα/μάρτυρα με διαλύτη (Clive and Spector, 1975).

Ηπατικά κλάσματα S9: υπερκείμενο υγρό ομογενοποιήματος ήπατος μετά από φυγοκέντρηση σε 9 000 g, δηλ. ανεπεξέργαστο εκχύλισμα ήπατος.

Μείγμα S9: μείγμα του ηπατικού κλάσματος S9 με συμπαράγοντες αναγκαίους για τη δράση των μεταβολικών ενζύμων.

Ανάπτυξη εναιωρήματος (suspension growth, SG): ο συντελεστής αύξησης του αριθμού των κυττάρων στη διάρκεια των φάσεων αγωγής και έκφρασης της MLA. Η SG υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας τον συντελεστή αύξησης την ημέρα 1 επί τον συντελεστή αύξησης την ημέρα 2 για τη βραχυχρόνια αγωγή (3 ή 4 ωρών). Σε περίπτωση που εφαρμόζεται αγωγή 24 ωρών, η SG είναι ο συντελεστής αύξησης στη διάρκεια της αγωγής 24 ωρών επί τους συντελεστές αύξησης τις ημέρες έκφρασης 1 και 2.

Μάρτυρας με διαλύτη: γενικός όρος για τον προσδιορισμό των καλλιεργειών-μαρτύρων που λαμβάνουν μόνο τον διαλύτη ο οποίος χρησιμοποιείται για τη διάλυση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Μάρτυρες που δεν υποβάλλονται σε αγωγή: καλλιέργειες που δεν υφίστανται καμία αγωγή (δηλ. ούτε με την υπό δοκιμή χημική ουσία ούτε με διαλύτη), αλλά ετοιμάζονται με τον ίδιο τρόπο με τις καλλιέργειες που λαμβάνουν την υπό δοκιμή χημική ουσία.

▼M8

Προσάρτημα 2

ΤΥΠΟΙ

Κυτταροτοξικότητα

Για αμφότερες τις εκδόσεις (άγαρ και μικροτιτλοδότησης) της MLA

Η κυτταροτοξικότητα ορίζεται ως η σχετική συνολική ανάπτυξη (RTG) που περιλαμβάνει τη σχετική ανάπτυξη εναιωρήματος (RSG) κατά τη διάρκεια της περιόδου έκφρασης διάρκειας δύο ημερών και τη σχετική απόδοση κλωνοποίησης (RCE) που μετράται κατά τη χρονική στιγμή της επιλογής των προϊόντων μετάλλαξης. Οι RTG, RSG και RCE εκφράζονται όλες ως ποσοστά.

Υπολογισμός της RSG: Η ανάπτυξη εναιωρήματος 1 (SG_1) είναι ο ρυθμός ανάπτυξης μεταξύ της ημέρας 0 και της ημέρας 1 (συγκέντρωση κυττάρων την ημέρα 1 / συγκέντρωση κυττάρων την ημέρα 0) και η ανάπτυξη εναιωρήματος 2 (SG_2) είναι ο ρυθμός ανάπτυξης μεταξύ της ημέρας 1 και της ημέρας 2 (συγκέντρωση κυττάρων την ημέρα 2 / συγκέντρωση κυττάρων την ημέρα 1). Η RSG είναι η συνολική SG (SG_1 x SG_2) για την υποβληθείσα σε αγωγή καλλιέργεια σε σύγκριση με τον μάρτυρα χωρίς αγωγή / μάρτυρα με διαλύτη. Δηλαδή: RSG = $[SG_{1(\text{δοκιμή})}$ x $SG_{2(\text{δοκιμή})}]$ / $[SG_{1(\text{μάρτυρας})}$ x $SG_{2(\text{μάρτυρας})}]$ Η SG_1 θα πρέπει να υπολογίζεται από την αρχική συγκέντρωση κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε στην αρχή της αγωγής των κυττάρων. Κατ' αυτόν τον τρόπο αποτυπώνεται τυχόν διαφορετική κυτταροτοξικότητα που εμφανίζεται στην ή στις καλλιέργειες δοκιμής κατά τη διάρκεια της αγωγής των κυττάρων.

Η RCE είναι η σχετική απόδοση κλωνοποίησης της καλλιέργειας δοκιμής σε σύγκριση με τη σχετική απόδοση κλωνοποίησης του μάρτυρα χωρίς αγωγή / μάρτυρα με διαλύτη που μετράται κατά τη χρονική στιγμή της επιλογής προϊόντων μετάλλαξης.

Σχετική συνολική ανάπτυξη (RTG): RTG = RSG x RCE

TK6

Σχετική επιβίωση (RS):

Η κυτταροτοξικότητα αξιολογείται βάσει της σχετικής επιβίωσης, δηλαδή της απόδοσης κλωνοποίησης (CE) κυττάρων επιστρωμένων αμέσως μετά την αγωγή, προσαρμοσμένη ως προς τυχόν απώλεια κυττάρων κατά τη διάρκεια της αγωγής, σε σύγκριση με την απόδοση κλωνοποίησης στους αρνητικούς μάρτυρες (στους οποίους έχει αποδοθεί επιβίωση 100 %). Η προσαρμογή ως προς την απώλεια κυττάρων κατά την αγωγή μπορεί να υπολογιστεί ως εξής:

$$\text{προσαρμοσμένη CE} = \text{CE} \times \frac{\textit{αριθμός κυττάρων στο τέλος της αγωγής}}{\textit{αριθμός κυττάρων στην αρχή της αγωγής}}$$

Η RS για καλλιέργεια που υποβάλλεται σε αγωγή υπολογίζεται ως εξής:

$$RS = \frac{\textit{προσαρμοσμένη CE στην καλλιέργεια αγωγής}}{\textit{προσαρμοσμένη CE στον μάρτυρα με διαλύτη}} \times 100$$

Συχνότητα προϊόντων μετάλλαξης για αμφότερες τις δοκιμές MLA και TK6

Η συχνότητα προϊόντων μετάλλαξης (MF) είναι η απόδοση κλωνοποίησης μεταλλαγμένων αποικιών σε επιλεκτικό μέσο (CE_M), προσαρμοσμένη ως προς την απόδοση κλωνοποίησης σε μη επιλεκτικό μέσο κατά τη χρονική στιγμή της επιλογής προϊόντων μετάλλαξης (CE_V). Δηλαδή $MF=CE_M/CE_V$. Ο υπολογισμός αυτών των δύο τιμών απόδοσης κλωνοποίησης περιγράφεται παρακάτω για τις μεθόδους κλωνοποίησης με άγαρ και μικροτιτλοδότηση.

▼**M8**

Έκδοση MLA με άγαρ*:* Στην έκδοση της MLA με μαλακό άγαρ, ο αριθμός των αποικιών στο τρυβλίο επιλογής προϊόντων μετάλλαξης (C_M) και ο αριθμός αποικιών στο μη επιλεκτικό τρυβλίο ή τρυβλίο απόδοσης κλωνοποίησης (καταμέτρηση βιώσιμων κυττάρων) (C_V) υπολογίζονται μέσω απευθείας καταμέτρησης των κλώνων. Όταν επιστρώνονται 600 κύτταρα για την απόδοση κλωνοποίησης (CE) για τα τρυβλία επιλογής προϊόντων μετάλλαξης (CE_M) και τα μη επιλεκτικά τρυβλία ή τρυβλία απόδοσης κλωνοποίησης (καταμέτρηση βιώσιμων κυττάρων) (CE_V) και 3 x 10^6 κύτταρα χρησιμοποιούνται για επιλογή προϊόντων μετάλλαξης,

$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$

$CE_V = C_V / 600$

Έκδοση μικροτιτλοδότησης MLA και TK6: Στην έκδοση μικροτιτλοδότησης της MLA, οι C_M και C_V προσδιορίζονται ως το γινόμενο του συνολικού αριθμού κοιλοτήτων (TW) επί του πιθανού αριθμού αποικιών ανά κοιλότητα (P) στα τρυβλία μικροτιτλοδότησης.

$C_M = P_M \times TW_M$

$CV = P_V \times TW_V$

Από τον μηδενικό όρο της κατανομής Poisson (Furth et al., 1981), το P προκύπτει από τον τύπο

$P = - \ln (EW / TW)$

όπου EW είναι οι κενές κοιλότητες και TW είναι οι συνολικές κοιλότητες. Ως εκ τούτου:

$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$

$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$

Στην έκδοση μικροτιτλοδότησης της MLA, οι συχνότητες προϊόντων μετάλλαξης μικρών και μεγάλων αποικιών υπολογίζονται με πανομοιότυπο τρόπο, με χρήση του σχετικού αριθμού κενών κοιλοτήτων για τις μικρές και τις μεγάλες αποικίες.

Στην TK6, οι συχνότητες προϊόντων μετάλλαξης μικρών και μεγάλων αποικιών βασίζονται στα πρώιμα εμφανιζόμενα και τα όψιμα εμφανιζόμενα προϊόντα μετάλλαξης.

▼M8

B.68 **IN VITRO ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ΒΡΑΧΥΧΡΟΝΙΑΣ ΕΚΘΕΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ i) ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ ΣΟΒΑΡΗ ΟΦΘΑΛΜΙΚΗ ΒΛΑΒΗ ΚΑΙ ii) ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΔΕΝ ΕΠΙΒΑΛΛΕΤΑΙ ΝΑ ΤΑΞΙΝΟΜΗΘΟΥΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΟΦΘΑΛΜΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΟ Η ΤΗ ΣΟΒΑΡΗ ΟΦΘΑΛΜΙΚΗ ΒΛΑΒΗ**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 491 του ΟΟΣΑ (2017). Η μέθοδος βραχυχρόνιας έκθεσης (STE) είναι *in vitro* μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιείται σε ορισμένες περιστάσεις και με συγκεκριμένους περιορισμούς για την ταξινόμηση και την επισήμανση της επικινδυνότητας των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη, καθώς και εκείνων που δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν ως ουσίες που προκαλούν είτε σοβαρή οφθαλμική βλάβη είτε οφθαλμικό ερεθισμό, όπως ορίζονται στο Παγκόσμια Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Ουσιών (GHS) των Ηνωμένων Εθνών (1) και στον κανονισμό (ΕΕ) 1272/2008 για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων (CLP) της Ευρωπαϊκής Ένωσης ([1]).

2. Εδώ και πολλά χρόνια, το δυναμικό επικινδυνότητας των χημικών προϊόντων για τους οφθαλμούς αξιολογείται με χρήση κυρίως μιας *in vivo* οφθαλμικής δοκιμής σε κουνέλια [μέθοδος δοκιμών B.5 (8), ισοδύναμη με την TG 405 του ΟΟΣΑ]. Είναι γενικά αποδεκτό ότι, στο εγγύς μέλλον, καμία μεμονωμένη εναλλακτική δοκιμή *in vitro* δεν θα μπορέσει να αντικαταστήσει πλήρως την *in vivo* οφθαλμική δοκιμή σε κουνέλια από την άποψη της πρόβλεψης του πλήρους φάσματος αποκρίσεων σοβαρής οφθαλμικής βλάβης / οφθαλμικού ερεθισμού για τις διάφορες χημικές κατηγορίες. Εντούτοις, στοχευμένοι συνδυασμοί εναλλακτικών μεθόδων δοκιμών στο πλαίσιο (κλιμακωτής) στρατηγικής δοκιμών θα μπορούσαν κάλλιστα να αντικαταστήσουν πλήρως την οφθαλμική δοκιμή σε κουνέλια (2). Η καθοδική προσέγγιση έχει σχεδιαστεί για τη διεξαγωγή δοκιμών χημικών ουσιών για τις οποίες μπορεί να αναμένεται, με βάση τις υπάρχουσες πληροφορίες, ότι παρουσιάζουν υψηλό δυναμικό ερεθιστικότητας ή προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη. Αντιθέτως, η ανοδική προσέγγιση έχει σχεδιαστεί για τη διεξαγωγή δοκιμών χημικών ουσιών για τις οποίες μπορεί να αναμένεται, με βάση τις υπάρχουσες πληροφορίες, ότι δεν προκαλούν οφθαλμικό ερεθισμό σε βαθμό που να απαιτείται η ταξινόμησή τους. Παρότι η μέθοδος δοκιμών STE δεν θεωρείται ότι αντικαθιστά πλήρως την *in vivo* οφθαλμική δοκιμή σε κουνέλια, εντούτοις είναι κατάλληλη για χρήση στο πλαίσιο κλιμακωτής στρατηγικής δοκιμών για λόγους κανονιστικής ταξινόμησης και επισήμανσης, όπως η καθοδική/ανοδική προσέγγιση, για τον προσδιορισμό, χωρίς περαιτέρω δοκιμές, i) των χημικών ουσιών που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη (κατηγορία 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP) και ii) των χημικών ουσιών (με εξαίρεση τις ουσίες υψηλής πτητικότητας και όλες τις στερεές χημικές ουσίες, εκτός των επιφανειοδραστικών) που δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν ως ουσίες που προκαλούν οφθαλμικό ερεθισμό ή σοβαρή οφθαλμική βλάβη (καμία κατηγορία κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP) (1)(2). Ωστόσο, για την οριστική ταξινόμηση μιας χημικής ουσίας για την οποία η μέθοδος δοκιμών STE δεν προβλέπει ότι προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη (κατηγορία 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP) ούτε την κατατάσσει σε κατηγορία GHS του ΟΗΕ / κανονισμού CLP (δεν προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη ούτε οφθαλμικό ερεθισμό) θα χρειαστούν συμπληρωματικές δοκιμές. Επιπλέον, θα πρέπει να ζητείται η γνώμη των αρμόδιων ρυθμιστικών αρχών πριν από τη χρήση της μεθόδου STE στο πλαίσιο ανοδικής προσέγγισης βάσει συστημάτων ταξινόμησης εκτός από το GHS του ΟΗΕ / τον κανονισμό CLP. Η επιλογή της καταλληλότερης μεθόδου δοκιμών και η χρήση αυτής είναι ζητήματα που θα πρέπει να εξετάζονται στο πλαίσιο των πληροφοριών που παρέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης «Ολοκληρωμένη προσέγγιση για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση για τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη και τον οφθαλμικό ερεθισμό» του ΟΟΣΑ (14).

3. Σκοπός της παρούσας μεθόδου δοκιμών είναι η περιγραφή των διαδικασιών που εφαρμόζονται για την αξιολόγηση του δυναμικού οφθαλμικής επικινδυνότητας που ενέχει η υπό δοκιμή ουσία, με βάση την ικανότητά της να

([1]) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων, την τροποποίηση και την κατάργηση των οδηγιών 67/548/ΕΟΚ και 1999/45/ΕΚ και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006, ΕΕ L 353 της 31.12.2008, σ. 1.

▼M8

προκαλεί κυτταροτοξικότητα στο πλαίσιο της μεθόδου δοκιμών βραχυχρόνιας έκθεσης. Η κυτταροτοξική επίδραση των χημικών ουσιών στα επιθηλιακά κύτταρα του κερατοειδούς αποτελεί σημαντικό τρόπο δράσης που οδηγεί στην πρόκληση βλάβης στο επιθήλιο του κερατοειδούς και οφθαλμικό ερεθισμό. Η κυτταρική βιωσιμότητα στη μέθοδο δοκιμών STE αξιολογείται διά του ποσοτικού προσδιορισμού, μετά την εκχύλισή του από τα κύτταρα, του κυανού άλατος φορμαζάνης που παράγεται από τα ζώντα κύτταρα μέσω ενζυμικής μετατροπής της χρωστικής ζωτικής χρώσης MTT (βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο), γνωστής και ως βρωμιούχο τετραζόλιο-κυανό του θειαζολυλίου (3). Η επιτευχθείσα κυτταρική βιωσιμότητα συγκρίνεται με τον μάρτυρα με διαλύτη (σχετική βιωσιμότητα) και χρησιμοποιείται για να εκτιμηθεί η δυνητική οφθαλμική επικινδυνότητα που ενέχει η υπό δοκιμή χημική ουσία. Μια υπό δοκιμή χημική ουσία ταξινομείται ως κατηγορίας 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP όταν αμφότερες οι συγκεντρώσεις 5 % και 0,05 % δίνουν κυτταρική βιωσιμότητα μικρότερη ή ίση με (≤) 70 %. Αντιθέτως, μια χημική ουσία προβλέπεται ότι αποτελεί ουσία καμίας κατηγορίας κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP όταν αμφότερες οι συγκεντρώσεις 5 % και 0,05 % δίνουν κυτταρική βιωσιμότητα υψηλότερη από (>) 70 %.

4. Ο όρος «υπό δοκιμή χημική ουσία» χρησιμοποιείται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών για να δηλώσει την ύλη που υποβάλλεται σε δοκιμή και δεν σχετίζεται με την εφαρμοσιμότητα της μεθόδου δοκιμών STE στον έλεγχο ουσιών και/ή μειγμάτων. Οι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

5. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών βασίζεται σε πρωτόκολλο που ανέπτυξε η Kao Corporation (4), το οποίο αποτέλεσε αντικείμενο δύο διαφορετικών μελετών επικύρωσης: μίας μελέτης της επιτροπής επικύρωσης της ΙαπωνικήςΕταιρείας Εναλλακτικών Μεθόδων προς τα Πειράματα σε Ζώα (JSAAE) (5) και μίας δεύτερης μελέτης του Ιαπωνικού Κέντρου για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (JaCVAM) (6). Τα NICEATM/ICCVAM πραγματοποίησαν αξιολόγηση από ομοτίμους με βάση τις εκθέσεις των μελετών επικύρωσης και τα έγγραφα επισκόπησης των διαθέσιμων δεδομένων σχετικά με τη μέθοδο δοκιμών (7).

6. Όταν η μέθοδος δοκιμών STE χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη [κατηγορία 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP (1)], τα δεδομένα που ελήφθησαν για 125 χημικά προϊόντα (περιλαμβανομένων ουσιών και μειγμάτων), παρουσίαζαν συνολική ορθότητα 83 % (104/125), ποσοστό ψευδοθετικών εκβάσεων 1 % (1/86) και ποσοστό ψευδοαρνητικών εκβάσεων 51 % (20/39) σε σύγκριση με την *in vivo* οφθαλμική δοκιμή σε κουνέλια (7). Το ποσοστό ψευδοαρνητικών εκβάσεων δεν είναι κρίσιμης σημασίας στο παρόν πλαίσιο, δεδομένου ότι όλες οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που επάγουν κυτταρική βιωσιμότητα ≤ 70 % σε συγκέντρωση 5 % και > 70 % σε συγκέντρωση 0,05 % ελέγχονται στη συνέχεια με επαρκώς επικυρωμένες μεθόδους δοκιμών *in vitro* ή, ως έσχατη επιλογή, με την *in vivo* οφθαλμική δοκιμή, ανάλογα με τις κανονιστικές απαιτήσεις και σύμφωνα με τη στρατηγική διαδοχικών δοκιμών και τις επί του παρόντος συνιστώμενες προσεγγίσεις βάρους της απόδειξης (1) (8). Υποβλήθηκαν σε δοκιμή κυρίως μονοσυστατικές ουσίες, αν και υπάρχουν επίσης περιορισμένα δεδομένα σχετικά με τις δοκιμές μειγμάτων. Η μέθοδος δοκιμών είναι πάντως τεχνικά εφαρμόσιμη στον έλεγχο πολυσυστατικών ουσιών και μειγμάτων. Ωστόσο, πριν από τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών σε μείγμα για την παραγωγή δεδομένων για συγκεκριμένο κανονιστικό σκοπό, θα πρέπει να εξετάζεται αν –και, εάν ναι, για ποιον λόγο– μπορεί να αποδώσει αποτελέσματα κατάλληλα για τον επιδιωκόμενο σκοπό. Τέτοια εξέταση δεν χρειάζεται όταν οι κανονιστικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τον έλεγχο του μείγματος. Η μέθοδος δοκιμών STE δεν παρουσίασε άλλα ειδικά μειονεκτήματα όταν χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό υπό δοκιμή χημικών ουσιών ως ουσιών κατηγορίας 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP. Οι ερευνητές μπορούν να εξετάζουν το ενδεχόμενο να χρησιμοποιούν την παρούσα μέθοδο δοκιμών, οπότε και η κυτταρική βιωσιμότητα ≤ 70 % σε συγκέντρωση 5 % και 0,05 % θα πρέπει να γίνεται δεκτή ως ενδεικτική απόκρισης που προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη που θα πρέπει να ταξινομηθεί ως κατηγορίας 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP χωρίς τη διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών.

▼**M8**

7. Όταν η μέθοδος δοκιμών STE χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) που δεν χρειάζονται ταξινόμηση ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό και τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη (καμία κατηγορία 1 GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP), τα δεδομένα που ελήφθησαν για 130 χημικά προϊόντα (περιλαμβανομένων ουσιών και μειγμάτων), παρουσίαζαν συνολική ορθότητα 85 % (110/130), ποσοστό ψευδοαρνητικών εκβάσεων 12 % (9/73) και ποσοστό ψευδοθετικών εκβάσεων 19 % (11/57) σε σύγκριση με την *in vivo* οφθαλμική δοκιμή σε κουνέλια (7). Όταν από το σύνολο δεδομένων αποκλείονται οι ουσίες υψηλής πτητικότητας και οι στερεές ουσίες, εκτός των επιφανειοδραστικών, η συνολική ορθότητα βελτιώνεται σε 90 % (92/102), το ποσοστό ψευδοαρνητικών εκβάσεων σε 2 % (1/54), και το ποσοστό ψευδοθετικών εκβάσεων σε 19 % (9/48) (7). Ως εκ τούτου, τα πιθανά μειονεκτήματα της μεθόδου δοκιμών STE, όταν χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό χημικών ουσιών που δεν χρειάζονται ταξινόμηση ως ουσίες που προκαλούν οφθαλμικό ερεθισμό και σοβαρή οφθαλμική βλάβη (καμία κατηγορία κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP), είναι το υψηλό ποσοστό ψευδοαρνητικών εκβάσεων με i) ουσίες υψηλής πτητικότητας με τάση ατμών πάνω από 6 kPa και ii) στερεά χημικά προϊόντα (ουσίες και μείγματα) εκτός των επιφανειοδραστικών και των μειγμάτων που αποτελούνται μόνο από επιφανειοδραστικά. Αυτά τα χημικά προϊόντα αποκλείονται από το πεδίο εφαρμοσιμότητας της μεθόδου δοκιμών STE (7).

8. Εκτός των χημικών προϊόντων που αναφέρονται στις παραγράφους 6 και 7, στο σύνολο δεδομένων που παρήχθη με τη μέθοδο δοκιμών STE περιλαμβάνονται επίσης εσωτερικά δεδομένα της επιχείρησης για 40 μείγματα, τα οποία, όταν συγκρίθηκαν με τα δεδομένα της *in vivo* οφθαλμικής δοκιμής Draize, εμφάνισαν ορθότητα 88 % (35/40), ποσοστό ψευδοθετικών εκβάσεων 50 % (5/10) και ποσοστό ψευδοαρνητικών εκβάσεων 0 % (0/30) όσον αφορά την πρόβλεψη για μείγματα που δεν χρειάζονται ταξινόμηση βάσει των συστημάτων ταξινόμησης GHS του ΟΗΕ / κανονισμού CLP (9). Ως εκ τούτου, η μέθοδος δοκιμών STE μπορεί να εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό μειγμάτων ως μειγμάτων «καμίας κατηγορίας» κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP στο πλαίσιο ανοδικής προσέγγισης, με εξαίρεση τα στερεά μείγματα, εκτός εκείνων που αποτελούνται μόνο από επιφανειοδραστικά, κατά προέκταση του περιορισμού της στις στερεές χημικές ουσίες. Επιπλέον, τα μείγματα που περιέχουν ουσίες με τάση ατμών υψηλότερη από 6kPa θα πρέπει να αξιολογούνται με προσοχή, προκειμένου να αποφεύγονται ενδεχόμενες υποπροβλέψεις, και η αξιολόγησή τους θα πρέπει να αιτιολογείται κατά περίπτωση.

9. Η μέθοδος δοκιμών STE δεν μπορεί να χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό υπό δοκιμή χημικών ουσιών ως «κατηγορίας 2 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP» ή «κατηγορίας 2A (οφθαλμικός ερεθισμός) ή 2B (ήπιος οφθαλμικός ερεθισμός) κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP», λόγω του σημαντικού αριθμού χημικών ουσιών κατηγορίας 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP που υποπροβλέπονται ως κατηγορίας 2, 2A ή 2B και των χημικών ουσιών καμίας κατηγορίας κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP που υπερπροβλέπονται ως κατηγορίας 2, 2A ή 2B (7). Για τον σκοπό αυτό, ενδέχεται να απαιτούνται περαιτέρω δοκιμές με άλλη κατάλληλη μέθοδο.

10. Η μέθοδος δοκιμών STE είναι κατάλληλη για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που διαλύονται ή εναιωρούνται ομοιόμορφα για τουλάχιστον 5 λεπτά σε φυσιολογικό ορό, σε 5 % διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) σε αλατούχο διάλυμα, ή σε ορυκτέλαιο. Η μέθοδος δοκιμών STE δεν είναι κατάλληλη για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που είναι μη διαλυτές ή δεν μπορούν να εναιωρηθούν ομοιόμορφα για τουλάχιστον 5 λεπτά σε φυσιολογικό ορό, σε 5 % διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) σε αλατούχο διάλυμα, ή σε ορυκτέλαιο. Η χρήση ορυκτελαίου στη μέθοδο δοκιμών STE είναι εφικτή λόγω της βραχυχρόνιας έκθεσης. Ως εκ τούτου, η μέθοδος δοκιμών STE είναι κατάλληλη για την πρόβλεψη του δυναμικού οφθαλμικής επικινδυνότητας μη υδατοδιαλυτών χημικών ουσιών (π.χ. λιπαρές αλκοόλες ή κετόνες μακράς αλυσίδας άνθρακα) εφόσον μπορούν να αναμειχθούν με τουλάχιστον έναν από τους ανωτέρω προτεινόμενους διαλύτες (4).

▼**M8**

11. Ο όρος «υπό δοκιμή χημική ουσία» χρησιμοποιείται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών για να δηλώσει την ύλη που υποβάλλεται σε δοκιμή ([1]) και δεν σχετίζεται με την εφαρμοσιμότητα της μεθόδου δοκιμών STE στον έλεγχο ουσιών και/ή μειγμάτων.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

12. Η μέθοδος δοκιμών STE είναι μια *in vitro* δοκιμασία που βασίζεται στην κυτταροτοξικότητα και που διεξάγεται σε συνεχή μονοστιβάδα κυττάρων Statens Seruminstitut Rabbit Cornea (SIRC), η οποία φέρεται σε τρυβλίο μικροτιτλοδότησης 96 κοιλοτήτων από πολυκαρβονικό εστέρα (4). Μετά από έκθεση διάρκειας πέντε λεπτών σε υπό δοκιμή χημική ουσία, η κυτταροτοξικότητα προσδιορίζεται ποσοτικά ως η σχετική βιωσιμότητα των κυττάρων SIRC με χρήση της δοκιμασίας MTT (4). Η μειωμένη κυτταρική βιωσιμότητα χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη των δυνητικών δυσμενών επιδράσεων που προκαλούν οφθαλμική βλάβη.

13. Έχει αναφερθεί ότι το 80 % διαλύματος που ενσταλάζεται στον οφθαλμό κουνελιού απεκκρίνεται μέσω του σάκου του επιπεφυκότα εντός τριών έως τεσσάρων λεπτών, ενώ ποσότητα άνω του 80 % διαλύματος που ενσταλάζεται στον ανθρώπινο οφθαλμό απεκκρίνεται εντός ενός ή δύο λεπτών (10). Με τη μέθοδο δοκιμών STE επιχειρείται η προσέγγιση αυτών των χρόνων έκθεσης και χρησιμοποιείται η κυτταροτοξικότητα ως παράμετρος για την αξιολόγηση της έκτασης της βλάβης που προκαλείται στα κύτταρα SIRC μετά από έκθεση διάρκειας πέντε λεπτών στην υπό δοκιμή χημική ουσία.

ΑΠΟΔΕΙΞΗ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

14. Πριν εντάξουν στην καθημερινή πρακτική τη μέθοδο δοκιμών STE που περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα ταξινομώντας σωστά τις έντεκα συνιστώμενες ουσίες του πίνακα 1. Οι εν λόγω ουσίες επιλέχτηκαν ως αντιπροσωπευτικές του πλήρους φάσματος αποκρίσεων όσον αφορά τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη ή τον οφθαλμικό ερεθισμό με βάση τα αποτελέσματα *in vivo* οφθαλμικών δοκιμών σε κουνέλια (TG 405) και το σύστημα ταξινόμησης GHS του ΟΗΕ / τον κανονισμό CLP (1). Άλλα κριτήρια επιλογής ήταν: οι ουσίες θα πρέπει να διατίθενται στο εμπόριο και θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμα *in vivo* δεδομένα αναφοράς υψηλής ποιότητας καθώς και *in vitro* δεδομένα υψηλής ποιότητας από τη μέθοδο δοκιμών STE (3). Σε περιπτώσεις όπου μια απαριθμούμενη ουσία δεν είναι διαθέσιμη, ή εφόσον αιτιολογείται, μπορεί να χρησιμοποιείται άλλη ουσία για την οποία υπάρχουν επαρκή δεδομένα αναφοράς *in vivo* και *in vitro*, υπό την προϋπόθεση ότι εφαρμόζονται τα ίδια κριτήρια επιλογής που περιγράφονται στο παρόν σημείο.

Πίνακας 1

Κατάλογος ουσιών ελέγχου ικανότητας

Ουσία	CASRN	Χημική κατηγορία ([1])	Φυσική κατάσταση	Κατηγορία in vivo κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP ([2])	Διαλύτης στη δοκιμή STE	Κατηγορία STE κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP
Χλωριούχο βενζαλκόνιο (10 %, υδατικό)	8001-54-5	Ένωση κατιόντων υδριδίων	Υγρό	Κατηγορία 1	Αλατούχο διάλυμα	Κατηγορία 1
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Αιθέρας	Υγρό	Κατηγορία 1	Αλατούχο διάλυμα	Κατηγορία 1

([1]) Τον Ιούνιο του 2013 η κοινή συνεδρίαση συμφώνησε ότι, όπου είναι δυνατόν, ο όρος «υπό δοκιμή χημική ουσία» που δηλώνει την ύλη που υποβάλλεται σε δοκιμή θα πρέπει να χρησιμοποιείται πλέον με μεγαλύτερη συνέπεια στις νέες και επικαιροποιημένες μεθόδους δοκιμών.

▼**M8**

Ουσία	CASRN	Χημική κατηγορία ([1])	Φυσική κατάσταση	Κατηγορία in vivo κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP ([2])	Διαλύτης στη δοκιμή STE	Κατηγορία STE κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP
Acid Red 92	18472-87-2	Ετεροκυκλική ένωση, βρωμιούχος ένωση, χλωριούχος ένωση	Στερεό	Κατηγορία 1	Αλατούχο διάλυμα	Κατηγορία 1
Υδροξείδιο του νατρίου	1310-73-2	Άλκαλι Ανόργανο χημικό προϊόν	Στερεό	Κατηγορία 1 ([3])	Αλατούχο διάλυμα	Κατηγορία 1
Βουτυρολακτόνη	96-48-0	Λακτόνη, ετεροκυκλική ένωση	Υγρό	Κατηγορία 2A (κατηγορία 2 στον κανονισμό CLP)	Αλατούχο διάλυμα	Αδύνατη η διατύπωση πρόβλεψης
1-Οκτανόλη	111-87-5	Αλκοόλη	Υγρό	Κατηγορία 2A/B ([4])(κατηγορία 2 στον κανονισμό CLP)	Ορυκτέλαιο	Αδύνατη η διατύπωση πρόβλεψης
Κυκλοπεντανόλη	96-41-3	Αλκοόλη, υδρογονάνθρακας, κυκλικός	Υγρό	Κατηγορία 2A/B ([5]) (κατηγορία 2 στον κανονισμό CLP)	Αλατούχο διάλυμα	Αδύνατη η διατύπωση πρόβλεψης
Οξικός 2-αιθοξυαιθυλεστέρας	111-15-9	Αλκοόλη, αιθέρας	Υγρό	Καμία κατηγορία	Αλατούχο διάλυμα	Καμία κατηγορία
Δωδεκάνιο	112-40-3	Υδρογονάνθρακας, άκυκλος	Υγρό	Καμία κατηγορία	Ορυκτέλαιο	Καμία κατηγορία
Μεθυλοϊσοβουτυλοκετόνη	108-10-1	Κετόνη	Υγρό	Καμία κατηγορία	Ορυκτέλαιο	Καμία κατηγορία

▼M8

Ουσία	CASRN	Χημική κατηγορία (1)	Φυσική κατάσταση	Κατηγορία in vivo κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP (2)	Διαλύτης στη δοκιμή STE	Κατηγορία STE κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP
Θειική 1,1-διμεθυλογουανιδίνη	598-65-2	Αμιδίνη, ένωση θείου	Στερεό	Καμία κατηγορία	Αλατούχο διάλυμα	Καμία κατηγορία

(1) Οι χημικές κατηγορίες αποδόθηκαν βάσει πληροφοριών που ελήφθησαν από προηγούμενες δημοσιεύσεις του NICEATM και, όπου δεν υπήρχαν, με χρήση των θεματικών επικεφαλίδων ιατρικού περιεχομένου (Medical Subject Headings, MeSH®) της Εθνικής Ιατρικής Βιβλιοθήκης των ΗΠΑ (μέσω του ChemIDplus®, στη διεύθυνση http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/) και βάσει των δομών που προσδιορίστηκαν από το NICEATM.

(2) Βάσει των αποτελεσμάτων της *in vivo* οφθαλμικής δοκιμής σε κουνέλια (TG 405 του ΟΟΣΑ) και σύμφωνα με το GHS του ΟΗΕ / τον κανονισμό CLP (1).

(3) Η ταξινόμηση στην κατηγορία 1 βασίζεται στο δυναμικό διαβρωτικότητας στο δέρμα υδροξειδίου του νατρίου 100 % (που απαριθμείται στην TG 435 του ΟΟΣΑ ως χημική ουσία ελέγχου ικανότητας με δυναμικό διαβρωτικότητας στο δέρμα) και το κριτήριο για την κατηγορία 1 του GHS του ΟΗΕ / του κανονισμού CLP (1).

(4) Η ταξινόμηση στην κατηγορία 2Α ή 2Β εξαρτάται από την ερμηνεία του κριτηρίου του GHS του ΟΗΕ για τη διάκριση μεταξύ αυτών των δύο κατηγοριών, δηλ. για την κατάταξη στην κατηγορία 2Α είναι απαραίτητο να εμφανίζουν επιδράσεις την 7η ημέρα 2 από τα 6 ζώα έναντι 4 από τα 6 ζώα. Το *in vivo* σύνολο δεδομένων περιλάμβανε 2 μελέτες με 3 ζώα η καθεμία. Σε μία μελέτη δύο από τα τρία ζώα εμφάνισαν επιδράσεις την 7η ημέρα, γεγονός που δικαιολογεί την ταξινόμηση στην κατηγορία 2Α (11), ενώ στη δεύτερη μελέτη όλες οι παράμετροι και στα τρία ζώα επανήλθαν σε μηδενική βαθμολογία την 7η ημέρα, γεγονός που δικαιολογεί ταξινόμηση στην κατηγορία 2Β (12).

(5) Η ταξινόμηση στην κατηγορία 2Α ή 2Β εξαρτάται από την ερμηνεία του κριτηρίου του GHS του ΟΗΕ για τη διάκριση μεταξύ αυτών των δύο κατηγοριών, δηλ. για την κατάταξη στην κατηγορία 2Α είναι απαραίτητο να εμφανίζουν επιδράσεις την 7η ημέρα 1 από τα 3 ζώα έναντι 2 από τα 3 ζώα. Η *in vivo* μελέτη περιελάμβανε 3 ζώα. Όλες οι παράμετροι, εκτός από τη θολερότητα του κερατοειδούς και το ερύθημα του επιπεφυκότος σε ένα ζώο, επανήλθαν σε μηδενική βαθμολογία την ημέρα 7 ή νωρίτερα. Το ένα ζώο που δεν είχε αναρρώσει πλήρως την ημέρα 7 παρουσίαζε θολερότητα του κερατοειδούς βαθμού 1 και ερύθημα επιπεφυκότος βαθμού 1 (την ημέρα 7), τα οποία είχαν υποχωρήσει πλήρως την ημέρα 14 (11).

Συντομογραφίες: CASRN = αριθμός μητρώου της υπηρεσίας Chemical Abstracts Service

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Παρασκευή της κυτταρικής μονοστιβάδας

15. Για τη διεξαγωγή της μεθόδου δοκιμών STE θα πρέπει να χρησιμοποιείται η κυτταρική σειρά κερατοειδούς κουνελιού SIRC. Συνιστάται τα κύτταρα SIRC να λαμβάνονται από καλώς πιστοποιημένη τράπεζα κυττάρων, όπως η American Type Culture Collection CCL60.

16. Τα κύτταρα SIRC καλλιεργούνται στους 37 °C και σε ατμόσφαιρα με ύγρανση και 5 % CO_2 εντός φιάλης καλλιέργειας που περιέχει θρεπτικό μέσο που αποτελείται από θρεπτικό μέσο ελάχιστων τροφικών απαιτήσεων Eagle (MEM), συμπληρωμένο με 10 % βόειου εμβρυϊκού ορού (FBS), 2 mM L-γλουταμίνης, 50–100 μονάδες/ml πενικιλίνης και 50–100 μg/ml στρεπτομυκίνης. Τα κύτταρα που έχουν συρρεύσει στη φιάλη καλλιέργειας θα πρέπει να διαχωρίζονται με χρήση διαλύματος θρυψίνης-αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος, με ή χωρίς χρήση ξέστρου κυττάρων. Τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται (π.χ. 2 έως 3 ανακαλλιέργειες) σε φιάλη καλλιέργειας προτού χρησιμοποιηθούν σε δοκιμές στην καθημερινή πρακτική, και δεν θα πρέπει να υποβάλλονται σε περισσότερες από 25 ανακαλλιέργειες μετά την απόψυξη.

17. Στη συνέχεια, τα κύτταρα που είναι έτοιμα για χρήση στη δοκιμή STE φέρονται στην κατάλληλη πυκνότητα και εμβολιάζονται στα τρυβλία 96 κοιλοτήτων. Η συνιστώμενη πυκνότητα εμβολιασμού κυττάρων είναι $6{,}0 \times 10^3$ κύτταρα ανά κοιλότητα, όταν τα κύτταρα χρησιμοποιούνται τέσσερις ημέρες μετά τον εμβολιασμό, ή $3{,}0 \times 10^3$ κύτταρα ανά κοιλότητα, όταν τα κύτταρα χρησιμοποιούνται πέντε ημέρες μετά τον εμβολιασμό, σε όγκο καλλιέργειας 200 μl. Τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή STE και τα οποία εμβολιάζονται σε θρεπτικό μέσο στην κατάλληλη πυκνότητα φτάνουν σε συρροή άνω του 80 % κατά τη χρονική στιγμή της δοκιμής, δηλαδή τέσσερις ή πέντε ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

Εφαρμογή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων

18. Ο διαλύτης πρώτης επιλογής για τη διάλυση ή την εναιώρηση υπό δοκιμή χημικών ουσιών είναι ο φυσιολογικός ορός. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία παρουσιάζει χαμηλή διαλυτότητα ή δεν μπορεί να διαλυθεί ή να εναιωρηθεί

▼M8

ομοιόμορφα για τουλάχιστον πέντε λεπτά σε αλατούχο διάλυμα, ως διαλύτης δεύτερης επιλογής χρησιμοποιείται 5 % DMSO (CAS#67-68-5) σε αλατούχο διάλυμα. Για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν μπορούν να διαλυθούν ή να εναιωρηθούν ομοιόμορφα για τουλάχιστον πέντε λεπτά σε αλατούχο διάλυμα ή σε 5 % DMSO σε αλατούχο διάλυμα, ως διαλύτης τρίτης επιλογής χρησιμοποιείται ορυκτέλαιο (CAS#8042-47-5).

19. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες διαλύονται ή εναιωρούνται ομοιόμορφα στον επιλεγμένο διαλύτη σε συγκέντρωση 5 % κ.β. και αραιώνονται περαιτέρω σε διαδοχικές αραιώσεις κατά 10 φορές μέχρι συγκέντρωσης 0,5 % και 0,05 %. Κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία πρέπει να υποβάλλεται σε δοκιμή σε συγκεντρώσεις 5 % και 0,05 %. Τα κύτταρα που καλλιεργούνται στο τρυβλίο 96 κοιλοτήτων εκτίθενται σε 200 μl/κοιλότητα του διαλύματος (ή εναιωρήματος) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε συγκέντρωση είτε 5 % είτε 0,05 % για πέντε λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες (μονοσυστατικές ή πολυσυστατικές ουσίες ή μείγματα) θεωρούνται αμιγείς ουσίες και αραιώνονται ή εναιωρούνται σύμφωνα με τη μέθοδο, ανεξάρτητα από την καθαρότητά τους.

20. Σε κάθε τρυβλίο της κάθε επανάληψης, ως μάρτυρας θρεπτικού μέσου χρησιμοποιείται το θρεπτικό μέσο που περιγράφεται στην παράγραφο 16. Επιπλέον, τα κύτταρα πρέπει να εκτίθενται και σε δείγματα μάρτυρα με διαλύτη σε κάθε τρυβλίο κάθε επανάληψης. Οι διαλύτες που απαριθμούνται στην παράγραφο 18 είναι αποδεδειγμένο ότι δεν προκαλούν δυσμενείς επιδράσεις στη βιωσιμότητα των κυττάρων SIRC.

21. Στη μέθοδο δοκιμών STE, ως θετικός μάρτυρας σε κάθε τρυβλίο κάθε επανάληψης πρέπει να χρησιμοποιείται 0,01 % λαυρυλοθειικού νατρίου (SLS) σε αλατούχο διάλυμα. Για τον υπολογισμό της κυτταρικής βιωσιμότητας του θετικού μάρτυρα, θα πρέπει σε κάθε τρυβλίο κάθε επανάληψης να περιλαμβάνεται μάρτυρας με αλατούχο διάλυμα.

22. Ένα τυφλό δείγμα είναι απαραίτητο για τον προσδιορισμό της αντιστάθμισης οπτικής πυκνότητας και θα πρέπει να λαμβάνεται από κοιλότητες που περιέχουν μόνο αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων, αλλά όχι ασβέστιο και μαγνήσιο (PBS-) ή κύτταρα.

23. Κάθε δείγμα (υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε συγκέντρωση 5 % και 0,05 %, μάρτυρα θρεπτικού μέσου, μάρτυρα με διαλύτη και θετικού μάρτυρα) θα πρέπει να ελέγχεται εις τριπλούν σε κάθε επανάληψη, μέσω έκθεσης των κυττάρων σε 200 μl κατάλληλης υπό δοκιμή χημικής ουσίας ή χημικής ουσίας μάρτυρα για πέντε λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

24. Οι ουσίες συγκριτικής αξιολόγησης είναι χρήσιμες για την αξιολόγηση του δυναμικού οφθαλμικού ερεθισμού άγνωστων χημικών ουσιών συγκεκριμένης χημικής κατηγορίας ή κατηγορίας προϊόντων ή για την αξιολόγηση του σχετικού ερεθιστικού δυναμικού ενός ερεθιστικού των οφθαλμών εντός συγκεκριμένου φάσματος αποκρίσεων ερεθισμού.

Μέτρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας

25. Μετά την έκθεση, τα κύτταρα εκπλένονται δύο φορές με 200 μl PBS και προστίθενται 200 μl διαλύματος MTT (0,5 mg MTT/ml θρεπτικού μέσου). Μετά από την πάροδο χρόνου αντίδρασης δύο ωρών σε επωαστήρα (37 °C, 5 % CO_2), μεταγγίζεται το διάλυμα MTT, εκχυλίζεται η φορμαζάνη MTT με προσθήκη 200 μl 0,04 N υδροχλωρικού οξέος–ισοπροπανόλης για 60 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου, και μετράται η απορρόφηση του διαλύματος φορμαζάνης MTT στα 570 nm με συσκευή ανάγνωσης τρυβλίων. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες (έγχρωμες ουσίες ή άμεσα αναγωγικά της MTT) παρεμποδίζουν τη δοκιμασία MTT μόνο εάν στο σύστημα δοκιμής διατηρηθεί σημαντική ποσότητα υπό δοκιμή χημικής ουσίας κατόπιν έκπλυσης μετά την έκθεση, όπως συμβαίνει με τους ιστούς τρισδιάστατου ανασυσταθέντος ανθρώπινου κερατοειδούς ή ανασυσταθείσας ανθρώπινης επιδερμίδας, χωρίς, ωστόσο, να ισχύει το ίδιο για τις δισδιάστατες κυτταρικές καλλιέργειες που χρησιμοποιούνται για τη μέθοδο δοκιμών STE.

▼M8

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων και μοντέλο πρόβλεψης

26. Οι τιμές οπτικής πυκνότητας (OD) που προκύπτουν για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία χρησιμοποιούνται στη συνέχεια για τον υπολογισμό της κυτταρικής βιωσιμότητας σε σχέση με τον μάρτυρα με διαλύτη, ο οποίος ορίζεται ίσος με 100 %. Η σχετική κυτταρική βιωσιμότητα εκφράζεται ως ποσοστό και υπολογίζεται με διαίρεση της οπτικής πυκνότητας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας διά της οπτικής πυκνότητας του μάρτυρα με διαλύτη αφού αφαιρεθεί η οπτική πυκνότητα του τυφλού δείγματος και από τις δύο τιμές.

$$\textit{βιωσιμότητα}(\%) = \frac{(OD_{570}\ \textit{ουσίας υπό δοκιμή}) - (OD_{570}\ \textit{τυφλού})}{(OD_{570}\ \textit{μάρτυρα με διαλύτη}) - (OD_{570}\ \textit{τυφλού})} \times 100$$

Αντίστοιχα, η σχετική κυτταρική βιωσιμότητα κάθε μάρτυρα με διαλύτη εκφράζεται ως ποσοστό και υπολογίζεται με διαίρεση της οπτικής πυκνότητας κάθε μάρτυρα με διαλύτη διά της οπτικής πυκνότητας του μάρτυρα θρεπτικού μέσου αφού αφαιρεθεί η οπτική πυκνότητα του τυφλού δείγματος και από τις δύο τιμές.

27. Θα πρέπει να εκτελούνται τρεις ανεξάρτητες επαναλήψεις, καθεμία εκ των οποίων περιλαμβάνει τρεις πανομοιότυπες κοιλότητες (n=9). Για τον υπολογισμό του αριθμητικού μέσου όρου της σχετικής κυτταρικής βιωσιμότητας χρησιμοποιείται ο αριθμητικός μέσος όρος των τριών κοιλοτήτων για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία και μάρτυρα με διαλύτη σε κάθε ανεξάρτητη επανάληψη. Ο τελικός αριθμητικός μέσος όρος της κυτταρικής βιωσιμότητας προκύπτει από τις τρεις ανεξάρτητες επαναλήψεις.

28. Παρακάτω δίνονται οι τιμές αποκοπής για την κυτταρική βιωσιμότητα για τον χαρακτηρισμό των υπό δοκιμή χημικών ουσιών που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη (κατηγορίας 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP) και των υπό δοκιμή χημικών ουσιών για τις οποίες δεν απαιτείται ταξινόμηση ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη (καμίας κατηγορίας κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP).

Πίνακας 2

Μοντέλο πρόβλεψης της μεθόδου δοκιμών STE

Κυτταρική βιωσιμότητα		Ταξινόμηση κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP	Εφαρμοσιμότητα
Σε 5 %	Σε 0,05 %		
> 70 %	> 70 %	Καμία κατηγορία	Ουσίες και μείγματα, με εξαίρεση τα ακόλουθα: i) ουσίες υψηλής πτητικότητας με τάση ατμών πάνω από 6 kPa [1] και ii) στερεά χημικά προϊόντα (ουσίες και μείγματα), με εξαίρεση τα επιφανειοδραστικά και τα μείγματα που αποτελούνται μόνο από επιφανειοδραστικά
≤ 70 %	> 70 %	Αδύνατη η διατύπωση πρόβλεψης	Άνευ αντικειμένου
≤ 70 %	≤ 70 %	Κατηγορία 1	Ουσίες και μείγματα [2]

([1]) Τα μείγματα που περιέχουν ουσίες με τάση ατμών υψηλότερη από 6 kPa θα πρέπει να αξιολογούνται με προσοχή, προκειμένου να αποφεύγονται ενδεχόμενες υποπροβλέψεις, και η αξιολόγησή τους θα πρέπει να αιτιολογείται κατά περίπτωση.

([2]) Βάσει των αποτελεσμάτων που προκύπτουν κυρίως με μονοσυστατικές ουσίες, αν και υπάρχει περιορισμένος αριθμός δεδομένων και σχετικά με τις δοκιμές μειγμάτων. Η μέθοδος δοκιμών είναι πάντως τεχνικά εφαρμόσιμη στον έλεγχο πολυσυστατικών ουσιών και μειγμάτων. Πριν από τη χρήση της μεθόδου δοκιμών σε μείγμα για την παραγωγή δεδομένων για συγκεκριμένο κανονιστικό σκοπό, θα πρέπει να εξετάζεται αν –και, εάν ναι, για ποιον λόγο– μπορεί να αποδώσει αποτελέσματα κατάλληλα για τον επιδιωκόμενο σκοπό. Τέτοια εξέταση δεν χρειάζεται όταν οι κανονιστικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τον έλεγχο του μείγματος.

▼M8

Κριτήρια αποδοχής

29. Τα αποτελέσματα των δοκιμών κρίνονται αποδεκτά εφόσον πληρούνται όλα τα ακόλουθα κριτήρια:

α) η οπτική πυκνότητα του μάρτυρα θρεπτικού μέσου (που εκτίθεται σε θρεπτικό μέσο) θα πρέπει να είναι 0,3 ή υψηλότερη, μετά την αφαίρεση της οπτικής πυκνότητας του τυφλού δείγματος.

β) η βιωσιμότητα του μάρτυρα με διαλύτη θα πρέπει να είναι 80 % ή υψηλότερη σε σχέση με τον μάρτυρα θρεπτικού μέσου. Σε περίπτωση που σε κάθε επανάληψη χρησιμοποιούνται πολλοί μάρτυρες με διαλύτη, η κυτταρική βιωσιμότητα για καθένα από τους εν λόγω μάρτυρες θα πρέπει να είναι υψηλότερη από 80 % προκειμένου να πληρούν τα κριτήρια οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που ελέγχονται με τους εν λόγω διαλύτες.

γ) η κυτταρική βιωσιμότητα που προκύπτει με τον θετικό μάρτυρα (0,01 % SLS) θα πρέπει να εμπίπτει εντός δύο τυπικών αποκλίσεων του ιστορικού μέσου όρου. Το ανώτατο και το κατώτατο όριο αποδοχής για τον θετικό μάρτυρα θα πρέπει να επικαιροποιείται συχνά, δηλ. κάθε τρεις μήνες, ή κάθε φορά που διεξάγεται αποδεκτή δοκιμή σε εργαστήρια όπου δεν διεξάγονται συχνά δοκιμές (δηλ. λιγότερο από μια φορά τον μήνα). Σε περίπτωση που ένα εργαστήριο δεν ολοκληρώσει επαρκή αριθμό πειραμάτων ώστε να καθορίσει στατιστικά αξιόπιστη κατανομή θετικών μαρτύρων, επιτρέπεται να χρησιμοποιεί το ανώτατο και το κατώτατο όριο αποδοχής που έχουν καθοριστεί από τον φορέα ανάπτυξης της μεθόδου, δηλ. μεταξύ 21,1 % και 62,3 %, σύμφωνα με τα εργαστηριακά ιστορικά δεδομένα του, ενώ διαμορφώνει εσωτερική κατανομή στη διάρκεια των πρώτων δοκιμών στο πλαίσιο της καθημερινής πρακτικής.

δ) Η τυπική απόκλιση της τελικής κυτταρικής βιωσιμότητας που προκύπτει από τις τρεις ανεξάρτητες επαναλήψεις θα πρέπει να μην υπερβαίνει το 15 % για αμφότερες τις συγκεντρώσεις 5 % και 0,05 % της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Σε περίπτωση που δεν πληρούται ένα ή περισσότερα από τα εν λόγω κριτήρια, τα αποτελέσματα θα πρέπει να απορρίπτονται και θα πρέπει να διεξάγονται τρεις επιπλέον ανεξάρτητες επαναλήψεις.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Δεδομένα

30. Τα δεδομένα για κάθε επιμέρους κοιλότητα (π.χ. οι τιμές κυτταρικής βιωσιμότητας) κάθε επανάληψης καθώς και ο συνολικός μέσος όρος, η SD και η ταξινόμηση πρέπει να αναφέρονται.

Έκθεση δοκιμής

31. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία και μάρτυρες

— Μονοσυστατική ουσία: ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία,

— Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγμα: χαρακτηρισμός, στο μέτρο του δυνατού, π.χ. χημική ταυτότητα (βλ. ανωτέρω), καθαρότητα, ποσότητα και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες (βλ. ανωτέρω) των συστατικών, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— φυσική κατάσταση, πτητικότητα, pH, LogP, μοριακό βάρος, χημική κατηγορία, και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες που σχετίζονται με τη διενέργεια της μελέτης, εφόσον είναι διαθέσιμα,

▼**M8**

— καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

— κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),

— συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα.

Συνθήκες και διαδικασίες μεθόδου δοκιμών

— Όνομα και διεύθυνση του χορηγού, της εγκατάστασης δοκιμών και του διευθυντή της μελέτης,

— Περιγραφή της χρησιμοποιούμενης μεθόδου δοκιμών,

— Χρησιμοποιούμενη κυτταρική σειρά, προέλευσή αυτής, αριθμός ανακαλλιεργειών και συρροή των κυττάρων που χρησιμοποιούνται για τις δοκιμές,

— Λεπτομέρειες σχετικά με τη χρησιμοποιούμενη διαδικασία δοκιμής,

— Αριθμός επαναλήψεων και πανομοιότυπων δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν,

— Συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που χρησιμοποιήθηκαν (εφόσον διαφέρουν από τις συνιστώμενες),

— Αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία,

— Διάρκεια της έκθεσης στην υπό δοκιμή χημική ουσία (εφόσον διαφέρει από τη συνιστώμενη),

— Περιγραφή τυχόν τροποποιήσεων της διαδικασίας δοκιμής,

— Περιγραφή των χρησιμοποιούμενων κριτηρίων αξιολόγησης και λήψης αποφάσεων,

— Παραπομπή στον μέσο όρο και την τυπική απόκλιση ιστορικών θετικών μαρτύρων,

— Απόδειξη της τεχνικής ικανότητας του εργαστηρίου όσον αφορά την εφαρμογή της μεθόδου δοκιμών (π.χ. με δοκιμές των ουσιών ελέγχου ικανότητας) ή απόδειξη της διαχρονικής αναπαραγωγιμότητας των επιδόσεων της μεθόδου.

Αποτελέσματα

— Για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία και μάρτυρα, και για κάθε ελεγχθείσα συγκέντρωση, θα πρέπει να παρέχονται υπό μορφή πίνακα οι επιμέρους τιμές οπτικής πυκνότητας ανά πανομοιότυπη κοιλότητα, ο αριθμητικός μέσος όρος των τιμών οπτικής πυκνότητας για κάθε ανεξάρτητη επανάληψη, το ποσοστό (%) κυτταρικής βιωσιμότητας για κάθε ανεξάρτητη επανάληψη, και ο αριθμητικός μέσος όρος (%) τελικής κυτταρικής βιωσιμότητας και η τυπική απόκλιση των τριών επαναλήψεων,

— Τα αποτελέσματα για το θρεπτικό μέσο, τον διαλύτη και τον θετικό μάρτυρα, που καταδεικνύουν ότι πληρούνται τα κατάλληλα κριτήρια αποδοχής της μελέτης,

— Περιγραφή άλλων επιδράσεων που παρατηρήθηκαν,

— Η συνολική ταξινόμηση στην οποία κατέληξε η δοκιμή, με αναφορά του μοντέλου πρόβλεψης / των κριτηρίων λήψης απόφασης που χρησιμοποιήθηκαν.

▼**M8**

Εξέταση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Scott L, *et al.* (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.

(3) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(4) Takahashi Y, *et al.* (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. In Vitro* 22,760-770.

(5) Sakaguchi H, *et al.* (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 25,796-809.

(6) Kojima H, *et al.* (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, pp.1855-1869.

(7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].

(8) Κεφάλαιο B.5 του παρόντος παραρτήματος, Οξείας μορφής ερεθισμός/διάβρωση των οφθαλμών.

(9) Saito K, *et al*. (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.

(10) Mikkelson TJ, Chrai SS and Robinson JR. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm*. Sci.1648-1653.

(11) ECETOC (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No 48. (2)), Brussels, Belgium.

(12) Gautheron P, *et al*. (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy. Fundam Appl *Toxicol.* 18, 442–449.

(13) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(14) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 263). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

Προσάρτημα

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ορθότητα: ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί μέτρο των επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς τη «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας μεθόδου δοκιμών (13).

Ουσία συγκριτικής αξιολόγησης: ουσία που χρησιμοποιείται ως πρότυπο για σύγκριση με μια υπό δοκιμή χημική ουσία. Μια ουσία συγκριτικής αξιολόγησης πρέπει να διαθέτει τις ακόλουθες ιδιότητες: i) σταθερή και αξιόπιστη πηγή προμήθειας, ii) δομική και λειτουργική ομοιότητα προς την κατηγορία των υπό δοκιμή ουσιών, iii) γνωστά φυσικά/χημικά χαρακτηριστικά, iv) υποστηρικτικά στοιχεία σχετικά με τις γνωστές επιδράσεις, και v) γνωστή ισχύς στο φάσμα της επιθυμητής απόκρισης.

Ανοδική (bottom-up) προσέγγιση: κλιμακωτή προσέγγιση που χρησιμοποιείται για υπό δοκιμή χημικές ουσίες για τις οποίες υπάρχουν υπόνοιες ότι δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη. Η προσέγγιση αυτή αρχίζει με τον προσδιορισμό των χημικών ουσιών που δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν (αρνητική έκβαση) με βάση άλλες χημικές ουσίες (θετική έκβαση).

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Οφθαλμικός ερεθισμός: πρόκληση αλλοιώσεων του οφθαλμού, οι οποίες εμφανίζονται μετά την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην εμπρόσθια επιφάνειά του και είναι πλήρως αναστρέψιμες εντός 21 ημερών από την εφαρμογή της ουσίας. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά προς τους όρους «αναστρέψιμες επιδράσεις στους οφθαλμούς» και «κατηγορία 2 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP».

Ποσοστό ψευδοαρνητικής έκβασης: το ποσοστό του συνόλου των θετικών χημικών ουσιών που εσφαλμένα χαρακτηρίζονται αρνητικές με μια μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί έναν από τους δείκτες επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών.

Ποσοστό ψευδοθετικής έκβασης: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών χημικών ουσιών που εσφαλμένα χαρακτηρίζονται θετικές με μια μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί έναν από τους δείκτες επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών.

Επικινδυνότητα: εγγενής ιδιότητα ενός παράγοντα ή μιας κατάστασης που μπορεί να έχει δυσμενείς επιδράσεις όταν ένας οργανισμός, ένα σύστημα ή ένας (υπο)πληθυσμός εκτίθεται στον παράγοντα.

Μάρτυρας θρεπτικού μέσου: πανομοιότυπο δείγμα που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και δεν υποβάλλεται σε αγωγή. Το δείγμα αυτό υποβάλλεται σε δοκιμή μαζί με τα δείγματα που έχουν υποβληθεί σε αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία και με άλλα δείγματα μάρτυρες, ούτως ώστε να διαπιστώνεται αν ο διαλύτης αλληλεπιδρά με το σύστημα δοκιμής.

Μείγμα: ένα μείγμα ή διάλυμα που αποτελείται από δύο ή περισσότερες ουσίες.

Μονοσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας ένα κύριο συστατικό περιέχεται σε ποσοστό τουλάχιστον 80 % κ.β.

MTT: βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο, βρωμιούχο τετραζόλιο-κυανό του θειαζολυλίου.

Πολυσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας περισσότερα από ένα κύρια συστατικά περιέχονται σε συγκέντρωση ≥ 10 % κ.β. και < 80 % κ.β. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα μεταποιητικών διεργασιών. Η διαφορά μεταξύ μείγματος και πολυσυστατικής ουσίας είναι ότι το μείγμα λαμβάνεται με ανάμειξη δύο ή περισσότερων ουσιών, χωρίς χημική αντίδραση. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα χημικών αντιδράσεων.

▼**M8**

OD: (Optical Density) οπτική πυκνότητα.

Θετικός μάρτυρας: πανομοιότυπο δείγμα που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και υποβάλλεται σε αγωγή με ουσία που είναι γνωστό ότι επάγει θετική απόκριση. Για να διασφαλίζεται η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας της απόκρισης του θετικού μάρτυρα σε συνάρτηση με τον χρόνο, το μέγεθος της θετικής απόκρισης δεν θα πρέπει να είναι υπερβολικό.

Καταλληλότητα: περιγραφή της σχέσης της δοκιμής με την υπό μελέτη επίδραση και του κατά πόσον αυτή έχει σημασία και είναι χρήσιμη για συγκεκριμένο σκοπό. Πρόκειται για τον βαθμό στον οποίο η δοκιμή μετρά ή προβλέπει σωστά τη βιολογική επίδραση υπό μελέτη. Η καταλληλότητα εμπεριέχει συνεκτίμηση της ορθότητας (συμφωνίας) της μεθόδου δοκιμών (10).

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια μέθοδος δοκιμών μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, καθώς και της ενδοεργαστηριακής επαναληψιμότητας (13).

Ευαισθησία: το ποσοστό του συνόλου των θετικών/δραστικών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των μεθόδων δοκιμών (10).

Σοβαρή οφθαλμική βλάβη: πρόκληση βλάβης στους οφθαλμικούς ιστούς ή σοβαρής μείωσης της όρασης, κατόπιν εφαρμογής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην πρόσθια επιφάνεια του οφθαλμού, η οποία δεν είναι πλήρως αναστρέψιμη εντός 21 ημερών από την εφαρμογή. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά προς τους όρους «μη αναστρέψιμες επιδράσεις στους οφθαλμούς» και «κατηγορία 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP».

Μάρτυρας με διαλύτη/φορέα: δείγμα που δεν υποβάλλεται σε αγωγή και περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής, συμπεριλαμβανομένου του διαλύτη ή του φορέα. Το δείγμα αυτό υποβάλλεται σε δοκιμή μαζί με τα δείγματα που έχουν υποβληθεί σε αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία και με άλλα δείγματα μάρτυρες, με σκοπό τον καθορισμό της βασικής απόκρισης των δειγμάτων που υποβάλλονται σε αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία διαλυμένη στον ίδιο διαλύτη ή φορέα. Όταν το εν λόγω δείγμα υποβάλλεται σε δοκιμή με παράλληλο μάρτυρα θρεπτικού μέσου, καταδεικνύει επίσης αν ο διαλύτης ή ο φορέας αλληλεπιδρά με το σύστημα δοκιμής.

Ειδικότητα: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών/αδρανών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των μεθόδων δοκιμών (13).

Ουσία: ένα χημικό στοιχείο και οι ενώσεις του σε φυσική κατάσταση ή όπως λαμβάνονται με οποιαδήποτε παραγωγική διεργασία, στα οποία συμπεριλαμβάνονται όλα τα πρόσθετα που απαιτούνται για να διατηρείται η σταθερότητά του, καθώς και τυχόν προσμείξεις που προκύπτουν από τη χρησιμοποιούμενη διεργασία, αλλά από τα οποία εξαιρούνται οι διαλύτες που είναι δυνατόν να διαχωριστούν χωρίς να επηρεαστεί η σταθερότητα της ουσίας ούτε να μεταβληθεί η σύνθεσή της.

Επιφανειοδραστική ουσία: ονομάζεται επίσης τασιενεργή ουσία και είναι χημική ουσία, όπως τα απορρυπαντικά, που μπορεί να μειώσει την επιφανειακή τάση ενός υγρού και, ως εκ τούτου, του επιτρέπει να σχηματίζει αφρό ή να διεισδύει σε στερεά· είναι επίσης γνωστή ως διαβρεκτικό μέσο.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

▼M8

Κλιμακωτή στρατηγική δοκιμών: στρατηγική δοκιμών κατά βαθμίδες, στο πλαίσιο της οποίας όλες οι υφιστάμενες πληροφορίες για μια υπό δοκιμή χημική ουσία εξετάζονται με συγκεκριμένη σειρά, με χρήση διαδικασίας βάρους της απόδειξης σε κάθε στάδιο, προκειμένου να διαπιστώνεται, πριν από τη μετάβαση στο επόμενο στάδιο, αν διατίθενται επαρκείς πληροφορίες για να ληφθεί απόφαση περί ταξινόμησης κινδύνου. Εάν σε υπό δοκιμή χημική ουσία μπορεί να αποδοθεί δυναμικό ερεθιστικότητας βάσει των υφιστάμενων πληροφοριών, δεν απαιτούνται περαιτέρω δοκιμές. Εάν βάσει των υφιστάμενων πληροφοριών δεν είναι εφικτή η απόδοση δυναμικού ερεθιστικότητας σε υπό δοκιμή χημική ουσία, εφαρμόζεται κλιμακωτή διαδικασία διαδοχικών δοκιμών σε ζώα έως ότου καταστεί εφικτή η βέβαιη ταξινόμηση της ουσίας.

Καθοδική (top-down) προσέγγιση: κλιμακωτή προσέγγιση που χρησιμοποιείται για υπό δοκιμή χημική ουσία για την οποία υπάρχουν υπόνοιες ότι προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη. Η προσέγγιση αυτή αρχίζει με τον προσδιορισμό των χημικών ουσιών που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη (θετική έκβαση) σε σχέση με άλλες χημικές ουσίες (αρνητική έκβαση).

Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Προϊόντων των Ηνωμένων Εθνών (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) (GHS του ΟΗΕ): σύστημα που προτείνει την ταξινόμηση των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) με βάση τυποποιημένα είδη και βαθμούς φυσικής επικινδυνότητας και επικινδυνότητας για την υγεία και το περιβάλλον και καλύπτει τα αντίστοιχα στοιχεία γνωστοποίησης, όπως εικονογράμματα, προειδοποιητικές λέξεις, δηλώσεις επικινδυνότητας, δηλώσεις προφύλαξης και δελτία δεδομένων ασφαλείας, με τα οποία γνωστοποιούνται πληροφορίες σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις με σκοπό την προστασία των ανθρώπων (εργοδοτών, εργαζομένων, μεταφορέων, καταναλωτών και διασωστών) και του περιβάλλοντος (1).

Κατηγορία 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP: βλ. «Σοβαρή οφθαλμική βλάβη».

Κατηγορία 2 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP: βλ. «Οφθαλμικός ερεθισμός».

Καμία κατηγορία κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP: χημικά προϊόντα που δεν ταξινομούνται ως κατηγορίας 1 ή 2 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP (ή κατηγορίας 2A ή 2B κατά GHS του ΟΗΕ).

UVCB: ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, πολύπλοκα προϊόντα αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά.

▼M8

Β.69 ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ΣΕ ΑΝΑΣΥΣΤΑΘΕΝ ΕΠΙΘΗΛΙΟ ΟΜΟΙΟ ΜΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΗ (RhCE) ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΔΕΝ ΕΠΙΒΑΛΛΕΤΑΙ ΝΑ ΤΑΞΙΝΟΜΗΘΟΥΝ ΚΑΙ ΝΑ ΕΠΙΣΗΜΑΝΘΟΥΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΟΦΘΑΛΜΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΟ Η ΤΗ ΣΟΒΑΡΗ ΟΦΘΑΛΜΙΚΗ ΒΛΑΒΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 492 του ΟΟΣΑ (2017). Η *σοβαρή οφθαλμική βλάβη* αναφέρεται στην πρόκληση βλάβης στους ιστούς των οφθαλμών ή τη σοβαρή μείωση της όρασης, η οποία εμφανίζεται μετά την εφαρμογή υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην εμπρόσθια επιφάνεια του οφθαλμού και δεν είναι πλήρως αναστρέψιμη εντός 21 ημερών από την εφαρμογή της ουσίας, όπως ορίζεται στο Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Ουσιών (GHS) των Ηνωμένων Εθνών (1) και στον κανονισμό (ΕΕ) 1272/2008 για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων (CLP) της Ευρωπαϊκής Ένωσης ([1]). Επίσης, σύμφωνα με το GHS του ΟΗΕ και τον κανονισμό CLP, *οφθαλμικός ερεθισμός* είναι η πρόκληση αλλοιώσεων του οφθαλμού, οι οποίες εμφανίζονται μετά την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην εμπρόσθια επιφάνεια του οφθαλμού και είναι πλήρως αναστρέψιμες εντός 21 ημερών από την εφαρμογή της ουσίας. Οι χημικές ουσίες που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη ταξινομούνται στην κατηγορία 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP, ενώ οι χημικές ουσίες που προκαλούν οφθαλμικό ερεθισμό ταξινομούνται στην κατηγορία 2 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν ταξινομούνται ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη ορίζονται ως εκείνες που δεν πληρούν τις απαιτήσεις για να ταξινομηθούν στην κατηγορία 1 ή 2 (2Α ή 2Β) κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP, και ως εκ τούτου χαρακτηρίζονται «καμίας κατηγορίας κατά GHS του ΟΗΕ και κανονισμό CLP».

2. Η εκτίμηση της σοβαρής οφθαλμικής βλάβης και του οφθαλμικού ερεθισμού πραγματοποιείται κατά κανόνα με τη χρήση πειραματόζωων [μέθοδος δοκιμών Β.5 (2)]. Η επιλογή της καταλληλότερης μεθόδου δοκιμών και η χρήση αυτής είναι ζητήματα που θα πρέπει να εξετάζονται στο πλαίσιο των πληροφοριών που παρέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης «Ολοκληρωμένη προσέγγιση για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση για τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη και τον οφθαλμικό ερεθισμό» του ΟΟΣΑ (39).

3. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών περιγράφεται μια *in vitro* διαδικασία που επιτρέπει τον χαρακτηρισμό χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) για τα οποία δεν απαιτείται ταξινόμηση και επισήμανση ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη σύμφωνα με το GHS του ΟΗΕ και τον κανονισμό CLP. Στη μέθοδο χρησιμοποιείται ανασυσταθέν επιθήλιο όμοιο με ανθρώπινο κερατοειδή (reconstructed human cornea-like epithelium, RhCE), το οποίο μιμείται σε μεγάλο βαθμό τις ιστολογικές, μορφολογικές, βιοχημικές και φυσιολογικές ιδιότητες του επιθηλίου του ανθρώπινου κερατοειδούς. Άλλες τέσσερις επιστημονικά έγκυρες *in vitro* μέθοδοι δοκιμών έχουν επικυρωθεί και εγκριθεί ως μέθοδοι δοκιμών Β.47 (3), Β.48 (4), Β.61 (5) και Β.68 (6) με σκοπό την κάλυψη της παραμέτρου «σοβαρή οφθαλμική βλάβη / οφθαλμικός ερεθισμός» της ανθρώπινης υγείας.

4. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών περιλαμβάνονται δύο επικυρωμένες δοκιμές στις οποίες χρησιμοποιούνται μοντέλα RhCE του εμπορίου. Έχουν διενεργηθεί μελέτες επικύρωσης για την αξιολόγηση του οφθαλμικού ερεθισμού / της σοβαρής οφθαλμικής βλάβης (7)(8)(9)(10)(11)(12)(13) με χρήση της δοκιμής οφθαλμικού ερεθισμού (ΕΙΤ) EpiOcular™ και της δοκιμής οφθαλμικού ερεθισμού (ΕΙΤ) του επιθηλίου του ανθρώπινου κερατοειδούς (HCE) SkinEthic™. Στις δοκιμές αυτές χρησιμοποιούνται εμπορικά διαθέσιμα ιστικά μορφώματα RhCE, τα οποία αναφέρονται στο κείμενο που ακολουθεί

([1]) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων, την τροποποίηση και την κατάργηση των οδηγιών 67/548/ΕΟΚ και 1999/45/ΕΚ και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006, ΕΕ L 353 της 31.12.2008, σ. 1.

▼**M8**

ως «επικυρωμένες μέθοδοι αναφοράς» VRM 1 και VRM2 αντίστοιχα. Με βάση τις εν λόγω μελέτες επικύρωσης και τη σχετική ανεξάρτητη αξιολόγηση από ομοτίμους (9)(12) εξήχθη το συμπέρασμα ότι οι EpiOcular™ EIT και SkinEthic™ HCE EIT μπορούν να χαρακτηρίζουν ορθά τα χημικά προϊόντα (ουσίες και μείγματα) για τα οποία δεν απαιτείται ταξινόμηση και επισήμανση ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό / τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη σύμφωνα με το GHS του ΟΗΕ, και συνιστώνται ως επιστημονικά έγκυρες για τον συγκεκριμένο σκοπό (13).

5. Είναι γενικά αποδεκτό ότι, στο εγγύς μέλλον, καμία μεμονωμένη μέθοδος δοκιμών *in vitro* δεν θα μπορέσει να αντικαταστήσει πλήρως την *in vivo* οφθαλμική δοκιμή Draize (2)(14) από την άποψη της πρόβλεψης του πλήρους φάσματος των αποκρίσεων σοβαρής οφθαλμικής βλάβης / οφθαλμικού ερεθισμού για τις διάφορες χημικές κατηγορίες. Εντούτοις, στοχευμένοι συνδυασμοί διαφόρων εναλλακτικών μεθόδων δοκιμών στο πλαίσιο (κλιμακωτών) στρατηγικών δοκιμών, όπως η ανοδική/καθοδική προσέγγιση, θα μπορούσαν ενδεχομένως να αντικαταστήσουν πλήρως την οφθαλμική δοκιμή Draize (15). Η ανοδική προσέγγιση (15) έχει σχεδιαστεί για χρήση σε περίπτωση που, με βάση τις υπάρχουσες πληροφορίες, μια χημική ουσία δεν αναμένεται να προκαλέσει οφθαλμικό ερεθισμό σε βαθμό που να απαιτείται η ταξινόμησή της, ενώ η καθοδική προσέγγιση (15) έχει σχεδιαστεί για χρήση σε περίπτωση που, με βάση τις υπάρχουσες πληροφορίες, μια χημική ουσία αναμένεται να προκαλέσει σοβαρή οφθαλμική βλάβη. Οι δοκιμές EpiOcular™ EIT και SkinEthic™ HCE EITσυνιστώνται για τον χαρακτηρισμό χημικών ουσιών για τις οποίες δεν επιβάλλεται η ταξινόμηση ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη σύμφωνα με το GHS του ΟΗΕ / τον κανονισμό CLP (καμία κατηγορία) χωρίς τη διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών, στο πλαίσιο στρατηγικής δοκιμών όπως η ανοδική/καθοδική προσέγγιση που προτείνουν οι Scott *et al.*, π.χ. ως αρχικό στάδιο στο πλαίσιο ανοδικής προσέγγισης ή ως ένα από τα τελευταία στάδια μιας καθοδικής προσέγγισης (15). Ωστόσο, οι δοκιμές EpiOcular™ EIT και SkinEthic™ HCE EIT δεν προορίζονται για τη διαφοροποίηση μεταξύ της κατηγορίας 1 (σοβαρή οφθαλμική βλάβη) και της κατηγορίας 2 (οφθαλμικός ερεθισμός) κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP. Η διαφοροποίηση αυτή θα πρέπει να γίνεται σε άλλη βαθμίδα της στρατηγικής δοκιμών (15). Ως εκ τούτου, σε περίπτωση υπό δοκιμή χημικής ουσίας που χαρακτηρίζεται ουσία για την οποία απαιτείται ταξινόμηση ως προς οφθαλμικό ερεθισμό / σοβαρή οφθαλμική βλάβη με τις δοκιμές EpiOcular™ EIT ή SkinEthic™ HCE EIT, θα απαιτηθεί η διεξαγωγή συμπληρωματικών δοκιμών (*in vitro* και/ή *in vivo*) για την εξαγωγή οριστικού συμπεράσματος (καμία κατηγορία, κατηγορία 2 ή κατηγορία 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP), με χρήση, για παράδειγμα, της μεθόδου δοκιμών B.47, B.48, B.61 ή B.68.

6. Σκοπός της παρούσας μεθόδου δοκιμών είναι η περιγραφή της διαδικασίας που εφαρμόζεται για την αξιολόγηση του δυναμικού οφθαλμικού κινδύνου που ενέχει η υπό δοκιμή ουσία, με βάση την ικανότητά της να προκαλεί κυτταροτοξικότητα σε ιστικό μόρφωμα RhCE, όπως μετράται από τη δοκιμή MTT (16) (βλ. παράγραφο 21). Η βιωσιμότητα του ιστού RhCE μετά από έκθεση σε υπό δοκιμή χημική ουσία προσδιορίζεται βάσει σύγκρισης με ιστούς που έχουν υποβληθεί σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα [ποσοστό (%) βιωσιμότητας], και, στη συνέχεια, χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη του δυναμικού οφθαλμικού κινδύνου που ενέχει η υπό δοκιμή χημική ουσία.

7. Υπάρχουν διαθέσιμα πρότυπα επιδόσεων (17) που διευκολύνουν την επικύρωση νέων ή τροποποιημένων *in vitro* δοκιμών που βασίζονται σε RhCE, ανάλογων με τις δοκιμές EpiOcular™ EIT και SkinEthic™ HCE EIT, σύμφωνα με τις αρχές του εγγράφου καθοδήγησης αριθ. 34 του ΟΟΣΑ (18), και επιτρέπουν την έγκαιρη τροποποίηση της TG 492 του ΟΟΣΑ ούτως ώστε να συμπεριληφθούν σε αυτήν. Η αμοιβαία αποδοχή δεδομένων (Mutual Acceptance of Data/MAD) βάσει της συμφωνίας του ΟΟΣΑ είναι διασφαλισμένη μόνο για δοκιμές που έχουν επικυρωθεί σύμφωνα με τα πρότυπα επιδόσεων, εφόσον αυτές έχουν κριθεί από τον ΟΟΣΑ και έχουν περιληφθεί στην αντίστοιχη κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών.

ΟΡΙΣΜΟΙ

8. Οι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

▼**M8**

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

9. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών βασίζεται σε τρισδιάστατα ιστικά μορφώματα RhCE του εμπορίου, που παράγονται είτε με χρήση πρωτογενών κερατινοκυττάρων ανθρώπινης επιδερμίδας (EpiOcular™ OCL-200) είτε ανθρώπινων αθανατοποιημένων επιθηλιακών κυττάρων του κερατοειδούς (SkinEthic™ HCE/S). Τα ιστικά μορφώματα των EpiOcular™ OCL-200 και SkinEthic™ HCE/S RhCE είναι παρόμοια με την *in vivo* τρισδιάστατη δομή του επιθηλίου του κερατοειδούς και παράγονται με χρήση κυττάρων από τα υπό μελέτη είδη (19)(20). Επιπλέον, οι δοκιμές μετρούν απευθείας την κυτταροτοξικότητα που προκύπτει από τη διείσδυση της χημικής ουσίας μέσω του κερατοειδούς και την πρόκληση βλαβών στα κύτταρα και τους ιστούς· στη συνέχεια, το συνολικό αποτέλεσμα της *in vivo* σοβαρής οφθαλμικής βλάβης/οφθαλμικού ερεθισμού προσδιορίζεται βάσει της κυτταροτοξικής απόκρισης. Βλάβες στα κύτταρα μπορούν να προκληθούν με διάφορους τρόπους δράσης (βλ. παράγραφο 20), αλλά η κυτταροτοξικότητα διαδραματίζει σημαντικό, εάν όχι τον κύριο, μηχανιστικό ρόλο όσον αφορά τον χαρακτήρα της απόκρισης συνολικής σοβαρής οφθαλμικής βλάβης/οφθαλμικού ερεθισμού σε μια χημική ουσία, η οποία εκδηλώνεται *in vivo* κυρίως μέσω θολερότητας του κερατοειδούς, ιρίτιδας, ερυθήματος του επιπεφυκότος και/ή οιδήματος του επιπεφυκότος, ανεξαρτήτως των χημικών διεργασιών που οδηγούν στην ιστική βλάβη.

10. Στη μελέτη επικύρωσης της παρούσας μεθόδου δοκιμών ελέγχθηκε ευρύ φάσμα χημικών ουσιών, οι οποίες κάλυπταν μεγάλη ποικιλία τύπων χημικών ουσιών, χημικών κατηγοριών, μοριακών βαρών, logP, χημικών δομών κ.λπ. Η βάση δεδομένων επικύρωσης της EpiOcular™ EIT περιελάμβανε συνολικά 113 χημικές ουσίες, καλύπτοντας 95 διαφορετικές οργανικές λειτουργικές ομάδες, σύμφωνα με την ανάλυση εργαλειοθήκης QSAR του ΟΟΣΑ (8). Αυτές ήταν κυρίως μονοσυστατικές ουσίες, αλλά στη μελέτη περιελήφθησαν επίσης αρκετές πολυσυστατικές ουσίες (περιλαμβανομένων 3 ομοπολυμερών, 5 συμπολυμερών και 10 οιονεί πολυμερών). Σε ό,τι αφορά τη φυσική κατάσταση και τις κατηγορίες GHS του ΟΗΕ/κανονισμού CLP, η κατανομή των 113 χημικών ουσιών που ελέγχθηκαν ήταν η ακόλουθη: 13 υγρά κατηγορίας 1, 15 στερεά κατηγορίας 1, 6 υγρά κατηγορίας 2A, 10 στερεά κατηγορίας 2A, 7 υγρά κατηγορίας 2B, 7 στερεά κατηγορίας 2B, 27 υγρά καμίας κατηγορίας και 28 στερεά καμίας κατηγορίας (8). Η βάση δεδομένων επικύρωσης της SkinEthic™ HCE EIT περιελάμβανε συνολικά 200 χημικές ουσίες, καλύπτοντας 165 διαφορετικές οργανικές λειτουργικές ομάδες (8)(10)(11). Αυτές ήταν κυρίως μονοσυστατικές ουσίες, αλλά στη μελέτη περιελήφθησαν επίσης αρκετές πολυσυστατικές ουσίες (περιλαμβανομένων 10 πολυμερών). Σε ό,τι αφορά τη φυσική κατάσταση και τις κατηγορίες GHS του ΟΗΕ/κανονισμού CLP, η κατανομή των 200 χημικών ουσιών που ελέγχθηκαν ήταν η ακόλουθη: 27 υγρά κατηγορίας 1, 24 στερεά κατηγορίας 1, 19 υγρά κατηγορίας 2A, 10 στερεά κατηγορίας 2A, 9 υγρά κατηγορίας 2B, 8 στερεά κατηγορίας 2B, 50 υγρά καμίας κατηγορίας και 53 στερεά καμίας κατηγορίας (10)(11).

11. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών εφαρμόζεται σε ουσίες και μείγματα, καθώς και σε στερεά, υγρά, ημιστερεά και κηρούς. Τα υγρά μπορεί να είναι υδατικά ή μη· και τα στερεά μπορεί να είναι υδατοδιαλυτά ή μη. Τα στερεά πρέπει, κατά το δυνατόν, να μετατρέπονται σε λεπτόκοκκη σκόνη πριν από την εφαρμογή· δεν απαιτείται άλλη προκατεργασία του δείγματος. Αέρια και αερολύματα δεν έχουν αξιολογηθεί ακόμη με μελέτη επικύρωσης. Παρότι η τεχνολογία RhCE μπορεί θεωρητικά να χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή αερίων και αερολυμάτων, αυτά δεν μπορούν να εξεταστούν με την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

12. Υπό δοκιμή χημικές ουσίες που απορροφούν το φως στο ίδιο φάσμα με το άλας φορμαζάνης MTT (με φυσικό τρόπο ή μετά από αγωγή) και υπό δοκιμή χημικές ουσίες ικανές να ανάγουν άμεσα τη χρωστική ζωτικής χρώσης MTT (σε άλας φορμαζάνης MTT) μπορεί να παρεμποδίζουν τις μετρήσεις βιωσιμότητας των ιστών, καθιστώντας αναγκαία τη χρήση προσαρμοσμένων μαρτύρων για διορθώσεις. Το είδος των προσαρμοσμένων μαρτύρων που μπορεί να απαιτούνται ποικίλλει ανάλογα με το είδος της παρεμποδιστικής δράσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και της χρησιμοποιούμενης διαδικασίας ποσοτικού προσδιορισμού του άλατος φορμαζάνης MTT (βλ. παραγράφους 36-42).

▼**M8**

13. Βάσει των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τις μελέτες προεπικύρωσης (21)(22) και τις πλήρεις μελέτες επικύρωσης (8)(10)(11), κατεδείχθη ότι αμφότερες οι δοκιμές EpiOcular™ EIT και SkinEthic™ HCE EIT μπορούν να διεξαχθούν από εργαστήρια που θεωρείται ότι δεν διαθέτουν πείρα στη διεξαγωγή των δοκιμασιών, καθώς και ότι είναι αναπαραγώγιμες εντός και μεταξύ εργαστηρίων. Με βάση τις εν λόγω μελέτες, το επίπεδο αναπαραγωγιμότητας από την άποψη της συμφωνίας των προβλέψεων που μπορεί να αναμένεται από την EpiOcular™ EIT από δεδομένα για 113 χημικές ουσίες ανέρχεται σε 95 % εντός εργαστηρίου και 93 % μεταξύ εργαστηρίων. Το επίπεδο αναπαραγωγιμότητας από την άποψη της συμφωνίας των προβλέψεων που μπορεί να αναμένεται από τη SkinEthic™ HCE EIT από δεδομένα για 120 χημικές ουσίες ανέρχεται σε 92 % εντός εργαστηρίου και 95 % μεταξύ εργαστηρίων.

14. Η μέθοδος δοκιμών EpiOcular™ EIT μπορεί να χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό χημικών ουσιών που δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη βάσει του συστήματος ταξινόμησης GHS του ΟΗΕ και του κανονισμού CLP. Με βάση τα δεδομένα που προέκυψαν από τη μελέτη επικύρωσης (8), η EpiOcular™ EIT παρουσιάζει συνολική ορθότητα 80 % (βάσει 112 χημικών ουσιών), ευαισθησία 96 % (βάσει 57 χημικών ουσιών), ποσοστό ψευδοαρνητικής έκβασης 4 % (βάσει 57 χημικών ουσιών), ειδικότητα 63 % (βάσει 55 χημικών ουσιών) και ποσοστό ψευδοθετικής έκβασης 37 % (βάσει 55 χημικών ουσιών), σε σύγκριση με δεδομένα αναφοράς της *in vivo* οφθαλμικής δοκιμής σε κουνέλια (μέθοδος δοκιμών B.5) (2)(14) που ταξινομήθηκαν με βάση το σύστημα ταξινόμησης GHS του ΟΗΕ και τον κανονισμό CLP. Βάσει μελέτης στην οποία ελέγχθηκαν 97 υγρά αγροχημικά σκευάσματα με την EpiOcular™ EIT, διαπιστώθηκαν ανάλογες επιδόσεις της μεθόδου δοκιμής για τον συγκεκριμένο τύπο μειγμάτων με εκείνες που προέκυψαν από τη μελέτη επικύρωσης (23). Τα 97 σκευάσματα κατανέμονταν ως εξής: 21 κατηγορίας 1, 19 κατηγορίας 2A, 14 κατηγορίας 2B και 43 καμίας κατηγορίας, τα οποία ταξινομήθηκαν σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης του GHS του ΟΗΕ βάσει δεδομένων αναφοράς της *in vivo* οφθαλμικής δοκιμής σε κουνέλια (μέθοδος δοκιμών B.5) (2)(14). Προέκυψε συνολική ορθότητα 82 % (βάσει 97 σκευασμάτων), ευαισθησία 91 % (βάσει 54 σκευασμάτων), ποσοστό ψευδοαρνητικής έκβασης 9 % (βάσει 54 σκευασμάτων), ειδικότητα 72 % (βάσει 43 σκευασμάτων) και ποσοστό ψευδοθετικής έκβασης 28 % (βάσει 43 σκευασμάτων) (23).

15. Η μέθοδος δοκιμών SkinEthic™ HCE EIT μπορεί να χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό χημικών ουσιών που δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη βάσει του συστήματος ταξινόμησης GHS του ΟΗΕ και του κανονισμού CLP. Με βάση τα δεδομένα που προέκυψαν από τη μελέτη επικύρωσης (10) (11), η SkinEthic™ HCE EIT παρουσιάζει συνολική ορθότητα 84 % (βάσει 200 χημικών ουσιών), ευαισθησία 95 % (βάσει 97 χημικών ουσιών), ποσοστό ψευδοαρνητικής έκβασης 5 % (βάσει 97 χημικών ουσιών), ειδικότητα 72 % (βάσει 103 χημικών ουσιών) και ποσοστό ψευδοθετικής έκβασης 28 % (βάσει 103 χημικών ουσιών), σε σύγκριση με δεδομένα αναφοράς της *in vivo* οφθαλμικής δοκιμής σε κουνέλια (μέθοδος δοκιμών B.5) (2)(14) που ταξινομήθηκαν με βάση το σύστημα ταξινόμησης GHS του ΟΗΕ και τον κανονισμό CLP.

16. Τα ποσοστά ψευδοαρνητικής έκβασης που προέκυψαν και από τις δύο δοκιμές RhCE, είτε με ουσίες είτε με μείγματα, εμπίπτουν στο 12 % συνολικής πιθανότητας χαρακτηρισμού των χημικών ουσιών είτε στην κατηγορία 2 κατά GHS του ΟΗΕ και κανονισμό CLP είτε σε καμία κατηγορία κατά GHS του ΟΗΕ και κανονισμό CLP βάσει της *in vivo* οφθαλμικής δοκιμής Draize, στο πλαίσιο επαναλαμβανόμενων δοκιμών· αυτό οφείλεται στην εγγενή μεταβλητότητα εντός δοκιμής που παρουσιάζει η μέθοδος (24). Τα ποσοστά ψευδοθετικής έκβασης που προέκυψαν και από τις δύο μεθόδους δοκιμών RhCE, είτε με ουσίες είτε με μείγματα, δεν είναι κρίσιμης σημασίας στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών, καθώς για όλες τιςυπό δοκιμή χημικές ουσίες που δίνουν βιωσιμότητα ιστών ίση ή χαμηλότερη από τις καθορισμένες τιμές αποκοπής (βλ. παράγραφο 44) θα απαιτηθούν περαιτέρω δοκιμές με άλλες μεθόδους *in vitro*, ανάλογα με τις κανονιστικές απαιτήσεις, με χρήση στρατηγικής διαδοχικών δοκιμών στο πλαίσιο προσέγγισης βάρους

▼M8

της απόδειξης. Οι εν λόγω μέθοδοι δοκιμών μπορούν να χρησιμοποιούνται για όλους τους τύπους χημικών ουσιών, οπότε και ένα αρνητικό αποτέλεσμα θα πρέπει να γίνεται δεκτό ως λόγος για τη μη ταξινόμηση μιας χημικής ουσίας ως προς οφθαλμικό ερεθισμό και σοβαρή οφθαλμική βλάβη (καμία κατηγορία κατά GHS του ΟΗΕ και κανονισμό CLP). Θα πρέπει να ζητείται η γνώμη των αρμόδιων ρυθμιστικών αρχών πριν από τη χρήση των EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT βάσει συστημάτων ταξινόμησης άλλων εκτός από το GHS του ΟΗΕ / τον κανονισμό CLP.

17. Ένας περιορισμός της παρούσας μεθόδου δοκιμών είναι ότι δεν επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ οφθαλμικού ερεθισμού / αναστρέψιμων επιδράσεων στους οφθαλμούς (κατηγορία 2) και σοβαρής οφθαλμικής βλάβης / μη αναστρέψιμων επιδράσεων στους οφθαλμούς (κατηγορία 1), βάσει του GHS του ΟΗΕ και του κανονισμού CLP, ούτε μεταξύ ερεθιστικών για τους οφθαλμούς (προαιρετική κατηγορία 2A) και ήπιων ερεθιστικών για τους οφθαλμούς (προαιρετική κατηγορία 2B), βάσει του GHS του ΟΗΕ (1). Για τους σκοπούς αυτούς απαιτείται η διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών με άλλες μεθόδους *in vitro*.

18. Ο όρος «υπό δοκιμή χημική ουσία» χρησιμοποιείται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών για να δηλώσει την ύλη που υποβάλλεται σε δοκιμή ([1]) και δεν σχετίζεται με την εφαρμοσιμότητα της μεθόδου δοκιμών RhCE στον έλεγχο ουσιών και/ή μειγμάτων.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

19. Η υπό δοκιμή χημική ουσία εφαρμόζεται τοπικά σε δύο τουλάχιστον τρισδιάστατα ιστικά μορφώματα RhCE και η κυτταρική βιωσιμότητα μετράται μετά την έκθεση και μετά από περίοδο επώασης κατόπιν αγωγής. Οι ιστοί RhCE ανασυστήνονται από πρωτογενή κερατινοκύτταρα ανθρώπινης επιδερμίδας ή αθανατοποιημένα επιθηλιακά κύτταρα ανθρώπινου κερατοειδούς, που έχουν καλλιεργηθεί για αρκετές ημέρες για να σχηματίσουν ένα στρωματοποιημένο, ισχυρά διαφοροποιημένο πλακώδες επιθήλιο, παρόμοιο μορφολογικά με το επιθήλιο του ανθρώπινου κερατοειδούς. Το ιστικό μόρφωμα EpiOcular™ RhCE αποτελείται από τουλάχιστον 3 βιώσιμα στρώματα κυττάρων και μια μη κερατινοποιημένη επιφάνεια, σχηματίζοντας δομή παρόμοια με του κερατοειδούς, ανάλογη με αυτή που παρατηρείται *in vivo*. Το ιστικό μόρφωμα SkinEthic™ HCE RhCE αποτελείται από τουλάχιστον 4 βιώσιμα στρώματα κυττάρων, στα οποία περιλαμβάνονται κυλινδρικά βασικά κύτταρα, μεταβατικά πτερυγοειδή κύτταρα και επιφανειακά πλακώδη κύτταρα, παρόμοια με τα κύτταρα του φυσιολογικού επιθηλίου του ανθρώπινου κερατοειδούς (20)(26).

20. Η σοβαρή οφθαλμική βλάβη / ο οφθαλμικός ερεθισμός που επάγονται από χημικά προϊόντα και εκδηλώνονται *in vivo* κυρίως με θολερότητα του κερατοειδούς, ιρίτιδα, ερύθημα του επιπεφυκότα και/ή οίδημα του επιπεφυκότα, είναι το αποτέλεσμα μιας σειράς διαδοχικών συμβάντων που ξεκινούν με τη διείσδυση της χημικής ουσίας διαμέσου του κερατοειδούς και/ή του επιπεφυκότα και την πρόκληση βλάβης στα κύτταρα. Βλάβη στα κύτταρα μπορεί να προκληθεί με διάφορους τρόπους δράσης, όπως: λύση της κυτταρικής μεμβράνης (π.χ. από επιφανειοδραστικές ουσίες, οργανικούς διαλύτες)· πήξη μακρομορίων (ιδίως πρωτεϊνών) (π.χ. λόγω επιφανειοδραστικών ουσιών, οργανικών διαλυτών, αλκαλίων και οξέων)· σαπωνοποίηση λιπιδίων (π.χ. λόγω αλκαλίων)· και αλκυλίωση ή άλλες ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις με μακρομόρια (π.χ. λόγω λευκαντικών, υπεροξειδίων και αλκυλιωτών) (15)(27)(28). Ωστόσο, έχει καταδειχθεί ότι η κυτταροτοξικότητα διαδραματίζει σημαντικό, αν όχι τον κύριο, μηχανιστικό ρόλο όσον αφορά τη γενική αντίδραση σοβαρής οφθαλμικής βλάβης / οφθαλμικού ερεθισμού σε μια χημική ουσία, ανεξαρτήτως των φυσικοχημικών διεργασιών που προκαλούν την ιστική βλάβη (29)(30). Επιπλέον, το δυναμικό πρόκλησης σοβαρής

([1]) Τον Ιούνιο του 2013, η κοινή συνεδρίαση του ΟΟΣΑ συμφώνησε ότι, όπου είναι δυνατόν, ο όρος «υπό δοκιμή χημική ουσία» που δηλώνει την ύλη που υποβάλλεται σε δοκιμή θα πρέπει να χρησιμοποιείται πλέον με μεγαλύτερη συνέπεια στις νέες και επικαιροποιημένες κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών του ΟΟΣΑ.

▼M8

οφθαλμικής βλάβης / οφθαλμικού ερεθισμού μιας χημικής ουσίας καθορίζεται πρωτίστως από τον βαθμό του αρχικού τραύματος (31), το οποίο συνδέεται με τον βαθμό της κυτταρικής νέκρωσης (29) και με την έκταση των επακόλουθων αποκρίσεων και τελικών εκβάσεων (32). Έτσι, τα ελαφρά ερεθιστικά επηρεάζουν γενικά μόνο το επιφανειακό επιθήλιο του κερατοειδούς, τα ήπια και μέτρια ερεθιστικά προκαλούν βλάβη πρωτίστως στο επιθήλιο και στο επιφανειακό στρώμα, ενώ τα ισχυρά ερεθιστικά προκαλούν βλάβη στο επιθήλιο, το εν τω βάθει στρώμα και, ενίοτε, στο ενδοθήλιο του κερατοειδούς (30)(33). Η μέτρηση της βιωσιμότητας του ιστικού μορφώματος RhCE μετά από τοπική έκθεση σε υπό δοκιμή χημική ουσία για τον προσδιορισμό χημικών ουσιών για τις οποίες δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν ως προς σοβαρή οφθαλμική βλάβη / οφθαλμικό ερεθισμό (καμία κατηγορία κατά GHS του ΟΗΕ και κανονισμό CLP) βασίζεται στην παραδοχή ότι όλες οι χημικές ουσίες που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη ή οφθαλμικό ερεθισμό θα επάγουν κυτταροτοξικότητα στο επιθήλιο του κερατοειδούς και/ή στον επιπεφυκότα.

21. Η βιωσιμότητα του ιστού RhCE μετράται παραδοσιακά με βάση την ενζυμική μετατροπή της χρωστικής ζωτικής χρώσης MTT [βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο· βρωμιούχο τετραζόλιο-κυανό του θειαζολυλίου· αριθ. CAS 298-93-1] από τα βιώσιμα κύτταρα του ιστού σε κυανό άλας φορμαζάνης MTT, το οποίο προσδιορίζεται ποσοτικά μετά την εκχύλισή του από τους ιστούς (16). Ως χημικές ουσίες για τις οποίες δεν επιβάλλεται η ταξινόμηση και η επισήμανση με βάση το GHS του ΟΗΕ / τον κανονισμό CLP (καμία κατηγορία) χαρακτηρίζονται οι ουσίες που δεν μειώνουν τη βιωσιμότητα των ιστών κάτω από ένα καθορισμένο όριο (δηλαδή βιωσιμότητα ιστών > 60 %, στις EpiOcular™ EIT και SkinEthic™ HCE EITL ([1]), ή > 50 % στη SkinEthic™ HCE EITS ([2])) (βλ. παράγραφο 44).

ΑΠΟΔΕΙΞΗ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

22. Πριν από την ένταξη των δοκιμών RhCE στην καθημερινή τους πρακτική για κανονιστικούς σκοπούς, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα πραγματοποιώντας ορθές προβλέψεις για τις δεκαπέντε χημικές ουσίες ελέγχου ικανότητας που απαριθμούνται στον πίνακα 1. Οι εν λόγω χημικές ουσίες επιλέχτηκαν μεταξύ των χημικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες επικύρωσης των επικυρωμένων μεθόδων αναφοράς (8)(10)(11). Η επιλογή περιλαμβάνει, στο μέτρο του δυνατού, χημικές ουσίες οι οποίες: i) καλύπτουν διαφορετικές φυσικές καταστάσεις· ii) καλύπτουν το πλήρες φάσμα αποκρίσεων σοβαρής οφθαλμικής βλάβης / οφθαλμικού ερεθισμού *in vivo* βάσει αποτελεσμάτων υψηλής ποιότητας που προέκυψαν από την *in vivo* οφθαλμική δοκιμή αναφοράς σε κουνέλια (μέθοδος δοκιμών B.5) (2)(14), το σύστημα ταξινόμησης GHS του ΟΗΕ (κατηγορίες 1, 2A, 2B, ή καμία κατηγορία) (1) και το σύστημα ταξινόμησης του κανονισμού CLP (κατηγορίες 1, 2 ή καμία κατηγορία)· iii) καλύπτουν τους διάφορους παράγοντες ταξινόμησης *in vivo* (24)(25)· iv) είναι αντιπροσωπευτικές των χημικών κατηγοριών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη επικύρωσης (8)(10)(11)· v) καλύπτουν ένα ορθό και ευρύ αντιπροσωπευτικό μέρος των οργανικών λειτουργικών ομάδων (8)(10)(11)· vi) έχουν καλά προσδιορισμένες χημικές δομές (8)(10)(11)· vii) είναι έγχρωμες και/ή άμεσα αναγωγικά της MTT· viii) παρήγαγαν αναπαραγώγιμα αποτελέσματα στις μεθόδους δοκιμών RhCE στη διάρκεια των σχετικών επικυρώσεων· ix) προβλέφθηκαν σωστά από τις μεθόδους δοκιμών RhCE στη διάρκεια των σχετικών μελετών επικύρωσης· x) καλύπτουν το πλήρες φάσμα των *in vitro* αποκρίσεων βάσει δεδομένων μεθόδων δοκιμών RhCE υψηλής ποιότητας (βιωσιμότητα 0 έως 100 %)· xi) διατίθενται στο εμπόριο· και xii) δεν έχουν απαγορευτικό κόστος απόκτησης και/ή απόρριψης. Σε περιπτώσεις στις οποίες μια απαριθμούμενη χημική ουσία δεν είναι διαθέσιμη ή δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για άλλους βάσιμους λόγους, μπορεί να χρησιμοποιείται άλλη χημική ουσία, π.χ. από τις χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την επικύρωση της επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς (VRM). Τέτοιες αποκλίσεις θα πρέπει ωστόσο να αιτιολογούνται.

([1]) EITL: EIT για υγρά στην περίπτωση της SkinEthic™ HCE
([2]) EITS: EIT για στερεά στην περίπτωση της SkinEthic™ HCE

▼**M8**

Πίνακας 1

Κατάλογος χημικών ουσιών ελέγχου ικανότητας

Χημική ονομασία	CASRN	Οργανική λειτουργική ομάδα (1)	Φυσική κατάσταση	Βιωσιμότητα VRM1 (%) (2)	Βιωσιμότητα VRM2 (%) (3)	Πρόβλεψη VRM	Αναγωγικό της MTT	Παρεμπόδιση λόγω χρώματος
***In vivo* κατηγορία 1** (4)								
Θειογλυκολικός μεθυλεστέρας	2365-48-2	Εστέρας καρβοξυλικού οξέος· θειοαλκοόλη	Υ	10,9±6,4	5,5±7,4	Αδύνατη η διατύπωση πρόβλεψης	Ναι (ισχυρό)	Όχι
Ακρυλικό υδροξυαιθύλιο	818-61-1	Ακρυλική ένωση· αλκοόλη	Υ	7,5±4,7 (5)	1,6±1,0	Αδύνατη η διατύπωση πρόβλεψης	Όχι	Όχι
2,5-Διμεθυλο-2,5-εξανοδιόλη	110-03-2	Αλκοόλη	Σ	2,3±0,2	0,2±0,1	Αδύνατη η διατύπωση πρόβλεψης	Όχι	Όχι
Οξαλικό νάτριο	62-76-0	Οξοκαρβοξυλικό οξύ	Σ	29,0±1,2	5,3±4,1	Αδύνατη η διατύπωση πρόβλεψης	Όχι	Όχι
***In vivo* κατηγορία 2A** (4)								
Δι-D-γλυκονικό N,N''-δις(4-χλωροφαινυλο)-3,12-διιμινο-2,4,11,13-τετρααζαδεκατετρανοδιιμιδαμίδιο (20 %, υδατικό) (6)	18472-51-0	Αρωματικό ετεροκυκλικό αλογονίδιο· αρυλαλογονίδιο· διυδροξυλική ομάδα· γουανιδίνη	Υ	4,0±1,1	1,3±0,6	Αδύνατη η διατύπωση πρόβλεψης	Όχι	Ναι (ασθενές)
Βενζοϊκό νάτριο	532-32-1	Αρύλιο· καρβοξυλικό οξύ	Σ	3,5±2,6	0,6±0,1	Αδύνατη η διατύπωση πρόβλεψης	Όχι	Όχι
***In vivo* κατηγορία 2B** (4)								
Διαιθυλοτολουαμίδιο	134-62-3	Βενζαμίδιο	Υ	15,6±6,3	2,8±0,9	Αδύνατη η διατύπωση πρόβλεψης	Όχι	Όχι
2,2-Διμεθυλο-3-μεθυλενοδικυκλο[2.2.1]επτάνιο	79-92-5	Αλκάνιο, διακλαδισμένο με τριτοταγές άτομο άνθρακα· αλκένιο· δικυκλοεπτάνιο· καρβοκυκλικές ενώσεις γεφυρωμένων δακτυλίων· κυκλοαλκάνιο	Σ	4,7±1,5	15,8±1,1	Αδύνατη η διατύπωση πρόβλεψης	Όχι	Όχι
Καμία κατηγορία *in vivo* (4)								
Αιθυλοθειικό 1-αιθυλο-3-μεθυλιμιδαζόλιο	342573-75-5	Αλκοξύ· αμμωνιακό άλας· αρύλιο· ιμιδαζόλιο· θειικό άλας	Υ	79,9±6,4	79,4±6,2	Καμία κατηγορία	Όχι	Όχι

▼**M8**

Χημική ονομασία	CASRN	Οργανική λειτουργική ομάδα ([1])	Φυσική κατάσταση	Βιωσιμότητα VRM1 (%) ([2])	Βιωσιμότητα VRM2 (%) ([3])	Πρόβλεψη VRM	Αναγωγικό της MTT	Παρεμπόδιση λόγω χρώματος
Δικαπρυλυλικός αιθέρας	629-82-3	Αλκοξύ· αιθέρας	Υ	97,8±4,3	95,2±3,0	Καμία κατηγορία	Όχι	Όχι
Πιπερονυλοβουτοξείδιο	51-03-6	Αλκοξύ· βενζοδιοξόλη· βενζύλιο· αιθέρας	Υ	104,2±4,2	96,5±3,5	Καμία κατηγορία	Όχι	Όχι
Πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG-40) υδρογονωμένο ρικινέλαιο	61788-85-0	Ακυλάλη· αλκοόλη· αλλύλιο· αιθέρας	Παχύρρευστο	77,6±5,4	89,1±2,9	Καμία κατηγορία	Όχι	Όχι
1-(4-Χλωροφαινυλο)-3-(3,4-διχλωροφαινυλ)ουρία	101-20-2	Αρωματικό ετεροκυκλικό αλογονίδιο· αρυλαλογονίδιο· παράγωγα ουρίας	Σ	106,7±5,3	101,9±6,6	Καμία κατηγορία	Όχι	Όχι
2,2'-Μεθυλενοδις(6-(2H)-βενζοτριαζολ-2-υλο)-4-(1,1,3,3-τετραμεθυλοβουτυλο)-φαινόλη)	103597-45-1	Αλκάνιο, διακλαδισμένο με τεταρτοταγές άτομο άνθρακα· συμπυκνωμένες καρβοκυκλικές αρωματικές ενώσεις· συμπυκνωμένες κορεσμένες ετεροκυκλικές ενώσεις· πρόδρομες κινοειδείς ενώσεις· tert-βουτύλιο	Σ	102,7±13,4	97,7±5,6	Καμία κατηγορία	Όχι	Όχι
Τετραφθοροβορικό κάλιο	14075-53-7	Ανόργανο άλας	Σ	88,6±3,3	92,9±5,1	Καμία κατηγορία	Όχι	Όχι

Συντομογραφίες:
CASRN = αριθμός μητρώου της υπηρεσίας Chemical Abstracts Service· GHS του ΟΗΕ = Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Προϊόντων των Ηνωμένων Εθνών (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) (1)· VRM1 = επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς, EpiOcular™ EIT· VRM2 = επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς, SkinEthic™ HCE EIT· Παρεμπόδιση λόγω χρώματος = παρεμπόδιση, λόγω χρώματος, της τυπικής μέτρησης απορρόφησης [οπτικής πυκνότητας (OD)] της φορμαζάνης MTT.

([1]) Οργανική λειτουργική ομάδα που αποδίδεται σύμφωνα με ένθετη ανάλυση εργαλειοθήκης 3.1 του ΟΟΣΑ (8).

([2]) Βάσει των αποτελεσμάτων που προέκυψαν με την EpiOcular™ EIT στη μελέτη επικύρωσης οφθαλμικού ερεθισμού του EURL ECVAM/Cosmetics Europe (EIVS) (8).

([3]) Βάσει των αποτελεσμάτων που προέκυψαν με τη SkinEthic™ HCE EIT στη μελέτη επικύρωσης (10)(11).

([4]) Βάσει των αποτελεσμάτων της *in vivo* οφθαλμικής δοκιμής σε κουνέλια (μέθοδος δοκιμών B.5/TG 405 του ΟΟΣΑ) (2)(14) και σύμφωνα με το GHS του ΟΗΕ.

([5]) Βάσει των αποτελεσμάτων που προέκυψαν στην CEFIC CONsortium για την *in vitro* μελέτη (CON4EI) στρατηγικής δοκιμών οφθαλμικού ερεθισμού.

([6]) Η ταξινόμηση στην κατηγορία 2A ή 2B εξαρτάται από την ερμηνεία του κριτηρίου του GHS του ΟΗΕ για τη διάκριση μεταξύ αυτών των δύο κατηγοριών, δηλ. για την κατάταξη στην κατηγορία 2A είναι απαραίτητο να εμφανίζουν επιδράσεις την 7η ημέρα 1 από τα 3 ζώα έναντι 2 από τα 3 ζώα. Η μελέτη *in vivo* περιλάμβανε 3 ζώα. Όλες οι παράμετροι, εκτός από τη θολερότητα του κερατοειδούς σε ένα ζώο, επανήλθαν σε μηδενική βαθμολογία την ημέρα 7 ή νωρίτερα. Το ένα ζώο που δεν είχε αναρρώσει πλήρως την ημέρα 7 παρουσίαζε θολερότητα του κερατοειδούς βαθμού 1 (την ημέρα 7) η οποία είχε υποχωρήσει πλήρως την ημέρα 9.

23. Στο πλαίσιο της δοκιμής απόδειξης ικανότητας, συνιστάται να ελέγχουν οι χρήστες τις ιδιότητες φραγμού των ιστών σύμφωνα με τις προδιαγραφές του παραγωγού των ιστικών μορφωμάτων RhCE, μετά την παραλαβή τους (βλ. παραγράφους 25, 27 και 30). Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία στις περιπτώσεις μεταφοράς των ιστών σε μεγάλες αποστάσεις/με μεγάλη διάρκεια. Μετά την επιτυχή εδραίωση μιας δοκιμής και αφού επιτευχθεί και αποδειχθεί η ικανότητα χρήσης της, ο εν λόγω έλεγχος δεν είναι απαραίτητος ως συνήθης πρακτική. Παρόλα αυτά, όταν η δοκιμή εισάγεται στη συνήθη πρακτική, συνιστάται να συνεχίζεται η αξιολόγηση των ιδιοτήτων φραγμού σε τακτά διαστήματα.

▼M8

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

24. Επί του παρόντος, η παρούσα μέθοδος δοκιμών καλύπτει τις επιστημονικά έγκυρες δοκιμές EpiOcular™ EIT και SkinEthic™ HCE EIT (9)(12)(13), που αναφέρονται ως «επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς» (VRM1 και VRM2 αντίστοιχα). Οι τυποποιημένες διαδικασίες λειτουργίας (SOP) για τις μεθόδους δοκιμών RhCE είναι διαθέσιμες και θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατά την εφαρμογή και τη χρήση των μεθόδων δοκιμών στο εργαστήριο (34)(35). Στις ακόλουθες παραγράφους και στο προσάρτημα 2 περιγράφονται τα κύρια στοιχεία και διαδικασίες των δοκιμών RhCE.

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ RHCE

Γενικοί όροι

25. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σχετικά κύτταρα ανθρώπινης προέλευσης για την ανασύσταση του τρισδιάστατου ιστού επιθηλίου παρόμοιου με του κερατοειδούς, ο οποίος θα πρέπει να αποτελείται από σταδιακώς στρωματοποιημένα αλλά όχι κερατινοποιημένα κύτταρα. Το ιστικό μόρφωμα RhCE παρασκευάζεται σε ενθέματα με πορώδη συνθετική μεμβράνη μέσω της οποίας μπορούν να διέρχονται οι θρεπτικές ουσίες προς τα κύτταρα. Στο παρόμοιο με κερατοειδή ανασυσταθέν επιθήλιο θα πρέπει να υπάρχουν πολλαπλές στοιβάδες βιώσιμων, μη κερατινοποιημένων επιθηλιακών κυττάρων. Η επιθηλιακή επιφάνεια του ιστικού μορφώματος RhCE θα πρέπει να βρίσκεται σε άμεση επαφή με τον αέρα ώστε να επιτρέπεται η άμεση τοπική έκθεση στις υπό δοκιμή χημικές ουσίες κατά τρόπο ανάλογο με αυτόν διά του οποίου θα εκτίθετο το επιθήλιο του κερατοειδούς *in vivo*. Το ιστικό μόρφωμα RhCE θα πρέπει να σχηματίζει λειτουργικό φραγμό, ανθεκτικό στην ταχεία διείσδυση των κυτταροτοξικών ουσιών συγκριτικής αξιολόγησης, π.χ. Triton X-100 ή δωδεκυλοσουλφονικού νατρίου (SDS). Η λειτουργία φραγμού θα πρέπει να αποδεικνύεται και μπορεί να αξιολογείται μέσω του προσδιορισμού είτε του χρόνου έκθεσης που απαιτείται για τη μείωση της βιωσιμότητας των ιστών κατά 50 % (ET_{50}) κατά την εφαρμογή ουσίας συγκριτικής αξιολόγησης σε καθορισμένη, σταθερή συγκέντρωση (π.χ. 100 μl Triton X-1000,3 % κ.ό.) είτε της συγκέντρωσης στην οποία μια ουσία συγκριτικής αξιολόγησης μειώνει τη βιωσιμότητα των ιστών κατά 50 % (IC_{50}) μετά από καθορισμένο χρόνο διάστημα έκθεσης (π.χ. 30 λεπτά αγωγής με 50 μl SDS) (βλ. παράγραφο 30). Οι ιδιότητες συγκράτησης του ιστικού μορφώματος RhE θα πρέπει να αποτρέπουν την παράκαμψη του βιώσιμου ιστού από την υπό δοκιμή χημική ουσία, η οποία μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα ατελή μοντελοποίηση της έκθεσης του κερατοειδούς. Τα κύτταρα ανθρώπινης προέλευσης που χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία του ιστικού μορφώματος RhCE θα πρέπει να είναι ελεύθερα μολύνσεων από βακτήρια, ιούς, μυκόπλασμα και μύκητες. Ο προμηθευτής θα πρέπει να ελέγχει τη στειρότητα του ιστικού μορφώματος ως προς την απουσία μόλυνσης από μύκητες και βακτήρια.

Λειτουργικοί όροι

Βιωσιμότητα

26. Για τον προσδιορισμό της τάξης μεγέθους της βιωσιμότητας χρησιμοποιείται η δοκιμασία MTT (16). Τα βιώσιμα κύτταρα του ιστικού μορφώματος RhCE ανάγουν τη χρωστική ζωτικής χρώσης MTT σε κυανό ίζημα άλατος φορμαζάνης MTT, το οποίο εκχυλίζεται στη συνέχεια από τον ιστό με χρήση ισοπροπανόλης (ή παρεμφερούς διαλύτη). Η τάξη μεγέθουςτου εκχυλισθέντος άλατος φορμαζάνης MTT μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με χρήση είτε τυπικής μέτρησης απορρόφησης [οπτικής πυκνότητας (OD)] είτε μέσω διαδικασίας HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας (36). Η οπτική πυκνότητα του διαλύτη εκχύλισης πρέπει να είναι αρκούντως χαμηλή, δηλαδή μικρότερη από 0,1. Οι χρήστες του ιστικού μορφώματος RhCE πρέπει να εξασφαλίζουν ότι κάθε παρτίδα του ιστικού μορφώματος RhCE πληροί καθορισμένα κριτήρια για τον αρνητικό μάρτυρα. Στον πίνακα 2 φαίνονται οι αποδεκτές κλίμακες τιμών οπτικής πυκνότητας του αρνητικού μάρτυρα για τις επικυρωμένες μεθόδους αναφοράς. Οι χρήστες HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας θα πρέπει να χρησιμοποιούν τις κλίμακες τιμών οπτικής πυκνότητας αρνητικού μάρτυρα που φαίνονται στον πίνακα 2 ως κριτήριο αποδοχής για τον αρνητικό μάρτυρα. Θα πρέπει να τεκμηριώνεται στην έκθεση δοκιμής ότι οι ιστοί που υποβάλλονται σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα είναι σταθεροί σε καλλιέργεια (δηλαδή δίνουν παραπλήσιες τιμές στις μετρήσεις βιωσιμότητας ιστού) για τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης της δοκιμής. Ο παρασκευαστής του ιστού θα πρέπει να ακολουθεί ανάλογη διαδικασία στο πλαίσιο του ποιοτικού ελέγχου για την αποδέσμευση παρτίδων ιστών,

▼M8

αλλά στη συγκεκριμένη περίπτωση ενδέχεται να ισχύουν διαφορετικά κριτήρια αποδοχής από εκείνα που φαίνονται στον πίνακα 2. Ο φορέας ανάπτυξης/προμηθευτής του ιστικού μορφώματος RhCE θα πρέπει να προσδιορίζει κλίμακα τιμών αποδοχής (ανώτερο και κατώτερο όριο) για τις τιμές OD αρνητικού μάρτυρα (στις συνθήκες της μεθόδου δοκιμών ποιοτικού ελέγχου).

Πίνακας 2

Κλίμακες τιμών αποδοχής για τις τιμές OD αρνητικού μαρτύρα (για τους χρήστες της δοκιμής)

Δοκιμή	Κατώτερο όριο αποδοχής	Ανώτερο όριο αποδοχής
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (για τα πρωτόκολλα υγρών και στερεών)	> 0,8 ([1])	< 2,5
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (για τα πρωτόκολλα υγρών και στερεών)	> 1,0	≤ 2,5

([1]) Για το εν λόγω όριο αποδοχής λαμβάνεται υπόψη η πιθανότητα αποστολής/αποθήκευσης παρατεταμένης διάρκειας (π.χ. > 4 ημέρες), η οποία έχει αποδειχθεί ότι δεν επηρεάζει τις επιδόσεις της μεθόδου δοκιμών (37).

Λειτουργία φραγμού

27. Το ιστικό μόρφωμα RhCE θα πρέπει να είναι αρκούντως παχύ και ανθεκτικό ώστε να ανθίσταται στην ταχεία διείσδυση των κυτταροτοξικών ουσιών συγκριτικής αξιολόγησης, όπως εκτιμάται π.χ. βάσει της ET_{50} (Triton X-100) ή της IC_{50} (SDS) (πίνακας 3). Η φραγματική λειτουργία κάθε παρτίδας του ιστικού μορφώματος RhCE θα πρέπει να καταδεικνύεται από τον φορέα ανάπτυξης/πωλητή του ιστικού μορφώματος RhCE κατά την προμήθεια των ιστών στον τελικό χρήστη (βλ. παράγραφο 30).

Μορφολογία

28. Η ιστολογική εξέταση του ιστικού μορφώματος RhCE θα πρέπει να αναδεικνύει δομή επιθηλίου παρόμοιου με ανθρώπινο κερατοειδή (που να περιλαμβάνει τουλάχιστον 3 στοιβάδες βιώσιμων επιθηλιακών κυττάρων και μη κερατινοποιημένη επιφάνεια). Για τις επικυρωμένες μεθόδους αναφοράς, η κατάλληλη μορφολογία έχει εξακριβωθεί από τον φορέα ανάπτυξης/προμηθευτή και, ως εκ τούτου, δεν είναι απαραίτητο να καταδεικνύεται εκ νέου από χρήστη της μεθόδου δοκιμών για κάθε χρησιμοποιούμενη παρτίδα ιστών.

Αναπαραγωγιμότητα

29. Τα αποτελέσματα για τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες της μεθόδου δοκιμών πρέπει να εμφανίζουν διαχρονική αναπαραγωγιμότητα.

Έλεγχος ποιότητας

30. Το ιστικό μόρφωμα RhCE θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο εφόσον ο φορέας ανάπτυξης/προμηθευτής αποδεικνύει ότι κάθε παρτίδα του ιστικού μορφώματος RhCE ανταποκρίνεται σε καθορισμένα κριτήρια αποδέσμευσης παρτίδων παραγωγής, τα σημαντικότερα από τα οποία είναι εκείνα που αφορούν τη βιωσιμότητα (παράγραφος 26) και τη λειτουργία φραγμού (παράγραφος 27). Ο φορέας ανάπτυξης/προμηθευτής του ιστικού μορφώματος RhCE θα πρέπει να καθορίζει κλίμακα τιμών αποδοχής (ανώτερα και κατώτερα όρια) για τις λειτουργίες φραγμού όπως μετράται από τις ET_{50} ή IC_{50} (βλ. παραγράφους 25 και 26). Η κλίμακα τιμών αποδοχής των ET_{50} και IC_{50} που χρησιμοποιείται ως κριτήριο αποδέσμευσης παρτίδων ποιοτικού ελέγχου από τον φορέα ανάπτυξης/προμηθευτή των ιστικών μορφωμάτων RhCE (που χρησιμοποιούνται στις επικυρωμένες μεθόδους αναφοράς) φαίνεται στον πίνακα 3. Ο φορέας ανάπτυξης/προμηθευτής του ιστικού μορφώματος RhCE θα πρέπει να παρέχει στους χρήστες της μεθόδου δοκιμών στοιχεία που καταδεικνύουν τη συμμόρφωση με το σύνολο των κριτηρίων αποδέσμευσης παρτίδων παραγωγής ώστε να μπορούν να συμπεριλαμβάνουν τις εν λόγω πληροφορίες στην έκθεση δοκιμής. Μόνο αποτελέσματα που προκύπτουν με ιστούς που πληρούν όλα αυτά τα κριτήρια αποδέσμευσης παρτίδων παραγωγής μπορούν να γίνονται δεκτά για την πραγματοποίηση αξιόπιστης πρόβλεψης σχετικά με χημικές ουσίες που δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν και να επισημανθούν ως ουσίες που προκαλούν οφθαλμικό ερεθισμό ή σοβαρή οφθαλμική βλάβη με βάση το GHS του ΟΗΕ / τον κανονισμό CLP.

▼M8

Πίνακας 3

Κριτήριο ποιοτικού ελέγχου για την αποδέσμευση παρτίδων

Δοκιμή	Κατώτερο όριο αποδοχής	Ανώτερο όριο αποδοχής
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (100 μl Triton X-1000,3 % κ.ό.)	ET_{50} = 12,2 min	ET_{50} = 37,5 min
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (αγωγή 30 λεπτών με 50 μl SDS)	IC_{50} = 1 mg/ml	IC_{50} = 3,2 mg/ml

Εφαρμογή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων

31. Σε κάθε σειρά δοκιμών πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον δύο πανομοιότυπα δείγματα ιστού για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία και κάθε μάρτυρα. Χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικά πρωτόκολλα αγωγής, ένα για τις υγρές και ένα για τις στερεές υπό δοκιμή χημικές ουσίες (34)(35). Και για τις δύο μεθόδους, και για τα δύο πρωτόκολλα, η επιφάνεια των ιστών θα πρέπει να διαβρέχεται με αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων Dulbecco ελεύθερο ασβεστίου και μαγνησίου (DPBS ελεύθερο Ca^{2+}/Mg^{2+}) πριν από την εφαρμογή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών, ώστε να προσομοιώνονται οι συνθήκες υγρασίας των ανθρώπινων οφθαλμών. Η αγωγή των ιστών ξεκινά με την έκθεση στην υπό δοκιμή χημική ουσία ή ουσίες και τους μάρτυρες. Και για τα δύο πρωτόκολλα αγωγής σε αμφότερες τις επικυρωμένες μεθόδους αναφοράς, θα πρέπει να εφαρμόζεται επαρκής ποσότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ή μάρτυρα ώστε να καλύπτεται ομοιόμορφα η επιφάνεια του επιθηλίου και, ταυτόχρονα, να αποφεύγονται οι πλεονάζουσες δόσεις (βλ. παραγράφους 32 και 33) (προσάρτημα 2).

32. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που μπορούν να φέρονται με σιφώνιο (πιπέτα) στους 37 °C ή σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (με χρήση σιφωνίου θετικής εκτόπισης, εάν χρειάζεται) αντιμετωπίζονται ως υγρά στις επικυρωμένες μεθόδους αναφοράς, διαφορετικά θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως στερεά (βλ. παράγραφο 33). Στις επικυρωμένες μεθόδους αναφοράς, οι υγρές υπό δοκιμή χημικές ουσίες επιστρώνονται ομοιόμορφα στην επιφάνεια των ιστών (δηλ. εφαρμόζονται τουλάχιστον 60 μl/cm^2) (βλ. προσάρτημα 2) (33)(34). Τα τριχοειδή φαινόμενα (φαινόμενα επιφανειακής τάσης) που μπορεί να εμφανιστούν λόγω των χαμηλών όγκων που εφαρμόζονται στο ένθεμα (στην επιφάνεια του ιστού) θα πρέπει να αποφεύγονται, στο μέτρο του δυνατού, ούτως ώστε να εξασφαλίζεται η χορήγηση της ορθής ποσότητας δόσεων στον ιστό. Οι ιστοί που υποβάλλονται σε αγωγή με υγρές υπό δοκιμή χημικές ουσίες επωάζονται επί 30 λεπτά σε τυπικές συνθήκες καλλιέργειας (37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥ 95 % RH). Στο τέλος της περιόδου έκθεσης, η υγρή υπό δοκιμή χημική ουσία και οι μάρτυρες θα πρέπει να αφαιρούνται προσεκτικά από την επιφάνεια των ιστών μέσω διεξοδικής έκπλυσης με DPBS ελεύθερο Ca^{2+}/Mg^{2+} σε θερμοκρασία δωματίου. Το στάδιο έκπλυσης ακολουθείται από εμβύθιση μετά την έκθεση σε πρόσφατο θρεπτικό μέσο σε θερμοκρασία δωματίου (για την αφαίρεση τυχόν χημικής ουσίας που έχει απορροφηθεί από τον ιστό) για προκαθορισμένο χρονικό διάστημα, η διάρκεια του οποίου εξαρτάται από τη χρησιμοποιούμενη επικυρωμένη μέθοδο αναφοράς. Μόνο για τη VMR1, πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμασίας MTT εφαρμόζεται επώαση μετά την έκθεση σε πρόσφατο θρεπτικό μέσο σε τυπικές συνθήκες καλλιέργειας [βλ. προσάρτημα 2, (34)(35)].

33. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν φέρονται με σιφώνιο σε θερμοκρασίες έως 37 °C αντιμετωπίζονται ως στερεά στις επικυρωμένες μεθόδους αναφοράς (VRM). Η υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να εφαρμόζεται σε επαρκή ποσότητα ώστε να καλύπτει ολόκληρη την επιφάνεια του ιστού, θα πρέπει δηλαδή να εφαρμόζονται τουλάχιστον 60 mg/cm^2 (προσάρτημα 2). Τα στερεά θα πρέπει, κατά το δυνατόν, να ελέγχονται σε μορφή λεπτόκοκκης σκόνης. Οι ιστοί που υποβάλλονται σε αγωγή με στερεές υπό δοκιμή χημικές ουσίες επωάζονται για προκαθορισμένο χρονικό διάστημα (ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη επικυρωμένη μέθοδο αναφοράς) σε τυπικές συνθήκες καλλιέργειας [βλ. προσάρτημα 2, (34) (35)]. Στο τέλος της περιόδου έκθεσης, η στερεή υπό δοκιμή χημική ουσία και οι μάρτυρες θα πρέπει να αφαιρούνται προσεκτικά από την επιφάνεια των ιστών μέσω διεξοδικής

▼M8

έκπλυσης με DPBS ελεύθερο Ca^{2+}/Mg^{2+} σε θερμοκρασία δωματίου. Το στάδιο έκπλυσης ακολουθείται από εμβύθιση μετά την έκθεση σε πρόσφατο θρεπτικό μέσο σε θερμοκρασία δωματίου (για την αφαίρεση τυχόν χημικής ουσίας που έχει απορροφηθεί από τον ιστό) για προκαθορισμένο χρονικό διάστημα, η διάρκεια του οποίου εξαρτάται από τη χρησιμοποιούμενη επικυρωμένη μέθοδο αναφοράς, και επώαση μετά την έκθεση σε πρόσφατο θρεπτικό μέσο σε τυπικές συνθήκες καλλιέργειας, πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμασίας MTT [βλ. προσάρτημα 2 (34)(35)].

34. Σε κάθε σειρά δοκιμών θα πρέπει να περιλαμβάνονται αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες προκειμένου να καταδεικνύεται ότι η βιωσιμότητα (που προσδιορίζεται με τον αρνητικό μάρτυρα) και η ευαισθησία (που προσδιορίζεται με τον θετικό μάρτυρα) των ιστών περιλαμβάνονται εντός της κλίμακας τιμών αποδοχής που καθορίζονται βάσει των ιστορικών δεδομένων. Ο παράλληλος αρνητικός μάρτυρας παρέχει επίσης τη γραμμή βάσης (βιωσιμότητα ιστού 100 %) για τον υπολογισμό της σχετικής εκατοστιαίας βιωσιμότητας των ιστών που υποβάλλονται σε αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία (%$Viability_{test}$). Η συνιστώμενη ουσία θετικού μάρτυρα προς χρήση με τις επικυρωμένες μεθόδους αναφοράς (VRM) είναι ο αμιγής οξικός μεθυλεστέρας (αριθ. CAS 79-20-9, διατίθεται στο εμπόριο μεταξύ άλλων από τη Sigma-Aldrich, αριθ. κατ. 45997, υγρό). Οι συνιστώμενες ουσίες αρνητικού μάρτυρα προς χρήση με τις επικυρωμένες μεθόδους αναφοράς VRM1 και VRM2 είναι το υπερκαθαρό H_2O και το DPBS ελεύθερο Ca^{2+}/Mg^{2+} αντίστοιχα. Αυτές ήταν οι ουσίες μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες επικύρωσης των επικυρωμένων μεθόδων αναφοράς και είναι οι ουσίες μάρτυρες για τις οποίες υπάρχουν τα περισσότερα ιστορικά δεδομένα. Η χρήση κατάλληλων εναλλακτικών θετικών ή αρνητικών μαρτύρων θα πρέπει να αιτιολογείται επαρκώς επιστημονικά. Οι αρνητικοί και οι θετικοί μάρτυρες θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή με το ή τα ίδια πρωτόκολλα με αυτά που χρησιμοποιούνται για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες που περιλαμβάνονται στη σειρά δοκιμών (δηλ. για τα υγρά και/ή τα στερεά). Η εφαρμογή θα πρέπει να ακολουθείται από έκθεση αγωγής, έκπλυση, εμβύθιση μετά την έκθεση, και επώαση μετά την έκθεση κατά περίπτωση, όπως περιγράφεται για τους μάρτυρες που υποβάλλονται σε δοκιμή παράλληλα με τις υγρές υπό δοκιμή χημικές ουσίες (βλ. παράγραφο 32) ή για τους μάρτυρες που υποβάλλονται σε δοκιμή παράλληλα με τις στερεές υπό δοκιμή χημικές ουσίες (βλ. παράγραφο 33), πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμασίας MTT (βλ. παράγραφο 35) (34)(35). Ένα μόνο σύνολο αρνητικών και θετικών μαρτύρων αρκεί για όλες τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες της ίδιας φυσικής κατάστασης (υγρά ή στερεά) που περιλαμβάνονται στην ίδια σειρά δοκιμών.

Μετρήσεις βιωσιμότητας ιστών

35. Η δοκιμασία MTT αποτελεί τυποποιημένη ποσοτική μέθοδο (16) η οποία πρέπει να χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της βιωσιμότητας των ιστών στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών. Είναι συμβατή με τη χρήση σε τρισδιάστατο ιστικό μόρφωμα. Η δοκιμασία MTT διεξάγεται αμέσως μετά την περίοδο επώασης μετά την έκθεση. Στις επικυρωμένες μεθόδους αναφοράς (VRM), το δείγμα ιστικού μορφώματος RhCE τοποθετείται σε 0,3 ml διαλύματος MTT 1 mg/ml επί 180±15 λεπτά σε τυπικές συνθήκες καλλιέργειας. Η χρωστική ζωτικής χρώσης MTT ανάγεται σε κυανό ίζημα άλατος φορμαζάνης MTT από τα βιώσιμα κύτταρα του ιστικού μορφώματος RhCE. Στη συνέχεια, εκχυλίζεται από τον ιστό το σχηματιζόμενο κυανό ίζημα άλατος φορμαζάνης MTT με χρήση κατάλληλου όγκου ισοπροπανόλης (ή παρεμφερούς διαλύτη) (34)(35). Οι ιστοί που υποβάλλονται σε δοκιμή με υγρές υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να εκχυλίζονται από το επάνω και το κάτω μέρος των ιστών, ενώ οι ιστοί που υποβάλλονται σε δοκιμή με στερεές υπό δοκιμή χημικές ουσίες και έγχρωμα υγρά θα πρέπει να εκχυλίζονται μόνο από το κάτω μέρος του ιστού (ώστε να ελαχιστοποιείται τυχόν μόλυνση του διαλύματος εκχύλισης ισοπροπανόλης με υπό δοκιμή χημική ουσία που ενδεχομένως έχει παραμείνει στον ιστό). Οι ιστοί που υποβάλλονται σε δοκιμή με υγρές υπό δοκιμή χημικές ουσίες οι οποίες δεν απομακρύνονται εύκολα με έκπλυση μπορούν επίσης να εκχυλίζονται μόνο από το κάτω μέρος του ιστού. Οι αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες που εξετάζονται παράλληλα θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με τρόπο ανάλογο με αυτόν της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Το εκχυλισθέν άλας φορμαζάνης MTT μπορεί να προσδιορίζεται ποσοτικά είτε μέσω τυπικής μέτρησης απορρόφησης (OD) στα 570 nm με φίλτρο μέγιστης ζώνης διάβασης ±30 nm είτε μέσω διαδικασίας HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας (βλ. παράγραφο 42) (11)(36).

▼M8

36. Οι οπτικές ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ή η χημική δράση της επί της MTT μπορεί να παρεμποδίσουν τη μέτρηση του άλατος φορμαζάνης MTT, με αποτέλεσμα εσφαλμένη εκτίμηση της βιωσιμότητας των ιστών. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορεί να παρεμποδίσουν τη μέτρηση του άλατος φορμαζάνης MTT επειδή ανάγουν άμεσα την MTT σε κυανή φορμαζάνη MTT και/ή επειδή δρουν παρεμποδιστικά ως έγχρωμες ουσίες, εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία απορροφά το φως, εκ φύσεως ή κατά την αγωγή, στο ίδιο φάσμα με τη φορμαζάνη MTT (δηλ. περίπου στα 570 nm). Θα πρέπει να διενεργούνται προέλεγχοι πριν από τη δοκιμή προκειμένου να επιτρέπεται ο προσδιορισμός των δυνητικών άμεσων αναγωγικών της MTT και/ή των έγχρωμων χημικών ουσιών με παρεμποδιστική δράση, και θα πρέπει να διενεργούνται πρόσθετοι έλεγχοι για την ανίχνευση και τη διόρθωση της δυνητικής παρεμποδιστικής δράσης των εν λόγω υπό δοκιμή χημικών ουσιών (βλ. παραγράφους 37-41). Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό όταν μια συγκεκριμένη υπό δοκιμή χημική ουσία δεν απομακρύνεται ολοκληρωτικά από το ιστικό μόρφωμα RhCE μέσω έκπλυσης ή όταν διαπερνά το παρόμοιο με κερατοειδή επιθήλιο, και, ως εκ τούτου, εξακολουθεί να είναι παρούσα στα ιστικά μορφώματα RhCE κατά την εκτέλεση της δοκιμασίας MTT. Όσον αφορά υπό δοκιμή χημικές ουσίες που απορροφούν το φως στο ίδιο φάσμα με αυτό του άλατος φορμαζάνης MTT (εκ φύσεως ή μετά από αγωγή), οι οποίες δεν είναι συμβατές με την τυπική μέτρηση απορρόφησης (OD) της φορμαζάνης MTT λόγω υπέρμετρα ισχυρής παρεμποδιστικής δράσης, δηλαδή ισχυρή απορρόφηση στα 570±30 nm, μπορεί να χρησιμοποιείται διαδικασία HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας για τη μέτρηση του άλατος φορμαζάνης MTT (βλ. παραγράφους 41 και 42) (11)(36). Ο τρόπος ανίχνευσης και διόρθωσης της άμεσης αναγωγής της MTT και της παρεμποδιστικής δράσης των έγχρωμων ουσιών περιγράφεται λεπτομερώς στις SOP των επικυρωμένων μεθόδων αναφοράς (34)(35). Επεξηγηματικά διαγράμματα ροής που παρέχουν καθοδήγηση σχετικά με τον τρόπο προσδιορισμού και μεταχείρισης των άμεσων αναγωγικών της MTT και/ή των έγχρωμων ουσιών με παρεμποδιστική δράση για τις VRM1 και VRM2 παρέχονται επίσης στα προσαρτήματα III και IV αντίστοιχα.

37. Για τον προσδιορισμό της δυνητικής παρεμποδιστικής δράσης υπό δοκιμή χημικών ουσιών που απορροφούν το φως στο ίδιο φάσμα με αυτό του άλατος φορμαζάνης MTT (εκ φύσεως ή μετά από αγωγή) και τη λήψη απόφασης σχετικά με την ανάγκη πρόσθετων μαρτύρων, η υπό δοκιμή χημική ουσία προστίθεται σε νερό και/ή ισοπροπανόλη και επωάζεται για κατάλληλο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία δωματίου [βλ. προσάρτημα 2, (34)(35)]. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία σε νερό και/ή ισοπροπανόλη απορροφά επαρκή ποσότητα φωτός στο φάσμα 570±20 nm για τη VRM1 (βλ. προσάρτημα 3), ή εάν λαμβάνεται έγχρωμο διάλυμα όταν αναμιγνύεται η υπό δοκιμή χημική ουσία με νερό για τη VRM2 (βλ. προσάρτημα 4), η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται ότι παρεμποδίζει την τυπική μέτρηση απορρόφησης (OD) του άλατος φορμαζάνης MTT και θα πρέπει να διενεργούνται περαιτέρω έλεγχοι για τις έγχρωμες ουσίες ή, εναλλακτικά, θα πρέπει να χρησιμοποιείται διαδικασία HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας, οπότε οι εν λόγω έλεγχοι δεν είναι απαραίτητοι (βλ. παραγράφους 41 και 42 και προσαρτήματα III και IV)(34)(35). Κατά την πραγματοποίηση της τυπικής μέτρησης απορρόφησης (OD), κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία με παρεμποδιστική δράση εφαρμόζεται τουλάχιστον σε δύο πανομοιότυπα δείγματα βιώσιμου ιστού, τα οποία υποβάλλονται σε όλα τα στάδια της δοκιμής, αλλά τα οποία επωάζονται με θρεπτικό μέσο αντί διαλύματος MTT κατά το στάδιο της επώασης της MTT προκειμένου να χρησιμεύσουν ως μάρτυρας μη ειδικού χρώματος σε ζώντες ιστούς (NSC_{living}) (34)(35). Ο έλεγχος μάρτυρα NSC_{living} πρέπει να διενεργείται ταυτόχρονα με τον έλεγχο της έγχρωμης υπό δοκιμή χημικής ουσίας και, σε περίπτωση πολλαπλών δοκιμών, πρέπει να διεξάγεται ανεξάρτητος έλεγχος NSC_{living} με κάθε εκτελούμενη δοκιμή (σε κάθε σειρά δοκιμών) λόγω της εγγενούς βιολογικής μεταβλητότητας των ζωντανών ιστών. Η πραγματική βιωσιμότητα των ιστών υπολογίζεται ως εξής: η εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών που μετρήθηκε με ζωντανούς ιστούς που εκτέθηκαν στην παρεμποδιστική υπό δοκιμή χημική ουσία και επωάστηκαν με το διάλυμα MTT ($\%Viability_{test}$) μείον την εκατοστιαία μη ειδική εμφάνιση χρώματος που μετρήθηκε με τους ζωντανούς ιστούς που εκτέθηκαν στην παρεμποδιστική υπό δοκιμή χημική ουσία και επωάστηκαν με θρεπτικό μέσο χωρίς MTT ταυτόχρονα με την υπό διόρθωση δοκιμή ($\%NSC_{living}$), δηλαδή πραγματική βιωσιμότητα ιστών = [$\%Viability_{test}$] - [$\%NSC_{living}$].

38. Για τον προσδιορισμό των άμεσων αναγωγικών της MTT, κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να προστίθεται σε πρόσφατο διάλυμα MTT. Κατάλληλη ποσότητα υπό δοκιμή χημικής ουσίας προστίθεται σε διάλυμα MTT

▼M8

και το μείγμα επωάζεται για περίπου 3 ώρες σε τυπικές συνθήκες καλλιέργειας (βλ. προσαρτήματα III και IV)(34)(35). Εάν το μείγμα MTT που περιέχει την υπό δοκιμή χημική ουσία (ή εναιώρημα για τις μη διαλυτές υπό δοκιμή χημικές ουσίες) αποκτήσει κυανό/ιώδες χρώμα, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται ότι ανάγει άμεσα την MTT και, επομένως, θα πρέπει να διενεργείται περαιτέρω λειτουργικός έλεγχος σε μη βιώσιμα ιστικά μορφώματα RhCE, ανεξάρτητα από τη χρήση της τυπικής μέτρησης απορρόφησης (OD) ή διαδικασίας HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας. Σε αυτόν τον πρόσθετο λειτουργικό έλεγχο χρησιμοποιούνται αδρανοποιημένοι ιστοί με υπολειμματική μόνο μεταβολική δραστηριότητα, οι οποίοι, ωστόσο, απορροφούν και κατακρατούν την υπό δοκιμή χημική ουσία σε βαθμό παρόμοιο με τους βιώσιμους ιστούς. Οι αδρανοποιημένοι ιστοί της VRM1 παρασκευάζονται με έκθεση σε χαμηλή θερμοκρασία («αδρανοποιημένοι με κατάψυξη»). Οι αδρανοποιημένοι ιστοί της VRM2 παρασκευάζονται με παρατεταμένη επώαση (π.χ. τουλάχιστον 24±1 ώρες) σε νερό, ακολουθούμενη από φύλαξη σε χαμηλή θερμοκρασία («αδρανοποιημένοι με νερό»). Κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία που ανάγει την MTT εφαρμόζεται σε τουλάχιστον δύο αδρανοποιημένα πανομοιότυπα δείγματα ιστού τα οποία υποβάλλονται σε όλα τα στάδια της διαδικασίας δοκιμής προκειμένου να προκληθεί μη ειδική αναγωγή της MTT (NSMTT) (34)(35). Ένας μοναδικός μάρτυρας NSMTT ανά υπό δοκιμή χημική ουσία αρκεί, ανεξάρτητα από τον αριθμό των ανεξάρτητων δοκιμών/σειρών δοκιμών που διεξάγονται. Η πραγματική βιωσιμότητα των ιστών υπολογίζεται ως εξής: η εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών που μετρήθηκε με ζωντανούς ιστούς που εκτέθηκαν στο αναγωγικό της MTT (%$Viability_{test}$) μείον την εκατοστιαία μη ειδική αναγωγή της MTT που μετρήθηκε με τους αδρανοποιημένους ιστούς που εκτέθηκαν στο ίδιο αναγωγικό της MTT, υπολογιζόμενη σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα που ελέγχθηκε ταυτόχρονα με την υπό διόρθωση δοκιμή (%NSMTT), δηλαδή πραγματική βιωσιμότητα ιστών = [%$Viability_{test}$] – [%NSMTT].

39. Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες που διαπιστώνεται ότι παρουσιάζουν τόσο παρεμποδιστική δράση λόγω χρώματος (βλ. παράγραφο 37) όσο και άμεση αναγωγή της MTT (βλ. παράγραφο 38) θα απαιτηθεί επίσης ένα τρίτο σύνολο μαρτύρων κατά την εκτέλεση της τυπικής μέτρησης απορρόφησης (OD), πέραν των μαρτύρων NSMTT και NSC_{living} που περιγράφονται στις προηγούμενες παραγράφους. Αυτό συμβαίνει συνήθως σε περιπτώσεις σκουρόχρωμων υπό δοκιμή χημικών ουσιών που απορροφούν το φως στο φάσμα 570±30 nm (π.χ. κυανές, ιώδεις, μαύρες), διότι το εγγενές χρώμα τους παρεμποδίζει την αξιολόγηση της ικανότητάς τους να ανάγουν απευθείας την MTT όπως περιγράφεται στην παράγραφο 38. Κατά συνέπεια, μαζί με τους μάρτυρες NSC_{living} χρειάζεται κατά κανόνα να χρησιμοποιούνται και μάρτυρες NSMTT. Υπό δοκιμή χημικές ουσίες για τις οποίες εκτελούνται αμφότεροι οι έλεγχοι μαρτύρων NSMTT και NSC_{living} μπορεί να απορροφηθούν και να συγκρατηθούν από τους ζωντανούς και τους αδρανοποιημένους ιστούς. Ως εκ τούτου, σε αυτή την περίπτωση, ο μάρτυρας NSMTT μπορεί να διορθώσει τη δοκιμή όχι μόνο ως προς την πιθανή άμεση αναγωγή της MTT από την υπό δοκιμή χημική ουσία αλλά και ως προς την παρεμπόδιση λόγω χρώματος που οφείλεται στην απορρόφηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας από τους αδρανοποιημένους ιστούς. Κατ' αυτόν τον τρόπο ενδέχεται να προκύψει διπλή διόρθωση ως προς την παρεμπόδιση λόγω χρώματος, δεδομένου ότι ο μάρτυρας NSC_{living} διορθώνει ήδη τη δοκιμή ως προς τηνπαρεμπόδιση λόγω χρώματος που οφείλεται στην απορρόφηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας από τους ζωντανούς ιστούς. Για την αποφυγή πιθανής διπλής διόρθωσης ως προς την παρεμπόδιση λόγω χρώματος, πρέπει να χρησιμοποιείται τρίτος μάρτυρας μη ειδικής εμφάνισης χρώματος σε αδρανοποιημένους ιστούς (NSC_{killed}) (βλ. προσαρτήματα III και IV)(34)(35). Σε αυτόν τον πρόσθετο μάρτυρα, η υπό δοκιμή χημική ουσία εφαρμόζεται σε τουλάχιστον δύο πανομοιότυπα δείγματα αδρανοποιημένου ιστού, τα οποία υποβάλλονται σε όλα τα στάδια της διαδικασίας δοκιμής αλλά τα οποία επωάζονται με θρεπτικό μέσο αντί διαλύματος MTT κατά το στάδιο της επώασης MTT. Ένας μοναδικός μάρτυρας NSC_{killed} ανά υπό δοκιμή χημική ουσία αρκεί, ανεξάρτητα από τον αριθμό των ανεξάρτητων δοκιμών δοκιμών/σειρών δοκιμών που εκτελούνται, αλλά θα πρέπει να χρησιμοποιείται ταυτόχρονα με τον μάρτυρα NSMTT και με την ίδια παρτίδα ιστών. Η πραγματική βιωσιμότητα των ιστών υπολογίζεται ως εξής: η εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών που μετρήθηκε με ζωντανούς ιστούς που εκτέθηκαν στην υπό δοκιμή χημική ουσία (%$Viability_{test}$) μείον τον %NSMTT μείον τον %NSC_{living} συν την εκατοστιαία μη ειδική εμφάνιση χρώματος που μετρήθηκε με τους αδρανοποιημένους ιστούς που εκτέθηκαν στην παρεμποδιστική υπό δοκιμή χημική ουσία και επωάστηκαν με θρεπτικό μέσο χωρίς MTT, υπολογιζόμενη σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα που χρησιμοποιήθηκε ταυτόχρονα με την υπό διόρθωση δοκιμή (%NSC_{killed}), ήτοι: πραγματική βιωσιμότητα ιστών = [%$Viability_{test}$] – [%NSMTT] – [%NSC_{living}] + [%NSC_{killed}].

▼M8

40. Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι οι παρεμποδίσεις λόγω μη ειδικής αναγωγής της MTT και λόγω μη ειδικού χρώματος ενδέχεται να αυξήσουν την OD (κατά την εκτέλεση μετρήσεων απορρόφησης προτύπου) του εκχυλίσματος ιστού πάνω από την περιοχή γραμμικότητας του φασματοφωτόμετρου, και ότι η μη ειδική αναγωγή της MTT μπορεί επίσης να αυξήσει το εμβαδόν της κορυφής του άλατος φορμαζάνης MTT (κατά την εκτέλεση μετρήσεων HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας) του εκχυλίσματος ιστού πάνω από την περιοχή γραμμικότητας του φασματοφωτόμετρου. Με βάση τα παραπάνω, είναι σημαντικό κάθε εργαστήριο να καθορίζει την περιοχή τιμών γραμμικότητας OD / εμβαδού κορυφής του φασματοφωτόμετρού του π.χ. με φορμαζάνη MTT (CAS # 57360-69-7), η οποία διατίθεται στο εμπόριο π.χ. από τη Sigma-Aldrich (αρ. κατ. M2003), προτού ξεκινήσει τις δοκιμές χημικών ουσιών για κανονιστικούς σκοπούς.

41. Η τυπική μέτρηση απορρόφησης (OD) με χρήση φασματοφωτόμετρου είναι κατάλληλη για την αξιολόγηση των υπό δοκιμή χημικών ουσιών που είναι άμεσα αναγωγικά της MTT και των παρεμποδιστικών λόγω χρώματος χημικών ουσιών, όταν η παρατηρούμενη παρεμπόδιση της μέτρησης του άλατος φορμαζάνης της MTT δεν είναι ιδιαίτερα ισχυρή (δηλαδή οι OD των εκχυλισμάτων που μετρώνται με την υπό δοκιμή χημική ουσία χωρίς καμία διόρθωση ως προς την άμεση αναγωγή της MTT και/ή την παρεμπόδιση λόγω χρώματος περιλαμβάνονται εντός της περιοχής γραμμικότητας του φασματοφωτόμετρου). Εντούτοις, τα αποτελέσματα για υπό δοκιμή χημικές ουσίες σε σχέση με τις οποίες προκύπτει %NSMTT και/ή $\%NSC_{living} \geq 60$ % (VRM1, και VRM2 για το πρωτόκολλο υγρών) ή 50 % (VRM2 για το πρωτόκολλο στερεών) του αρνητικού μάρτυρα θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη με επιφυλακτικότητα, διότι αυτή είναι η τιμή αποκοπής που χρησιμοποιείται στις επικυρωμένες μεθόδους αναφοράς (VRM) για τη διάκριση μεταξύ ταξινομημένων και μη ταξινομημένων χημικών ουσιών (βλ. παράγραφο 44). Ωστόσο, η τυπική απορρόφηση (OD) δεν μπορεί να μετρηθεί όταν η παρεμπόδιση της μέτρησης του άλατος φορμαζάνης MTT είναι ιδιαίτερα ισχυρή (δηλαδή δίνει μη διορθωμένες οπτικές πυκνότητες των εκχυλισμάτων ιστού δοκιμής που βρίσκονται εκτός της περιοχής γραμμικότητας του φασματοφωτόμετρου). Οι έγχρωμες υπό δοκιμή χημικές ουσίες ή οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που καθίστανται έγχρωμες όταν έρχονται σε επαφή με το νερό ή την ισοπροπανόλη και οι οποίες παρεμποδίζουν υπέρμετρα την τυπική μέτρηση απορρόφησης (OD) του άλατος φορμαζάνης της MTT μπορούν, ωστόσο, να αξιολογούνται με χρήση HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας (βλ. προσαρτήματα III και IV). Αυτό οφείλεται στο ότι το σύστημα HPLC/UPLC επιτρέπει τον διαχωρισμό της φορμαζάνης MTT από τη χημική ουσία πριν από τον ποσοτικό προσδιορισμό της (36). Για αυτόν τον λόγο, δεν χρειάζονται ποτέ μάρτυρες NSC_{living} ή NSC_{killed} όταν χρησιμοποιείται HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρία, ανεξάρτητα από την υπό δοκιμή χημική ουσία. Εντούτοις, μάρτυρες NSMTT θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε περίπτωση που υπάρχουν υπόνοιες ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία ανάγει άμεσα την MTT (βάσει της διαδικασίας που περιγράφεται στην παράγραφο 38). Μάρτυρες NSMTT θα πρέπει επίσης να χρησιμοποιούνται με υπό δοκιμή χημικές ουσίες που έχουν χρώμα (εγγενές ή εμφανιζόμενο κατά την επαφή με νερό) που παρεμποδίζει την αξιολόγηση της ικανότητας άμεσης αναγωγής της MTT, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 38. Όταν γίνεται χρήση HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας για τη μέτρηση της φορμαζάνης MTT, η εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών υπολογίζεται ως το ποσοστό του εμβαδού της κορυφής της φορμαζάνης MTT που μετράται με ζωντανούς ιστούς που εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία σε σχέση με την κορυφή της φορμαζάνης MTT που μετράται με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα. Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες που ανάγουν άμεσα την MTT, η πραγματική βιωσιμότητα υπολογίζεται ως εξής: $\%Viability_{test}$ μείον %NSMTT, όπως περιγράφεται στην τελευταία πρόταση της παραγράφου 38. Τέλος, πρέπει να επισημανθεί ότι οι άμεσοι αναγωγείς της MTT ή οι άμεσοι αναγωγείς της MTT οι οποίοι έχουν επίσης παρεμποδιστική δράση λόγω χρώματος, και οι οποίοι κατακρατούνται στους ιστούς μετά την αγωγή και ανάγουν την MTT σε τέτοιο βαθμό ώστε να δίνουν OD (με τυπική μέτρηση OD) ή εμβαδά κορυφών (με χρήση UPLC/HPLC-φασματοφωτομετρίας) εκτός της περιοχής γραμμικότητας του φασματοφωτόμετρου, δεν μπορούν να αξιολογηθούν με μεθόδους δοκιμών RhCE, αν και δεν αναμένεται να εμφανίζονται παρά σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις.

42. Η HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρία μπορεί να χρησιμοποιηθεί με όλα τα είδη υπό δοκιμή χημικών ουσιών (έγχρωμων, μη έγχρωμων, αναγωγικών της MTT και μη αναγωγικών της MTT) για τη μέτρηση της φορμαζάνης MTT (11)(36). Λόγω της ποικιλίας των συστημάτων HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας, δεν

▼M8

είναι εφικτό ο κάθε χρήστης να διασφαλίσει την ύπαρξη πανομοιότυπων συνθηκών συστήματος. Για τον λόγο αυτό, πριν από τη χρήση του συστήματος HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας για τον ποσοτικό προσδιορισμό της φορμαζάνης MTT από εκχυλίσματα ιστών, θα πρέπει να καταδεικνύεται η καταλληλότητά του για τον συγκεκριμένο σκοπό διά της εκπλήρωσης των κριτηρίων αποδοχής για σειρά τυποποιημένων παραμέτρων συμμόρφωσης που βασίζονται στις παραμέτρους που περιγράφονται στην καθοδήγηση της αμερικανικής Υπηρεσίας Τροφίμων και Φαρμάκων για τον κλάδο σχετικά με την επικύρωση των βιοαναλυτικών μεθόδων (36)(38). Οι εν λόγω κύριες παράμετροι και τα κριτήρια αποδοχής τους παρατίθενται στο προσάρτημα 5. Εφόσον εκπληρούνται τα κριτήρια αποδοχής που καθορίζονται στο προσάρτημα 5, το σύστημα HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας θεωρείται κατάλληλο και έτοιμο για μέτρηση της φορμαζάνης MTT υπό τις πειραματικές συνθήκες που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών.

Κριτήρια αποδοχής

43. Για κάθε σειρά δοκιμών στην οποία γίνεται χρήση παρτίδων ιστών RhCE που έχει διαπιστωθεί ότι πληρούν τα κριτήρια ποιοτικού ελέγχου (βλ. παράγραφο 30), οι ιστοί που υποβάλλονται σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα θα πρέπει να παρουσιάζουν οπτική πυκνότητα αντιπροσωπευτική της ποιότητας των ιστών μετά τα στάδια αποστολής και παραλαβής και τις διεργασίες πρωτοκόλλου και δεν θα πρέπει να βρίσκονται εκτός των καθορισμένων ορίων που εμφαίνονται στον πίνακα 2 (βλ. παράγραφο 26). Παρομοίως, οι ιστοί που υποβάλλονται σε αγωγή με τον θετικό μάρτυρα, δηλ. τον οξικό μεθυλεστέρα, θα πρέπει να παρουσιάζουν μέση βιωσιμότητα ιστών < 50 % σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα στην VRM1 με χρήση των πρωτοκόλλων υγρών ή στερεών, και ≤ 30 % (πρωτόκολλο υγρών) ή ≤ 20 % (πρωτόκολλο στερεών) σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα στην VRM2, ούτως ώστε να αντικατοπτρίζεται η ικανότητά τους να αποκρίνονται σε ερεθιστική υπό δοκιμή χημική ουσία υπό τις συνθήκες της μεθόδου δοκιμών (34)(35). Η μεταβλητότητα της δράσης των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστών θα πρέπει να περιλαμβάνεται εντός των αποδεκτών ορίων (δηλαδή η διαφορά βιωσιμότητας μεταξύ δύο πανομοιότυπων δειγμάτων ιστών δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 20 % ή η τυπική απόκλιση (SD) μεταξύ τριών πανομοιότυπων δειγμάτων ιστών δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 18 %). Σε περίπτωση που είτε ο αρνητικός είτε ο θετικός μάρτυρας που περιλαμβάνονται σε μια σειρά δοκιμών είναι εκτός των αποδεκτών πεδίων τιμών, η σειρά θεωρείται ότι δεν πληροί τα κριτήρια και θα πρέπει να επαναλαμβάνεται. Εάν η μεταβλητότητα της δράσης μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας μεταξύ πανομοιότυπων δειγμάτων ιστών είναι εκτός του αποδεκτού πεδίου τιμών, η δοκιμή πρέπει να θεωρείται ότι δεν πληροί τα κριτήρια και θα πρέπει να επαναλαμβάνεται.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων και μοντέλο πρόβλεψης

44. Οι τιμές OD / τα εμβαδά κορυφής που μετρώνται με τα εκχυλίσματα πανομοιότυπων δειγμάτων ιστών για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της μέσης εκατοστιαίας βιωσιμότητας των ιστών (μέση τιμή μεταξύ πανομοιότυπων δειγμάτων ιστών), κανονικοποιημένης ως προς τον αρνητικό μάρτυρα, ο οποίος ορίζεται ίσος με 100 %. Στον πίνακα 4 φαίνεται η εκατοστιαία τιμή αποκοπής για τη βιωσιμότητα των ιστών κατά τον προσδιορισμό υπό δοκιμή χημικών ουσιών οι οποίες δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη (καμία κατηγορία κατά GHS του ΟΗΕ και κανονισμό CLP). Ως εκ τούτου, τα αποτελέσματα ερμηνεύονται ως εξής:

— Η υπό δοκιμή χημική ουσία χαρακτηρίζεται ουσία για την οποία δεν επιβάλλεται ταξινόμηση και επισήμανση βάσει του GHS του ΟΗΕ και του κανονισμού CLP (καμία κατηγορία) εάν η μέση εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών μετά την έκθεση και την επώαση μετά την έκθεση υπερβαίνει (>) την καθορισμένη εκατοστιαία τιμή αποκοπής βιωσιμότητας των ιστών, όπως φαίνεται στον πίνακα 4. Σε αυτή την περίπτωση, δεν είναι απαραίτητη η δοκιμή με άλλες μεθόδους.

▼M8

— Εάν η μέση εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών μετά την έκθεση και την επώαση μετά την έκθεση είναι μικρότερη ή ίση με την καθορισμένη εκατοστιαία τιμή αποκοπής για την ιστική βιωσιμότητα, δεν μπορεί να γίνει πρόβλεψη, όπως φαίνεται στον πίνακα 4. Σε αυτή την περίπτωση θα χρειαστεί δοκιμή με άλλες μεθόδους, διότι οι μέθοδοι δοκιμών RhCE δίνουν ένα ορισμένο ποσοστό ψευδοθετικών αποτελεσμάτων (βλ. παραγράφους 14-15) και δεν είναι εφικτή η διάκριση μεταξύ των κατηγοριών 1 και 2 του GHS του ΟΗΕ και του κανονισμού CLP (βλ. παράγραφο 17).

Πίνακας 4

Μοντέλα πρόβλεψης βάσει της ταξινόμησης του GHS του ΟΗΕ και του κανονισμού CLP

VRM	Καμία κατηγορία	Αδύνατη η διατύπωση πρόβλεψης
VRM 1 - EpiOcular™ EIT (και για τα δύο πρωτόκολλα)	Μέση βιωσιμότητα ιστών > 60 %	Μέση βιωσιμότητα ιστών ≤ 60 %
VRM 2 - SkinEthic™ HCE EIT (για το πρωτόκολλο υγρών)	Μέση βιωσιμότητα ιστών > 60 %	Μέση βιωσιμότητα ιστών ≤ 60 %
VRM2 - SkinEthic™ HCE EIT (για το πρωτόκολλο στερεών)	Μέση βιωσιμότητα ιστών > 50 %	Μέση βιωσιμότητα ιστών ≤ 50 %

45. Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες των οποίων το αποτέλεσμα δεν επιδέχεται αμφισβήτηση, αρκεί μία μόνο δοκιμή, αποτελούμενη από δύο τουλάχιστον πανομοιότυπα δείγματα ιστού. Όταν όμως το αποτέλεσμα είναι οριακό, όπως η ασυμφωνία μεταξύ των μετρήσεων των πανομοιότυπων δειγμάτων και/ή μια μέση εκατοστιαία τιμή βιωσιμότητας ιστών ίση με 60 ± 5 % (VRM1, και VRM2 για το πρωτόκολλο υγρών) ή 50 ± 5 % (VRM2 για το πρωτόκολλο στερεών), θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο εκτέλεσης δεύτερης δοκιμής, ακόμη και τρίτης δοκιμής, σε περίπτωση ασυμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο πρώτων δοκιμών.

46. Ανάλογα με την περίπτωση και εφόσον αιτιολογείται, μπορεί να εξετάζεται το ενδεχόμενο καθορισμού διαφορετικών εκατοστιαίων τιμών αποκοπής για τη βιωσιμότητα ιστών για συγκεκριμένους τύπους μειγμάτων, προκειμένου να αυξηθούν οι συνολικές επιδόσεις της μεθόδου δοκιμών για τους συγκεκριμένους τύπους μειγμάτων (βλ. παράγραφο 14). Η χρήση χημικών ουσιών συγκριτικής αξιολόγησης μπορεί να είναι χρήσιμη για την αξιολόγηση του δυναμικού πρόκλησης σοβαρής οφθαλμικής βλάβης / οφθαλμικού ερεθισμού άγνωστων υπό δοκιμή ουσιών ή κατηγοριών προϊόντων, ή για την αξιολόγηση του σχετικού δυναμικού οφθαλμικής τοξικότητας ταξινομημένης χημικής ουσίας εντός συγκεκριμένου φάσματος θετικών αποκρίσεων.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Δεδομένα

47. Τα δεδομένα από μεμονωμένα πανομοιότυπα δείγματα ιστών σε μια σειρά δοκιμών (π.χ. τιμές OD / εμβαδόν κορυφής φορμαζάνης MTT και δεδομένα υπολογισθείσας εκατοστιαίας βιωσιμότητας των ιστών για την υπό δοκιμή χημική ουσία και τους μάρτυρες, και η τελική πρόβλεψη της μεθόδου δοκιμών RhCE) θα πρέπει να αναφέρονται υπό μορφή πίνακα για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία, συμπεριλαμβανομένων των δεδομένων από επαναλήψεις δοκιμών, ανάλογα με την περίπτωση. Επιπλέον, θα πρέπει να αναφέρεται η μέση εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών και η διαφορά βιωσιμότητας μεταξύ δύο πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού (εάν n=2 πανομοιότυπα δείγματα ιστού) ή η SD (εάν n≥ 3 πανομοιότυπα δείγματα ιστού) για κάθε μεμονωμένη υπό δοκιμή χημική ουσία και μάρτυρα. Για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να αναφέρονται τυχόν παρατηρούμενες παρεμποδίσεις της μέτρησης της φορμαζάνης MTT λόγω άμεσης αναγωγής της MTT και/ή παρεμπόδισης λόγω χρώματος.

Έκθεση δοκιμής

48. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

▼**M8**

Υπό δοκιμή χημική ουσία

Μονοσυστατική ουσία

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία,

— φυσική κατάσταση, πτητικότητα, pH, LogP, μοριακό βάρος, χημική κατηγορία, και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες που σχετίζονται με τη διενέργεια της μελέτης, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού κ.λπ.,

— κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),

— συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα.

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγμα

— χαρακτηρισμός, στο μέτρο του δυνατού, π.χ. χημική ταυτότητα (βλ. ανωτέρω), καθαρότητα, ποσότητα και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες (βλ. ανωτέρω) των συστατικών, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— φυσική κατάσταση και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες που σχετίζονται με τη διενέργεια της μελέτης, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού κ.λπ.,

— κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),

— συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα.

Θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία,

— φυσική κατάσταση, πτητικότητα, μοριακό βάρος, χημική κατηγορία, και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες που σχετίζονται με τη διενέργεια της μελέτης, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού κ.λπ.,

— κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),

— συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— αιτιολόγηση της χρήσης διαφορετικού αρνητικού μάρτυρα από το υπερκαθαρό H_2O ή το DPBS ελεύθερο Ca^{2+}/Mg^{2+}, εάν ισχύει,

— αιτιολόγηση της χρήσης διαφορετικού θετικού μάρτυρα από τον αμιγή οξικό μεθυλεστέρα, εάν ισχύει,

— παραπομπή σε ιστορικά αποτελέσματα θετικών και αρνητικών μαρτύρων που καταδεικνύουν την εφαρμογή κατάλληλων κριτηρίων αποδοχής των σειρών δοκιμών.

Πληροφορίες σχετικά με τον χορηγό και την εγκατάσταση δοκιμών

— όνομα και διεύθυνση του χορηγού, της εγκατάστασης δοκιμών και του διευθυντή της μελέτης.

— *Ιστικό μόρφωμα RhCE και πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκαν (με αιτιολόγηση των επιλογών, εάν ισχύει)*

▼**M8**

Συνθήκες της μεθόδου δοκιμών

— ιστικό μόρφωμα RhCE που χρησιμοποιήθηκε, περιλαμβανομένου του αριθμού παρτίδας,

— μήκος κύματος και ζώνη διάβασης (κατά περίπτωση) που χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό της φορμαζάνης MTT, και περιοχή γραμμικότητας της συσκευής μέτρησης (π.χ. φασματοφωτόμετρο),

— περιγραφή της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της φορμαζάνης MTT,

— περιγραφή του συστήματος HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας που χρησιμοποιήθηκε, κατά περίπτωση,

— πλήρη στοιχεία τεκμηρίωσης για το συγκεκριμένο ιστικό μόρφωμα RhCE που χρησιμοποιήθηκε, συμπεριλαμβανομένων των επιδόσεών του. Τα εν λόγω δεδομένα πρέπει να περιλαμβάνουν τα ακόλουθα, χωρίς να περιορίζονται σ' αυτά:

  i) ποιοτικός έλεγχος βιωσιμότητας (προμηθευτής)

  ii) βιωσιμότητα υπό τις συνθήκες της μεθόδου δοκιμών (χρήστης),

  iii) ποιοτικός έλεγχος λειτουργίας φραγμού,

  iv) μορφολογία, εάν διατίθεται,

  v) αναπαραγωγιμότητα και προβλεπτική ικανότητα,

  vi) άλλοι ποιοτικοί έλεγχοι του ιστικού μορφώματος RhCE, εάν διατίθενται,

— παραπομπή σε ιστορικά δεδομένα για το ιστικό μόρφωμα RhCE. Τα εν λόγω δεδομένα πρέπει να περιλαμβάνουν τα ακόλουθα, χωρίς να περιορίζονται σ' αυτά: αποδοχή των δεδομένων ποιοτικού ελέγχου σε σχέση με ιστορικά δεδομένα για τις παρτίδες,

— δήλωση ότι η εγκατάσταση δοκιμών έχει αποδείξει την τεχνική της ικανότητα να χρησιμοποιεί τη μέθοδο δοκιμών προτού την εντάξει στην καθημερινή της πρακτική διά του ελέγχου των χημικών ουσιών ελέγχου ικανότητας.

Κριτήρια της σειράς δοκιμών και της αποδοχής δοκιμής

— μέσες τιμές και πεδία τιμών αποδοχής του θετικού και αρνητικού μάρτυρα βάσει ιστορικών δεδομένων,

— αποδεκτή μεταβλητότητα μεταξύ πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού για τους θετικούς και τους αρνητικούς μάρτυρες,

— αποδεκτή μεταβλητότητα μεταξύ πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού για την υπό δοκιμή χημική ουσία.

Διαδικασία δοκιμής

— λεπτομέρειες για την εφαρμοσθείσα διαδικασία δοκιμών,

— χρησιμοποιηθείσες δόσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και των μαρτύρων,

— διάρκεια και θερμοκρασία περιόδων έκθεσης και εμβύθισης μετά την έκθεση και επώασης μετά την έκθεση (ανάλογα με την περίπτωση),

— περιγραφή τυχόν τροποποιήσεων της διαδικασίας δοκιμής,

▼M8

— αναφορά των χρησιμοποιηθέντων μαρτύρων για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που είναι άμεσα αναγωγικά της MTT ή /και έγχρωμες, κατά περίπτωση,

— αριθμός των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που χρησιμοποιήθηκαν ανά υπό δοκιμή χημική ουσία και μάρτυρα (θετικός μάρτυρας, αρνητικός μάρτυρας, NSMTT, NSC_{living} και NSC_{killed}, κατά περίπτωση).

Αποτελέσματα

— δεδομένα σε μορφή πίνακα από τις επιμέρους υπό δοκιμή χημικές ουσίες και τους μάρτυρες, για κάθε σειρά δοκιμών (περιλαμβανομένων των επαναληπτικών πειραμάτων, ανάλογα με την περίπτωση) και κάθε μέτρηση πανομοιότυπου δείγματος, περιλαμβανομένης της τιμής OD ή του εμβαδού κορυφής της φορμαζάνης MTT, της εκατοστιαίας βιωσιμότητας ιστών, της μέσης εκατοστιαίας βιωσιμότητας ιστών, της διαφοράς μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού ή της SD, και της τελικής πρόβλεψης,

— κατά περίπτωση, αποτελέσματα των μαρτύρων που χρησιμοποιήθηκαν για τα άμεσα αναγωγικά της MTT και/ή τις έγχρωμες υπό δοκιμή χημικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένης της τιμής OD ή του εμβαδού της κορυφής της φορμαζάνης MTT, του %NSMTT, του $\%NSC_{living}$, του $\%NSC_{killed}$, της διαφοράς μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού ή της SD, της τελικής ορθής εκατοστιαίας βιωσιμότητας ιστών, και της τελικής πρόβλεψης,

— αποτελέσματα που προέκυψαν με την υπό δοκιμή χημική ουσία/-ες και τους μάρτυρες σε σχέση με τα καθορισμένα κριτήρια αποδοχής για τη σειρά δοκιμών και τη δοκιμή,

— περιγραφή άλλων παρατηρηθεισών επιδράσεων, π.χ. χρώση των ιστών από έγχρωμη υπό δοκιμή χημική ουσία.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

Συμπέρασμα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) UN (2015). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York and Geneva: United Nations. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(2) Κεφάλαιο B.5 του παρόντος παραρτήματος: Οξείας μορφής ερεθισμός/διάβρωση των οφθαλμών.

(3) Κεφάλαιο B.47 του παρόντος παραρτήματος: Μέθοδος δοκιμών αδιαφάνειας και διαπερατότητας του βόειου κερατοειδούς για τον προσδιορισμό i) χημικών ουσιών που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη και ii) χημικών ουσιών που δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη.

(4) Κεφάλαιο B.48 του παρόντος παραρτήματος: Μέθοδος δοκιμών σε απομονωμένους οφθαλμούς ορνιθίων για τον προσδιορισμό i) χημικών ουσιών που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη και ii) χημικών ουσιών που δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν.

(5) Κεφάλαιο B.61 του παρόντος παραρτήματος: Μέθοδος δοκιμών διαρροής φλουορεσκεΐνης για τον προσδιορισμό διαβρωτικών και ισχυρών ερεθιστικών των οφθαλμών.

▼**M8**

(6) Κεφάλαιο Β.68 του παρόντος παραρτήματος: *In Vitro* μέθοδος δοκιμών βραχυχρόνιας έκθεσης για τον προσδιορισμό i) χημικών ουσιών που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη και ii) χημικών ουσιών για τις οποίες δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη.

(7) Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special Issue 2010,261-266.

(8) EC EURL ECVAM (2014). The EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28125 EN· doi:10.2787/41680. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280.

(9) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. ESAC Opinion No 2014-03 of 17 November 2014 EUR 28173 EN· doi: 10.2787/043697. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702.

(10) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D, Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In Vitro* 31, 43-53.

(11) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. In Vitro* 34, 55-70.

(12) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No 2016-02 of 24 June 2016 EUR 28175 EN· doi: 10.2787/390390. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704.

(13) EC EURL ECVAM (2016). Recommendation on the Use of the Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Serious Eye Damage/Eye Irritation According to UN GHS. (Χειρόγραφο υπό επεξεργασία).

(14) Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. Journal of *Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 82, 377-390.

(15) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *In Vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.

▼**M8**

(16) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(17) OECD (2016). Series on Testing and Assessment No 216: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(18) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(19) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339-364.

(20) Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for in vitro toxicology. Στο: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), Alternative Toxicological Methods, CRC Press, pp. 147-159.

(21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 619-626.

(22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 1476-1488.

(23) Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1-18.

(24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In Vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701-723.

(25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521-547.

(26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113-126.

▼**M8**

(27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. Στο *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* Marzulli F.N.and Maibach H.I. (Eds.), 4th Edition, pp. 749–815. Washington, DC, USA: Hemisphere Publishing Corporation.

(28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Cassaret and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, pp. 665–697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson.

(29) Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922–936.

(30) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36, 106-117.

(31) Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. In Vitro* 15, 115–130.

(32) Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2610–2625.

(33) Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 25, 41–54.

(34) EpiOcular™ EIT SOP, Version 8 (March 05, 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: [https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index].

(35) SkinEthic™ HCE EIT SOP, Version 1. (July 20, 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index.

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29, 741-761.

(37) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2015). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. *Altern. Lab Anim.* 43, 101-127.

(38) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf.

(39) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No 263. ENV Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ορθότητα: ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί κριτήριο επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών και μια από τις πτυχές της «καταλληλότητας». Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς την «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας μεθόδου δοκιμών (18).

Χημική ουσία συγκριτικής αξιολόγησης: χημική ουσία που χρησιμοποιείται ως πρότυπο για σύγκριση με μια υπό δοκιμή χημική ουσία. Οι χημικές ουσίες συγκριτικής αξιολόγησης θα πρέπει να διαθέτουν τις ακόλουθες ιδιότητες: i) συνεπείς και αξιόπιστες πηγές προέλευσης για τον προσδιορισμό και τον χαρακτηρισμό τους, ii) δομική, λειτουργική ομοιότητα και/ή ομοιότητα χημικής κατηγορίας ή κατηγορίας προϊόντος με την υπό δοκιμή χημική ουσία/-ες, iii) γνωστές φυσικοχημικές ιδιότητες; iv) δεδομένα τεκμηρίωσης γνωστών επιδράσεων, και v) γνωστή ισχύ στο φάσμα της επιθυμητής απόκρισης.

Ανοδική προσέγγιση (bottom-up): κλιμακωτή προσέγγιση που χρησιμοποιείται για υπό δοκιμή χημικές ουσίες για τις οποίες θεωρείται ότι δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν και να επισημανθούν ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη. Η προσέγγιση αυτή αρχίζει με τον προσδιορισμό των χημικών ουσιών που δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν και να επισημανθούν (αρνητική έκβαση) με βάση άλλες χημικές ουσίες (θετική έκβαση).

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Συμφωνία: βλ. «ορθότητα».

Κερατοειδής: το διαφανές τμήμα του πρόσθιου τμήματος του οφθαλμικού βολβού, το οποίο καλύπτει την ίριδα και την κόρη και επιτρέπει την είσοδο φωτός στο εσωτερικό του οφθαλμού.

CV: (Coefficient of Variation) συντελεστής μεταβλητότητας.

Dev: (Deviation) απόκλιση.

EIT: (Eye Irritation Test) δοκιμή οφθαλμικού ερεθισμού.

EURL ECVAM: εργαστήριο αναφοράς της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τις εναλλακτικές μεθόδους αντί των δοκιμών σε ζώα.

Οφθαλμικός ερεθισμός: πρόκληση αλλοιώσεων του οφθαλμού, οι οποίες εμφανίζονται μετά την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην εμπρόσθια επιφάνειά του και είναι πλήρως αναστρέψιμες εντός 21 ημερών από την εφαρμογή της ουσίας. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά προς τους όρους «αναστρέψιμες επιδράσεις στους οφθαλμούς» και «κατηγορία 2 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP».

ET_{50}: χρόνος έκθεσης που απαιτείται για να μειωθεί η βιωσιμότητα των ιστών κατά 50 % μετά την εφαρμογή καθορισμένης συγκέντρωσης της ουσίας συγκριτικής αξιολόγησης.

Ποσοστό ψευδοαρνητικής έκβασης: το ποσοστό όλων των θετικών ουσιών που εσφαλμένα χαρακτηρίζονται αρνητικές με μια μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί έναν από τους δείκτες επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών.

Ποσοστό ψευδοθετικής έκβασης: το ποσοστό όλων των αρνητικών ουσιών που εσφαλμένα χαρακτηρίζονται θετικές με μια μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί έναν από τους δείκτες επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών.

Επικινδυνότητα: εγγενής ιδιότητα ενός παράγοντα ή μιας κατάστασης που μπορεί να έχει δυσμενείς επιδράσεις όταν οργανισμός, σύστημα ή (υπο)πληθυσμός εκτεθεί στον συγκεκριμένο παράγοντα.

HCE: επιθήλιο ανθρώπινου κερατοειδούς SkinEthic™.

▼**M8**

HPLC: υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης.

IC_{50}: συγκέντρωση στην οποία μια χημική ουσία συγκριτικής αξιολόγησης μειώνει τη βιωσιμότητα των ιστών κατά 50 % μετά από καθορισμένο χρόνο έκθεσης (π.χ. αγωγή 30 λεπτών με SDS).

Πλεονάζουσα δόση: ποσότητα υπό δοκιμή χημικής ουσίας που εφαρμόζεται στο ιστικό μόρφωμα RhCE και υπερβαίνει την απαιτούμενη για την πλήρη και ομοιόμορφη κάλυψη της επιφάνειας του επιθηλίου.

Μη αναστρέψιμες επιδράσεις στους οφθαλμούς: βλ. «Σοβαρή οφθαλμική βλάβη».

LLOQ: (Lower Limit of Quantification) κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης.

LogP: λογάριθμος του συντελεστή κατανομής σε οκτανόλη/νερό.

Μείγμα: ένα μείγμα ή διάλυμα που αποτελείται από δύο ή περισσότερες ουσίες.

Μονοσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας ένα κύριο συστατικό περιέχεται σε ποσοστό τουλάχιστον 80 % κ.β.

Πολυσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας περισσότερα από ένα κύρια συστατικά περιέχονται σε συγκέντρωση ≥ 10 % κ.β. και < 80 % κ.β. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα μεταποιητικών διεργασιών. Η διαφορά μεταξύ μείγματος και πολυσυστατικής ουσίας είναι ότι το μείγμα λαμβάνεται με ανάμειξη δύο ή περισσότερων ουσιών, χωρίς χημική αντίδραση. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα χημικών αντιδράσεων.

MTT: βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο, βρωμιούχο τετραζόλιο-κυανό του θειαζολυλίου.

Αρνητικός μάρτυρας: δείγμα που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και υποβάλλεται σε αγωγή με ουσία που είναι γνωστό ότι δεν επάγει θετική απόκριση στο σύστημα δοκιμής. Το δείγμα αυτό υποβάλλεται σε δοκιμή μαζί με τα δείγματα που έχουν υποβληθεί σε αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία και με άλλα δείγματα μάρτυρες, και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της 100 % βιωσιμότητας των ιστών.

Δεν ταξινομείται: χημικές ουσίες που δεν ταξινομούνται ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό (κατηγορία 2 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP, κατηγορία 2A ή 2B κατά GHS του ΟΗΕ) ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη (κατηγορία 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά προς τον όρο «καμία κατηγορία κατά GHS του ΟΗΕ».

NSC_{killed}: (Non-Specific Colour in killed tissues) μάρτυρας μη ειδικού χρώματος σε αδρανοποιημένους ιστούς.

NSC_{living}: (Non-Specific Colour in living tissues) μάρτυρας μη ειδικού χρώματος σε ζωντανούς ιστούς.

NSMTT: (Non-Specific MTT reduction) μη ειδική αναγωγή της MTT.

OD: (Optical Density) οπτική πυκνότητα.

Πρότυπα επιδόσεων: πρότυπα που βασίζονται σε επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών η οποία κρίθηκε ότι είναι επιστημονικά έγκυρη, και παρέχουν τη βάση για την αξιολόγηση της συγκρισιμότητας προτεινόμενης μεθόδου δοκιμών η οποία είναι μηχανιστικά και λειτουργικά παρεμφερής. Σε αυτά περιλαμβάνονται: i) βασικά στοιχεία της μεθόδου δοκιμών, ii) κατάλογος ελάχιστων ουσιών αναφοράς, οι οποίες έχουν επιλεγεί μεταξύ των χημικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για την απόδειξη των αποδεκτών επιδόσεων της επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς, και (iii) τα συγκρίσιμα επίπεδα ορθότητας και αξιοπιστίας, που βασίζονται στα επιτευχθέντα για την επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών και τα οποία πρέπει να επιδεικνύει η προτεινόμενη μέθοδος δοκιμών όταν αξιολογείται με χρήση του καταλόγου ελαχίστων ουσιών αναφοράς (18).

▼M8

Θετικός μάρτυρας: δείγμα που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και υποβάλλεται σε αγωγή με ουσία που είναι γνωστό ότι επάγει θετική απόκριση στο σύστημα δοκιμής. Το δείγμα αυτό υποβάλλεται σε δοκιμή μαζί με τα δείγματα που έχουν υποβληθεί σε αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία και με άλλα δείγματα μάρτυρες. Για να διασφαλίζεται η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας της απόκρισης του θετικού μάρτυρα σε συνάρτηση με τον χρόνο, το μέγεθος της θετικής απόκρισης δεν θα πρέπει να είναι υπερβολικό.

Καταλληλότητα: περιγραφή της σχέσης της δοκιμής με την υπό μελέτη επίδραση και του κατά πόσον αυτή έχει σημασία και είναι χρήσιμη για συγκεκριμένο σκοπό. Πρόκειται για τον βαθμό στον οποίο η δοκιμή μετρά ή προβλέπει σωστά τη βιολογική επίδραση υπό μελέτη. Η καταλληλότητα εμπεριέχει συνεκτίμηση της ορθότητας (συμφωνίας) της μεθόδου δοκιμών (18).

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια μέθοδος δοκιμών μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, καθώς και της ενδοεργαστηριακής επαναληψιμότητας (18).

Δοκιμή υποκατάστασης: δοκιμή που έχει σχεδιαστεί για να υποκαταστήσει δοκιμή χρησιμοποιούμενη στην καθημερινή πρακτική και αποδεκτή για τον προσδιορισμό της επικινδυνότητας και/ή την εκτίμηση κινδύνου και η οποία, όπως έχει διαπιστωθεί, εξασφαλίζει ισοδύναμη ή βελτιωμένη προστασία της υγείας του ανθρώπου ή των ζώων ή του περιβάλλοντος, κατά περίπτωση, σε σύγκριση με την αποδεκτή δοκιμή, για όλες τις πιθανές περιπτώσεις δοκιμής και υπό δοκιμή χημικές ουσίες (18).

Αναπαραγωγιμότητα: η συμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τη διεξαγωγή επαναληπτικών δοκιμών με την ίδια υπό δοκιμή χημική ουσία και με τη χρήση του ίδιου πρωτοκόλλου δοκιμών (βλ. «αξιοπιστία») (18).

Αναστρέψιμες επιδράσεις στους οφθαλμούς: βλ. «Οφθαλμικός ερεθισμός».

RhCE: (Reconstructed human Cornea-like Epithelium) ανασυσταθέν επιθήλιο παρόμοιο με τον ανθρώπινο κερατοειδή.

Σειρά δοκιμών: η σειρά περιλαμβάνει μία ή περισσότερες υπό δοκιμή χημικές ουσίες που υποβάλλονται σε δοκιμή ταυτόχρονα με αρνητικό μάρτυρα και θετικό μάρτυρα.

SD: (Standard Deviation) τυπική απόκλιση.

Ευαισθησία: το ποσοστό του συνόλου των θετικών/δραστικών υπό δοκιμή χημικών ουσιών που ταξινομούνται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των μεθόδων δοκιμών (18).

Σοβαρή οφθαλμική βλάβη: πρόκληση βλάβης στους οφθαλμικούς ιστούς ή σοβαρής μείωσης της όρασης, κατόπιν εφαρμογής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην πρόσθια επιφάνεια του οφθαλμού, η οποία δεν είναι πλήρως αναστρέψιμη εντός 21 ημερών από την εφαρμογή. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά προς τους όρους «μη αναστρέψιμες επιδράσεις στους οφθαλμούς» και «κατηγορία 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP».

Τυποποιημένες διαδικασίες λειτουργίας (Standard Operating Procedures, SOP): επίσημες γραπτές διαδικασίες που περιγράφουν αναλυτικά τον τρόπο εκτέλεσης συγκεκριμένων εργαστηριακών εργασιών της καθημερινής πρακτικής σε σχέση με συγκεκριμένες δοκιμές. Είναι υποχρεωτικές βάσει της ορθής εργαστηριακής πρακτικής (GLP).

Ειδικότητα: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών/αδρανών υπό δοκιμή χημικών ουσιών που ταξινομούνται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των μεθόδων δοκιμών (18).

▼M8

Ουσία: ένα χημικό στοιχείο και οι ενώσεις του σε φυσική κατάσταση ή όπως λαμβάνονται με οποιαδήποτε παραγωγική διεργασία, στα οποία συμπεριλαμβάνονται όλα τα πρόσθετα που απαιτούνται για να διατηρείται η σταθερότητά του, καθώς και τυχόν προσμείξεις που προκύπτουν από τη χρησιμοποιούμενη διεργασία, αλλά από τα οποία εξαιρούνται οι διαλύτες που είναι δυνατόν να διαχωριστούν χωρίς να επηρεαστεί η σταθερότητα της ουσίας ούτε να μεταβληθεί η σύνθεσή της.

Δοκιμή: μια μεμονωμένη υπό δοκιμή χημική ουσία η οποία υποβάλλεται ταυτόχρονα σε δοκιμή σε τουλάχιστον δύο πανομοιότυπα δείγματα ιστών, όπως ορίζεται στην αντίστοιχη SOP.

Βιωσιμότητα των ιστών: παράμετρος με την οποία μετράται η συνολική δραστηριότητα κυτταρικού πληθυσμού σε ανασυσταθέντα ιστό, ως ικανότητα αναγωγής της χρωστικής ζωτικής χρώσης MTT, η οποία, ανάλογα με τη μετρούμενη παράμετρο και τον χρησιμοποιούμενο σχεδιασμό δοκιμής, συσχετίζεται με τον συνολικό αριθμό και/ή τη ζωτικότητα των ζωντανών κυττάρων.

Καθοδική (top-down) προσέγγιση: κλιμακωτή προσέγγιση που χρησιμοποιείται για υπό δοκιμή χημική ουσία για την οποία υπάρχουν υπόνοιες ότι προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη. Η προσέγγιση αυτή αρχίζει με τον προσδιορισμό των χημικών ουσιών που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη (θετική έκβαση) σε σχέση με άλλες χημικές ουσίες (αρνητική έκβαση).

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Κλιμακωτή στρατηγική δοκιμών: στρατηγική δοκιμών κατά βαθμίδες, στο πλαίσιο της οποίας χρησιμοποιούνται μέθοδοι δοκιμών κατά διαδοχικό τρόπο. Όλες οι υφιστάμενες πληροφορίες για μια υπό δοκιμή χημική ουσία εξετάζονται σε κάθε στάδιο με χρήση διαδικασίας βάρους της απόδειξης, προκειμένου να διαπιστώνεται, πριν από τη μετάβαση στο επόμενο στάδιο της στρατηγικής, αν διατίθενται επαρκείς πληροφορίες για να ληφθεί απόφαση περί ταξινόμησης κινδύνου. Εάν σε υπό δοκιμή χημική ουσία μπορεί να αποδοθεί δυναμικό επικινδυνότητας/ισχύς βάσει των υφιστάμενων πληροφοριών σε συγκεκριμένο στάδιο, δεν απαιτούνται περαιτέρω δοκιμές (18).

ULOQ: (Upper Limit of Quantification) ανώτερο όριο ποσοτικοποίησης.

Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Προϊόντων των Ηνωμένων Εθνών (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) (GHS του ΟΗΕ): σύστημα που προτείνει την ταξινόμηση των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) με βάση τυποποιημένα είδη και βαθμούς φυσικής επικινδυνότητας και επικινδυνότητας για την υγεία και το περιβάλλον και καλύπτει τα αντίστοιχα στοιχεία γνωστοποίησης, όπως εικονογράμματα, προειδοποιητικές λέξεις, δηλώσεις επικινδυνότητας, δηλώσεις προφύλαξης και δελτία δεδομένων ασφαλείας, με τα οποία γνωστοποιούνται πληροφορίες σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις με σκοπό την προστασία των ανθρώπων (εργοδοτών, εργαζομένων, μεταφορέων, καταναλωτών και διασωστών) και του περιβάλλοντος (1).

Κατηγορία 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP: βλ. «Σοβαρή οφθαλμική βλάβη».

Κατηγορία 2 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP: βλ. «Οφθαλμικός ερεθισμός».

Καμία κατηγορία κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP: χημικά προϊόντα που δεν πληρούν τις απαιτήσεις ταξινόμησης ως κατηγορίας 1 ή 2 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP (ή κατηγορίας 2Α ή 2Β κατά GHS του ΟΗΕ). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά προς τον όρο «δεν ταξινομείται».

UPLC: (Ultra-High Performance Liquid Chromatography) υγροχρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης.

▼**M8**

UVCB: ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, πολύπλοκα προϊόντα αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά.

Έγκυρη μέθοδος δοκιμών: μέθοδος δοκιμών που θεωρείται επαρκούς καταλληλότητας και αξιοπιστίας για συγκεκριμένο σκοπό και βασίζεται σε επιστημονικά τεκμηριωμένες αρχές. Οι μέθοδοι δοκιμών δεν είναι ποτέ έγκυρες με την απόλυτη σημασία του όρου, αλλά μόνο σε σχέση με καθορισμένο σκοπό (18).

Επικυρωμένη μέθοδος δοκιμών: μέθοδος δοκιμών για την οποία έχουν ολοκληρωθεί μελέτες επικύρωσης προκειμένου να προσδιοριστούν η καταλληλότητα (συμπεριλαμβανομένης της ορθότητας) και η αξιοπιστία της για συγκεκριμένο σκοπό. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι επιδόσεις επικυρωμένης μεθόδου δοκιμών από πλευράς ορθότητας και αξιοπιστίας ενδέχεται να μην επαρκούν για να κριθεί αποδεκτή για τον προτεινόμενο σκοπό (18).

VRM: (Validated Reference Method) επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς.

VRM1: η EpiOcular™ EIT αναφέρεται ως η επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς 1.

VRM2: η SkinEthic™ HCE EIT αναφέρεται ως η επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς 2.

Βάρος της απόδειξης: διαδικασία εξέτασης της ισχύος και των αδυναμιών διαφόρων πληροφοριών για τη συναγωγή και την τεκμηρίωση συμπεράσματος σχετικά με το δυναμικό επικινδυνότητας που ενέχει μια υπό δοκιμή χημική ουσία.

▼M8

Προσάρτημα 2

ΚΥΡΙΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ RHCE ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΕΠΙΚΥΡΩΘΕΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΔΕΝ ΕΠΙΒΑΛΛΕΤΑΙ ΝΑ ΤΑΞΙΝΟΜΗΘΟΥΝ ΚΑΙ ΝΑ ΕΠΙΣΗΜΑΝΘΟΥΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΟΦΘΑΛΜΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΟ Ή ΤΗ ΣΟΒΑΡΗ ΟΦΘΑΛΜΙΚΗ ΒΛΑΒΗ

Στοιχεία δοκιμής	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Πρωτόκολλα	Υγρά (φέρονται με σιφώνιο στους 37±1°C ή σε χαμηλότερες θερμοκρασίες επί 15 λεπτά)	Στερεά (δεν φέρονται με σιφώνιο)	Υγρά και παχύρρευστα (φέρονται με σιφώνιο)	Στερεά (δεν φέρονται με σιφώνιο)
Επιφάνεια μοντέλου	0,6 cm^2	0,6 cm^2	0,5 cm^2	0,5 cm^2
Αριθμός πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού	Τουλάχιστον 2	Τουλάχιστον 2	Τουλάχιστον 2	Τουλάχιστον 2
Προέλεγχος για παρεμπόδιση λόγω χρώματος	50 μl + 1 ml H_2O επί 60 λεπτά στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH (μη έγχρωμες υπό δοκιμή χημικές ουσίες), ή 50 μl + 2 ml ισοπροπανόλης με ανάμειξη επί 2-3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (έγχρωμες υπό δοκιμή χημικές ουσίες) → εάν η οπτική πυκνότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στα 570±20 nm, μετά την αφαίρεση της οπτικής πυκνότητας για την ισοπροπανόλη ή το νερό, είναι > 0,08 (που αντιστοιχεί στο 5 % περίπου της μέσης οπτικής πυκνότητας του αρνητικού μάρτυρα), θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν ζωντανοί προσαρμοσμένοι μάρτυρες	50 mg + 1 ml H_2O επί 60 λεπτά στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH (μη έγχρωμες υπό δοκιμή χημικές ουσίες) και/ή 50 mg + 2 ml ισοπροπανόλης με ανάμειξη επί 2-3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (έγχρωμες και μη έγχρωμες υπό δοκιμή χημικές ουσίες) →εάν η οπτική πυκνότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στα 570±20 nm, μετά την αφαίρεση της οπτικής πυκνότητας για την ισοπροπανόλη ή το νερό, είναι > 0,08 (που αντιστοιχεί στο 5 % περίπου της μέσης οπτικής πυκνότητας του αρνητικού μάρτυρα), θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν ζωντανοί προσαρμοσμένοι μάρτυρες	10 μl + 90 μl H_2O αναμεμειγμένα επί 30±2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (RT, 18-28°C) → εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι έγχρωμη, πρέπει να χρησιμοποιηθούν ζωντανοί προσαρμοσμένοι μάρτυρες	10 mg + 90 μl H_2O αναμεμειγμένα επί 30±2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου → εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι έγχρωμη, πρέπει να χρησιμοποιηθούν ζωντανοί προσαρμοσμένοι μάρτυρες

▼M8

Στοιχεία δοκιμής	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Προέλεγχος για άμεση αναγωγή της MTT	50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml διαλύματος επί 180±15 λεπτά στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH → εάν το διάλυμα αποκτήσει κυανό/ιώδες χρώμα, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν αδρανοποιημένοι με κατάψυξη προσαρμοσμένοι μάρτυρες (χρησιμοποιούνται 50 µl αποστειρωμένου απιονισμένου νερού σε διάλυμα MTT ως αρνητικός μάρτυρας)	50 mg + 1 ml MTT 1 mg/ml διαλύματος επί 180±15 λεπτά στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH → εάν το διάλυμα αποκτήσει κυανό/ιώδες χρώμα, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν αδρανοποιημένοι με κατάψυξη προσαρμοσμένοι μάρτυρες (χρησιμοποιούνται 50 µl αποστειρωμένου απιονισμένου νερού σε διάλυμα MTT ως αρνητικός μάρτυρας)	30 µl + 300 µl MTT 1 mg/ml διαλύματος επί 180± 15 λεπτά στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH → εάν το διάλυμα αποκτήσει κυανό/ιώδες χρώμα, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν αδρανοποιημένοι σε νερό προσαρμοσμένοι μάρτυρες (χρησιμοποιούνται 30 µl αποστειρωμένου απιονισμένου νερού σε διάλυμα MTT ως αρνητικός μάρτυρας)	30 mg + 300 µl MTT 1 mg/ml διαλύματος επί 180± 15 λεπτά στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH → εάν το διάλυμα αποκτήσει κυανό/ιώδες χρώμα, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν αδρανοποιημένοι σε νερό προσαρμοσμένοι μάρτυρες (χρησιμοποιούνται 30 µl αποστειρωμένου απιονισμένου νερού σε διάλυμα MTT ως αρνητικός μάρτυρας)
Προκαταρκτική αγωγή	20 µl DPBS ελεύθερο Ca^{2+}/Mg^{2+} επί 30 ± 2 λεπτά στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH, προστατευμένο από το φως.	20 µl DPBS ελεύθερο Ca^{2+}/Mg^{2+} επί 30±2 λεπτά στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH, προστατευμένο από το φως.	—	—
Δόσεις αγωγής και εφαρμογή	50 µl (83,3 µl/cm^2)	50 mg (83,3 mg/cm^2) με χρήση βαθμονομημένου εργαλείου (π.χ. κοφτή κουταλιά βαθμονομημένη να χωράει 50 mg χλωριούχου νατρίου).	10 µl DPBS ελεύθερο Ca^{2+}/Mg^{2+} + 30 ± 2 µl (60 µl/cm^2) Για παχύρρευστο, χρησιμοποιήστε πλέγμα νάιλον	30 µl DPBS ελεύθερο Ca^{2+}/Mg^{2+} >+ 30 ± 2 mg (60 mg/cm^2)
Χρόνος και θερμοκρασία έκθεσης	30 λεπτά (± 2 λεπτά) σε θρεπτικό μέσο στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	6 ώρες (± 0,25 ώρες) σε θρεπτικό μέσο στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	30 λεπτά (± 2 λεπτά) σε θρεπτικό μέσο στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	4 ώρες (± 0,1 ώρες) σε θρεπτικό μέσο στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH
Έκπλυση σε θερμοκρασία δωματίου	3 φορές σε 100 ml DPBS ελεύθερο Ca^{2+}/Mg^{2+}	3 φορές σε 100 ml DPBS ελεύθερο Ca^{2+}/Mg^{2+}	20 ml DPBS ελεύθερο Ca^{2+}/Mg^{2+}	25 ml DPBS ελεύθερο Ca^{2+}/Mg^{2+}
Εμβύθιση μετά την έκθεση	12 λεπτά (± 2 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου σε θρεπτικό μέσο	25 λεπτά (± 2 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου σε θρεπτικό μέσο	30 λεπτά (± 2 λεπτά) στους 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH σε θρεπτικό μέσο	30 λεπτά (± 2 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου σε θρεπτικό μέσο

▼M8

Στοιχεία δοκιμής	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Επώαση μετά την έκθεση	120 λεπτά (± 15 λεπτά) σε θρεπτικό μέσο στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	18 ώρες (± 0,25 ώρες) σε θρεπτικό μέσο στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	καμία	18 ώρες (± 0,5 ώρες) σε θρεπτικό μέσο στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH
Αρνητικός μάρτυρας	50 μl H_2O Παράλληλη δοκιμή	50 μl H_2O Παράλληλη δοκιμή	30 ± 2 μl DPBS ελεύθερο Ca^{2+}/Mg^{2+} Παράλληλη δοκιμή	30 ± 2 μl DPBS ελεύθερο Ca^{2+}/Mg^{2+} Παράλληλη δοκιμή
Θετικός μάρτυρας	50 μl οξικού μεθυλεστέρα Παράλληλη δοκιμή	50 μl οξικού μεθυλεστέρα Παράλληλη δοκιμή	30 ± 2 μl οξικού μεθυλεστέρα Παράλληλη δοκιμή	30 ± 2 μl οξικού μεθυλεστέρα Παράλληλη δοκιμή
Διάλυμα MTT	300 μl 1 mg/ml	300 μl 1 mg/ml	300 μl 1 mg/ml	300 μl 1 mg/ml
Χρόνος και θερμοκρασία επώασης MTT	180 λεπτά (± 15 λεπτά) στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	180 λεπτά (± 15 λεπτά) στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	180 λεπτά (± 15 λεπτά) στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	180 λεπτά (± 15 λεπτά) στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH
Διαλύτης εκχύλισης	2 ml ισοπροπανόλης (εκχύλιση από το επάνω και το κάτω τμήμα του ενθέματος με διάτρηση του ιστού)	2 ml ισοπροπανόλης (εκχύλιση από το κάτω τμήμα του ενθέματος με διάτρηση του ιστού)	1,5 ml ισοπροπανόλης (εκχύλιση από το επάνω και το κάτω τμήμα του ενθέματος)	1,5 ml ισοπροπανόλης (εκχύλιση από το κάτω τμήμα του ενθέματος)
Χρόνος και θερμοκρασία εκχύλισης	2-3 ώρες με ανάδευση (~120 σ.α.λ.) σε θερμοκρασία δωματίου ή ολονυχτίως στους 4-10°C	2-3 ώρες με ανάδευση (~120 σ.α.λ.) σε θερμοκρασία δωματίου ή ολονυχτίως στους 4-10°C	4 ώρες με ανάδευση (~120 σ.α.λ.) σε θερμοκρασία δωματίου ή τουλάχιστον ολονυχτίως χωρίς ανάδευση στους 4-10°C	Τουλάχιστον 2 ώρες με ανάδευση (~120 σ.α.λ.) σε θερμοκρασία δωματίου
Μέτρηση OD	570 nm (550 - 590 nm) χωρίς φίλτρο αναφοράς	570 nm (550-590 nm) χωρίς φίλτρο αναφοράς	570 nm (540 - 600 nm) χωρίς φίλτρο αναφοράς	570 nm (540 - 600 nm) χωρίς φίλτρο αναφοράς
Ποιοτικός έλεγχος ιστού	Αγωγή με 100 μl Triton X-1 000,3% κ.ό. 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 λεπτά	Αγωγή με 100 μl Triton X-1 000,3% κ.ό. 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 λεπτά	Αγωγή 30 λεπτών με SDS (50 μl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,5 mg/ml	Αγωγή 30 λεπτών με SDS (50 μl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,2 mg/ml

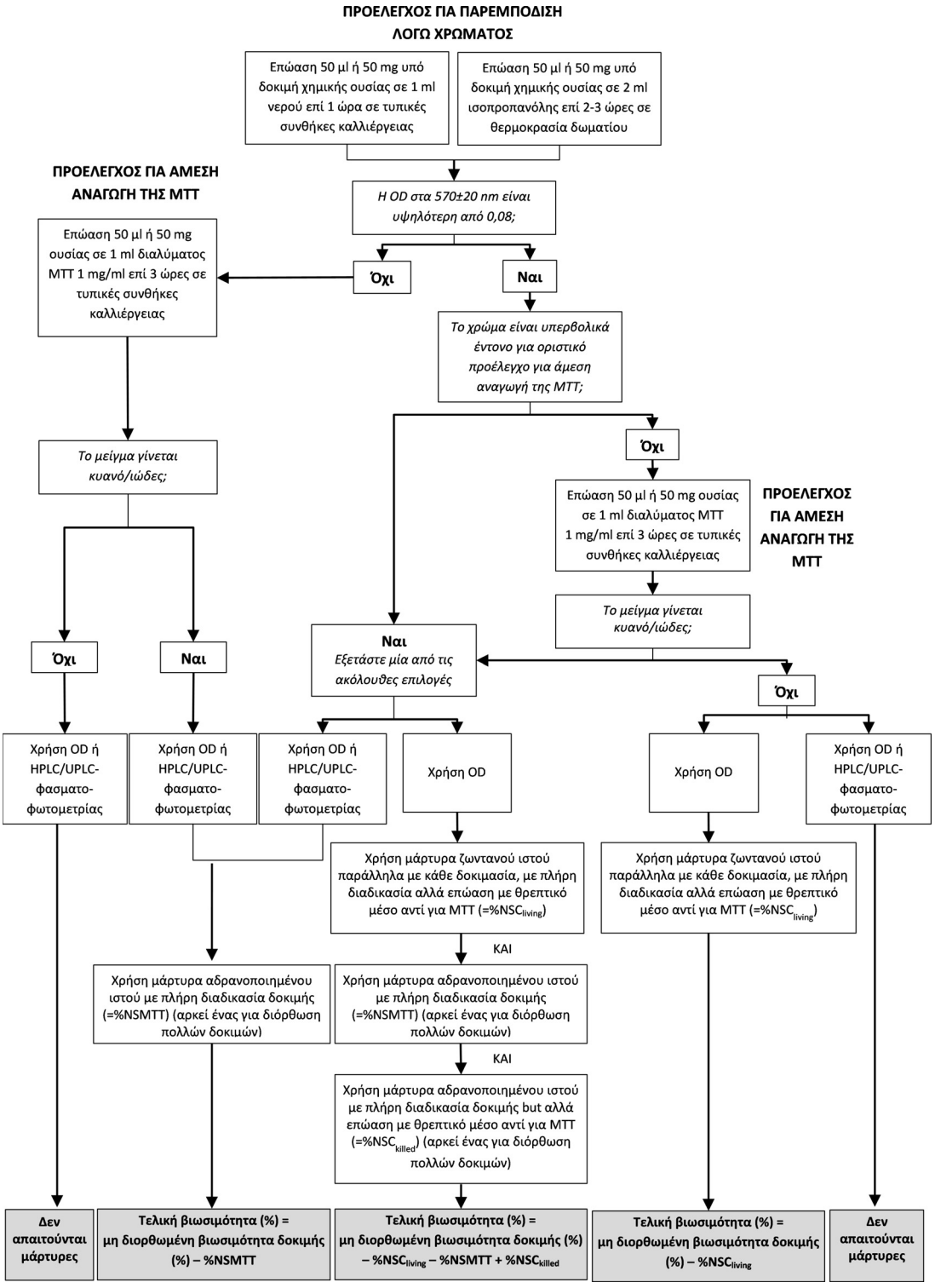
▼M8

Στοιχεία δοκιμής	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Κριτήρια αποδοχής	1. Η μέση OD των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που υποβλήθηκαν σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα θα πρέπει να είναι > 0,8 και < 2,5 2. Η μέση βιωσιμότητα των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που εκτέθηκαν επί 30 λεπτά στον θετικό μάρτυρα, εκφραζόμενη ως ποσοστό (%) του αρνητικού μάρτυρα, θα πρέπει να είναι < 50 % 3. Η διαφορά βιωσιμότητας μεταξύ δύο πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 20 %.	1. Η μέση OD των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που υποβλήθηκαν σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα θα πρέπει να είναι > 0,8 και < 2,5 2. Η μέση βιωσιμότητα των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που εκτέθηκαν επί 6 ώρες στον θετικό μάρτυρα, εκφραζόμενη ως ποσοστό (%) του αρνητικού μάρτυρα, θα πρέπει να είναι < 50 % 3. Η διαφορά βιωσιμότητας μεταξύ δύο πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 20 %.	1. Η μέση OD των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που υποβλήθηκαν σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα θα πρέπει να είναι > 1,0 και ≤ 2,5 2. Η μέση βιωσιμότητα των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που εκτέθηκαν επί 30 λεπτά στον θετικό μάρτυρα, εκφραζόμενη ως ποσοστό (%) του αρνητικού μάρτυρα, θα πρέπει να είναι ≤ 30 % 3. Η διαφορά βιωσιμότητας μεταξύ δύο πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 20 %.	1. Η μέση OD των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που υποβλήθηκαν σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα θα πρέπει να είναι > 1,0 και ≤ 2,5 2. Η μέση βιωσιμότητα των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που εκτέθηκαν επί 4 ώρες στον θετικό μάρτυρα, εκφραζόμενη ως ποσοστό (%) του αρνητικού μάρτυρα, θα πρέπει να είναι ≤ 20 % 3. Η διαφορά βιωσιμότητας μεταξύ δύο πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 20 %.

▼**M8**

Προσάρτημα 3

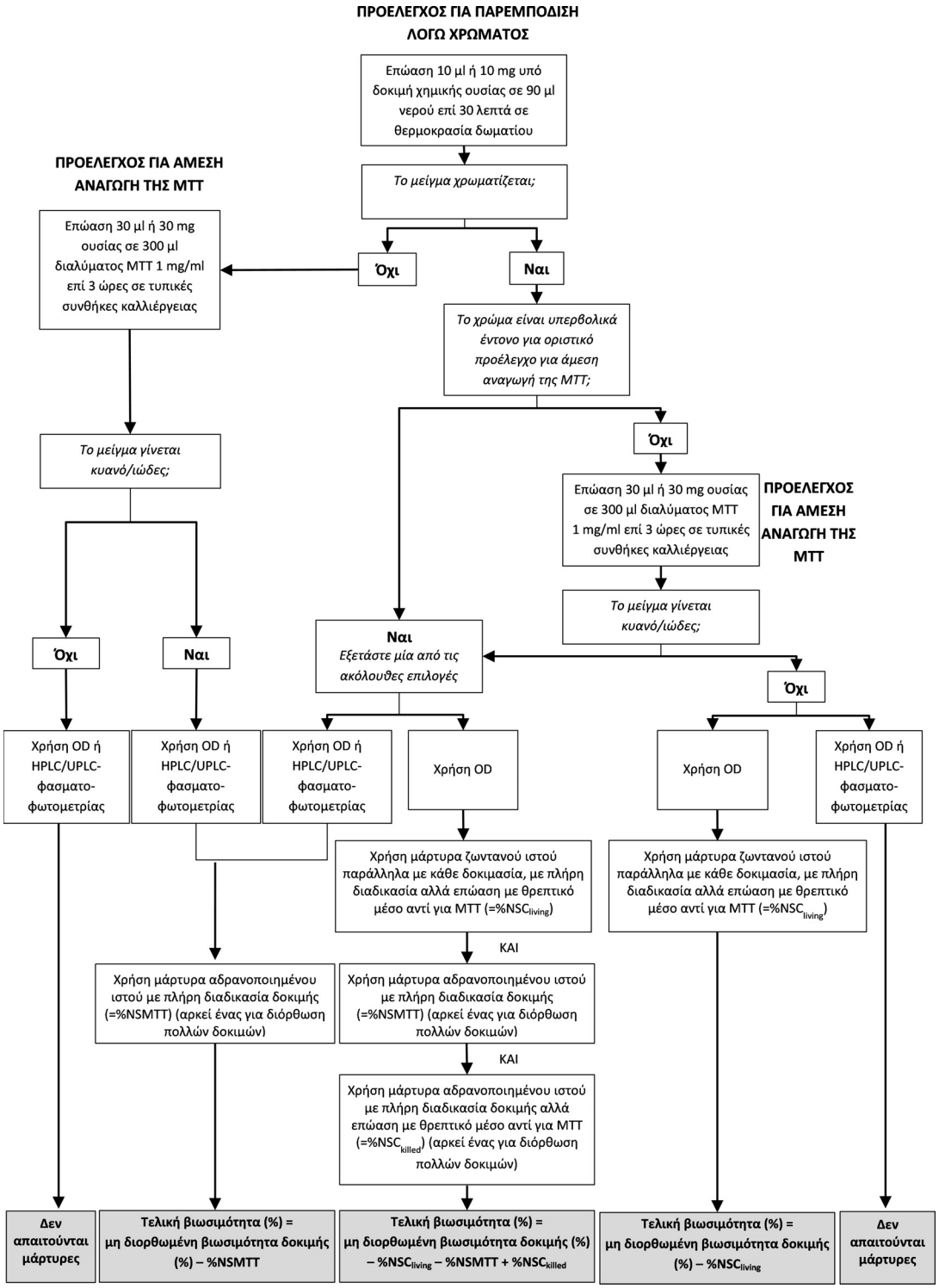
ΕΠΕΞΗΓΗΜΑΤΙΚΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΡΟΗΣ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΟΝ ΤΡΟΠΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΑΜΕΣΩΝ ΑΝΑΓΩΓΙΚΩΝ ΤΗΣ MTT ΚΑΙ/Η ΤΩΝ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΤΙΚΩΝ ΛΟΓΩ ΧΡΩΜΑΤΟΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ, ΒΑΣΕΙ ΤΗΣ SOP ΤΗΣ VRM1



▼**M8**

Προσάρτημα 4

ΕΠΕΞΗΓΗΜΑΤΙΚΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΡΟΗΣ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΟΝ ΤΡΟΠΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΑΜΕΣΩΝ ΑΝΑΓΩΓΙΚΩΝ ΤΗΣ MTT ΚΑΙ/Η ΤΩΝ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΤΙΚΩΝ ΛΟΓΩ ΧΡΩΜΑΤΟΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ, ΒΑΣΕΙ ΤΗΣ SOP ΤΗΣ VRM2



▼**M8**

Προσάρτημα 5

ΒΑΣΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΚΑΙ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΠΟΔΟΧΗΣ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΗΤΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ HPLC/UPLC-ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΓΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΦΟΡΜΑΖΑΝΗΣ MTT ΠΟΥ ΕΚΧΥΛΙΖΕΤΑΙ ΑΠΟ ΙΣΤΙΚΑ ΜΟΡΦΩΜΑΤΑ RHE

Παράμετρος	Πρωτόκολλο από την καθοδήγηση της FDA (36)(38)	Κριτήρια αποδοχής
Επιλεκτικότητα	Ανάλυση ισοπροπανόλης, ζωντανού τυφλού δείγματος (εκχύλισμα ισοπροπανόλης από ζωντανούς ιστούς RhCE χωρίς καμία αγωγή), αδρανοποιημένου τυφλού δείγματος (εκχύλισμα ισοπροπανόλης από αδρανοποιημένα ιστικά μορφώματα RhCE χωρίς καμία αγωγή) και χρωστικής (π.χ. κυανό του μεθυλενίου)	εμβαδόν$_{παρεμβολής}$ ≤ 20 % του εμβαδού$_{LLOQ}$ ([1])
Ακρίβεια	Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου (φορμαζάνη MTT στα 1,6 μg/ml, 16 μg/ml και 160 μg/ml) σε ισοπροπανόλη (n=5)	CV ≤ 15 % ή ≤ 20 % για το LLOQ
Ορθότητα	Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ισοπροπανόλη (n=5)	%Dev ≤ 15 % ή ≤ 20 % για το LLOQ
Φαινόμενο μήτρας	Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ζωντανό τυφλό δείγμα (n=5)	85 % ≤ φαινόμενο μήτρας % ≤ 115 %
Μεταφορά υλικού	Ανάλυση ισοπροπανόλης μετά από πρότυπο ULOQ ([2])	εμβαδόν$_{παρεμβολής}$ ≤ 20 % του εμβαδού$_{LLOQ}$
Αναπαραγωγιμότητα (εντός ημέρας)	3 ανεξάρτητες καμπύλες βαθμονόμησης (με βάση 6 διαδοχικές αραιώσεις φορμαζάνης MTT 1:3 σε ισοπροπανόλη, ξεκινώντας από το ULOQ, δηλαδή 200 μg/ml), Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ισοπροπανόλη (n=5)	Καμπύλες βαθμονόμησης: %Dev ≤ 15 % ή ≤ 20 % για το LLOQ Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου: %Dev ≤ 15 % και CV ≤ 15 %
Αναπαραγωγιμότητα (μεταξύ ημερών)	Ημέρα 1: 1 καμπύλη βαθμονόμησης και μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ισοπροπανόλη (n=3) Ημέρα 2: 1 καμπύλη βαθμονόμησης και μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ισοπροπανόλη (n=3) Ημέρα 3: 1 καμπύλη βαθμονόμησης και μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ισοπροπανόλη (n=3)	
Βραχυχρόνια σταθερότητα της φορμαζάνης MTT σε εκχύλισμα ιστών RhCE	Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ζωντανό τυφλό δείγμα (n=3) αναλυόμενοι την ημέρα της παρασκευής και μετά από 24 ώρες φύλαξης σε θερμοκρασία δωματίου	%Dev ≤ 15 %
Μακροχρόνια σταθερότητα της φορμαζάνης MTT σε εκχύλισμα ιστών RhCE, εφόσον απαιτείται	Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ζωντανό τυφλό δείγμα (n=3) αναλυόμενοι την ημέρα της παρασκευής και μετά από αρκετές ημέρες φύλαξης στους -20°C	%Dev ≤ 15 %

([1]) LLOQ: κατώτερο όριο ποσοτικού προσδιορισμού, ορισμένο ώστε να καλύπτει βιωσιμότητα ιστού 1-2 %, δηλαδή 0,8 μg/ml.

([2]) ULOQ: ανώτερο όριο ποσοτικού προσδιορισμού, ορισμένο ώστε να είναι τουλάχιστον δύο φορές υψηλότερο από την υψηλότερη αναμενόμενη συγκέντρωση φορμαζάνης MTT σε εκχυλίσματα ισοπροπανόλης από αρνητικούς μάρτυρες (~70 μg/ml στην VRM), δηλαδή 200 μg/ml.

▼M8

Β.70 *IN VITRO* ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ER

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών του ΟΟΣΑ με βάση τις επιδόσεις

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 493 του ΟΟΣΑ (2015). Η TG 493 είναι μια κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών που βασίζεται στις επιδόσεις (PBTG), στην οποία περιγράφεται η μεθοδολογία για τις *in vitro* δοκιμασίες ανασυνδυασμένου ανθρώπινου υποδοχέα οιστρογόνων για την ανίχνευση συγγένειας δέσμευσης με τον υποδοχέα οιστρογόνων (δοκιμασίες δέσμευσης hrER). Περιλαμβάνει δύο μηχανιστικά και λειτουργικά παρεμφερείς δοκιμασίες για τον προσδιορισμό ουσιών που δεσμεύονται στον υποδοχέα οιστρογόνων (ERα) και αναμένεται να διευκολύνει την ανάπτυξη νέων παρεμφερών ή τροποποιημένων δοκιμασιών, σύμφωνα με τις αρχές επικύρωσης που καθορίζονται στο έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ για την επικύρωση και τη διεθνή αποδοχή νέων ή επικαιροποιημένων μεθόδων δοκιμών για την αξιολόγηση επικινδυνότητας (1). Οι πλήρως επικυρωμένες μέθοδοι δοκιμών αναφοράς (προσάρτημα 2 και προσάρτημα 3) που αποτελούν τη βάση για την εν λόγω PBTG είναι οι ακόλουθες:

— η *in vitro* δοκιμασία δέσμευσης υποδοχέα οιστρογόνων (ER) Freyberger-Wilson (FW) με χρήση ανθρώπινου ανασυνδυασμένου ERα πλήρους μήκους (2) και

— η *in vitro* δοκιμασία δέσμευσης υποδοχέα οιστρογόνων με χρήση ανασυνδυασμένης ανθρώπινης πρωτεΐνης περιοχής δέσμευσης προσδέματος, του Chemical Evaluation and Research Institute (CERI) (Ινστιτούτο αξιολόγησης και έρευνας χημικών ουσιών) (2).

Υπάρχουν διαθέσιμα πρότυπα επιδόσεων (PS) (3) που διευκολύνουν την ανάπτυξη και επικύρωση παρεμφερών μεθόδων δοκιμών για την ίδια παράμετρο επικινδυνότητας και επιτρέπουν την έγκαιρη τροποποίηση της PBTG 493, ούτως ώστε να εφικτή η προσθήκη νέων παρεμφερών δοκιμασιών στην επικαιροποιημένη PBTG. Εντούτοις, παρεμφερείς δοκιμασίες θα προστίθενται μόνο αφού τις εξετάσει ο ΟΟΣΑ και συμφωνήσει ότι πληρούνται τα πρότυπα επιδόσεων. Οι δοκιμασίες που περιλαμβάνονται στην TG 493 μπορούν να χρησιμοποιούνται αδιακρίτως για τη συμμόρφωση προς τις απαιτήσεις των χωρών μελών του ΟΟΣΑ όσον αφορά τα αποτελέσματα δοκιμών σχετικά με τη δέσμευση υποδοχέα οιστρογόνων, με παράλληλη αξιοποίηση της αμοιβαίας αποδοχής δεδομένων του ΟΟΣΑ.

Ιστορικό και αρχές των δοκιμασιών που περιλαμβάνονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών

2. Το 1998 ο ΟΟΣΑ ανέλαβε μια δράση πρώτης προτεραιότητας με σκοπό την αναθεώρηση των υφιστάμενων και την εκπόνηση νέων κατευθυντήριων γραμμών δοκιμών για τη διαλογή και τις δοκιμές δυνητικών ενδοκρινικών διαταρακτών. Το εννοιακό πλαίσιο του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση δυνητικών ενδοκρινικών διαταρακτών αναθεωρήθηκε το 2012. Τα αρχικά και τα αναθεωρημένα εννοιακά πλαίσια περιλαμβάνονται ως παραρτήματα στο έγγραφο καθοδήγησης «Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption» (Τυποποιημένες κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών για την αξιολόγηση του δυναμικού χημικών ουσιών ως ενδοκρινικών διαταρακτών) (4). Το εννοιακό πλαίσιο περιλαμβάνει πέντε επίπεδα, καθένα εκ των οποίων αντιστοιχεί σε διαφορετικό επίπεδο βιολογικής πολυπλοκότητας. Οι δοκιμασίες δέσμευσης ER που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών κατατάσσονται στο επίπεδο 2, το οποίο περιλαμβάνει «*in vitro δοκιμασίες για την παροχή δεδομένων σχετικά με επιλεγμένους ενδοκρινικούς μηχανισμούς/οδούς*». Η παρούσα μέθοδος δοκιμών αφορά *in vitro* δοκιμασίες δέσμευσης υποδοχέα που έχουν σχεδιαστεί για τον προσδιορισμό προσδεμάτων του ανθρώπινου υποδοχέα οιστρογόνων α (ERα).

▼**M8**

3. Η καταλληλότητα της *in vitro* δοκιμασίας ER για τις βιολογικές λειτουργίες έχει καταδειχθεί με σαφήνεια. Οι δοκιμασίες δέσμευσης ER έχουν σχεδιαστεί για τον προσδιορισμό χημικών ουσιών που μπορούν να διαταράξουν την οιστρογονική ορμονική οδό και έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως κατά τις τελευταίες δύο δεκαετίες για τον χαρακτηρισμό της κατανομής των ER στους ιστούς, καθώς και για τον προσδιορισμό των αγωνιστών/ανταγωνιστών ER. Οι εν λόγω δοκιμασίες αποτυπώνουν την αλληλεπίδραση προσδέματος-υποδοχέα η οποία είναι το πρώτο στάδιο της οδού σηματοδότησης οιστρογόνων και είναι κρίσιμης σημασίας για την αναπαραγωγική λειτουργία όλων των σπονδυλωτών.

4. Η αλληλεπίδραση των οιστρογόνων με τους ER μπορεί να επηρεάσει τη μεταγραφή των ελεγχόμενων από τα οιστρογόνα γονιδίων και να επαγάγει μη γονιδιωματικές επιδράσεις, με αποτέλεσμα την επαγωγή ή την αναστολή κυτταρικών διεργασιών, περιλαμβανομένων όσων είναι αναγκαίες για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τη φυσιολογική ανάπτυξη του διαμορφωμένου εμβρύου, και την αναπαραγωγική λειτουργία (5) (6) (7). Η διατάραξη των φυσιολογικών οιστρογονικών συστημάτων μπορεί να προκαλέσει δυσμενείς επιπτώσεις στη φυσιολογική ανάπτυξη (οντογένεση), την αναπαραγωγική υγεία και την ακεραιότητα του αναπαραγωγικού συστήματος. Η απρόσφορη σηματοδότηση μέσω των ER μπορεί να οδηγήσει σε επιδράσεις όπως αυξημένος κίνδυνος ορμονοεξαρτώμενου καρκίνου, δυσμενείς επιπτώσεις στη γονιμότητα και αλλοιώσεις στη διαδικασία αύξησης και ανάπτυξης του εμβρύου (8).

5. Οι *in vitro* δοκιμασίες δέσμευσης βασίζονται στην άμεση αλληλεπίδραση μιας ουσίας με συγκεκριμένη θέση δέσμευσης προσδέματος υποδοχέα που ρυθμίζει τη γονιδιακή μεταγραφή. Το κύριο στοιχείο της δοκιμασίας δέσμευσης ανθρώπινου ανασυνδυασμένου υποδοχέα οιστρογόνων α (hrERα) μετρά την ικανότητα ενός ραδιοσημασμένου προσδέματος ([^{3}H]17β-οιστραδιόλη) να δεσμεύεται στον ER παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας (ανταγωνιστή). Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για τον ER ανταγωνίζονται με το ραδιοσημασμένο πρόσδεμα σε χαμηλότερη συγκέντρωση σε σύγκριση με τις χημικές ουσίες με χαμηλότερη συγγένεια για τον υποδοχέα. Η δοκιμασία αυτή αποτελείται από δύο βασικά στοιχεία: ένα πείραμα δέσμευσης κορεσμού για τον χαρακτηρισμό των παραμέτρων αλληλεπίδρασης υποδοχέα-προσδέματος και την τεκμηρίωση της ειδικότητας του ER, ακολουθούμενο από ένα πείραμα ανταγωνιστικής δέσμευσης που χαρακτηρίζει τον ανταγωνισμό μεταξύ μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας και ενός ραδιοσημασμένου προσδέματος ως προς τη δέσμευση στον ER.

6. Μελέτες επικύρωσης των δοκιμασιών δέσμευσης CERI και FW έχουν καταδείξει την καταλληλότητα και την αξιοπιστία τους ως προς τον σκοπό για τον οποίο προορίζονται (2).

7. Οι ορισμοί και οι συντομογραφίες που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

Πεδίο εφαρμογής και περιορισμοί που σχετίζονται με τις δοκιμασίες δέσμευσης υποδοχέα

8. Οι δοκιμασίες αυτές προτείνονται για σκοπούς διαλογής και καθορισμού προτεραιοτήτων, αλλά μπορούν επίσης να παρέχουν πληροφορίες για ένα μοριακό εναρκτήριο συμβάν (MIE) που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο πλαίσιο προσέγγισης βάρους της απόδειξης. Αφορούν τη δέσμευση χημικών ουσιών στη θέση δέσμευσης προσδέματος ERα σε *in vitro* σύστημα. Ως εκ τούτου, τα αποτελέσματα δεν θα πρέπει να παρεκβάλλονται άμεσα στην πολύπλοκη σηματοδότηση και ρύθμιση του ακέραιου ενδοκρινικού συστήματος *in vivo*.

▼**M8**

9. Η δέσμευση του φυσικού προσδέματος, της 17β-οιστραδιόλης, είναι το αρχικό στάδιο της σειράς μοριακών συμβάντων που ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων στόχων και καταλήγει εντέλει σε αλλαγές της φυσιολογίας (9). Ως εκ τούτου, η δέσμευση στην περιοχή δέσμευσης προσδέματος ERα θεωρείται ένας από τους βασικούς μηχανισμούς ενδοκρινικών διαταραχών που μεσολαβούνται από τον ER, αν και υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί μέσω των οποίων μπορεί να λάβει χώρα ενδοκρινική διαταραχή, συμπεριλαμβανομένων i) των αλληλεπιδράσεων με θέσεις του ERα διαφορετικές από τη θέση δέσμευσης προσδέματος, ii) των αλληλεπιδράσεων με άλλους υποδοχείς που σχετίζονται με τη σηματοδότηση οιστρογόνων, τον ERβ και τον συζευγμένο με πρωτεΐνη G υποδοχέα οιστρογόνων, άλλους υποδοχείς και ενζυμικά συστήματα εντός του ενδοκρινικού συστήματος, iii) της σύνθεσης ορμονών, iv) της μεταβολικής ενεργοποίησης και/ή της αδρανοποίησης ορμονών, v) της κατανομής ορμονών στους ιστούς στόχους, και vi) της απομάκρυνσης ορμονών από το σώμα. Καμία από τις δοκιμασίες της παρούσας μεθόδου δοκιμών δεν αφορά τους συγκεκριμένους τρόπους δράσης.

10. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών αφορά την ικανότητα των ουσιών να δεσμεύονται σε ανθρώπινο ERα και δεν παρέχει τη δυνατότητα διάκρισης μεταξύ αγωνιστών ή ανταγωνιστών του ERα. Οι δοκιμασίες δεν αφορούν ούτε περαιτέρω κατάντη συμβάντα, όπως η μεταγραφή γονιδίων, ούτε φυσιολογικές αλλαγές. Δεδομένου ότι κατά την επικύρωση χρησιμοποιήθηκαν μόνο μεμονωμένες μονοσυστατικές ουσίες, δεν έχει εξεταστεί η εφαρμοσιμότητα σε μείγματα δοκιμών. Οι δοκιμασίες είναι πάντως θεωρητικά εφαρμόσιμες στον έλεγχο πολυσυστατικών ουσιών και μειγμάτων. Πριν από τη χρήση της μεθόδου δοκιμών σε μείγμα για την παραγωγή δεδομένων για συγκεκριμένο κανονιστικό σκοπό, θα πρέπει να εξετάζεται αν –και, εάν ναι, για ποιον λόγο– μπορεί να αποδώσει αποτελέσματα κατάλληλα για τον επιδιωκόμενο σκοπό. Τέτοια εξέταση δεν χρειάζεται όταν οι κανονιστικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τον έλεγχο του μείγματος.

11. Τα ελεύθερα κυττάρων συστήματα υποδοχέα δεν διαθέτουν εγγενή μεταβολική ικανότητα και δεν επικυρώθηκαν σε συνδυασμό με μεταβολικά ενζυμικά συστήματα. Ωστόσο, η ενσωμάτωση της μεταβολικής δραστηριότητας στον σχεδιασμό μελέτης μπορεί να είναι εφικτή αλλά θα απαιτήσει περαιτέρω εργασίες επικύρωσης.

12. Χημικές ουσίες που μπορούν να μετουσιώσουν την πρωτεΐνη (του υποδοχέα), όπως επιφανειοδραστικά ή χημικές ουσίες που μπορούν να μεταβάλλουν το pH του ρυθμιστικού διαλύματος της δοκιμασίας, δεν επιτρέπεται να υποβάλλονται σε δοκιμή ή επιτρέπεται να υποβάλλονται σε δοκιμή μόνο σε συγκεντρώσεις που δεν προκαλούν τέτοιες αλληλεπιδράσεις. Επιπλέον, το φάσμα συγκεντρώσεων μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας που μπορεί να εξεταστεί περιορίζεται από τη διαλυτότητά της στο ρυθμιστικό διάλυμα της δοκιμασίας.

13. Για λόγους πληροφόρησης, στον πίνακα 1 παρατίθενται τα αποτελέσματα δοκιμών αγωνιστών για τις 24 ουσίες που υποβλήθηκαν σε δοκιμή στο πλαίσιο αμφότερων των πλήρως επικυρωμένων δοκιμασιών που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών. Εξ αυτών, οι 17 χαρακτηρίζονται ουσίες δεσμευόμενες στον ER και οι 6 χαρακτηρίζονται μη δεσμευόμενες με βάση δημοσιευμένες εργασίες, περιλαμβανομένων και *in vitro* δοκιμασιών για μεταγραφική ενεργοποίηση ER και/ή της μητροτροφικής δοκιμασίας (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Όσον αφορά τα δεδομένα που παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα 1, υπήρξε σχεδόν 100 % συμφωνία μεταξύ των δύο δοκιμασιών σχετικά με τις ταξινομήσεις όλων των ουσιών έως 10^{-4}M, και κάθε ουσία ταξινομήθηκε σωστά ως δεσμευόμενη ή μη δεσμευόμενη στον ER. Συμπληρωματικές πληροφορίες σχετικά με την εν λόγω ομάδα χημικών ουσιών καθώς και πρόσθετων χημικών ουσιών που υποβλήθηκαν στις δοκιμασίες δέσμευσης ER στη διάρκεια των μελετών επικύρωσης παρέχονται στα πρότυπα επιδόσεων για τη δοκιμασία δέσμευσης hrER (3), προσάρτημα 2 (πίνακες 1, 2 και 3).

▼M8

Πίνακας 1

Ταξινόμηση ουσιών ως δεσμευόμενων ή μη δεσμευόμενων στον ER, όταν υποβάλλονται σε δοκιμή στις δοκιμασίες δέσμευσης hrER FW και CERI σε σύγκριση με την αναμενόμενη απόκριση

	Ονομασία της ουσίας	Αριθ. CAS	Αναμενόμενη απόκριση	Δοκιμασία FW		Δοκιμασία CERI		Κατηγορία χημικής ουσίας MESH	Κατηγορία προϊόντος
				Πεδίο τιμών συγκέντρωσης (M)	Ταξινόμηση	Πεδίο τιμών συγκέντρωσης (M)	Ταξινόμηση		
1	17β-Οιστραδιόλη	50-28-2	*Δεσμευόμενη*	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Δεσμευόμενη	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Δεσμευόμενη	Στεροειδές	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
2	Νορεθυνοδρέλη	68-23-5	*Δεσμευόμενη*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Δεσμευόμενη	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Δεσμευόμενη	Στεροειδές	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
3	Νορεθινδρόνη	68-22-4	*Δεσμευόμενη*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Δεσμευόμενη	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Δεσμευόμενη	Στεροειδές	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
4	Φθαλικό δι-*n*-βουτύλιο	84-74-2	*Μη δεσμευόμενη* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Μη δεσμευόμενη (**) (+)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Μη δεσμευόμενη (**) (+)	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός), εστέρας	Πλαστικοποιητής, ενδιάμεση χημική ουσία
5	DES	56-53-1	*Δεσμευόμενη*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός), φαινόλη	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
6	17α-Αιθινυλοιστραδιόλη	57-63-6	*Δεσμευόμενη*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	Στεροειδές	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
7	meso-Εξεστρόλη	84-16-2	*Δεσμευόμενη*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός), φαινόλη	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
8	Γενιστεΐνη	446-72-0	*Δεσμευόμενη*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	Υδρογονάνθρακας (ετεροκυκλικός), φλαβονοειδές	Φυσικό προϊόν

▼M8

	Ονομασία της ουσίας	Αριθ. CAS	Αναμενόμενη απόκριση	Δοκιμασία FW		Δοκιμασία CERI		Κατηγορία χημικής ουσίας MESH	Κατηγορία προϊόντος
				Πεδίο τιμών συγκέντρωσης (M)	Ταξινόμηση	Πεδίο τιμών συγκέντρωσης (M)	Ταξινόμηση		
9	Εκουόλη	531-95-3	*Δεσμευόμενη*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	Μεταβολίτης φυτοοιστρογόνων	Φυσικό προϊόν
10	p-Υδροξυβενζοϊκός βουτυλεστέρας (4-υδροξυβενζοϊκό *n*-βουτύλιο)	94-26-8	*Δεσμευόμενη*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	Paraben (p-υδροξυβενζοϊκός εστέρας)	Συντηρητικό
11	Εννεϋλοφαινόλη (μείγμα)	84852-15-3	*Δεσμευόμενη*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	Αλκυλοφαινόλη	Ενδιάμεση ένωση
12	*o,p'*-DDT	789-02-6	*Δεσμευόμενη*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	Οργανοχλωριούχος	Εντομοκτόνο
13	Κορτικοστερόνη	50-22-6	*Μη δεσμευόμενη* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Μη δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Μη δεσμευόμενη	Στεροειδές	Φυσικό προϊόν
14	Ζεαραλενόνη	17924-92-4	*Δεσμευόμενη*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	Υδρογονάνθρακας (ετεροκυκλικός), λακτόνη	Φυσικό προϊόν
15	Ταμοξιφαίνη	10540-29-1	*Δεσμευόμενη*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός)	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
16	5α-Διυδροτεστοστερόνη	521-18-6	*Δεσμευόμενη*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	Στεροειδές, μη φαινολική	Φυσικό προϊόν
17	Δισφαινόλη Α	80-05-7	*Δεσμευόμενη*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	Φαινόλη	Ενδιάμεση χημική ουσία
18	4-*n*-Επτυλοφαινόλη	1987-50-4	*Δεσμευόμενη*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Αμφίβολο ([a])	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	Αλκυλοφαινόλη	Ενδιάμεσο προϊόν

▼M8

	Ονομασία της ουσίας	Αριθ. CAS	Αναμενόμενη απόκριση	Δοκιμασία FW		Δοκιμασία CERI		Κατηγορία χημικής ουσίας MESH	Κατηγορία προϊόντος
				Πεδίο τιμών συγκέντρωσης (M)	Ταξινόμηση	Πεδίο τιμών συγκέντρωσης (M)	Ταξινόμηση		
19	Κεπόνη (Chlordecone)	143-50-0	*Δεσμευόμενη*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	Υδρογονάνθρακας (αλογονωμένος)	Φυτοφάρμακο
20	Βενζο(a)ανθρακένιο	56-55-3	*Μη δεσμευόμενη*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Μη δεσμευόμενη ([β])	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Μη δεσμευόμενη ([β])	Αρωματικός υδρογονάνθρακας	Ενδιάμεσο προϊόν
21	Εντερολακτόνη	78473-71-9	*Δεσμευόμενη*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	Φυτοοιστρογόνο	Φυσικό προϊόν
22	Προγεστερόνη	57-83-0	*Μη δεσμευόμενη* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Μη δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Μη δεσμευόμενη	Στεροειδές	Φυσικό προϊόν
23	Οκτυλοτριαιθοξυσιλάνιο	2943-75-1	*Μη δεσμευόμενη*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Μη δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Μη δεσμευόμενη	Σιλάνιο	Τροποποιητής επιφανειών
24	Ατραζίνη	1912-24-9	*Μη δεσμευόμενη* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Μη δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Μη δεσμευόμενη	Ετεροκυκλική ένωση,	Ζιζανιοκτόνο

(*) Όριο διαλυτότητας $< 1 \times 10^{-4}$ M.

(**) Η χρήση και ταξινόμηση του φθαλικού δι-n-βουτυλίου (DBP) ως μη δεσμευόμενης ουσίας βασίστηκε στη διεξαγωγή δοκιμών σε συγκεντρώσεις έως 10^{-4} M, διότι είχε παρατηρηθεί ότι η ουσία είναι αδιάλυτη στα 10^{-3}M (π.χ. θολερότητα) σε ορισμένα εργαστήρια στη διάρκεια των μελετών προεπικύρωσης.

([+]) Στη μελέτη επικύρωσης, το φθαλικό δι-*n*-βουτύλιο (DBP) υποβλήθηκε σε δοκιμή ως κωδικοποιημένη υπό δοκιμή χημική ουσία σε συγκεντρώσεις έως 10^{-3} M. Υπό αυτές τις συνθήκες, ορισμένα εργαστήρια παρατήρησαν μείωση της δέσμευσης του ραδιοσημασμένου προσδέματος στην υψηλότερη συγκέντρωση (10^{-3} M) και/ή αμφίβολη προσαρμογή της καμπύλης. Για τις εν λόγω σειρές δοκιμών, η DBP ταξινομήθηκε ως «αμφίβολη» ή «δεσμευόμενη» σε 3/5 εργαστήρια με χρήση της δοκιμασίας CERI και σε 5/6 εργαστήρια με χρήση της δοκιμασίας FW [βλ. παραπομπή (2), ενότητες IV.B.3α, β και VI.A].

([α]) Η ταξινόμηση δεν ήταν η αναμενόμενη. Η ταξινόμηση της 4-*n*-επτυλοφαινόλης ως «αμφίβολη» ή «μη δεσμευόμενη» από 3/5 εργαστήρια είχε ως αποτέλεσμα την ταξινόμησή της ως «αμφίβολη» κατά μέσο όρο. Κατόπιν διεξοδικότερου ελέγχου, διαπιστώθηκε ότι αυτό οφειλόταν στους περιορισμούς διαλυτότητας της ουσίας, που εμπόδιζαν την παραγωγή πλήρους καμπύλης δέσμευσης.

([β]) Στη διάρκεια της μελέτης επικύρωσης, το βενζο(a)ανθρακένιο ταξινομήθηκε εκ νέου ως μη δεσμευόμενη (αρνητική) ουσία βάσει δημοσιευθείσας βιβλιογραφίας στην οποία καταδεικνύεται ότι η *in vitro* οιστρογόνος δραστηριότητα που αναφέρεται για την εν λόγω ουσία (16) εξαρτάται πρωτίστως από τη μεταβολική ενεργοποίησή της (17)(18). Στις ελεύθερες κυττάρων δοκιμασίες δέσμευσης hrER, όπως χρησιμοποιούνται στην παρούσα διεργαστηριακή μελέτη επικύρωσης, δεν αναμένεται ενζυμική μεταβολική ενεργοποίηση της ουσίας. Ως εκ τούτου, η ορθή ταξινόμηση για την εν λόγω ουσία είναι «μη δεσμευόμενη» όταν χρησιμοποιείται υπό τις πειραματικές συνθήκες που ισχύουν για τις δοκιμασίες FW και CERI.

▼M8

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ hrER

Βασικά στοιχεία της δοκιμασίας

14. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών εφαρμόζεται σε δοκιμασίες που χρησιμοποιούν υποδοχέα ER και κατάλληλα ισχυρό πρόσδεμα του υποδοχέα, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης/ιχνηθέτης για τη δοκιμασία και μπορεί να εκτοπίζεται από αυξανόμενες συγκεντρώσεις μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Οι δοκιμασίες δέσμευσης περιλαμβάνουν τα ακόλουθα δύο βασικά στοιχεία: 1) δέσμευση κορεσμού και 2) ανταγωνιστική δέσμευση. Η δοκιμασία δέσμευσης κορεσμού χρησιμοποιείται για την επιβεβαίωση της ειδικότητας και της δραστικότητας των σκευασμάτων υποδοχέα, ενώ το πείραμα ανταγωνιστικής δέσμευσης χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της ικανότητας μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας να δεσμεύεται στον hrER.

Μάρτυρες

15. Θα πρέπει να περιγράφεται η βάση του προτεινόμενου παράλληλου οιστρογόνου αναφοράς και των μαρτύρων. Οι παράλληλοι μάρτυρες [διαλύτης (φορέας), θετικός (ουσία δεσμευόμενη στον ER, ισχυρή και ασθενής συγγένεια), αρνητικός (μη δεσμευόμενη ουσία)], κατά περίπτωση, χρησιμεύουν ως ένδειξη της λειτουργικότητας της δοκιμασίας υπό τις συνθήκες δοκιμής και παρέχουν μια βάση για συγκρίσεις μεταξύ πειραμάτων· αποτελούν συνήθως μέρος των κριτηρίων αποδοχής για συγκεκριμένο πείραμα (1). Σε ένα τρυβλίο στη διάρκεια κάθε σειράς δοκιμών, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πλήρεις καμπύλες συγκέντρωσης για το οιστρογόνο αναφοράς και τους μάρτυρες (ασθενώς δεσμευόμενη και μη δεσμευόμενη ουσία). Όλα τα άλλα τρυβλία θα πρέπει να περιέχουν: 1) υψηλή (σχεδόν πλήρης εκτόπιση του ραδιοσημασμένου προσδέματος) και μέτρια (περίπου ίση με την IC_{50}) συγκέντρωση E2 και ασθενώς δεσμευόμενης ουσίας, καθεμία εκ των οποίων εις τριπλούν, 2) μάρτυρα με διαλύτη και μη ειδική δέσμευση, καθένα εκ των οποίων εις τριπλούν.

Τυπικές διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου

16. Οι τυπικές διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου θα πρέπει να διεκπεραιώνονται σύμφωνα με τα οριζόμενα για κάθε δοκιμασία προκειμένου να διασφαλίζεται ότι οι υποδοχείς είναι ενεργοί, οι συγκεντρώσεις των χημικών ουσιών είναι ορθές και τα όρια ανοχής παραμένουν σταθερά στη διάρκεια πολλών επαναλήψεων, διασφαλίζοντας τη διαχρονική ικανότητα παροχής των αναμενόμενων αποκρίσεων δέσμευσης ER.

Απόδειξη της τεχνικής ικανότητας του εργαστηρίου

17. Πριν από τον έλεγχο άγνωστων χημικών ουσιών με οποιαδήποτε από τις δοκιμασίες της παρούσας μεθόδου δοκιμών, κάθε εργαστήριο θα πρέπει να αποδεικνύει την τεχνική ικανότητά του να διεξάγει δοκιμασίες κορεσμού για την επιβεβαίωση της ειδικότητας και της δραστικότητας του σκευάσματος ER, καθώς και δοκιμασίες ανταγωνιστικής δέσμευσης με το οιστρογόνο αναφοράς και τους μάρτυρες (ασθενώς δεσμευόμενης και μη δεσμευόμενης ουσίας). Το εργαστήριο θα πρέπει να δημιουργεί βάση ιστορικών δεδομένων με τα αποτελέσματα για το οιστρογόνο αναφοράς και τους μάρτυρες που προέκυψαν από 3-5 ανεξάρτητα πειράματα που διεξήχθησαν σε διαφορετικές ημέρες. Τα εν λόγω πειράματα θα αποτελούν τη βάση για το οιστρογόνο αναφοράς και τους ιστορικούς μάρτυρες του εργαστηρίου και θα χρησιμοποιούνται για τη μερική αξιολόγηση της αποδοχής της δοκιμασίας για μελλοντικές σειρές δοκιμών.

18. Η αποκρισιμότητα του συστήματος δοκιμής θα επιβεβαιώνεται και μέσω ελέγχου των ουσιών ελέγχου ικανότητας που απαριθμούνται στον πίνακα 2. Ο κατάλογος ουσιών ελέγχου ικανότητας είναι ένα υποσύνολο των ουσιών αναφοράς που περιλαμβάνονται στα πρότυπα επιδόσεων για τις δοκιμασίες δέσμευσης ER (3). Οι ουσίες αυτές είναι διαθέσιμες στο εμπόριο, αντιπροσωπεύουν τις κατηγορίες χημικών ουσιών που συνδέονται συνήθως με δράση δέσμευσης των ER, παρουσιάζουν το κατάλληλο φάσμα ισχύος που αναμένεται για τις δεσμευόμενες στον ER ουσίες (ισχυρές έως ασθενείς) και περιλαμβάνουν μη δεσμευόμενες (αρνητικές) ουσίες. Για κάθε ουσία ελέγχου ικανότητας, οι υπό δοκιμή συγκεντρώσεις θα πρέπει να καλύπτουν το φάσμα που παρέχεται στον πίνακα 2. Θα πρέπει να διεξάγονται τουλάχιστον τρία πειράματα για κάθε ουσία και τα αποτελέσματα θα πρέπει να είναι σύμφωνα με την αναμενόμενη χημική δραστικότητα. Κάθε πείραμα θα πρέπει να διεξάγεται ανεξάρτητα (δηλ. με πρόσφατα παρασκευασμένες αραιώσεις υποδοχέα, χημικών ουσιών και αντιδραστηρίου), με τρία πανομοιότυπα δείγματα για κάθε συγκέντρωση. Η τεχνική ικανότητα αποδεικνύεται μέσω της ορθής ταξινόμησης (θετική/αρνητική) κάθε ουσίας ελέγχου ικανότητας. Οι δοκιμές ελέγχου ικανότητας θα πρέπει να εκτελούνται από κάθε τεχνικό κατά την εκμάθηση των δοκιμασιών.

▼M8

Πίνακας 2

Κατάλογος μαρτύρων και ουσιών ελέγχου ικανότητας για τις δοκιμασίες ανταγωνιστικής δέσμευσης hrER [1]

Αριθ.	Ονομασία της ουσίας	Αριθ. CAS [2]	Αναμενόμενη Απόκριση [3] [4]	Εύρος συγκεντρώσεων δοκιμής (M)	Χημική κατηγορία MeSH [5]	Κατηγορία προϊόντος [6]
Μάρτυρες (οιστρογόνο αναφοράς, ασθενώς δεσμευόμενη ουσία, μη δεσμευόμενη ουσία)						
1	17β-Οιστραδιόλη	50-28-2	Δεσμευόμενη	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Στεροειδές	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
2	Νορεθυνοδρέλη (ή) Νορεθινδρόνη	68-23-5 (ή) 68-22-4	Δεσμευόμενη	3×10^{-9} – 30×10^{-6}	Στεροειδές	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
3	Οκτυλοτριαιθοξυσιλάνιο	2943-75-1	Μη δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Σιλάνιο	Τροποποιητής επιφανειών
Ουσίες ελέγχου ικανότητας [6]						
4	Διαιθυλοστιλβεστρόλη	56-53-1	Δεσμευόμενη	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός), φαινόλη	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
5	17α-Αιθινυλοιστραδιόλη	57-63-6	Δεσμευόμενη	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Στεροειδές	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
6	meso-Εξεστρόλη	84-16-2	Δεσμευόμενη	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός), φαινόλη	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
7	Ταμοξιφαίνη	10540-29-1	Δεσμευόμενη	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός)	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
8	Γενιστεΐνη	446-72-0	Δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ετεροκυκλική ένωση, φλαβονοειδές	Φυσικό προϊόν
9	Δισφαινόλη Α	80-05-7	Δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Φαινόλη	Ενδιάμεση χημική ουσία
10	Ζεαραλενόνη	17924-92-4	Δεσμευόμενη	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	Ετεροκυκλική ένωση, λακτόνη	Φυσικό προϊόν

▼M8

Αριθ.	Ονομασία της ουσίας	Αριθ. CAS ([2])	Αναμενόμενη Απόκριση ([3]) ([4])	Εύρος συγκεντρώσεων δοκιμής (M)	Χημική κατηγορία MeSH ([5])	Κατηγορία προϊόντος ([6])
11	p-Υδροξυβενζοϊκός βουτυλεστέρας	94-26-8	Δεσμευόμενη	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	Καρβοξυλικό οξύ, φαινόλη	Συντηρητικό
12	Ατραζίνη	1912-24-9	Μη δεσμευόμενη	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Ετεροκυκλική ένωση,	Ζιζανιοκτόνο
13	Φθαλικό δι-n-βουτύλιο (DBP) ([7])	84-74-2	Μη δεσμευόμενη ([8])	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός), εστέρας	Πλαστικοποιητής, ενδιάμεση χημική ουσία
14	Κορτικοστερόνη	50-22-6	Μη δεσμευόμενη	1×10^{-11} – 1×10^{-4}	Στεροειδές	Φυσικό προϊόν

([1]) Σε περίπτωση που μια ουσία ελέγχου ικανότητας δεν διατίθεται πλέον στο εμπόριο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ουσία με την ίδια ταξινόμηση ως προς δέσμευση του ER και συγκρίσιμη ισχύ και χημική κατηγορία.
([2]) Συντομογραφίες: Αριθ. CAS = αριθμός μητρώου της υπηρεσίας Chemical Abstract Service
([3]) Ταξινόμηση ως ουσία δεσμευόμενη ή μη δεσμευόμενη στον ERα κατά τη μελέτη επικύρωσης για τις δοκιμασίες δέσμευσης hrER CERI και FW (2).
([4]) Η δραστικότητα δέσμευσης ER βασίστηκε στο έγγραφα επισκόπησης των διαθέσιμων δεδομένων της ICCVAM για τις δοκιμασίες δέσμευσης ER και TA (9) καθώς και σε εμπειρικά δεδομένα και άλλες πληροφορίες που ελήφθησαν από τις αναφερόμενες δημοσιευμένες μελέτες που εξετάστηκαν (10) (11) (12) (13) (14) (15).
([5]) Οι ουσίες ταξινομήθηκαν σε μία ή περισσότερες χημικές κατηγορίες με χρήση των θεματικών επικεφαλίδων ιατρικού περιεχομένου (Medical Subject Headings, MeSH) της Εθνικής Ιατρικής Βιβλιοθήκης των ΗΠΑ, ενός διεθνώς αναγνωρισμένου, τυποποιημένου συστήματος ταξινόμησης (διατίθεται στη διεύθυνση: http://www.nlm.nih.gov/mesh).
([6]) Οι ουσίες ταξινομήθηκαν σε μία ή περισσότερες κατηγορίες προϊόντων με χρήση της βάσης δεδομένων επικίνδυνων ουσιών της Εθνικής Ιατρικής Βιβλιοθήκης των ΗΠΑ (διατίθεται στη διεύθυνση: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB)
([7]) Το DBP μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτικός μάρτυρας μη δεσμευόμενης ουσίας, σε μέγιστη συγκέντρωση 10^{-4} M.
([8]) Το όριο διαλυτότητας για την ουσία αυτή είναι 10^{-4}. Η χρήση και ταξινόμηση του φθαλικού δι-n-βουτυλίου (DBP) ως μη δεσμευόμενης ουσίας βασίστηκε στη διεξαγωγή δοκιμών σε συγκεντρώσεις έως 10^{-4} M, διότι είχε παρατηρηθεί ότι η ουσία είναι αδιάλυτη στα 10^{-3} M (π.χ. θολερότητα) σε ορισμένα εργαστήρια στη διάρκεια των μελετών προεπικύρωσης.

▼M8

Δοκιμές διαλυτότητας και προσδιορισμός εύρους συγκεντρώσεων για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες

19. Θα πρέπει να διεξάγεται προκαταρκτική δοκιμή για τον προσδιορισμό του ορίου διαλυτότητας για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία και για τον προσδιορισμό του κατάλληλου εύρους συγκεντρώσεων προς χρήση κατά τη διεξαγωγή της δοκιμής. Το όριο διαλυτότητας κάθε υπό δοκιμή χημικής ουσίας πρέπει να προσδιορίζεται αρχικά στον διαλύτη και να επιβεβαιώνεται περαιτέρω υπό τις συνθήκες δοκιμασίας. Η τελική συγκέντρωση που υποβάλλεται σε δοκιμή στη δοκιμασία δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 1 mM. Οι δοκιμές προσδιορισμού εύρους περιλαμβάνουν μάρτυρα με διαλύτη και οκτώ λογαριθμικές, διαδοχικές αραιώσεις, που ξεκινούν από τη μέγιστη αποδεκτή συγκέντρωση (π.χ. 1 mM ή χαμηλότερη, με βάση το όριο διαλυτότητας), και καταγραφή της παρουσίας θολερότητας ή ιζήματος. Οι συγκεντρώσεις στο δεύτερο και το τρίτο πείραμα θα πρέπει να προσαρμόζονται κατά περίπτωση, με σκοπό τη βελτίωση του χαρακτηρισμού της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης.

Κριτήρια αποδοχής σειρών δοκιμών

20. Η αποδοχή ή η απόρριψη μιας σειράς δοκιμών βασίζεται στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται για το οιστρογόνο αναφοράς και τον μάρτυρα που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε πείραμα. Πρώτον, για το τρυβλίο 1, οι πλήρεις καμπύλες συγκέντρωσης για τους μάρτυρες αναφοράς από κάθε πείραμα θα πρέπει να αντιστοιχούν στα μέτρα των επιδόσεων με τις παραμέτρους προσαρμογής της καμπύλης (π.χ. IC_{50} και κλίση Hill) να βασίζονται στα αποτελέσματα που έχουν αναφερθεί για τα αντίστοιχα πρωτόκολλα των δοκιμασιών CERI και FW (προσάρτημα 2 και 3), καθώς και στα ιστορικά δεδομένα για τους μάρτυρες του εργαστηρίου που διεξάγει τη δοκιμή. Όλοι οι μάρτυρες (οιστρογόνο αναφοράς, ασθενώς δεσμευόμενη ουσία, μη δεσμευόμενη ουσία) θα πρέπει να ταξινομούνται σωστά για κάθε πείραμα. Δεύτερον, πρέπει να αξιολογείται η συνέπεια των μαρτύρων όλων των επακόλουθων τρυβλίων σε σχέση με το τρυβλίο 1. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται επαρκές εύρος συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ώστε να προσδιορίζεται με σαφήνεια η μέγιστη τιμή της καμπύλης ανταγωνιστικής δέσμευσης. Η μεταβλητότητα μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων σε κάθε συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας καθώς και μεταξύ των τριών ανεξάρτητων σειρών δοκιμών θα πρέπει να είναι εντός εύλογων ορίων και να τεκμηριώνεται επιστημονικά. Η ικανότητα συνεπούς διεξαγωγής της δοκιμασίας θα πρέπει να αποδεικνύεται μέσω της ανάπτυξης και διατήρησης βάσης ιστορικών δεδομένων για το οιστρογόνο αναφοράς και τους μάρτυρες. Ως μέτρο της αναπαραγωγιμότητας εντός εργαστηρίου μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι τυπικές αποκλίσεις ή οι συντελεστές μεταβλητότητας για τους μέσους όρους των παραμέτρων προσαρμογής των καμπυλών του οιστρογόνου αναφοράς και της ασθενώς δεσμευόμενης ουσίας-μάρτυρα από πολλαπλά πειράματα. Η επανεξέταση των αποτελεσμάτων μαρτύρων τρυβλίων κάθε σειράς δοκιμών καθώς και για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να πραγματοποιείται με βάση την επαγγελματική κρίση.

Επιπλέον, αναφορικά με τα κριτήρια αποδοχής, θα πρέπει να διασφαλίζεται η συμμόρφωση με τις ακόλουθες αρχές:

— θα πρέπει να υπάρχουν επαρκή δεδομένα για την ποσοτική αξιολόγηση της δέσμευσης ER

— οι συγκεντρώσεις που ελέγχονται θα πρέπει να παραμένουν εντός του φάσματος διαλυτότητας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Ανάλυση των δεδομένων

21. Η καθορισμένη διαδικασία ανάλυσης δεδομένων για τα δεδομένα κορεσμού και ανταγωνιστικής δέσμευσης θα πρέπει να συμμορφώνεται με τις βασικές αρχές χαρακτηρισμού των αλληλεπιδράσεων υποδοχέα-προσδέματος. Τυπικά, τα δεδομένα δέσμευσης κορεσμού αναλύονται με χρήση μοντέλου μη γραμμικής παλινδρόμησης που καλύπτει τη συνολική και τη μη ειδική δέσμευση. Κατά τον προσδιορισμό των Bmax και Kd, ενδέχεται να χρειάζεται διόρθωση ως προς την εξάντληση του προσδέματος [π.χ. Swillens, 1995 (19)]. Τα δεδομένα από τις δοκιμασίες ανταγωνιστικής δέσμευσης

▼M8

τυπικά μετασχηματίζονται [π.χ. εκατοστιαία ειδική δέσμευση και συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (log M)]. Οι εκτιμήσεις των τιμών λογαρίθμου (IC_{50}) για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να προσδιορίζονται με χρήση λογισμικού μη γραμμικής προσαρμογής καμπύλης κατάλληλου για την προσαρμογή εξίσωσης Hill τεσσάρων παραμέτρων. Μετά την αρχική ανάλυση, θα πρέπει να εξετάζονται οι παράμετροι προσαρμογής της καμπύλης και να μελετάται ο βαθμός προσαρμογής των δεδομένων δέσμευσης στην προκύπτουσα καμπύλη ανταγωνιστικής δέσμευσης. Σε ορισμένες περιπτώσεις ενδέχεται να χρειάζεται συμπληρωματική ανάλυση προκειμένου να επιτευχθεί η βέλτιστη δυνατή προσαρμογή της καμπύλης [π.χ. περιορισμός της μέγιστης και/ή της ελάχιστης τιμής της καμπύλης, χρήση του κανόνα του 10 %, βλ. προσάρτημα 4 και παραπομπή 2 (ενότητα III.A.2)].

22. Η συμμόρφωση με τα κριτήρια αποδοχής (παράγραφος 20) υποδεικνύει ότι το σύστημα δοκιμής λειτουργεί σωστά, αλλά δεν διασφαλίζει ότι οποιαδήποτε συγκεκριμένη δοκιμή θα παράξει ορθά δεδομένα. Η επανάληψη των ορθών αποτελεσμάτων της πρώτης δοκιμής αποτελεί την καλύτερη ένδειξη ότι παρήχθησαν ορθά δεδομένα.

Γενικά κριτήρια ερμηνείας των δεδομένων

23. Επί του παρόντος δεν υφίσταται καθολικά αποδεκτή μέθοδος ερμηνείας των δεδομένων δέσμευσης ER. Εντούτοις, τόσο η ποιοτική (π.χ. δεσμευόμενη / μη δεσμευόμενη ουσία) όσο και η ποσοτική [π.χ. log IC_{50}, σχετική συγγένεια δέσμευσης (RBA) κ.λπ.] αξιολόγηση της μεσολαβούμενης από τον hrER δραστικότητας θα πρέπει να βασίζονται σε εμπειρικά δεδομένα και ορθή επιστημονική κρίση.

Έκθεση δοκιμής

24. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Δοκιμασία:

— χρησιμοποιηθείσα δοκιμασία,

Μάρτυρας/πρότυπο αναφοράς/υπό δοκιμή χημική ουσία

— πηγή, αριθμός παρτίδας, καταληκτική ημερομηνία χρήσης, εφόσον υπάρχει,

— σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εάν είναι γνωστή,

— διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον διαλύτη, εάν είναι γνωστές,

— μέτρηση του pH, της ωσμωμοριακότητας και του ιζήματος του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας στο οποίο προστέθηκε η υπό δοκιμή χημική ουσία, κατά περίπτωση.

Μονοσυστατική ουσία:

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμείξεων, κατά περίπτωση και εφόσον είναι πρακτικά εφικτό, κ.λπ.

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγματα:

— περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

▼**M8**

Διαλύτης/φορέας:

— χαρακτηρισμός (φύση, προμηθευτής και παρτίδα),

— αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη/φορέα,

— διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον διαλύτη/φορέα, εάν είναι γνωστές.

Υποδοχείς:

— προέλευση υποδοχέων (προμηθευτής, αριθ. καταλόγου, παρτίδα, είδος υποδοχέα, παρεχόμενη από τον προμηθευτή συγκέντρωση ενεργού υποδοχέα, παρεχόμενη από τον προμηθευτή πιστοποίηση),

— χαρακτηρισμός των υποδοχέων (περιλαμβανομένων των αποτελεσμάτων δέσμευσης κορεσμού): Kd, Bmax,

— φύλαξη των υποδοχέων,

— ραδιοσημασμένο πρόσδεμα:

— προμηθευτής, αριθ. καταλόγου, παρτίδα, ειδική δραστικότητα.

Συνθήκες δοκιμής:

— περιορισμοί διαλυτότητας υπό τις συνθήκες δοκιμασίας,

— σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος δέσμευσης,

— συγκέντρωση υποδοχέα,

— συγκέντρωση ιχνηθέτη (ραδιοσημασμένου προσδέματος),

— συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας,

— εκατοστιαία τιμή φορέα στην τελική δοκιμασία,

— θερμοκρασία και χρόνος επώασης,

— μέθοδος διαχωρισμού δεσμευμένου/ελεύθερου προσδέματος,

— θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες/ουσίες αναφοράς,

— κριτήρια για την κατάταξη δοκιμών ως θετικών, αρνητικών ή αμφίβολων.

Έλεγχος αποδοχής:

— πραγματικές τιμές IC_{50} και κλίσης Hill για τους παράλληλους θετικούς μάρτυρες/ουσίες αναφοράς.

Αποτελέσματα:

— ανεπεξέργαστα δεδομένα και δεδομένα για δεσμευμένο/ελεύθερο πρόσδεμα,

— έλεγχος επιβεβαίωσης μετουσίωσης, ανάλογα με την περίπτωση,

— η χαμηλότερη αποτελεσματική συγκέντρωση (LEC), εάν υπάρχει,

— τιμές RBA και/ή IC_{50}, ανάλογα με την περίπτωση,

— σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης, όπου είναι δυνατόν,

— στατιστικές αναλύσεις, εάν υπάρχουν, μαζί με μέτρο σφάλματος και εμπιστοσύνης (π.χ. SEM, SD, CV ή 95 % CI) και περιγραφή του τρόπου υπολογισμού των τιμών αυτών.

▼**M8**

Εξέταση των αποτελεσμάτων:

— εφαρμογή του κανόνα του 10 %

Συμπέρασμα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) OECD (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) OECD (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 222), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(5) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: p.20-6.

(6) Welboren W.J., *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr*. Relat. Cancer., 16(4): p. 1073-89.

(7) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. *Pathol*. Lab. Med., 135(1): p. 63-6.

(8) Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, Endo Rev 30(4):293-342.

(9) ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. (NIH Publication No 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.

(10) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(12) Akahori Y. *et al.* (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol*. *In Vitro*, 22(1): 225-231.

(13) OECD (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 67), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

(14) Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. p. 1-188.

(15) Yamasaki, K· Noda, S· Imatanaka, N· Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, Toxicol. Letters, 146: 111-120.

(16) Kummer V· Maskova, J· Zraly, Z· Neca, J· Simeckova, P· Vondracek, J· Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol.* Letters, 180: 213-221.

(17) Gozgit, JM· Nestor, KM· Fasco, MJ· Pentecost, BT· Arcaro, KF. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol*., 196: 58-67.

(18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. Chemosphere, 34: 835-848.

(19) Swillens S (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, Mol Pharmacol 47(6):1197-1203.

▼**M8**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Κανόνας του 10 %: δυνατότητα αποκλεισμού, από τις αναλύσεις, εκείνων των σημείων δεδομένων στα οποία η μέση τιμή των πανομοιότυπων δειγμάτων για την εκατοστιαία ειδική δέσμευση της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης υπερβαίνει κατά 10 % ή περισσότερο τη μέση τιμή σε χαμηλότερη συγκέντρωση (βλ. προσάρτημα 4).

Κριτήρια αποδοχής: ελάχιστα πρότυπα για τις επιδόσεις των πειραματικών ελέγχων και των προτύπων αναφοράς. Για να θεωρηθεί ένα πείραμα έγκυρο, θα πρέπει να πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής.

Ορθότητα (συμφωνία): ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί κριτήριο επιδόσεων της δοκιμασίας και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς τη «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας δοκιμασίας (1).

CF: (Conceptual Framework) το εννοιακό πλαίσιο του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση των ενδοκρινικών διαταρακτών.

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

CV: (Coefficient of variation) συντελεστής μεταβλητότητας.

E2: 17β-οιστραδιόλη

ED: ενδοκρινική διαταραχή

hERα: (Human estrogen receptor alpha) ανθρώπινος υποδοχέας οιστρογόνων α

ER: (Estrogen receptor) υποδοχέας οιστρογόνων

Οιστρογονική δραστικότητα: η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να μιμείται την ικανότητα της 17β-οιστραδιόλης να δεσμεύεται από τους υποδοχείς οιστρογόνων. Η δέσμευση στον hERα μπορεί να ανιχνευτεί με την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

IC50: ήμισυ της μέγιστης αποτελεσματικής συγκέντρωσης μιας ανασταλτικής χημικής ουσίας.

ICCVAM: (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) Διυπηρεσιακή Συντονιστική Επιτροπή για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (ΗΠΑ)

Διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα: μέτρο του βαθμού στον οποίο διαφορετικά ειδικευμένα εργαστήρια, που χρησιμοποιούν το ίδιο πρωτόκολλο και ελέγχουν τις ίδιες ουσίες, μπορούν να παράγουν ανάλογα αποτελέσματα από ποιοτική και ποσοτική άποψη. Η διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα προσδιορίζεται κατά τις διαδικασίες προεπικύρωσης και επικύρωσης και αποτελεί ένδειξη του κατά πόσον υπάρχει δυνατότητα επιτυχούς μεταφοράς μιας δοκιμής μεταξύ εργαστηρίων· καλείται επίσης αναπαραγωγιμότητα μεταξύ εργαστηρίων (1).

Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα: προσδιορισμός του βαθμού στον οποίο ειδικευμένα άτομα μπορούν να επαναλάβουν με επιτυχία τα ίδια αποτελέσματα εντός του ίδιου εργαστηρίου, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένο πρωτόκολλο σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Καλείται επίσης «αναπαραγωγιμότητα εντός εργαστηρίου» (1).

LEC: (Lowest Effective Concentration) η ελάχιστη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που επάγει απόκριση (δηλαδή η χαμηλότερη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην οποία ο συντελεστής αύξησης της επαγωγής διαφέρει σε στατιστικά σημαντικό βαθμό από τον παράλληλο μάρτυρα με φορέα).

▼M8

Δοκιμή παρόμοιου τύπου («me-too»): έκφραση της καθομιλουμένης που παραπέμπει σε δοκιμασία η οποία είναι δομικά και λειτουργικά ανάλογη με επικυρωμένη και εγκεκριμένη μέθοδο δοκιμών αναφοράς. Ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς την «παρεμφερή μέθοδο δοκιμών».

PBTG: (Performance-Based Test Guideline) κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών με βάση τις επιδόσεις.

Πρότυπα επιδόσεων: πρότυπα που βασίζονται σε επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών και παρέχουν τη βάση για την αξιολόγηση της συγκρισιμότητας προτεινόμενης δοκιμασίας η οποία είναι μηχανιστικά και λειτουργικά παρεμφερής. Στα πρότυπα επιδόσεων περιλαμβάνονται 1) τα βασικά στοιχεία της δοκιμασίας, 2) κατάλογος ελάχιστων ουσιών αναφοράς, οι οποίες έχουν επιλεγεί μεταξύ των χημικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για την απόδειξη των αποδεκτών επιδόσεων της επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς, και 3) τα συγκρίσιμα επίπεδα ορθότητας και αξιοπιστίας, που βασίζονται στα επιτευχθέντα για την επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών και τα οποία πρέπει να επιδεικνύει η προτεινόμενη δοκιμασία όταν αξιολογείται με χρήση του καταλόγου ελαχίστων ουσιών αναφοράς (1).

Ουσίες ελέγχου ικανότητας: υποσύνολο των ουσιών αναφοράς που περιλαμβάνονται στα πρότυπα επιδόσεων και οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιούνται από τα εργαστήρια για να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα στη διεξαγωγή τυποποιημένης δοκιμασίας. Τα κριτήρια επιλογής για τις εν λόγω ουσίες είναι συνήθως τα εξής: αντιπροσωπεύουν όλο το φάσμα αποκρίσεων, διατίθενται στο εμπόριο και συνοδεύονται από διαθέσιμα δεδομένα αναφοράς υψηλής ποιότητας.

Τεχνική ικανότητα: η αποδεδειγμένη ικανότητα ορθής διεξαγωγής δοκιμασίας, πριν από τη διεξαγωγή δοκιμών με άγνωστες ουσίες.

Οιστρογόνο αναφοράς: 17β-οιστραδιόλη (E2, CAS 50-28-2).

Μέθοδοι δοκιμών αναφοράς: οι δοκιμασίες στις οποίες βασίζεται η PBTG 493.

RBA: (Relative Binding Affinity) σχετική συγγένεια δέσμευσης. Η RBA μιας ουσίας υπολογίζεται ως ποσοστό του λογάριθμου (IC_{50}) για την ουσία σε σχέση με τον λογάριθμο (IC_{50}) για την 17β-οιστραδιόλη

Καταλληλότητα: περιγραφή της σχέσης μιας δοκιμασίας με την υπό μελέτη επίδραση και του κατά πόσον είναι κατάλληλη και χρήσιμη για συγκεκριμένο σκοπό. Πρόκειται για τον βαθμό στον οποίο η δοκιμασία μετρά ή προβλέπει σωστά τη βιολογική επίδραση υπό μελέτη. Η καταλληλότητα εμπεριέχει συνεκτίμηση της ορθότητας (συμφωνίας) μιας δοκιμασίας (1).

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια δοκιμασία μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας.

SD: (Standard Deviation) τυπική απόκλιση.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Επικυρωμένη μέθοδος δοκιμών: δοκιμασία για την οποία έχουν ολοκληρωθεί μελέτες επικύρωσης προκειμένου να προσδιοριστούν η καταλληλότητα (συμπεριλαμβανομένης της ορθότητας) και η αξιοπιστία της για συγκεκριμένο σκοπό. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι επιδόσεις επικυρωμένης μεθόδου δοκιμών από πλευράς ορθότητας και αξιοπιστίας ενδέχεται να μην επαρκούν για να κριθεί αποδεκτή για τον προτεινόμενο σκοπό (1).

Επικύρωση: η διαδικασία διά της οποίας διακριβώνεται η αξιοπιστία και η καταλληλότητα μιας συγκεκριμένης προσέγγισης, μεθόδου, δοκιμασίας, διεργασίας ή αξιολόγησης για καθορισμένο σκοπό (1).

▼**M8**

Προσάρτημα 2

ΟΙ IN VITRO ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΚΟΡΕΣΜΟΥ ΚΑΙ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ (ERA) FREYBERGER-WILSON ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ ER ΠΛΗΡΟΥΣ ΜΗΚΟΥΣΑ

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ (ΒΛ. ΕΠΙΣΗΣ ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ)

1. Στην παρούσα *in vitro* δοκιμασία κορεσμού και ανταγωνιστικής δέσμευσης υποδοχέα οιστρογόνων (ERα) χρησιμοποιείται ανθρώπινος υποδοχέας ERα (hrERα) πλήρους μήκους που παράγεται και απομονώνεται από κύτταρα εντόμων μολυσμένα με βακουλοϊό. Το πρωτόκολλο, που ανέπτυξαν οι Freyberger και Wilson, αποτέλεσε αντικείμενο διεθνούς μελέτης επικύρωσης πολλών εργαστηρίων (2), η οποία κατέδειξε την καταλληλότητα και την αξιοπιστία του για τον επιδιωκόμενο σκοπό της δοκιμασίας.

2. Η παρούσα δοκιμασία αποτελεί διαδικασία διαλογής για τον προσδιορισμό ουσιών που μπορούν να δεσμεύονται στον hrERα πλήρους μήκους. Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ικανότητας υπό δοκιμή χημικής ουσίας να ανταγωνίζεται την 17β-οιστραδιόλη όσον αφορά τη δέσμευση από τον hrERα. Τα ποσοτικά αποτελέσματα της δοκιμασίας είναι η IC_{50} (μέτρο της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που απαιτείται για να εκτοπιστεί το ήμισυ της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης από τον hrERα) και οι σχετικές συγγένειες δέσμευσης των υπό δοκιμή χημικών ουσιών για τον hrERα σε σύγκριση με τη 17β-οιστραδιόλη. Για λόγους διαλογής των χημικών ουσιών, στα αποδεκτά ποιοτικά αποτελέσματα της δοκιμασίας περιλαμβάνεται η ταξινόμηση των υπό δοκιμή χημικών ουσιών ως δεσμευόμενων, μη δεσμευόμενων ή αμφίβολης δέσμευσης στον hrERα, με βάση τα κριτήρια που περιγράφονται για τις καμπύλες δέσμευσης.

3. Στη δοκιμασία χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένο πρόσδεμα για τον οποίο το εργαστήριο απαιτείται να διαθέτει άδεια ραδιενεργών υλικών. Για κάθε διαδικασία στο πλαίσιο της οποίας γίνεται χρήση ραδιοϊσοτόπων και επικίνδυνων χημικών ουσιών θα πρέπει να τηρούνται οι κανονισμοί και οι διαδικασίες που ορίζει η εθνική νομοθεσία.

4. Πριν από τη χρήση της παρούσας δοκιμασίας για κανονιστικούς σκοπούς, θα πρέπει να μελετηθούν οι ενότητες «**ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ**» και «**ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ hrER**». Οι ορισμοί και οι συντομογραφίες που χρησιμοποιούνται στην παρούσα κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ (ΒΛ. ΕΠΙΣΗΣ ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ)

5. Η δοκιμασία δέσμευσης hrERα μετρά την ικανότητα ενός ραδιοσημασμένου προσδέματος ([^{3}H]17β-οιστραδιόλη) να δεσμεύεται στον ER παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας (ανταγωνιστή). Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για τον ER ανταγωνίζονται με το ραδιοσημασμένο πρόσδεμα σε χαμηλότερη συγκέντρωση σε σύγκριση με τις χημικές ουσίες με χαμηλότερη συγγένεια για τον υποδοχέα.

6. Η εν λόγω δοκιμασία αποτελείται από δύο βασικά στοιχεία: ένα πείραμα δέσμευσης κορεσμού για τον χαρακτηρισμό των παραμέτρων αλληλεπίδρασης υποδοχέα-προσδέματος, ακολουθούμενο από ένα πείραμα ανταγωνιστικής δέσμευσης που χαρακτηρίζει τον ανταγωνισμό μεταξύ μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας και ενός ραδιοσημασμένου προσδέματος ως προς τη δέσμευση στον ER.

7. Σκοπός του πειράματος δέσμευσης κορεσμού είναι ο χαρακτηρισμός συγκεκριμένης παρτίδας υποδοχέων ως προς τη συγγένεια δέσμευσης και τον αριθμό εν είδει προετοιμασίας για τη διεξαγωγή του πειράματος ανταγωνιστικής δέσμευσης. Το πείραμα δέσμευσης κορεσμού μετρά, υπό συνθήκες ισορροπίας, τη συγγένεια καθορισμένης συγκέντρωσης του υποδοχέα οιστρογόνων σε σχέση με το φυσικό πρόσδεμά του (η οποία αντιπροσωπεύεται από τη σταθερά διάστασης Kd), και τη συγκέντρωση των ενεργών θέσεων του υποδοχέα (Bmax).

▼M8

8. Το πείραμα ανταγωνιστικής δέσμευσης μετρά τη συγγένεια δέσμευσης μιας ουσίας στον ER, ανταγωνιζόμενη την [^{3}H]17β-οιστραδιόλη. Η συγγένεια προσδιορίζεται ποσοτικά βάσει της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας η οποία, σε συνθήκες ισορροπίας, αναστέλλει το 50 % της ειδικής δέσμευσης της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης (και η οποία καλείται «ανασταλτική συγκέντρωση 50 %» ή IC50). Η συγγένεια μπορεί επίσης να εκτιμηθεί με χρήση της σχετικής συγγένειας δέσμευσης (RBA, σε σχέση με την IC50 της οιστραδιόλης που μετράται χωριστά στην ίδια σειρά δοκιμών). Το πείραμα ανταγωνιστικής δέσμευσης μετρά τη δέσμευση της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης σε καθορισμένη συγκέντρωση παρουσία ευρέος φάσματος (οκτώ τάξεων μεγέθους) συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Στη συνέχεια, τα δεδομένα προσαρμόζονται σε μια μορφή της εξίσωσης Hill (Hill, 1910) βάσει της οποίας περιγράφεται η εκτόπιση του ραδιοσημασμένου προσδέματος από ανταγωνιστική δεσμευόμενη ουσία μίας θέσης. Ο βαθμός εκτόπισης της ραδιοσημασμένης οιστραδιόλης σε ισορροπία χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ως δεσμευόμενης, μη δεσμευόμενης ή αμφίβολης απόκρισης.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Επίδειξη των αποδεκτών επιδόσεων πρωτεΐνης hrERα

9. Πριν από την ένταξη των δοκιμασιών δέσμευσης κορεσμού και ανταγωνιστικής δέσμευσης στην καθημερινή πρακτική, θα πρέπει να καταδεικνύονται οι ορθές επιδόσεις κάθε νέας παρτίδας hrERα στο εργαστήριο στο οποίο θα χρησιμοποιηθεί. Για την επίδειξη των επιδόσεων θα πρέπει να χρησιμοποιείται διαδικασία δύο σταδίων. Τα στάδια αυτής είναι τα ακόλουθα:

— Διεξαγωγή δοκιμασίας δέσμευσης κορεσμού [^{3}H]17β-οιστραδιόλης με σκοπό να καταδειχθεί η ειδικότητα και ο κορεσμός του hrERα. Η μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης των δεδομένων αυτών (π.χ. BioSoft, McPherson, 1985, Motulsky, 1995) και η επακόλουθη ανάλυση Scatchard θα πρέπει να τεκμηριώνουν τη συγγένεια δέσμευσης της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης με τον hrERα (Kd) και τον αριθμό των υποδοχέων (Bmax) για κάθε παρτίδα hrERα.

— Διεξάγεται μια δοκιμασία ανταγωνιστικής δέσμευσης με χρήση των ουσιών μαρτύρων [οιστρογόνο αναφοράς (17β-οιστραδιόλη)], μιας ασθενώς δεσμευόμενης ουσίας (π.χ. νορεθυνοδρέλη ή νορεθινδρόνη) και μιας μη δεσμευόμενης ουσίας (οκτυλοτριαιθοξυσιλάνιο, OTES). Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να δημιουργεί βάση ιστορικών δεδομένων για να τεκμηριώνει τη συνέπεια της τιμής IC_{50} και άλλων σχετικών τιμών για το οιστρογόνο αναφοράς και την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία στα διάφορα πειράματα και τις διάφορες παρτίδες hrERα. Οι παράμετροι των καμπυλών ανταγωνιστικής δέσμευσης για τις ουσίες μάρτυρες θα πρέπει να περιλαμβάνονται εντός των ορίων του διαστήματος εμπιστοσύνης 95 % (βλ. πίνακα 1) που αναπτύχθηκαν με χρήση δεδομένων των εργαστηρίων που συμμετείχαν στη μελέτη επικύρωσης για την παρούσα δοκιμασία (2).

Πίνακας 1

Κριτήρια επιδόσεων που αναπτύχθηκαν για το οιστρογόνο αναφοράς και την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία της δοκιμασίας δέσμευσης hrER FW

Ουσία	Παράμετρος	Μέσος όρος (α)	Τυπική απόκλιση (n)	Διαστήματα εμπιστοσύνης 95 % (β)	
				Κατώτατο όριο	Ανώτατο όριο
17β-Οιστραδιόλη	Μέγιστη απόκριση (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Ελάχιστη απόκριση (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Κλίση Hill	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	$LogIC_{50}$ (M)	-8,92 (γ)	0,18 (67)	-8,97	-8,88

▼**M8**

Ουσία	Παράμετρος	Μέσος όρος (α)	Τυπική απόκλιση (n)	Διαστήματα εμπιστοσύνης 95 % (β)	
				Κατώτατο όριο	Ανώτατο όριο
Νορεθυνοδρέλη	Μέγιστη απόκριση (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Ελάχιστη απόκριση (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Κλίση Hill	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	Log IC_{50} (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Νορεθινδρόνη (γ)	Μέγιστη απόκριση (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Ελάχιστη απόκριση (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Κλίση Hill	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	$LogIC_{50}$ (M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

(α) Η μέση τιμή (n) ± τυπική απόκλιση (SD) υπολογίστηκαν με χρήση εκτιμήσεων για τις παραμέτρους προσαρμογής της καμπύλης (εξίσωση Hill 4 παραμέτρων) για σειρές δοκιμών μαρτύρων που διεξήχθησαν σε τέσσερα εργαστήρια στη διάρκεια της μελέτης επικύρωσης (βλ. παράρτημα Ν της παραπομπής 2).

(β) Τα διαστήματα εμπιστοσύνης επιπέδου 95 % παρέχονται ως οδηγός για τα κριτήρια αποδοχής.

(γ) Η υποβολή της νορεθινδρόνης σε δοκιμές ήταν προαιρετική για το υποέργο 4 στη διάρκεια της μελέτης επικύρωσης (βλ. παραπομπή 2, υποέργο 4). Ως εκ τούτου, η μέση τιμή ± SD (n) υπολογίστηκαν με χρήση εκτιμήσεων της προσαρμογής της καμπύλης (εξίσωση Hill 4 παραμέτρων) για τις σειρές δοκιμών μαρτύρων που διεξήχθησαν σε δύο εργαστήρια.
Η κλίμακα τιμών της IC_{50} *θα εξαρτάται από την Kd του σκευάσματος υποδοχέα και τη συγκέντρωση του ραδιοσημασμένου προσδέματος που χρησιμοποιούνται σε κάθε εργαστήριο. Η κατάλληλη προσαρμογή της κλίμακας τιμών* IC_{50} *με βάση τις συνθήκες που χρησιμοποιούνται για τη διεξαγωγή της δοκιμασίας είναι αποδεκτή.*

Απόδειξη της τεχνικής ικανότητας του εργαστηρίου

10. Βλ. παραγράφους 17 και 18, και πίνακα 2 στην ενότητα «**ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ hrER**» της παρούσας μεθόδου δοκιμών. Κάθε δοκιμασία (κορεσμού και ανταγωνιστικής δέσμευσης) θα πρέπει να περιλαμβάνει τρεις ανεξάρτητες σειρές δοκιμών (με πρόσφατα παρασκευασμένες αραιώσεις του υποδοχέα, των χημικών ουσιών και των αντιδραστηρίων) σε διαφορετικές ημέρες, και κάθε σειρά δοκιμών θα πρέπει να περιλαμβάνει τρία πανομοιότυπα δείγματα.

Προσδιορισμός της συγκέντρωσης υποδοχέα (hrERα)

11. Η συγκέντρωση του ενεργού υποδοχέα διαφέρει ελαφρώς ανά παρτίδα και συνθήκες φύλαξης. Για αυτόν τον λόγο, θα πρέπει να προσδιορίζεται η συγκέντρωση του ενεργού υποδοχέα κατά την παραλαβή του από τον προμηθευτή. Κατ' αυτόν τον τρόπο θα υπολογιστεί η κατάλληλη συγκέντρωση του ενεργού υποδοχέα κατά τη χρονική στιγμή της σειράς δοκιμών.

12. Υπό κατάλληλες για την ανταγωνιστική δέσμευση συνθήκες (δηλ. 1 nM [^{3}H]-οιστραδιόλη), θα πρέπει να επωάζονται ονομαστικές συγκεντρώσεις υποδοχέα 0,25, 0,5, 0,75, και 1 nM απουσία (συνολική δέσμευση) και παρουσία (μη ειδική δέσμευση) 1 μM μη ραδιοσημασμένης οιστραδιόλης. Η ειδική δέσμευση, υπολογιζόμενη ως η διαφορά συνολικής και μη ειδικής δέσμευσης, χαράσσεται έναντι της ονομαστικής συγκέντρωσης υποδοχέα. Η συγκέντρωση του υποδοχέα από την οποία προκύπτουν τιμές ειδικής δέσμευσης που αντιστοιχούν στο 20 % της προστεθείσας ραδιοσήμανσης σχετίζεται με την αντίστοιχη ονομαστική συγκέντρωση υποδοχέα, και η εν λόγω συγκέντρωση υποδοχέα θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τα πειράματα κορεσμού και ανταγωνιστικής δέσμευσης. Συχνά, μια τελική συγκέντρωση hrER ίση με 0,5 nM θα συμμορφώνεται με τη συνθήκη αυτή.

▼M8

13. Σε περίπτωση που αποτυγχάνει επανειλημμένα η ικανοποίηση του κριτηρίου του 20 %, θα πρέπει να ελέγχεται η οργάνωση του πειράματος για πιθανά σφάλματα. Η μη επίτευξη του κριτηρίου του 20 % μπορεί να υποδεικνύει ότι ο αριθμός των ενεργών υποδοχέων στην ανασυνδυασμένη παρτίδα είναι υπερβολικά χαμηλός, οπότε και θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης άλλης παρτίδας υποδοχέων.

Δοκιμασία κορεσμού

14. Θα πρέπει να αξιολογούνται εις τριπλούν οκτώ αυξανόμενες συγκεντρώσεις [^{3}H]17β-οιστραδιόλης, υπό τις ακόλουθες τρεις συνθήκες (βλ. πίνακα 2):

— απουσία μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης και παρουσία ER. Έτσι προσδιορίζεται η συνολική δέσμευση βάσει της ραδιενέργειας στις κοιλότητες που περιέχουν μόνο [^{3}H]17β-οιστραδιόλη,

— παρουσία 1 000πλάσιας πλεονάζουσας συγκέντρωσης μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης σε σχέση με τη ραδιοσημασμένη 17β-οιστραδιόλη και παρουσία ER. Στόχος είναι ο κορεσμός των ενεργών θέσεων δέσμευσης με μη ραδιοσημασμένη 17β-οιστραδιόλη και ο προσδιορισμός της μη ειδικής δέσμευσης μέσω μέτρησης της ραδιενέργειας στις κοιλότητες. Τυχόν εναπομένουσα ραδιοσημασμένη οιστραδιόλη που μπορεί να δεσμευτεί στον υποδοχέα θεωρείται ότι δεσμεύεται σε μη ειδική θέση, καθώς η μη ραδιοσημασμένη οιστραδιόλη βρίσκεται σε τόσο υψηλή συγκέντρωση ώστε θα πρέπει να έχει δεσμευτεί σε όλες τις διαθέσιμες ειδικές θέσεις του υποδοχέα,

— απουσία μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης και απουσία ER (προσδιορισμός της συνολικής ραδιενέργειας).

Παρασκευή διαλυμάτων [^{3}H]17β-οιστραδιόλης και μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης

15. Παρασκευάζονται αραιώσεις [^{3}H]17β-οιστραδιόλης με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας σε αποθεματικό διάλυμα [^{3}H]17β-οιστραδιόλης 12 nM έτσι ώστε να προκύπτουν συγκεντρώσεις που κυμαίνονται αρχικά από 0,12 nM έως 12 nM. Με την προσθήκη 40 μl από τα διαλύματα αυτά στις αντίστοιχες κοιλότητες δοκιμασίας ενός τρυβλίου μικροτιτλοδότησης 96 κοιλοτήτων (σε τελικό όγκο 160 μl), θα επιτευχθούν οι τελικές συγκεντρώσεις δοκιμασίας, που κυμαίνονται από 0,03 έως 3,0 nM. Η παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας, αποθεματικού διαλύματος και αραιώσεων [^{3}H]17β-οιστραδιόλης και ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων περιγράφονται αναλυτικά στο πρωτόκολλο FW (2).

16. Οι αραιώσεις των διαλυμάτων 17β-οιστραδιόλης με αιθανόλη θα πρέπει να παρασκευάζονται με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας με σκοπό την επίτευξη οκτώ αυξανόμενων συγκεντρώσεων, που κυμαίνονται αρχικά από 0,06 μM έως 6 μM. Οι τελικές συγκεντρώσεις δοκιμασίας, από 0,03 μM έως 3 μM, λαμβάνονται με μεταφορά 80 μl των εν λόγω διαλυμάτων στις αντίστοιχες κοιλότητες δοκιμασίας τρυβλίου μικροτιτλοδότησης 96 κοιλοτήτων (σε τελικό όγκο 160 μl). Η τελική συγκέντρωση της μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης στις μεμονωμένες κοιλότητες δοκιμασίας μη ειδικής δέσμευσης θα πρέπει να είναι 1 000πλάσια σε σχέση με τη συγκέντρωση ραδιοσημασμένης [^{3}H]17β-οιστραδιόλης. Η παρασκευή των αραιώσεων μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης περιγράφεται αναλυτικά στο πρωτόκολλο FW (2).

17. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται η ονομαστική συγκέντρωση υποδοχέα από την οποία προκύπτει ειδική δέσμευση 20±5 % (βλ. παραγράφους 12-13). Το διάλυμα hrERα θα πρέπει να παρασκευάζεται ακριβώς πριν τη χρήση του.

18. Τα τρυβλία μικροτιτλοδότησης 96 κοιλοτήτων παρασκευάζονται όπως φαίνεται στον πίνακα 2, με 3 πανομοιότυπα δείγματα ανά συγκέντρωση. Παραδείγματα κατανομής των συγκεντρώσεων και των όγκων της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης, της μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης, του ρυθμιστικού διαλύματος και του υποδοχέα στα τρυβλία παρέχονται στο προσάρτημα 2.2.

▼**M8**

Πίνακας 2

Διάταξη τρυβλίου μικροτιτλοδότησης δοκιμασίας δέσμευσης κορεσμού

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,06 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,08 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,10 nM [^{3}H] E_2 + ER			Συνολική δέσμευση (διαλύτης)
B	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E_2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E_2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E_2 + ER			
Γ													
Δ	0,03 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,03 μM E_2			0,06 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,06 μM E_2			0,08 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,08 μM E_2			0,10 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,10 μM E_2			Μη ειδική δέσμευση
E	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,30 μM E_2			0,60 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,60 μM E_2			1,0 nM [^{3}H] E_2 + ER + 1,0 μM E_2			3,0 nM [^{3}H] E_2 + ER + 3,0 μM E			
ΣΤ													
Z													
H													

[^{3}H] E2: [^{3}H]17β-οιστραδιόλη
ER: υποδοχέας οιστρογόνων
E_2: μη ραδιοσημασμένη 17β-οιστραδιόλη

19. Τα τρυβλία μικροτιτλοδότησης δοκιμασίας θα πρέπει να επωάζονται σε θερμοκρασία 2° έως 8°C επί 16 έως 20 ώρες και να τοποθετούνται σε στροφέα στη διάρκεια της περιόδου επώασης.

Μέτρηση της δεσμευμένης σε hrERα [^{3}H]17β-οιστραδιόλης

20. Η δεσμευμένη στον hrERα [^{3}H]17β-οιστραδιόλη θα πρέπει να διαχωρίζεται από την ελεύθερη [^{3}H]17β-οιστραδιόλη με προσθήκη 80 μl μη ραδιοσημασμένου εναιωρήματος DCC σε κάθε κοιλότητα, ανάδευση των τρυβλίων μικροτιτλοδότησης επί 10 λεπτά και φυγοκέντρησή τους επί 10 λεπτά στις 2 500 σ.α.λ. περίπου. Για την ελαχιστοποίηση της διάστασης της δεσμευμένης [^{3}H]17β-οιστραδιόλης από τον hrERα κατά τη διαδικασία αυτή, είναι εξαιρετικά σημαντικό η θερμοκρασία των ρυθμιστικών διαλυμάτων και των κοιλοτήτων δοκιμασίας να διατηρείται μεταξύ 2 και 8°C και κάθε στάδιο να διεκπεραιώνεται γρήγορα. Για την αποδοτική και ταχεία επεξεργασία των τρυβλίων, είναι απαραίτητη η ύπαρξη αναδευτήρα για τρυβλία μικροτιτλοδότησης.

21. Στη συνέχεια, 50 μl υπερκείμενου υγρού που περιέχει τη δεσμευμένη στον hrERα [^{3}H]17β-οιστραδιόλη λαμβάνονται με εξαιρετική προσοχή, προκειμένου να αποφευχθεί τυχόν μόλυνση των κοιλοτήτων από την επαφή με τον DCC, και μεταφέρονται σε δεύτερο τρυβλίο μικροτιτλοδότησης.

22. Κατόπιν, σε κάθε κοιλότητα (A1-B12 και Δ1 έως E12) προστίθενται 200 μl υγρού σπινθηρισμού, το οποίο μπορεί να μετατρέπει την κινητική ενέργεια των πυρηνικών εκπομπών σε φωτεινή ενέργεια. Οι κοιλότητες Z1-H12 [προσδιοριζόμενες ως συνολικές διασπάσεις ανά λεπτό (dpm)] αντιπροσωπεύουν διαδοχικές αραιώσεις της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης (40 μl) οι οποίες θα πρέπει να παρέχονται απευθείας στο υγρό σπινθηρισμού στις κοιλότητες του τρυβλίου μέτρησης, όπως φαίνεται στον πίνακα 3, δηλαδή περιέχουν μόνο 200 μl υγρού σπινθηρισμού και την κατάλληλη αραίωση [^{3}H]17β-οιστραδιόλης. Οι μετρήσεις αυτές δείχνουν την ποσότητα της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης, σε dpm, που προστέθηκε σε κάθε σύνολο κοιλοτήτων για τη συνολική δέσμευση και τη μη ειδική δέσμευση.

▼M8

Πίνακας 3

Διάταξη τρυβλίου μικροτιτλοδότησης δοκιμασίας δέσμευσης κορεσμού, μέτρηση ραδιενέργειας

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,06 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,08 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,10 nM [^{3} H] E_2 + ER			Συνολική δέσμευση (διαλύτης)
B	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E_2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E_2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E_2 + ER			
Γ													
Δ	0,03 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,03 μM E_2			0,06 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,06 μM E_2			0,08 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,08 μM E_2			0,10 nM [3H] E_2 + ER + 0,10 μM E_2			Μη ειδική δέσμευση
E	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,30 μM E_2			0,60 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,60 μM E_2			1,0 nM [^{3}H] E_2 + ER + 1,0 μM E_2			3,0 nM [^{3}H] E_2 + ER + 3,0 μM E_2			
ΣT													
Z	0,03 nM [^{3}H] E_2 (συνολικές dpm)			0,06 nM [^{3}H] E_2			0,08 nM [^{3}H] E_2			0,10 nM [^{3}H] E_2			Συνολικές dpm (*)
H	0,30 nM [^{3}H] E_2			0,60 nM [^{3}H] E_2			1,0 nM [^{3}H] E_2			3,0 nM [^{3}H] E_2			

[^{3}H] E2: [^{3}H]17β-οιστραδιόλη

ER: υποδοχέας οιστρογόνων

E2: μη ραδιοσημασμένη 17β-οιστραδιόλη

dpm: διασπάσεις ανά λεπτό

(*) Εδώ, οι ραδιοσημασμένες διαδοχικές αραιώσεις της [^{3}H]-ραδιοσημασμένης οιστραδιόλης θα πρέπει να προστίθενται απευθείας σε 200 μl υγρού σπινθηρισμού στις κοιλότητες Z1 – H12.

23. Η μέτρηση θα πρέπει να ξεκινά μετά από τουλάχιστον 2 ώρες και ο χρόνος καταμέτρησης θα πρέπει να είναι 40 λεπτά ανά κοιλότητα. Για τον προσδιορισμό των dpm/κοιλότητα με διόρθωση για τη σβέση θα πρέπει να χρησιμοποιείται μετρητής σπινθηρισμού τρυβλίων μικροτιτλοδότησης. Εναλλακτικά, εάν δεν υπάρχει διαθέσιμος μετρητής σπινθηρισμού, τα δείγματα μπορούν να μετρώνται σε συμβατικό μετρητή. Στην περίπτωση αυτή μπορεί ενδεχομένως να μειωθεί ο χρόνος καταμέτρησης.

Δοκιμασία ανταγωνιστικής δέσμευσης

24. Η δοκιμασία ανταγωνιστικής δέσμευσης μετρά τη δέσμευση μιας μεμονωμένης συγκέντρωσης [^{3}H]17β-οιστραδιόλης παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Για κάθε συγκέντρωση σε μία σειρά δοκιμών θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τρία παράλληλα πανομοιότυπα δείγματα. Επιπλέον, για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να εκτελούνται τρεις μη παράλληλες σειρές δοκιμών. Η δοκιμασία θα πρέπει να οργανώνεται σε ένα ή περισσότερα τρυβλία μικροτιτλοδότησης 96 κοιλοτήτων.

Μάρτυρες

25. Κατά τη διεξαγωγή της δοκιμασίας, σε κάθε πείραμα θα πρέπει να περιλαμβάνεται παράλληλος διαλύτης και μάρτυρες (οιστρογόνο αναφοράς, ασθενώς δεσμευόμενη ουσία και μη δεσμευόμενη ουσία). Σε ένα τρυβλίο στη διάρκεια κάθε σειράς δοκιμών, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πλήρεις καμπύλες συγκέντρωσης για το οιστρογόνο αναφοράς και τους μάρτυρες (ασθενώς δεσμευόμενη και μη δεσμευόμενη ουσία). Όλα τα υπόλοιπα τρυβλία θα πρέπει να περιέχουν i) υψηλή (μέγιστη εκτόπιση) και μέτρια (περίπου ίση με την IC_{50}) συγκέντρωση E2 και ασθενώς δεσμευόμενης ουσίας, εις τριπλούν, ii) μάρτυρα με διαλύτη και μη ειδική δέσμευση, καθένα εκ των οποίων τουλάχιστον εις τριπλούν. Οι διαδικασίες για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας και των διαλυμάτων μαρτύρων, [^{3}H]17β-οιστραδιόλης, hrERα και των υπό δοκιμή χημικών ουσιών περιγράφονται στην παραπομπή 2 (παράρτημα K, βλ. πρωτόκολλο δοκιμασίας FW).

▼**M8**

Μάρτυρας με διαλύτη:

26. Ο μάρτυρας με διαλύτη υποδεικνύει ότι ο διαλύτης δεν αλληλεπιδρά με το σύστημα δοκιμής και, επίσης, μετρά τη συνολική δέσμευση (TB). Ο προτιμώμενος διαλύτης είναι η αιθανόλη. Εναλλακτικά, εάν η υψηλότερη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας δεν είναι διαλυτή στην αιθανόλη, μπορεί να χρησιμοποιείται DMSO. Η συγκέντρωση της αιθανόλης ή του DMSO, εφόσον χρησιμοποιείται, στις κοιλότητες της τελικής δοκιμασίας είναι 1,5 % και δεν μπορεί να υπερβαίνει το 2 %.

Μάρτυρας με ρυθμιστικό διάλυμα:

27. Ο μάρτυρας με ρυθμιστικό διάλυμα δεν θα πρέπει να περιέχει ούτε διαλύτη ούτε υπό δοκιμή χημική ουσία, αλλά όλα τα υπόλοιπα στοιχεία της δοκιμασίας. Τα αποτελέσματα του μάρτυρα με ρυθμιστικό διάλυμα συγκρίνονται με τον μάρτυρα με διαλύτη προκειμένου να επαληθευτεί ότι ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης δεν επηρεάζει το σύστημα δοκιμασίας.

Ισχυρώς δεσμευόμενη ουσία (οιστρογόνο αναφοράς)

28. Η 17β-οιστραδιόλη (CAS 50-28-2) είναι το ενδογενές πρόσδεμα και δεσμεύεται με υψηλή συγγένεια στον ER υποτύπου α. Θα πρέπει να καταρτίζεται πρότυπη καμπύλη με χρήση 17β-οιστραδιόλης για κάθε δοκιμασία ανταγωνιστικής δέσμευσης hrERα, προκειμένου να είναι δυνατή η αξιολόγηση της μεταβλητότητας με την πάροδο του χρόνου κατά τη διεξαγωγή της δοκιμασίας στο ίδιο εργαστήριο. Θα πρέπει να παρασκευάζονται οκτώ διαλύματα μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης σε αιθανόλη, με εύρος συγκεντρώσεων στις κοιλότητες δοκιμασίας 100 nM – 10 pM (-7[logM] έως -11[logM]), στα εξής διαστήματα: (-7[logM], -8[logM], -8,5[logM], -9[logM], -9,5[logM], -10[logM], -11[logM]). Η υψηλότερη συγκέντρωση μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης (1 μM) χρησιμεύει επίσης ως δείκτης μη ειδικής δέσμευσης. Παρότι αποτελεί επίσης μέρος της πρότυπης καμπύλης, η συγκεκριμένη συγκέντρωση διακρίνεται από την ένδειξη «NSB» στον πίνακα 4.

Ασθενώς δεσμευόμενη ουσία

29. Θα πρέπει να περιλαμβάνεται μια ασθενώς δεσμευόμενη ουσία [νορεθυνοδρέλη (CAS68-23-5) ή νορεθινδρόνη (CAS 68-22-4)] προκειμένου να καταδεικνύεται η ευαισθησία κάθε πειράματος και να παρέχεται η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας με την πάροδο του χρόνου στο πλαίσιο διεξαγωγής της δοκιμασίας. Θα πρέπει να παρασκευάζονται οκτώ διαλύματα της ασθενώς δεσμευόμενης ουσίας σε αιθανόλη, με εύρος συγκεντρώσεων στις κοιλότητες δοκιμασίας 3 nM έως 30 μM (-8,5[logM] έως -4,5[logM]), στα εξής διαστήματα: -4,5[logM], -5[logM], -5,5[logM], -6[logM], -6,5[logM], -7[logM], -7,5[logM], -8,5[logM].

Μη δεσμευόμενη ουσία

30. Ως αρνητικός μάρτυρας (μη δεσμευόμενη ουσία) θα πρέπει να χρησιμοποιείται το οκτυλοτριαιθοξυσιλάνιο (OTES, CAS 2 943-75-1). Αυτό διασφαλίζει ότι η δοκιμασία θα ανιχνεύσει τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν δεσμεύονται στον hrERα. Θα πρέπει να παρασκευάζονται οκτώ διαλύματα της μη δεσμευόμενης ουσίας σε αιθανόλη, με εύρος συγκεντρώσεων στις κοιλότητες δοκιμασίας 0,1 nM έως 1 000 μM (-10[logM] έως -3[logM]), ανά λογαριθμικές βηματικές προσαυξήσεις. Ως εναλλακτικός μάρτυρας μη δεσμευόμενης ουσίας μπορεί να χρησιμοποιείται το φθαλικό δι-*n*-βουτύλιο (DBP). Η μέγιστη διαλυτότητά του έχει καταδειχθεί ότι είναι -4[logM].

Συγκέντρωση hrERα

31. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται η ποσότητα υποδοχέα από την οποία προκύπτει ειδική δέσμευση 20±5 % ραδιοσημασμένου προσδέματος 1 nM (βλ. παραγράφους 12-13 του προσαρτήματος 2). Το διάλυμα hrERα θα πρέπει να παρασκευάζεται ακριβώς πριν τη χρήση του.

[^{3}H]17β-οιστραδιόλη

32. Η συγκέντρωση της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης στις κοιλότητες δοκιμασίας θα πρέπει να είναι 1,0 nM.

▼**M8**

Υπό δοκιμή χημικές ουσίες

33. Καταρχάς, είναι απαραίτητο να διεξάγεται δοκιμή διαλυτότητας για τον προσδιορισμό του ορίου διαλυτότητας για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία και για τον προσδιορισμό του κατάλληλου εύρους συγκεντρώσεων προς χρήση κατά τη διεξαγωγή του πρωτοκόλλου δοκιμής. Το όριο διαλυτότητας κάθε υπό δοκιμή χημικής ουσίας πρέπει να προσδιορίζεται αρχικά στον διαλύτη και να επιβεβαιώνεται περαιτέρω υπό τις συνθήκες δοκιμασίας. Η τελική συγκέντρωση που υποβάλλεται σε δοκιμή στη δοκιμασία δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 1 mM. Οι δοκιμές προσδιορισμού εύρους περιλαμβάνουν μάρτυρα με διαλύτη και 8 λογαριθμικές, διαδοχικές αραιώσεις, που ξεκινούν από τη μέγιστη αποδεκτή συγκέντρωση (π.χ. 1 mM ή χαμηλότερη, με βάση το όριο διαλυτότητας), και καταγραφή της παρουσίας θολερότητας ή ιζήματος (βλ. επίσης παράγραφο 35). Η υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να υποβάλλεται σε δοκιμή με χρήση 8 λογαριθμικά κατανεμημένων καμπυλών συγκέντρωσης, όπως έχουν καθοριστεί από την προηγούμενη δοκιμή προσδιορισμού εύρους συγκεντρώσεων. Οι συγκεντρώσεις στο δεύτερο και το τρίτο πείραμα θα πρέπει να προσαρμόζονται κατά περίπτωση, με σκοπό τη βελτίωση του χαρακτηρισμού της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης.

34. Οι αραιώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να παρασκευάζονται στον κατάλληλο διαλύτη (βλ. παράγραφο 26 του προσαρτήματος 2). Εάν η υψηλότερη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας δεν είναι διαλυτή ούτε σε αιθανόλη ούτε σε DMSO, και η προσθήκη περισσότερου διαλύτη θα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του διαλύτη στον τελικό σωλήνα πάνω από το αποδεκτό όριο, επιτρέπεται η μείωση της υψηλότερης συγκέντρωσης έως την επόμενη χαμηλότερη συγκέντρωση. Σε αυτή την περίπτωση, μπορεί να προστεθεί μία επιπλέον συγκέντρωση στο χαμηλό άκρο της σειράς συγκεντρώσεων. Οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις της σειράς θα πρέπει να παραμείνουν αμετάβλητες.

35. Τα διαλύματα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να παρακολουθούνται στενά όταν προστίθενται στην κοιλότητα δοκιμασίας, καθότι η υπό δοκιμή χημική ουσία μπορεί να σχηματίσει ίζημα κατά την προσθήκη της στην κοιλότητα δοκιμασίας. Τα δεδομένα για όλες τις κοιλότητες που περιέχουν ίζημα θα πρέπει να αποκλείονται από την προσαρμογή της καμπύλης, και θα πρέπει να καταγράφεται ο λόγος του αποκλεισμού τους.

36. Εάν υπάρχουν ήδη διαθέσιμες πληροφορίες από άλλες πηγές που παρέχουν τον λογάριθμο (IC_{50}) μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας, ίσως είναι σκόπιμο τα διαστήματα των αραιώσεων να διαμορφωθούν με γεωμετρικό τρόπο [δηλ. 0,5 λογαριθμικές μονάδες γύρω από τον αναμενόμενο λογάριθμο (IC_{50})]. Το τελικό αποτέλεσμα θα πρέπει να αντιπροσωπεύει επαρκή διασπορά συγκεντρώσεων εκατέρωθεν του λογάριθμου (IC_{50}), περιλαμβανομένης της μέγιστης και της ελάχιστης τιμής, κατά τρόπον ώστε να είναι εφικτός ο επαρκής χαρακτηρισμός της καμπύλης δέσμευσης.

Οργάνωση τρυβλίων δοκιμασίας

37. Θα πρέπει να προετοιμάζονται επισημασμένα τρυβλία μικροτιτλοδότησης για εξαπλές επωάσεις, με κωδικούς για τον μάρτυρα με διαλύτη, την υψηλότερη συγκέντρωση του οιστρογόνου αναφοράς που χρησιμεύει επίσης ως δείκτης μη ειδικής δέσμευσης (NSB), καθώς και τον μάρτυρα με ρυθμιστικό διάλυμα, και για τριπλές επωάσεις με κωδικούς για καθεμία από τις οκτώ συγκεντρώσεις του μάρτυρα μη δεσμευόμενης ουσίας (οκτυλοτριαιθοξυσιλάνιο), τις 7 χαμηλότερες συγκεντρώσεις για το οιστρογόνο αναφοράς, τα επίπεδα δόσης των οκτώ συγκεντρώσεων της ασθενώς δεσμευόμενης ουσίας, και τις 8 συγκεντρώσεις κάθε υπό δοκιμή χημικής ουσίας (TC). Ένα παράδειγμα διάταξης του διαγράμματος τρυβλίων για τις πλήρεις καμπύλες συγκέντρωσης που αφορούν το οιστρογόνο αναφοράς και τον μάρτυρα παρέχεται στον πίνακα 4 κατωτέρω. Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες χρησιμοποιούνται πρόσθετα τρυβλία μικροτιτλοδότησης, τα οποία θα πρέπει να περιλαμβάνουν μάρτυρες τρυβλίων, ήτοι 1) μια υψηλή (μέγιστη εκτόπιση) και μία μέτρια (περίπου ίση με την IC_{50}) συγκέντρωση E2 και ασθενώς δεσμευόμενης ουσίας, εις τριπλούν, και 2) μάρτυρα με διαλύτη και μη ειδική δέσμευση, καθένα εκ των οποίων εις εξαπλούν (πίνακας 5). Παράδειγμα

▼M8

φύλλου εργασίας διάταξης τρυβλίου μικροτιτλοδότησης δοκιμασίας ανταγωνιστικής δέσμευσης με χρήση τριών άγνωστων υπό δοκιμή χημικών ουσιών παρέχεται στο προσάρτημα 2.3. Οι συγκεντρώσεις που φαίνονται στους πίνακες 4 και 5 είναι οι τελικές συγκεντρώσεις της δοκιμασίας. Η μέγιστη συγκέντρωση για την E2 θα πρέπει να είναι 1×10^{-7} M, ενώ όσον αφορά την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία θα πρέπει να χρησιμοποιείται η υψηλότερη συγκέντρωση που χρησιμοποιείται για την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία στο τρυβλίο 1. Η συγκέντρωση IC_{50} θα πρέπει να καθορίζεται από το εργαστήριο βάσει της βάσης ιστορικών δεδομένων για τους μάρτυρες. Η εν λόγω τιμή αναμένεται να είναι παρεμφερής με την τιμή που παρατηρήθηκε στις μελέτες επικύρωσης (βλ. πίνακα 1).

Πίνακας 4

Διάταξη τρυβλίου μικροτιτλοδότησης δοκιμασίας ανταγωνιστικής δέσμευσης, πλήρεις καμπύλες συγκέντρωσης για το οιστρογόνο αναφοράς και τους μάρτυρες (τρυβλίο 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (μόνο διαλύτης)			TB (μόνο διαλύτης)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10^{-7})			E2 (1×10^{-8})			E2 ($1\times10^{-8,5}$)			E2 (1×10^{-9})		
Γ	E2 ($1\times10^{-9,5}$)			E2 (1×10^{-10})			E2 (1×10^{-11})			Τυφλό (*)		
Δ	NE ($1\times10^{-4,5}$)			NE (1×10^{-5})			NE ($1\times10^{-5,5}$)			NE (1×10^{-6})		
E	NE ($1\times10^{-6,5}$)			NE (1×10^{-7})			NE ($1\times10^{-7,5}$)			NE ($1\times10^{-8,5}$)		
ΣΤ	OTES (1×10^{-3})			OTES (1×10^{-4})			OTES (1×10^{-5})			OTES (1×10^{-6})		
Z	OTES (1×10^{-7})			OTES (1×10^{-8})			OTES (1×10^{-9})			OTES (1×10^{-10})		
H	Τυφλό (για ραδιοσήμανση) (**)			Τυφλό (για ραδιοσήμανση) (**)			Μάρτυρας με ρυθμιστικό διάλυμα			Μάρτυρας με ρυθμιστικό διάλυμα		

Στο παράδειγμα, η ασθενώς δεσμευόμενη ουσία είναι η νορεθυνοδρέλη (NE)
(*) πραγματικό τυφλό, μη χρησιμοποιούμενη κοιλότητα
(**) τυφλό, δεν χρησιμοποιείται κατά την επώαση, αλλά χρησιμοποιείται για την επιβεβαίωση της συνολικής προστιθέμενης ραδιενέργειας.

Πίνακας 5

Διάταξη τρυβλίου μικροτιτλοδότησης δοκιμασίας ανταγωνιστικής δέσμευσης, πλήρεις καμπύλες συγκέντρωσης για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες και τους μάρτυρες τρυβλίου

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (μόνο διαλύτης)			TB (μόνο διαλύτης)			NSB			NSB		
B	TC1 (1×10^{-3})			TC1 (1×10^{-4})			TC1 (1×10^{-5})			TC1 (1×10^{-6})		
Γ	TC1 (1×10^{-7})			TC1 (1×10^{-8})			TC1 (1×10^{-9})			TC1 (1×10^{-10})		
Δ	TC2 (1×10^{-3})			TC2 (1×10^{-4})			TC2 (1×10^{-5})			TC2 (1×10^{-6})		
E	TC2 (1×10^{-7})			TC2 (1×10^{-8})			TC2 (1×10^{-9})			TC2 (1×10^{-10})		
ΣΤ	TC3 (1×10^{-3})			TC3 (1×10^{-4})			TC3 (1×10^{-5})			TC3 (1×10^{-6})		
Z	TC3 (1×10^{-7})			TC3 (1×10^{-8})			TC3 (1×10^{-9})			TC3 (1×10^{-10})		
H	NE (IC_{50})			NE ($1\times10^{-4,5}$)			E2 (IC_{50})			E2 (1×10^{-7})		

Στο παράδειγμα, η ασθενώς δεσμευόμενη ουσία είναι η νορεθυνοδρέλη (NE)

▼M8

Ολοκλήρωση της δοκιμασίας ανταγωνιστικής δέσμευσης

38. Όπως φαίνεται στον πίνακα 6, στις κοιλότητες θα πρέπει να προστεθούν 80 μl του μάρτυρα με διαλύτη, του οιστρογόνου αναφοράς, της ασθενώς δεσμευόμενης ουσίας, της μη δεσμευόμενης ουσίας και των υπό δοκιμή χημικών ουσιών που παρασκευάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα της δοκιμασίας. Στη συνέχεια, σε κάθε κοιλότητα θα πρέπει να προστεθούν 40 μl διαλύματος [^{3}H]17β-οιστραδιόλης 4 nM. Μετά από ήπια ανάδευση επί 10 έως 15 λεπτά σε θερμοκρασία μεταξύ 2° και 8°C, θα πρέπει να προστεθούν 40 μl διαλύματος hrERα. Τα τρυβλία μικροτιτλοδότησης δοκιμασίας θα πρέπει να επωάζονται σε θερμοκρασία 2° έως 8°C επί 16 έως 20 ώρες και να τοποθετούνται σε περιστροφικό αναδευτήρα στη διάρκεια της περιόδου επώασης.

Πίνακας 6

Όγκος στοιχείων δοκιμασίας για τη δοκιμασία ανταγωνιστικής δέσμευσης hrER, τρυβλία μικροτιτλοδότησης

Όγκος (μl)	Συστατικό
80	Μη ραδιοσημασμένη 17β-οιστραδιόλη, νορεθυνοδρέλη, OTES, υπό δοκιμή χημικές ουσίες, διαλύτης ή ρυθμιστικό διάλυμα
40	4 nM διαλύματος [^{3}H]17β-οιστραδιόλης
40	Διάλυμα hrERα, συγκέντρωση όπως έχει καθοριστεί
160	***Συνολικός όγκος σε κάθε κοιλότητα δοκιμασίας***

39. Στη συνέχεια, θα πρέπει να πραγματοποιείται ποσοτικός προσδιορισμός της δεσμευμένης στον hrERα [^{3}H]17β-οιστραδιόλης, μετά τον διαχωρισμό της δεσμευμένης στον hrERα [^{3}H]17β-οιστραδιόλης από την ελεύθερη [^{3}H]17β-οιστραδιόλη, διά της προσθήκης 80 μl μη ραδιοσημασμένου εναιωρήματος DCC σε κάθε κοιλότητα, όπως περιγράφεται στις παραγράφους 20-23 για τη δοκιμασία δέσμευσης κορεσμού.

40. Οι κοιλότητες Η1-6 [που προσδιορίζονται ως τυφλό δείγμα (για τη ραδιοσήμανση) στον πίνακα 4] αντιπροσωπεύουν τις dpm της [^{3}H]-ραδιοσημασμένης οιστραδιόλης σε 40 μl. Η ποσότητα των 40 μl θα πρέπει να προστίθεται απευθείας στο υγρό σπινθηρισμού στις κοιλότητες Η1 – Η6.

Κριτήρια αποδοχής

Δοκιμασία δέσμευσης κορεσμού

41. Η καμπύλη ειδικής δέσμευσης θα πρέπει να φθάνει σε ένα πλατώ όταν χρησιμοποιούνται αυξανόμενες συγκεντρώσεις [^{3}H]17β-οιστραδιόλης, γεγονός που υποδεικνύει τον κορεσμό του hrERα με το πρόσδεμα.

42. Η ειδική δέσμευση σε 1 nM [^{3}H]17β-οιστραδιόλης θα πρέπει να βρίσκεται εντός του αποδεκτού φάσματος 15 % έως 25 % της μέσης μετρηθείσας συνολικής ραδιενέργειας που προστέθηκε σε όλες τις σειρές δοκιμών. Περιστασιακές ελαφρές αποκλίσεις εκτός του εν λόγω φάσματος είναι αποδεκτές, αλλά εάν οι σειρές δοκιμών βρίσκονται μονίμως εκτός του φάσματος ή μια συγκεκριμένη σειρά δοκιμών βρίσκεται αρκετά έξω από αυτό, η συγκέντρωση πρωτεΐνης θα πρέπει να προσαρμοστεί και η δοκιμασία κορεσμού να επαναληφθεί.

43. Από τα δεδομένα θα πρέπει να προκύπτει γραμμικό διάγραμμα Scatchard.

44. Η μη ειδική δέσμευση δεν θα πρέπει να είναι υπέρμετρη. Η τιμή της μη ειδικής δέσμευσης θα πρέπει να αντιστοιχεί κατά κανόνα σε <35 % της συνολικής δέσμευσης. Ωστόσο, ο λόγος μπορεί περιστασιακά να υπερβαίνει το εν λόγω όριο, όταν μετρώνται ιδιαίτερα χαμηλές dpm για τη χαμηλότερη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης.

▼**M8**

Δοκιμασία ανταγωνιστικής δέσμευσης

45. Οι αυξανόμενες συγκεντρώσεις μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης θα πρέπει να εκτοπίζουν την [^{3}H]17β-οιστραδιόλη από τον υποδοχέα κατά τρόπο που συνάδει με ανταγωνιστική δέσμευση μίας θέσης.

46. Η τιμή IC_{50} για το οιστρογόνο αναφοράς (δηλ. τη 17β-οιστραδιόλη) θα πρέπει να είναι κατά προσέγγιση ίση με τη γραμμομοριακή συγκέντρωση της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης συν την Kd που προσδιορίζεται από τη δοκιμασία δέσμευσης κορεσμού.

47. Η συνολική ειδική δέσμευση θα πρέπει να εμπίπτει σταθερά εντός του αποδεκτού φάσματος 20 ± 5 % όταν η μέση μετρηθείσα συγκέντρωση συνολικής ραδιενέργειας που προστέθηκε σε κάθε κοιλότητα ήταν 1 nM στη διάρκεια όλων των σειρών δοκιμών. Περιστασιακές ελαφρές αποκλίσεις εκτός του εν λόγω φάσματος είναι αποδεκτές, αλλά εάν οι σειρές δοκιμών βρίσκονται μονίμως εκτός του φάσματος ή μια συγκεκριμένη σειρά δοκιμών βρίσκεται αρκετά έξω από αυτό, η συγκέντρωση πρωτεΐνης θα πρέπει να προσαρμοστεί.

48. Ο διαλύτης δεν θα πρέπει να αλλοιώνει την ευαισθησία ή την αναπαραγωγιμότητα της δοκιμασίας. Τα αποτελέσματα του μάρτυρα με διαλύτη (κοιλότητες TB) συγκρίνονται με τον μάρτυρα με ρυθμιστικό διάλυμα προκειμένου να επαληθευτεί ότι ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης δεν επηρεάζει το σύστημα δοκιμασίας. Τα αποτελέσματα της συνολικής δέσμευσης (TB) και του μάρτυρα με ρυθμιστικό διάλυμα θα πρέπει να είναι συγκρίσιμα, εάν δεν υπάρχει επίδραση του διαλύτη στη δοκιμασία.

49. Η μη δεσμευόμενη ουσία δεν θα πρέπει να εκτοπίζει ποσοστό άνω του 25 % της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης από τον hrERα, όταν ελέγχεται σε συγκέντρωση έως 10^{-3} M (OTES) ή 10^{-4} M (DBP).

50. Για το οιστρογόνο αναφοράς και δύο ασθενώς δεσμευόμενες ουσίες (π.χ. νορεθυνοδρέλη, νορεθινδρόνη) αναπτύχθηκαν κριτήρια επιδόσεων με χρήση δεδομένων από τη μελέτη επικύρωσης της δοκιμασίας δέσμευσης hrER FW (παράρτημα N της παραπομπής 2). Παρέχονται διαστήματα εμπιστοσύνης 95 % για τη μέση τιμή (n) +/- την SD για όλες τις σειρές δοκιμών μάρτυρα σε όλα τα εργαστήρια που συμμετείχαν στη μελέτη επικύρωσης. Υπολογίστηκαν διαστήματα εμπιστοσύνης 95 % για τις παραμέτρους προσαρμογής της καμπύλης (δηλ. μέγιστη τιμή, ελάχιστη τιμή, κλίση Hill, $logIC_{50}$) για το οιστρογόνο αναφοράς και τις ασθενώς δεσμευόμενες ουσίες, και για το log_{10}RBA των ασθενώς δεσμευόμενων ουσιών σε σχέση με το οιστρογόνο αναφοράς, τα οποία παρέχονται ως κριτήρια επιδόσεων για τους θετικούς μάρτυρες. Στον πίνακα 1 φαίνονται οι αναμενόμενες κλίμακες τιμών για τις παραμέτρους προσαρμογής της καμπύλης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως κριτήρια επιδόσεων. Στην πράξη, η κλίμακα τιμών της IC_{50} μπορεί να ποικίλλει ελαφρώς με βάση την Kd του σκευάσματος υποδοχέα και τη συγκέντρωση προσδέματος.

51. Δεν αναπτύχθηκαν κριτήρια επιδόσεων για τις παραμέτρους προσαρμογής της καμπύλης για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες λόγω του ευρέος φάσματος των δυνητικών υπό δοκιμή χημικών ουσιών που υπάρχουν και του φάσματος των δυνητικών συγγενειών και εκβάσεων (π.χ. πλήρης καμπύλη, μερική καμπύλη, καμία προσαρμογή καμπύλης). Ωστόσο, η εξέταση των αποτελεσμάτων από κάθε σειρά δοκιμών για μια υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να πραγματοποιείται με βάση την επαγγελματική κρίση. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται επαρκές εύρος συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ώστε να προσδιορίζεται με σαφήνεια η μέγιστη τιμή (π.χ. 90 - 100 % δέσμευσης) της καμπύλης ανταγωνιστικής δέσμευσης. Η μεταβλητότητα μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων σε κάθε συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας καθώς και μεταξύ των 3 μη παράλληλων σειρών δοκιμών θα πρέπει να είναι εντός εύλογων ορίων και να τεκμηριώνεται επιστημονικά. Οι μάρτυρες από κάθε σειρά δοκιμών για μια υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να προσεγγίζουν τα μέτρα επιδόσεων που αναφέρονται για τη συγκεκριμένη δοκιμασία FW και πρέπει να είναι σύμφωνοι με τα ιστορικά δεδομένα για τους μάρτυρες από κάθε αντίστοιχο εργαστήριο.

▼M8

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Δοκιμασία δέσμευσης κορεσμού

52. Μετράται τόσο η συνολική όσο και η μη ειδική δέσμευση. Από τις εν λόγω τιμές, υπολογίζεται η ειδική δέσμευση αυξανόμενων συγκεντρώσεων [^{3}H]17β-οιστραδιόλης υπό συνθήκες ισορροπίας, αφαιρώντας τη μη ειδική δέσμευση από τη συνολική δέσμευση. Ένα διάγραμμα της ειδικής δέσμευσης έναντι της συγκέντρωσης [^{3}H]17β-οιστραδιόλης αναμένεται ότι θα φθάνει σε πλατώ όσον αφορά τη μέγιστη ειδική δέσμευση, το οποίο υποδεικνύει τον κορεσμό του hrERα με την [^{3}H]17β-οιστραδιόλη. Επιπλέον, η ανάλυση των δεδομένων θα πρέπει να τεκμηριώνει τη δέσμευση της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης σε μία μοναδική θέση δέσμευσης υψηλής συγγένειας. Η μη ειδική, η συνολική και η ειδική δέσμευση θα πρέπει να παρουσιάζονται σε καμπύλη δέσμευσης κορεσμού. Στο πλαίσιο περαιτέρω ανάλυσης των εν λόγω δεδομένων θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί ανάλυση μη γραμμικής παλινδρόμησης (π.χ. BioSoft, McPherson 1985, Motulsky 1995), με τελική παρουσίαση των δεδομένων υπό μορφή ανάλυσης Scatchard.

53. Η ανάλυση δεδομένων θα πρέπει να προσδιορίζει τις Bmax και Kd αποκλειστικά από τα δεδομένα συνολικής δέσμευσης, βάσει της παραδοχής ότι η μη ειδική δέσμευση είναι γραμμική, εκτός εάν αιτιολογείται η χρήση διαφορετικής μεθόδου. Επιπλέον, κατά τον προσδιορισμό της βέλτιστης προσαρμογής θα πρέπει να χρησιμοποιείται ανάλυση εύρωστης παλινδρόμησης, εκτός εάν παρέχονται οι λόγοι για τη μη χρήση της. Θα πρέπει να αναφέρεται η επιλεγμένη μέθοδος για την εύρωστη παλινδρόμηση. Κατά τον προσδιορισμό των Bmax και Kd από δεδομένα δέσμευσης κορεσμού, θα πρέπει να εφαρμόζεται διόρθωση ως προς την εξάντληση του προσδέματος (π.χ. με χρήση της μεθόδου Swillens 1995).

Δοκιμασία ανταγωνιστικής δέσμευσης

54. Η καμπύλη ανταγωνιστικής δέσμευσης χαράσσεται ως ειδική δέσμευση [^{3}H]17β-οιστραδιόλης έναντι της συγκέντρωσης (μονάδες log10) του ανταγωνιστή. Η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που αναστέλλει το 50 % της μέγιστης ειδικής δέσμευσης [^{3}H]17β-οιστραδιόλης είναι η τιμή IC_{50}.

55. Οι εκτιμήσεις των τιμών λογάριθμου (IC_{50}) για τους θετικούς μάρτυρες (οιστρογόνο αναφοράς και ασθενώς δεσμευόμενη ουσία) θα πρέπει να προσδιορίζονται με χρήση λογισμικού μη γραμμικής προσαρμογής καμπύλης κατάλληλου για την προσαρμογή εξίσωσης Hill τεσσάρων παραμέτρων (π.χ. BioSoft, McPherson 1985, Motulsky 1995). Κατά την προσαρμογή των εν λόγω καμπυλών, η μέγιστη τιμή, η ελάχιστη τιμή, η κλίση και ο λογάριθμος (IC_{50}) θα πρέπει, γενικά, να μην περιορίζονται. Κατά τον προσδιορισμό της βέλτιστης προσαρμογής, θα πρέπει να χρησιμοποιείται ανάλυση εύρωστης παλινδρόμησης, εκτός εάν παρέχονται οι λόγοι για τη μη χρήση της. Δεν θα πρέπει να εφαρμόζεται διόρθωση ως προς την εξάντληση του προσδέματος. Μετά την αρχική ανάλυση, κάθε καμπύλη δέσμευσης θα πρέπει να ελέγχεται ώστε να διασφαλίζεται η κατάλληλη προσαρμογή στο μοντέλο. Η σχετική συγγένεια δέσμευσης (RBA) για την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία θα πρέπει να υπολογίζεται ως ποσοστό του λογάριθμου (IC_{50}) για την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία σε σχέση με τον λογάριθμο (IC_{50}) για τη 17β-οιστραδιόλη. Τα αποτελέσματα από τους θετικούς μάρτυρες και τον μάρτυρα μη δεσμευόμενης ουσίας θα πρέπει να αξιολογούνται με χρήση των μέτρων των επιδόσεων δοκιμασίας των παραγράφων 45-50 του παρόντος προσαρτήματος 2.

56. Τα δεδομένα για το σύνολο των υπό δοκιμή χημικών ουσιών θα πρέπει να αναλύονται με χρήση κλιμακωτής προσέγγισης ώστε να διασφαλίζεται η δέουσα ανάλυσή τους και η σωστή ταξινόμηση κάθε καμπύλης ανταγωνιστικής δέσμευσης. Συνιστάται κάθε σειρά δοκιμών για υπό δοκιμή χημική ουσία να υποβάλλεται αρχικά σε τυποποιημένη ανάλυση δεδομένων πανομοιότυπη με την ανάλυση που χρησιμοποιείται για το οιστρογόνο αναφοράς και την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία (βλ. παράγραφο 55 ανωτέρω). Μετά την αρχική ανάλυση, θα πρέπει να γίνεται τεχνική επανεξέταση των παραμέτρων προσαρμογής της καμπύλης και να εξετάζεται οπτικά η ποιότητα της προσαρμογής των δεδομένων δέσμευσης στην προκύπτουσα καμπύλη ανταγωνιστικής δέσμευσης για κάθε σειρά δοκιμών. Εάν, κατά την τεχνική επανεξέταση, παρατηρηθεί εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση μείωση του ποσοστού της ειδικά δεσμευμένης [^{3}H]17β-οιστραδιόλης, χαμηλή μεταβλητότητα μεταξύ των τεχνικών πανομοιότυπων δειγμάτων σε κάθε συγκέντρωση χημικής ουσίας, και συμφωνία των παραμέτρων προσαρμογής μεταξύ των τριών σειρών δοκιμών, αυτό αποτελεί ουσιαστική ένδειξη ότι η δοκιμασία και οι αναλύσεις δεδομένων διεξήχθησαν ορθά.

▼**M8**

Ερμηνεία των δεδομένων

57. Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής, μια υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται δεσμευόμενη στον hrERα εάν είναι εφικτή η προσαρμογή μιας καμπύλης δέσμευσης και το χαμηλότερο σημείο της καμπύλης απόκρισης εντός της κλίμακας των δεδομένων είναι χαμηλότερο από 50 % (σχήμα 1).

58. Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής, μια υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται μη δεσμευόμενη στον hrERα εάν:

— είναι εφικτή η προσαρμογή μιας καμπύλης δέσμευσης και το χαμηλότερο σημείο της προσαρμοσμένης καμπύλης απόκρισης εντός της κλίμακας των δεδομένων υπερβαίνει το 75 %, ή

— δεν είναι εφικτή η προσαρμογή καμπύλης δέσμευσης και το χαμηλότερο μη εξομαλυμένο μέσο εκατοστιαίο ποσοστό δέσμευσης μεταξύ των ομάδων συγκέντρωσης στα δεδομένα υπερβαίνει το 75 %.

59. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες θεωρούνται αμφίβολες εάν δεν πληρούται καμία από τις ανωτέρω προϋποθέσεις (π.χ. το χαμηλότερο σημείο της προσαρμοσμένης καμπύλης απόκρισης βρίσκεται μεταξύ 76 και 51 %).

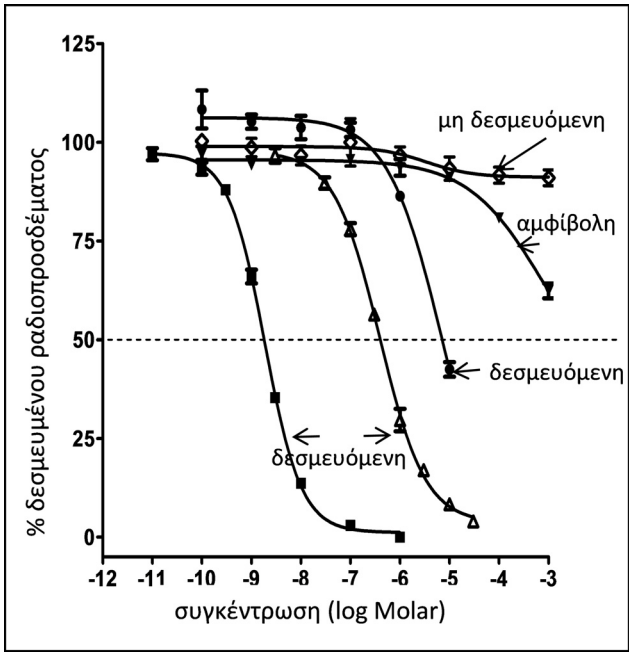
Πίνακας 7

Κριτήρια ταξινόμησης βάσει της καμπύλης ανταγωνιστικής δέσμευσης για υπό δοκιμή χημική ουσία

Ταξινόμηση	Κριτήρια
Δεσμευόμενη[α]	Είναι εφικτή η προσαρμογή καμπύλης δέσμευσης. Το **χαμηλότερο σημείο της καμπύλης απόκρισης εντός της κλίμακας των δεδομένων είναι χαμηλότερο από 500%.**
Μη δεσμευόμενη[β]	Εάν είναι εφικτή η προσαρμογή καμπύλης δέσμευσης, το **χαμηλότερο σημείο της προσαρμοσμένης καμπύλης απόκρισης εντός της κλίμακας των δεδομένων υπερβαίνει το 75 %.** Εάν δεν είναι εφικτή η προσαρμογή καμπύλης δέσμευσης, το **χαμηλότερο μη εξομαλυμένο εκατοστιαίο ποσοστό δέσμευσης μεταξύ των ομάδων συγκέντρωσης στα δεδομένα υπερβαίνει το 75 %.**
Αμφίβολη[γ]	Οποιαδήποτε ελέγξιμη σειρά δοκιμών η οποία δεν αντιστοιχεί ούτε σε δεσμευόμενη ούτε σε μη δεσμευόμενη ουσία (π.χ. το χαμηλότερο σημείο της προσαρμοσμένης καμπύλης απόκρισης βρίσκεται μεταξύ 76 και 51 %).

Σχήμα 1

Παραδείγματα ταξινόμησης υπό δοκιμή χημικής ουσίας με χρήση καμπύλης ανταγωνιστικής δέσμευσης



▼**M8**

60. Πολλές σειρές δοκιμών που διεξάγονται σε ένα εργαστήριο για υπό δοκιμή χημική ουσία συνδυάζονται διά της απόδοσης αριθμητικών τιμών σε κάθε σειρά δοκιμών και διά της εξαγωγής του μέσου όρου των σειρών δοκιμών, όπως φαίνεται στον πίνακα 8. Τα αποτελέσματα των συνδυασμένων σειρών δοκιμών σε κάθε εργαστήριο συγκρίνονται με την αναμενόμενη ταξινόμηση για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία.

Πίνακας 8

Μέθοδος ταξινόμησης υπό δοκιμή χημικής ουσίας με χρήση πολλών σειρών δοκιμών σε ένα εργαστήριο

Για την απόδοση τιμής σε κάθε σειρά δοκιμών:	
Ταξινόμηση	**Αριθμητική τιμή**
Δεσμευόμενη	2
Αμφίβολη	1
Μη δεσμευόμενη	0
Για την ταξινόμηση του μέσου όρου αριθμητικών τιμών στις σειρές δοκιμών:	
Ταξινόμηση	**Αριθμητική τιμή**
Δεσμευόμενη	Μέσος όρος ≥ 1,5
Αμφίβολη	0,5 ≤ Μέσος όρος < 1,5
Μη δεσμευόμενη	Μέσος όρος < 0,5

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

61. Βλ. παράγραφο 24 της ενότητας «**ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ hrER**» της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

▼**M8**

Προσάρτημα 2.1

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΟΡΩΝ

[^{3}H]E2: 17β-οιστραδιόλη ραδιοσημασμένη με τρίτιο

DCC: επιχρισμένος με δεξτράνη ενεργός άνθρακας

E2: μη ραδιοσημασμένη 17β-οιστραδιόλη (αδρανής)

Ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμασίας: 10 mM Tris, 10 mg αλβουμίνης βόειου ορού /ml, 2 mM DTT, 10 % γλυκερόλης, 0,2 mM λευπεπτίνης, pH 7,5

hrERα: (human recombinant estrogen receptor alpha) ανασυνδασμένος ανθρώπινος υποδοχέας οιστρογόνων α

Πανομοιότυπο δείγμα: μία από πολλές κοιλότητες με το ίδιο περιεχόμενο στις ίδιες συγκεντρώσεις, οι οποίες υποβάλλονται ταυτόχρονα σε δοκιμή στο πλαίσιο μεμονωμένης σειράς δοκιμών. Στο παρόν πρωτόκολλο, κάθε συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας υποβάλλεται σε δοκιμή εις τριπλούν· δηλαδή υπάρχουν τρία πανομοιότυπα δείγματα που υποβάλλονται ταυτόχρονα σε δοκιμή για κάθε συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Σειρά δοκιμών: πλήρης σειρά ταυτόχρονα εξεταζόμενων κοιλοτήτων δοκιμασίας τρυβλίων μικροτιτλοδότησης, που παρέχει όλες τις πληροφορίες που είναι απαραίτητες για τον χαρακτηρισμό της δέσμευσης μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον hrERα (δηλαδή συνολική [^{3}H]17β-οιστραδιόλη που προστίθεται στην κοιλότητα δοκιμασίας, μέγιστη δέσμευση [^{3}H]17β-οιστραδιόλης στον hrERα, μη ειδική δέσμευση, και συνολική δέσμευση σε διάφορες συγκεντρώσεις υπό δοκιμή χημικής ουσίας). Μια σειρά δοκιμών μπορεί να περιλαμβάνει ακόμη και μία μόνο κοιλότητα δοκιμασίας (πανομοιότυπο δείγμα) ανά συγκέντρωση αλλά, δεδομένου ότι στο παρόν πρωτόκολλο απαιτείται η διεξαγωγή της δοκιμασίας εις τριπλούν, μία σειρά δοκιμών περιλαμβάνει τρεις κοιλότητες δοκιμασίας ανά συγκέντρωση. Επιπλέον, στο παρόν πρωτόκολλο απαιτούνται τρεις ανεξάρτητες (δηλ. μη παράλληλες) σειρές δοκιμών ανά χημική ουσία.

▼**M8**

Προσάρτημα 2.2

ΤΥΠΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΚΟΡΕΣΜΟΥ [^{3}H]17Β-ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗΣ ΜΕ ΤΡΕΙΣ ΠΑΝΟΜΟΙΟΤΥΠΕΣ ΚΟΙΛΟΤΗΤΕΣ

Τυπική δοκιμασία κορεσμού [3H]-17β-οιστραδιόλης με τρεις πανομοιότυπες κοιλότητες

Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Κωδικός τύπου κοιλότητας	Αρχική συγκέντρωση ραδιοσημασμένης E2 (nM)	Όγκος ραδιοσημασμένης E2 (μl)	Τελική συγκέντρωση ραδιοσημασμένης E2 (nM)	Αρχική συγκέντρωση μη ραδιοσημασμένης E2 (μM)	Όγκος μη ραδιοσημασμένης E2 (μl)	Τελική συγκέντρωση μη ραδιοσημασμένης E2 (μM)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)	Όγκος υποδοχέα (μl)	Συνολικός όγκος ξυλώνου στις κοιλότητες
A1	1	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A2	2	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A3	3	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A4	1	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A5	2	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A6	3	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A7	1	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A8	2	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A9	3	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A10	1	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A11	2	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A12	3	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
B1	1	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B2	2	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B3	3	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B4	1	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B5	2	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B6	3	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B7	1	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B8	2	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160

▼**M8**

Τυπική δοκιμασία κορεσμού [3H]-17β-οιστραδιόλης με τρεις πανομοιότυπες κοιλότητες

Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Κωδικός τύπου κοιλότητας	Αρχική συγκέντρωση ραδιοσημασμένης E2 (nM)	Όγκος ραδιοσημασμένης E2 (μl)	Τελική συγκέντρωση ραδιοσημασμένης E2 (nM)	Αρχική συγκέντρωση μη ραδιοσημασμένης E2 (μM)	Όγκος μη ραδιοσημασμένης E2 (μl)	Τελική συγκέντρωση μη ραδιοσημασμένης E2 (μM)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)	Όγκος υποδοχέα (μl)	Συνολικός όγκος στις κοιλότητες
B9	3	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B10	1	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B11	2	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B12	3	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
D1	1	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D2	2	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D3	3	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D4	1	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D5	2	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D6	3	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D7	1	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D8	2	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D9	3	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D10	1	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D11	2	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D12	3	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
E1	1	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E2	2	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E3	3	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E4	1	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E5	2	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E6	3	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160

▼**M8**

Τυπική δοκιμασία κορεσμού [3Η]-17β-οιστραδιόλης με τρεις πανομοιότυπες κοιλότητες

Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Κωδικός τύπου κοιλότητας	Αρχική συγκέντρωση ραδιοσημασμένης E2 (nM)	Όγκος ραδιοσημασμένης E2 (μl)	Τελική συγκέντρωση ραδιοσημασμένης E2 (nM)	Αρχική συγκέντρωση μη ραδιοσημασμένης E2 (μM)	Όγκος μη ραδιοσημασμένης E2 (μl)	Τελική συγκέντρωση μη ραδιοσημασμένης E2 (μM)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)	Όγκος υποδοχέα (μl)	Συνολικός όγκος στις κοιλότητες
E7	1	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E8	2	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E9	3	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E10	1	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E11	2	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E12	3	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
G1	1	Ραδιοσημα-σμένο	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Ραδιοσημα-σμένο	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Ραδιοσημα-σμένο	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Ραδιοσημα-σμένο	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Ραδιοσημα-σμένο	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Ραδιοσημα-σμένο	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Ραδιοσημα-σμένο	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Ραδιοσημα-σμένο	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Ραδιοσημα-σμένο	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Ραδιοσημα-σμένο	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Ραδιοσημα-σμένο	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Ραδιοσημα-σμένο	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40

▼**M8**

Τυπική δοκιμασία κορεσμού [3H]-17β-οιστραδιόλης με τρεις πανομοιότυπες κοιλότητες

Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Κωδικός τύπου κοιλότητας	Αρχική συγκέντρωση ραδιοσημασμένης E2 (nM)	Όγκος ραδιοσημασμένης E2 (μl)	Τελική συγκέντρωση ραδιοσημασμένης E2 (nM)	Αρχική συγκέντρωση μη ραδιοσημασμένης E2 (μM)	Όγκος μη ραδιοσημασμένης E2 (μl)	Τελική συγκέντρωση μη ραδιοσημασμένης E2 (μM)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)	Όγκος υποδοχέα (μl)	Συνολικός όγκος στις κοιλότητες
H1	1	Ραδιοσημα-σμένο	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Ραδιοσημα-σμένο	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Ραδιοσημα-σμένο	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Ραδιοσημα-σμένο	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H5	2	Ραδιοσημα-σμένο	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Ραδιοσημα-σμένο	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Ραδιοσημα-σμένο	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Ραδιοσημα-σμένο	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Ραδιοσημα-σμένο	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Ραδιοσημα-σμένο	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Ραδιοσημα-σμένο	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Ραδιοσημα-σμένο	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Επισημαίνεται ότι οι «ραδιοσημασμένες» κοιλότητες είναι κενές κατά την επώαση. Τα 40 μl προστίθενται μόνο για τη μέτρηση του σπινθηρισμού.

▼**M8**

Προσάρτημα 2.3

ΔΙΑΤΑΞΗ ΚΟΙΛΟΤΗΤΩΝ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ

Τρυβλίο	**Θέση**	**Πανομοιότυπο δείγμα**	**Τύπος κοιλότητας**	**Κωδικός κοιλότητας**	**Κωδικός συγκέντρωσης**	**Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)**	**Αποθεματικό διάλυμα hrER (μl)**	**Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)**	**Όγκος υγρής θέτης (σημασμένης E2) (μL)**	**Όγκος από το τρυβλίο πρόσωσης (μL)**	**Τελικός όγκος (μl)**	**Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)**
S	A1	1	συνολική δέσμευση	TB	TB1	—	40		40	80	160	—
S	A2	2	συνολική δέσμευση	TB	TB2	—	40		40	80	160	—
S	A3	3	συνολική δέσμευση	TB	TB3	—	40		40	80	160	—
S	A4	1	συνολική δέσμευση	TB	TB4	—	40		40	80	160	—
S	A5	2	συνολική δέσμευση	TB	TB5	—	40		40	80	160	—
S	A6	3	συνολική δέσμευση	TB	TB6	—	40		40	80	160	—
S	A7	1	μη σημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A8	2	μη σημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A9	3	μη σημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A10	1	μη σημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A11	2	μη σημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A12	3	μη σημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	B1	1	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B2	2	μη ραδιοσημασμένο E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B3	3	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B4	1	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08

▼**M8**

Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (μl)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)	Όγκος υγρής θέτης (σημασμένης E2) (μL)	Όγκος από το τρυβλίο αραίωσης (μL)	Τελικός όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
S	B5	2	μη ραδιο-σημα-σμένη E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B6	3	μη ραδιο-σημα-σμένη E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B7	1	μη ραδιο-σημα-σμένη E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B8	2	μη ραδιο-σημα-σμένη E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B9	3	μη ραδιο-σημα-σμένη E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B10	1	μη ραδιο-σημα-σμένη E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	B11	2	μη ραδιο-σημα-σμένη E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	B12	3	μη ραδιο-σημα-σμένη E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	C1	1	μη ραδιο-σημα-σμένη E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C2	2	μη ραδιο-σημα-σμένη E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C3	3	μη ραδιο-σημα-σμένη E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C4	1	μη ραδιο-σημα-σμένη E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C5	2	μη ραδιο-σημα-σμένη E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C6	3	μη ραδιο-σημα-σμένη E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C7	1	μη ραδιο-σημα-σμένη E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C8	2	μη ραδιο-σημα-σμένη E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11

▼**M8**

Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (μl)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)	Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (μL)	Όγκος από το τρυβλίο φράγωσης (μL)	Τελικός όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
S	C9	3	μη ραδιο-σημα-σμένη E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C10	1	τυφλό	τυφλό	B1	—	—	160	—	—	160	—
S	C11	2	τυφλό	τυφλό	B2	—	—	160	—	—	160	—
S	C12	3	τυφλό	τυφλό	B3	—	—	160	—	—	160	—
S	D1	1	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D2	1	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D3	1	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D4	1	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D5	1	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D6	1	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D7	1	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D8	1	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D9	1	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D10	1	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	D11	1	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	D12	1	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	E1	1	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E2	2	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E3	3	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E4	1	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E5	2	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E6	3	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E7	1	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08

▼**M8**

Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (μl)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)	Όγκος υγρής θέτης (σημασμένης E2) (μL)	Όγκος από το τρυβλίο φράτωσης (μL)	Τελικός όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
S	E8	2	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E9	3	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E10	1	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	E11	2	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	E12	3	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	F1	1	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	—	40	80	160	1,0E-03
S	F2	2	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	—	40	80	160	1,0E-03
S	F3	3	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	—	40	80	160	1,0E-03
S	F4	1	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	—	40	80	160	1,0E-04
S	F5	2	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	—	40	80	160	1,0E-04
S	F6	3	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	—	40	80	160	1,0E-04
S	F7	1	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	F10	1	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	F11	2	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	F12	3	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	G1	1	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	—	40	80	160	3,0E-07
S	G2	2	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	—	40	80	160	3,0E-07
S	G3	3	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	—	40	80	160	3,0E-07
S	G4	1	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	G5	2	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08

▼**M8**

Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (μl)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)	Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (μL)	Όγκος από το τρυβλίο αραίωσης (μL)	Τελικός όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
S	G6	3	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	G7	1	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	G8	2	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	G9	3	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	G10	1	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	—	40	—	160	1,0E-10
S	G11	2	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	—	40	—	160	1,0E-10
S	G12	3	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	—	40	—	160	1,0E-10
S	H1	1	ραδιοση-μασμένο	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H2	1	ραδιοση-μασμένο	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H3	1	ραδιοση-μασμένο	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H4	1	ραδιοση-μασμένο	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H5	1	ραδιοση-μασμένο	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H6	1	ραδιοση-μασμένο	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H7	1	ρυθμιστικό διάλυμα	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H8	1	ρυθμιστικό διάλυμα	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H9	1	ρυθμιστικό διάλυμα	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H10	1	ρυθμιστικό διάλυμα	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H11	1	ρυθμιστικό διάλυμα	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H12	1	ρυθμιστικό διάλυμα	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—

Επισημαίνεται ότι οι «ραδιοσημασμένες» κοιλότητες είναι κενές κατά την επώαση. Τα 40 μl προστίθενται μόνο για τη μέτρηση του σπινθηρισμού.

▼**M8**

Διάταξη κοιλοτήτων δοκιμασίας ανταγωνιστικής δέσμευσης												
Τρυβλίο	**Θέση**	**Πανομοιότυπο δείγμα**	**Τύπος κοιλότητας**	**Κωδικός κοιλότητας**	**Κωδικός συγκέντρωσης**	**Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)**	**Αποθεματικό διάλυμα hrER (μL)**	**Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μL)**	**Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (μL)**	**Όγκος από το τρυβλίο αραίωσης (μL)**	**Τελικός όγκος (μl)**	**Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)**
P1	A1	1	συνολική δέσμευση	TB	TBB1B1	—	40	—	40	80	160	—
P1	A2	2	συνολική δέσμευση	TB	TB2	—	40	—	40	80	160	—
P1	A3	3	συνολική δέσμευση	TB	TB3	—	40	—	40	80	160	—
P1	A4	1	συνολική δέσμευση	TB	TB4	—	40	—	40	80	160	—
P1	A5	2	συνολική δέσμευση	TB	TB5	—	40	—	40	80	160	—
P1	A6	3	συνολική δέσμευση	TB	TB6	—	40	—	40	80	160	—
P1	A7	1	μη σημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A8	2	μη σημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A9	3	μη σημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A10	1	μη σημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A11	2	μη σημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A12	3	μη σημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	B1	1	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B2	2	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B3	3	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B4	1	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B5	2	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B6	3	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B7	1	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B8	2	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B9	3	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B10	1	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B11	2	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B12	3	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

▼**M8**

Διάταξη κοιλοτήτων δοκιμασίας ανταγωνιστικής δέσμευσης												
Τρυβλίο	**Θέση**	**Πανομοιότυπο δείγμα**	**Τύπος κοιλότητας**	**Κωδικός κοιλότητας**	**Κωδικός συγκέντρωσης**	**Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)**	**Αποθεματικό διάλυμα hrER (μL)**	**Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μL)**	**Όγκος ιχνηθέτη (ισημασβέστης E2) (μL)**	**Όγκος από το τρυβλίο αραίωσης (μL)**	**Τελικός όγκος (μl)**	**Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)**
P1	C1	1	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C2	2	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C3	3	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C4	1	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C5	2	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C6	3	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C7	1	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C8	2	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C9	3	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C10	1	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C11	2	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C12	3	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	D1	1	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D2	2	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D3	3	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D4	1	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D5	2	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D6	3	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D7	1	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D8	2	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D9	3	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D10	1	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D11	2	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D12	3	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

▼**M8**

Διάταξη κοιλοτήτων δοκιμασίας ανταγωνιστικής δέσμευσης												
Τρυβλίο	**Θέση**	**Πανομοιότυπο δείγμα**	**Τύπος κοιλότητας**	**Κωδικός κοιλότητας**	**Κωδικός συγκέντρωσης**	**Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)**	**Αποθεματικό διάλυμα hrER (μL)**	**Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μL)**	**Όγκος ιχνηθέτη (ιωμπαμπέιντς E2) (μL)**	**Όγκος από το τρυβλίο αραίωσης (μL)**	**Τελικός όγκος (μl)**	**Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)**
P1	E1	1	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E2	2	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E3	3	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E4	1	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E5	2	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E6	3	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E7	1	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E8	2	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E9	3	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E10	1	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E11	2	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E12	3	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	F1	1	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F2	2	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F3	3	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F4	1	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F5	2	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F6	3	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F7	1	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F8	2	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F9	3	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F10	1	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F11	2	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F12	3	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

▼**M8**

Διάταξη κοιλοτήτων δοκιμασίας ανταγωνιστικής δέσμευσης

Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (μL)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μL)	Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (μL)	Όγκος από το τρυβλίο αραίωσης (μL)	Τελικός όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
P1	G1	1	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G2	2	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G3	3	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G4	1	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G5	2	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G6	3	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G7	1	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G8	2	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G9	3	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G10	1	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G11	2	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G12	3	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	H1	1	νορεθυνοδρέλη	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	νορεθυνοδρέλη	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	νορεθυνοδρέλη	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	νορεθυνοδρέλη	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	νορεθυνοδρέλη	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	νορεθυνοδρέλη	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	μη ραδιοσημασμένη E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	μη ραδιοσημασμένη E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	μη ραδιοσημασμένη E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	μη ραδιοσημασμένη E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	μη ραδιοσημασμένη E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	μη ραδιοσημασμένη E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	

▼**M8**

Προσάρτημα 3

IN VITRO ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΠΡΟΣΔΕΜΑΤΟΣ ERA, ΤΟΥ CHEMICAL EVALUATION AND RESEARCH INSTITUTE (CERI) (ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ)

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ (ΒΛ. ΕΠΙΣΗΣ ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ)

1. Η παρούσα *in vitro* δοκιμασία κορεσμού υποδοχέα οιστρογόνων (ERα) και ανταγωνιστικής δέσμευσης χρησιμοποιεί μια περιοχή δέσμευσης προσδέματος (ligand binding domain, LBD) του ανθρώπινου ERα (hrERα). Αυτό το πρωτεϊνικό κατασκεύασμα παρήχθη από το ιαπωνικό Ινστιτούτο Αξιολόγησης και Έρευνας Χημικών Ουσιών (CERI) ως πρωτεΐνη σύντηξης με S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) και εκφράζεται στην *E. coli*. Το πρωτόκολλο CERI αποτέλεσε αντικείμενο διεθνούς μελέτης επικύρωσης πολλών εργαστηρίων (2), η οποία κατέδειξε την καταλληλότητα και την αξιοπιστία του για τον επιδιωκόμενο σκοπό της δοκιμασίας.

2. Η παρούσα δοκιμασία αποτελεί διαδικασία διαλογής για τον προσδιορισμό ουσιών που μπορούν να δεσμεύονται στον hrERα. Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ικανότητας μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας να ανταγωνίζεται τη 17β-οιστραδιόλη ως προς τη δέσμευση στην hrERα-LBD. Τα ποσοτικά αποτελέσματα της δοκιμασίας είναι η IC_{50} (μέτρο της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που απαιτείται για να εκτοπιστεί το ήμισυ της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης από τον hrERα) και οι σχετικές συγγένειες δέσμευσης των υπό δοκιμή χημικών ουσιών για τον hrERα σε σύγκριση με τη 17β-οιστραδιόλη. Για λόγους διαλογής των χημικών ουσιών, στα αποδεκτά ποιοτικά αποτελέσματα της δοκιμασίας περιλαμβάνεται η ταξινόμηση των υπό δοκιμή χημικών ουσιών ως δεσμευόμενων, μη δεσμευόμενων ή αμφίβολης δέσμευσης στον hrERα, με βάση τα κριτήρια που περιγράφονται για τις καμπύλες δέσμευσης.

3. Στη δοκιμασία χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένο πρόσδεμα για τον οποίο το εργαστήριο απαιτείται να διαθέτει άδεια ραδιενεργών υλικών. Για κάθε διαδικασία στο πλαίσιο της οποίας γίνεται χρήση ραδιοϊσοτόπων και επικίνδυνων χημικών ουσιών θα πρέπει να τηρούνται οι κανονισμοί και οι διαδικασίες που ορίζει η εθνική νομοθεσία.

4. Πριν από τη χρήση της παρούσας δοκιμασίας για κανονιστικούς σκοπούς, θα πρέπει να μελετηθούν οι ενότητες «**ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ**» και «**ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ hrER**». Οι ορισμοί και οι συντομογραφίες που χρησιμοποιούνται στην παρούσα κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ (ΒΛ. ΕΠΙΣΗΣ ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ)

5. Η δοκιμασία δέσμευσης hrERα μετρά την ικανότητα ενός ραδιοσημασμένου προσδέματος ([^{3}H]17β-οιστραδιόλη) να δεσμεύεται στον ER παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας (ανταγωνιστή). Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για τον ER ανταγωνίζονται με το ραδιοσημασμένο πρόσδεμα σε χαμηλότερη συγκέντρωση σε σύγκριση με τις χημικές ουσίες με χαμηλότερη συγγένεια για τον υποδοχέα.

6. Η δοκιμασία αυτή αποτελείται από δύο βασικά στοιχεία: ένα πείραμα δέσμευσης κορεσμού για τον χαρακτηρισμό των παραμέτρων αλληλεπίδρασης υποδοχέα-προσδέματος, ακολουθούμενο από ένα πείραμα ανταγωνιστικής δέσμευσης που χαρακτηρίζει τον ανταγωνισμό μεταξύ μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας και ενός ραδιοσημασμένου προσδέματος ως προς τη δέσμευση στον ER.

▼**M8**

7. Σκοπός του πειράματος δέσμευσης κορεσμού είναι ο χαρακτηρισμός συγκεκριμένης παρτίδας υποδοχέων ως προς τη συγγένεια δέσμευσης και τον αριθμό εν είδει προετοιμασίας για τη διεξαγωγή του πειράματος ανταγωνιστικής δέσμευσης. Το πείραμα δέσμευσης κορεσμού μετρά, υπό συνθήκες ισορροπίας, τη συγγένεια καθορισμένης συγκέντρωσης του υποδοχέα οιστρογόνων σε σχέση με το φυσικό πρόσδεμά του (η οποία αντιπροσωπεύεται από τη σταθερά διάστασης Kd), και τη συγκέντρωση των ενεργών θέσεων του υποδοχέα (Bmax).

8. Το πείραμα ανταγωνιστικής δέσμευσης μετρά τη συγγένεια δέσμευσης μιας ουσίας στον ER, ως ανταγωνίστρια της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης. Η συγγένεια προσδιορίζεται ποσοτικά βάσει της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας η οποία, σε συνθήκες ισορροπίας, αναστέλλει το 50 % της ειδικής δέσμευσης της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης (και η οποία καλείται «ανασταλτική συγκέντρωση 50 %» ή IC_{50}). Η συγγένεια μπορεί επίσης να εκτιμηθεί με χρήση της σχετικής συγγένειας δέσμευσης (RBA, σε σχέση με την IC_{50} της οιστραδιόλης που μετράται χωριστά στην ίδια σειρά δοκιμών). Το πείραμα ανταγωνιστικής δέσμευσης μετρά τη δέσμευση της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης σε καθορισμένη συγκέντρωση παρουσία ευρέος φάσματος (οκτώ τάξεων μεγέθους) συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Στη συνέχεια, τα δεδομένα προσαρμόζονται σε μια μορφή της εξίσωσης Hill (Hill, 1910) βάσει της οποίας περιγράφεται η εκτόπιση του ραδιοσημασμένου προσδέματος από ανταγωνιστική δεσμευόμενη ουσία μίας θέσης. Ο βαθμός εκτόπισης της ραδιοσημασμένης οιστραδιόλης σε ισορροπία χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ως δεσμευόμενης, μη δεσμευόμενης ή αμφίβολης απόκρισης.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Επίδειξη των αποδεκτών επιδόσεων πρωτεΐνης hrERα

9. Πριν από την ένταξη των δοκιμασιών δέσμευσης κορεσμού και ανταγωνιστικής δέσμευσης στην καθημερινή πρακτική, θα πρέπει να καταδεικνύονται οι ορθές επιδόσεις κάθε νέας παρτίδας hrERα στο εργαστήριο στο οποίο θα χρησιμοποιηθεί. Για την επίδειξη των επιδόσεων θα πρέπει να χρησιμοποιείται διαδικασία δύο σταδίων. Τα στάδια αυτής είναι τα ακόλουθα:

— Διεξαγωγή δοκιμασίας δέσμευσης κορεσμού [^{3}H]17β-οιστραδιόλης με σκοπό να καταδειχθεί η ειδικότητα και ο κορεσμός του hrERα. Η μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης των δεδομένων αυτών (π.χ. BioSoft, McPherson 1985, Motulsky 1995) και η επακόλουθη ανάλυση Scatchard θα πρέπει να τεκμηριώνουν τη συγγένεια δέσμευσης της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης με τον hrERα (Kd) και τον αριθμό των υποδοχέων (Bmax) για κάθε παρτίδα hrERα.

— Διεξαγωγή δοκιμασίας ανταγωνιστικής δέσμευσης με χρήση των ουσιών μαρτύρων [οιστρογόνο αναφοράς (17β-οιστραδιόλη), μια ασθενώς δεσμευόμενη ουσία (π.χ. νορεθυνοδρέλη ή νορεθινδρόνη) και μια μη δεσμευόμενη ουσία (οκτυλοτριαιθοξυσιλάνιο, OTES)]. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να δημιουργεί βάση ιστορικών δεδομένων για να τεκμηριώνει τη συνέπεια της τιμής IC50 και των σχετικών τιμών για το οιστρογόνο αναφοράς και την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία στα διάφορα πειράματα και τις διάφορες παρτίδες hrERα. Επιπλέον, οι παράμετροι των καμπυλών ανταγωνιστικής δέσμευσης για τις ουσίες μάρτυρες θα πρέπει να περιλαμβάνονται εντός των ορίων του διαστήματος εμπιστοσύνης 95 % (βλ. πίνακα 1) που αναπτύχθηκαν με χρήση δεδομένων των εργαστηρίων που συμμετείχαν στη μελέτη επικύρωσης για την παρούσα δοκιμασία (2).

Πίνακας 1

Κριτήρια επιδόσεων που αναπτύχθηκαν για το οιστρογόνο αναφοράς και την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία της δοκιμασίας δέσμευσης hrER CERI

Ουσία	Παράμετρος	Μέσος όρος (α)	Τυπική απόκλιση (n)	Διαστήματα εμπιστοσύνης 95 % (β)	
				Κατώτατο όριο	Ανώτατο όριο
17β-Οιστραδιόλη	Μέγιστη απόκριση	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Ελάχιστη απόκριση	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43

▼**M8**

Ουσία	Παράμετρος	Μέσος όρος (α)	Τυπική απόκλιση (n)	Διαστήματα εμπιστοσύνης 95 % (β)	
				Κατώτατο όριο	Ανώτατο όριο
	Κλίση Hill	–1,22	0,20 (70)	–1,27	–1,17
	$LogIC_{50}$	–8,93	0,23 (70)	–8,98	–8,87
Νορεθυνοδρέλη	Μέγιστη απόκριση	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Ελάχιστη απόκριση	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Κλίση Hill	–1,04	0,21 (68)	–1,09	–0,99
	$LogIC_{50}$	–6,19	0,40 (68)	–6,29	–6,10
Νορεθινδρόνη (γ)	Μέγιστη απόκριση	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Ελάχιστη απόκριση	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Κλίση Hill	–1,18	0,32 (23)	–1,31	–1,04
	$LogIC_{50}$	–6,01	0,54 (23)	–6,25	–5,78

(α) Η μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (SD) με μέγεθος δείγματος (n) υπολογίστηκαν με χρήση εκτιμήσεων για την προσαρμογή της καμπύλης (εξίσωση Hill 4 παραμέτρων) για σειρές δοκιμών μαρτύρων που διεξήχθησαν σε τέσσερα εργαστήρια στη διάρκεια της μελέτης επικύρωσης (βλ. παράρτημα Ν της παραπομπής 2).

(β) Η εμπιστοσύνη επιπέδου 95 % παρέχεται ως οδηγός για τα κριτήρια αποδοχής.

(γ) Η υποβολή της νορεθινδρόνης σε δοκιμές ήταν προαιρετική για το υποέργο 4 στη διάρκεια της μελέτης επικύρωσης (βλ. παραπομπή 2, υποέργο 4). Ως εκ τούτου, η μέση τιμή ± SD (n) υπολογίστηκαν με χρήση εκτιμήσεων της προσαρμογής της καμπύλης (εξίσωση Hill 4 παραμέτρων) για τις σειρές δοκιμών μαρτύρων που διεξήχθησαν σε δύο εργαστήρια.
Η κλίμακα τιμών της IC_{50} θα εξαρτάται από την Kd του σκευάσματος υποδοχέα και τη συγκέντρωση του ραδιοσημασμένου προσδέματος που χρησιμοποιούνται σε κάθε εργαστήριο. Η κατάλληλη προσαρμογή της κλίμακας τιμών IC_{50} με βάση τις συνθήκες που χρησιμοποιούνται για τη διεξαγωγή της δοκιμασίας είναι αποδεκτή.

Απόδειξη της τεχνικής ικανότητας του εργαστηρίου

10. Βλ. παραγράφους 17 και 18, και πίνακα 2 στην ενότητα «**ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ hrER**» της παρούσας μεθόδου δοκιμών. Κάθε δοκιμασία (κορεσμού και ανταγωνιστικής δέσμευσης) θα πρέπει να περιλαμβάνει τρεις ανεξάρτητες σειρές δοκιμών (με πρόσφατα παρασκευασμένες αραιώσεις του υποδοχέα, των χημικών ουσιών και των αντιδραστηρίων) σε διαφορετικές ημέρες, και κάθε σειρά δοκιμών θα πρέπει να περιλαμβάνει τρία πανομοιότυπα δείγματα.

Προσδιορισμός της συγκέντρωσης υποδοχέα (hrERα)

11. Η συγκέντρωση του ενεργού υποδοχέα διαφέρει ελαφρώς ανά παρτίδα και ανάλογα με τις συνθήκες φύλαξης. Για αυτόν τον λόγο, θα πρέπει να προσδιορίζεται η συγκέντρωση του ενεργού υποδοχέα κατά την παραλαβή του από τον προμηθευτή. Κατ' αυτόν τον τρόπο θα υπολογιστεί η κατάλληλη συγκέντρωση του ενεργού υποδοχέα κατά τη χρονική στιγμή της σειράς δοκιμών.

12. Υπό συνθήκες κατάλληλες για την ανταγωνιστική δέσμευση (δηλαδή 0,5 nM [^{3}H]-οιστραδιόλης), θα πρέπει να επωάζονται ονομαστικές συγκεντρώσεις υποδοχέα 0,1, 0,2, 0,4 και 0,6 nM απουσία (συνολική δέσμευση) και παρουσία (μη ειδική δέσμευση) 1 μM μη ραδιοσημασμένης οιστραδιόλης. Η ειδική

▼M8

δέσμευση, υπολογιζόμενη ως η διαφορά μεταξύ συνολικής και μη ειδικής δέσμευσης, χαράσσεται έναντι της ονομαστικής συγκέντρωσης υποδοχέα. Η συγκέντρωση του υποδοχέα από την οποία προκύπτουν τιμές ειδικής δέσμευσης που αντιστοιχούν στο 40 % της προστεθείσας ραδιοσήμανσης σχετίζεται με την αντίστοιχη συγκέντρωση υποδοχέα, και η εν λόγω συγκέντρωση υποδοχέα θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τα πειράματα κορεσμού και ανταγωνιστικής δέσμευσης. Συχνά, μια τελική συγκέντρωση hrER ίση με 0,2 nM θα συμμορφώνεται με τη συνθήκη αυτή.

13. Σε περίπτωση που αποτυγχάνει επανειλημμένα η ικανοποίηση του κριτηρίου του 40 %, θα πρέπει να ελέγχεται η οργάνωση του πειράματος για πιθανά σφάλματα. Η μη επίτευξη του κριτηρίου του 40 % μπορεί να υποδεικνύει ότι ο αριθμός των ενεργών υποδοχέων στην ανασυνδυασμένη παρτίδα είναι υπερβολικά χαμηλός, οπότε και θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης άλλης παρτίδας υποδοχέων.

Δοκιμασία κορεσμού

14. Θα πρέπει να αξιολογούνται εις τριπλούν οκτώ αυξανόμενες συγκεντρώσεις [^{3}H]17β-οιστραδιόλης, υπό τις ακόλουθες τρεις συνθήκες (βλ. πίνακα 2):

α) απουσία μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης και παρουσία ER. Έτσι προσδιορίζεται η συνολική δέσμευση βάσει της ραδιενέργειας στις κοιλότητες που περιέχουν μόνο [^{3}H]17β-οιστραδιόλη.

β) παρουσία κατά 2 000 φορές πολλαπλάσιας υπερβάλλουσας συγκέντρωσης μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης σε σχέση με τη ραδιοσημασμένη 17β-οιστραδιόλη και παρουσία ER. Στόχος είναι ο κορεσμός των ενεργών θέσεων δέσμευσης με μη ραδιοσημασμένη 17β-οιστραδιόλη και ο προσδιορισμός της μη ειδικής δέσμευσης μέσω μέτρησης της ραδιενέργειας στις κοιλότητες. Τυχόν εναπομένουσα ραδιοσημασμένη οιστραδιόλη που μπορεί να δεσμευτεί στον υποδοχέα θεωρείται ότι δεσμεύεται σε μη ειδική θέση, καθώς η μη ραδιοσημασμένη οιστραδιόλη βρίσκεται σε τόσο υψηλή συγκέντρωση ώστε θα πρέπει να έχει δεσμευτεί σε όλες τις διαθέσιμες ειδικές θέσεις του υποδοχέα.

γ) απουσία μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης και απουσία ER (προσδιορισμός της συνολικής ραδιενέργειας).

Παρασκευή διαλυμάτων [^{3}H]17β-οιστραδιόλης, μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης και hrERα

15. Θα πρέπει να παρασκευάζεται διάλυμα 40 nM [^{3}H]17β-οιστραδιόλης από αποθεματικό διάλυμα 1 μM [^{3}H]17β-οιστραδιόλης σε DMSO, με προσθήκη DMSO (για την παρασκευή 200 nM) και ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας σε θερμοκρασία δωματίου (για την παρασκευή 40 nM). Χρησιμοποιώντας αυτό το διάλυμα 40 nM παρασκευάζεται η σειρά αραιώσεων [^{3}H]17β-οιστραδιόλης, από 0,313 nM έως 40 nM, με ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμασίας σε θερμοκρασία δωματίου (όπως φαίνεται στη στήλη 12 του πίνακα 2). Οι τελικές συγκεντρώσεις δοκιμασίας, από 0,0313 έως 4,0 nM, λαμβάνονται με προσθήκη 10 μl από τα διαλύματα αυτά στις αντίστοιχες κοιλότητες δοκιμασίας τρυβλίου μικροτιτλοδότησης 96 κοιλοτήτων (βλ. πίνακες 2 και 3). Η παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας, ο υπολογισμός του αρχικού αποθεματικού διαλύματος [^{3}H]17β-οιστραδιόλης βάσει της ειδικής δραστικότητάς του, η παρασκευή αραιώσεων και ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων περιγράφονται αναλυτικά στο πρωτόκολλο CERI (2).

16. Οι αραιώσεις των διαλυμάτων μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης θα πρέπει να παρασκευάζονται από αποθεματικό διάλυμα 17β-οιστραδιόλης 1 nM, με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας με σκοπό την επίτευξη οκτώ αυξανόμενων συγκεντρώσεων, που κυμαίνονται αρχικά από 0,625 μM έως 80 μM. Οι τελικές συγκεντρώσεις δοκιμασίας, από 0,0625 έως 8 μM, λαμβάνονται με προσθήκη 10 μl από αυτά τα διαλύματα στις αντίστοιχες κοιλότητες δοκιμασίας τρυβλίου μικροτιτλοδότησης 96 κοιλοτήτων που προορίζονται ειδικά για τη μέτρηση της μη ειδικής δέσμευσης (βλ. πίνακες 2 και 3). Η παρασκευή των αραιώσεων μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης περιγράφεται αναλυτικά στο πρωτόκολλο CERI (2).

▼**M8**

17. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται η συγκέντρωση υποδοχέα από την οποία προκύπτει ειδική δέσμευση 40±10 % (βλ. παραγράφους 12-13). Το διάλυμα hrERα θα πρέπει να παρασκευάζεται με παγόψυχρο ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμασίας ακριβώς πριν από τη χρήση, δηλαδή μετά την προετοιμασία όλων των κοιλοτήτων για συνολική δέσμευση, μη ειδική δέσμευση και ραδιοσημασμένο πρόσδεμα μόνο.

18. Τα τρυβλία μικροτιτλοδότησης 96 κοιλοτήτων παρασκευάζονται όπως φαίνεται στον πίνακα 2, με 3 πανομοιότυπα δείγματα ανά συγκέντρωση [^{3}H]17β-οιστραδιόλης. Η κατανομή όγκων της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης, της μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης, του ρυθμιστικού διαλύματος και του υποδοχέα περιγράφεται στον πίνακα 3.

Πίνακας 2

Διάταξη τρυβλίου μικροτιτλοδότησης δοκιμασίας δέσμευσης κορεσμού

	1 (*)	2 (*)	3 (*)	4 (*)	5 (*)	6 (*)	7 (*)	8 (*)	9 (*)	10	11 (**)	12 (**)
	Για μέτρηση της ΤΒ			Για μέτρηση της NSB			Για τον προσδιορισμό του ραδιοσημασμένου προσδέματος μόνο				Αραιώσεις μη ραδιοσημασμένης Ε2 για τη στήλη τρυβλίου 4-6	Αραιώσεις [^{3}H]Ε2 για τη στήλη τρυβλίου 1-9
Α	0,0313 nM [^{3}H] E2+ ER			0,0313 nM [^{3}H] E2+ 0,0625 μM E2+ ER			0,0313 nM				0,625 μM	0,313 nM
Β	0,0625 nM [^{3}H] E2+ ER			0,0625 nM [^{3}H] E2+ 0,125 μM E2+ ER			0,0625 nM				1,25 μM	0,625 nM
Γ	0,125 nM [^{3}H] E2+ ER			0,125 nM [^{3}H] E2+ 0,25 μM E2+ ER			0,125 nM				2,5 μM	1,25 nM
Δ	0,250 nM [^{3}H] E2+ ER			0,250 nM [^{3}H] E2+ 0,5 μM E2+ ER			0,250 nM				5 μM	2,5 nM
Ε	0,50 nM [H] E2+ ER			0,50 nM [^{3}H] E2+ 1 μM E2+ ER			0,50 nM				10 μM	5 nM
ΣΤ	1,00 nM [^{3}H] E2+ ER			1,00 nM [^{3}H] E2+ 2 μM E2+ ER			1,00 nM				20 μM	10 nM
Ζ	2,00 nM [^{3}H] E2+ ER			2,00 nM [^{3}H] E2+ 4 μM E2+ ER			2,00 nM				40 μM	20 nM
Η	4,00 nM [^{3}H] E2+ ER			4,00 nM [^{3}H] E2+ 8 μM E2+ ER			4,00 nM				80 μM	40 nM

ΤΒ: συνολική δέσμευση
NSB: μη ειδική δέσμευση
[^{3}H] E_2: [^{3}H]17β-οιστραδιόλη
Ε2: μη ραδιοσημασμένη 17β-οιστραδιόλη
(*) Οι υποδεικνυόμενες συγκεντρώσεις εδώ είναι οι τελικές συγκεντρώσεις σε κάθε κοιλότητα.
(**) Οι αραιώσεις της μη ραδιοσημασμένης Ε2 και της [^{3}H]Ε2 μπορούν να παρασκευαστούν σε διαφορετικό τρυβλίο.

▼**M8**

Πίνακας 3

Όγκοι αντιδραστηρίου για το τρυβλίο μικροτιτλοδότησης κορεσμού

Αριθμός λωρίδας		1	2	3	4	5	6	7 (*)	8 (*)	9 (*)
Στάδια παρασκευής		Κοιλότητες TB			Κοιλότητες NSB			Μόνο ραδιοσημασμένο πρόσδεμα		
Όγκος στοιχείων για τις παραπάνω κοιλότητες αντίδρασης και σειρά προσθήκης	Ρυθμιστικό διάλυμα	60 μl			50 μl			90 μl		
	μη ραδιοσημασμένη E2 από τη λωρίδα 11 στον πίνακα 2	-			10 μl			-		
	[^{3}H]E2 από τη λωρίδα 12 στον πίνακα 2	10 μl			10 μl			10 μl		
	hrERα	30 μl			30 μl			-		
Συνολικός όγκος αντίδρασης		100 μl			100 μl			100 μl		
Επώαση		**ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΕΠΩΑΣΗΣ 2 ΩΡΩΝ**						Ποσοτικός προσδιορισμός της ραδιενέργειας αμέσως μετά την παρασκευή Καμία επώαση		
Αγωγή με 0,4 % DCC		Ναι			Ναι			**Όχι**		
Όγκος 0,4 % DCC		100 μl			100 μl			—		
Διήθηση		Ναι			Ναι			Όχι		
ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ DPM										
Όγκος ποσοτικού προσδιορισμού που προστέθηκε στο κοκτέιλ σπινθηρισμού		100 μl (**)			100 μl (**)			50 μl		

(*) Εάν για τη μέτρηση των dpm χρησιμοποιείται LSC για τρυβλία μικροτιτλοδότησης, δεν είναι σκόπιμο να γίνεται η παρασκευή ραδιοσημασμένου προσδέματος μόνο στο ίδιο τρυβλίο δοκιμασίας με τις κοιλότητες TB και NSB. Το ραδιοσημασμένο πρόσδεμα μόνο θα πρέπει να παρασκευάζεται σε διαφορετικό τρυβλίο.

(**) Εάν για τον διαχωρισμό του DCC χρησιμοποιείται φυγοκέντρηση, τα 50 μl υπερκείμενου υγρού θα πρέπει να μετρώνται με LSC προκειμένου να αποφεύγεται η μόλυνση του DCC.

19. Τα τρυβλία μικροτιτλοδότησης δοκιμασίας για τον προσδιορισμό της συνολικής δέσμευσης και της μη ειδικής δέσμευσης θα πρέπει να επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου (22°C έως 28°C) επί δύο ώρες.

Μέτρηση της δεσμευμένης στον hrERα [^{3}H]17β-οιστραδιόλης

20. Μετά την περίοδο επώασης διάρκειας δύο ωρών, η δεσμευμένη στον hrERα [^{3}H]17β-οιστραδιόλη θα πρέπει να διαχωρίζεται από την ελεύθερη [^{3}H]17β-οιστραδιόλη διά της προσθήκης 100 μl παγόψυχρου εναιωρήματος DCC 0,4 %. Στη συνέχεια, τα τρυβλία θα πρέπει να τοποθετούνται στον πάγο επί 10 λεπτά και το μείγμα αντίδρασης και το εναιώρημα DCC θα πρέπει να διηθούνται, μέσω μεταφοράς σε φίλτρο τρυβλίων μικροτιτλοδότησης, για την αφαίρεση του DCC. Στη συνέχεια, 100 μl του διηθήματος θα πρέπει να προστίθενται στο υγρό σπινθηρισμού σε φιαλίδια LSC για τον προσδιορισμό των διασπάσεων ανά λεπτό (dpm) ανά φιαλίδιο.

▼M8

21. Εναλλακτικά, εάν δεν υπάρχει διαθέσιμο φίλτρο τρυβλίων μικροτιτλοδότησης, η αφαίρεση του DCC μπορεί να γίνει μέσω φυγοκέντρησης. Στη συνέχεια, 50 μl υπερκείμενου υγρού που περιέχει τη δεσμευμένη στον hrERα [^{3}H]17β-οιστραδιόλη λαμβάνονται με εξαιρετική προσοχή, προκειμένου να αποφευχθεί τυχόν μόλυνση των κοιλοτήτων από την επαφή με τον DCC, και χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση του σπινθηρισμού.

22. Η συνθήκη «ραδιοσημασμένο πρόσδεμα μόνο» χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των διασπάσεων ανά λεπτό (dpm) της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης που προστίθεται στις κοιλότητες δοκιμασίας. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της ραδιενέργειας θα πρέπει να πραγματοποιείται αμέσως μετά την παρασκευή. Οι εν λόγω κοιλότητες δεν θα πρέπει να επωάζονται ούτε να υποβάλλονται σε αγωγή με το εναιώρημα DCC, αλλά το περιεχόμενό τους θα πρέπει να χορηγείται απευθείας στο υγρό σπινθηρισμού. Οι μετρήσεις αυτές δείχνουν την ποσότητα της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης, σε dpm, που προστέθηκε σε κάθε σύνολο κοιλοτήτων για τη συνολική δέσμευση και τη μη ειδική δέσμευση.

Δοκιμασία ανταγωνιστικής δέσμευσης

23. Η δοκιμασία ανταγωνιστικής δέσμευσης μετρά τη δέσμευση μιας μεμονωμένης συγκέντρωσης [^{3}H]17β-οιστραδιόλης παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Για κάθε συγκέντρωση σε μία σειρά δοκιμών θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τρία παράλληλα πανομοιότυπα δείγματα. Επιπλέον, για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να εκτελούνται τρεις μη παράλληλες σειρές δοκιμών. Η δοκιμασία θα πρέπει να οργανώνεται σε ένα ή περισσότερα τρυβλία μικροτιτλοδότησης 96 κοιλοτήτων.

Μάρτυρες

24. Κατά τη διεξαγωγή της δοκιμασίας, σε κάθε πείραμα θα πρέπει να περιλαμβάνεται παράλληλος διαλύτης και μάρτυρες (οιστρογόνο αναφοράς, ασθενώς δεσμευόμενη ουσία και μη δεσμευόμενη ουσία). Σε ένα τρυβλίο στη διάρκεια κάθε σειράς δοκιμών, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πλήρεις καμπύλες συγκέντρωσης για το οιστρογόνο αναφοράς και τους μάρτυρες (ασθενώς δεσμευόμενη και μη δεσμευόμενη ουσία). Όλα τα υπόλοιπα τρυβλία θα πρέπει να περιέχουν i) υψηλή (μέγιστη εκτόπιση, δηλαδή σχεδόν πλήρη εκτόπιση του ραδιοσημασμένου προσδέματος) και μέτρια (περίπου ίση με την IC_{50}) συγκέντρωση E2 και ασθενώς δεσμευόμενης ουσίας, εις τριπλούν, ii) μάρτυρα με διαλύτη και μη ειδική δέσμευση, καθένα εκ των οποίων εις τριπλούν. Οι διαδικασίες για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας και των διαλυμάτων [^{3}H]17β-οιστραδιόλης, hrERα και των υπό δοκιμή χημικών ουσιών περιγράφονται αναλυτικά στο πρωτόκολλο CERI (2).

Μάρτυρας με διαλύτη:

25. Ο μάρτυρας με διαλύτη δείχνει ότι ο διαλύτης δεν αλληλεπιδρά με το σύστημα δοκιμής και, επίσης, μετρά τη συνολική δέσμευση (TB). Ο προτιμώμενος διαλύτης είναι το DMSO. Εναλλακτικά, εάν η υψηλότερη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας δεν είναι διαλυτή στο DMSO, μπορεί να χρησιμοποιείται αιθανόλη. Η συγκέντρωση του DMSO στις τελικές κοιλότητες δοκιμασίας θα πρέπει να είναι 2,05 % και μπορεί να αυξηθεί μέχρι και σε 2,5 % εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν είναι διαλυτή. Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται συγκεντρώσεις DMSO άνω του 2,5 %, λόγω του ότι οι υψηλότερες συγκεντρώσεις διαλύτη παρεμποδίζουν τη δοκιμασία. Για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν είναι διαλυτές σε DMSO, αλλά είναι διαλυτές σε αιθανόλη, μπορεί να χρησιμοποιείται στη δοκιμασία 2 % αιθανόλης κατά μέγιστο χωρίς να υπάρχει παρεμπόδιση.

Μάρτυρας με ρυθμιστικό διάλυμα:

26. Ο μάρτυρας με ρυθμιστικό διάλυμα (BC) δεν θα πρέπει να περιέχει ούτε διαλύτη ούτε υπό δοκιμή χημική ουσία, αλλά όλα τα υπόλοιπα στοιχεία της δοκιμασίας. Τα αποτελέσματα του μάρτυρα με ρυθμιστικό διάλυμα συγκρίνονται με τον μάρτυρα με διαλύτη προκειμένου να επαληθευτεί ότι ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης δεν επηρεάζει το σύστημα δοκιμασίας.

▼M8

Ισχυρώς δεσμευόμενη ουσία (οιστρογόνο αναφοράς)

27. Η 17β-οιστραδιόλη (CAS 50-28-2) είναι το ενδογενές πρόσδεμα και δεσμεύεται με υψηλή συγγένεια στον ER υποτύπου α. Θα πρέπει να καταρτίζεται πρότυπη καμπύλη με χρήση 17β-οιστραδιόλης για κάθε δοκιμασία ανταγωνιστικής δέσμευσης hrERα, προκειμένου να είναι δυνατή η αξιολόγηση της μεταβλητότητας με την πάροδο του χρόνου κατά τη διεξαγωγή της δοκιμασίας στο ίδιο εργαστήριο. Θα πρέπει να παρασκευάζονται οκτώ διαλύματα μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης σε DMSO και ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμασίας, με τις τελικές συγκεντρώσεις στις κοιλότητες δοκιμασίας προς χρήση για την πρότυπη καμπύλη, στα εξής διαστήματα: 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, $10^{-8,5}$, 10^{-9}, $10^{-9,5}$, 10^{-10}, 10^{-11} M. Η υψηλότερη συγκέντρωση της μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης (1 μM) θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως δείκτης μη ειδικής δέσμευσης. Παρότι αποτελεί επίσης μέρος της πρότυπης καμπύλης, η συγκεκριμένη συγκέντρωση διακρίνεται από την ένδειξη «NSB» στον πίνακα 4.

Ασθενώς δεσμευόμενη ουσία

28. Θα πρέπει να περιλαμβάνεται μια ασθενώς δεσμευόμενη ουσία [νορεθυνοδρέλη (CAS68-23-5) ή, εναλλακτικά, νορεθινδρόνη (CAS 68-22-4)] προκειμένου να καταδεικνύεται η ευαισθησία κάθε πειράματος και να παρέχεται η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας με την πάροδο του χρόνου στο πλαίσιο διεξαγωγής της δοκιμασίας. Θα πρέπει να παρασκευάζονται οκτώ διαλύματα της ασθενώς δεσμευόμενης ουσίας σε DMSO και ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμασίας, με τις τελικές συγκεντρώσεις στις κοιλότητες δοκιμασίας ως ακολούθως: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6}, $10^{-6,5}$, 10^{-7}, $10^{-7,5}$, 10^{-8} και 10^{-9} M.

Μη δεσμευόμενη ουσία

29. Ως αρνητικός μάρτυρας (μη δεσμευόμενη ουσία) θα πρέπει να χρησιμοποιείται το οκτυλοτριαιθοξυσιλάνιο (OTES, CAS 2943-75-1). Έτσι εξασφαλίζεται ότι η δοκιμασία, όπως εκτελείται, μπορεί να ανιχνεύσει τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν δεσμεύονται στον hrERα. Θα πρέπει να παρασκευάζονται οκτώ διαλύματα της μη δεσμευόμενης ουσίας σε DMSO και ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμασίας, με τις τελικές συγκεντρώσεις στις κοιλότητες δοκιμασίας ως ακολούθως: 10^{-3},10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10} M. Ως εναλλακτική μη δεσμευόμενη ουσία μπορεί να χρησιμοποιηθεί το φθαλικό δι-n-βουτύλιο (DBP, CAS 84-72-2), αλλά μόνο σε συγκεντρώσεις έως 10^{-4} M. Η μέγιστη διαλυτότητα του DBP στη δοκιμασία έχει καταδειχθεί ότι είναι 10^{-4} M.

Συγκέντρωση hrERα

30. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται η ποσότητα υποδοχέα από την οποία προκύπτει ειδική δέσμευση 40±10 % (βλ. παραγράφους 12-13 του προσαρτήματος 3). Το διάλυμα hrERα θα πρέπει να παρασκευάζεται μέσω αραίωσης του λειτουργικού hrERα σε παγόψυχρο ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμασίας ακριβώς πριν τη χρήση.

[^{3}H]17β-οιστραδιόλη

31. Η τελική συγκέντρωση της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης στις κοιλότητες δοκιμασίας θα πρέπει να είναι 0,5 nM.

Υπό δοκιμή χημικές ουσίες

32. Καταρχάς, είναι απαραίτητο να διεξάγεται δοκιμή διαλυτότητας για τον προσδιορισμό του ορίου διαλυτότητας για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία και για τον προσδιορισμό του κατάλληλου εύρους συγκεντρώσεων προς χρήση κατά τη διεξαγωγή του πρωτοκόλλου δοκιμής. Το όριο διαλυτότητας κάθε υπό δοκιμή χημικής ουσίας πρέπει να προσδιορίζεται αρχικά στον διαλύτη και, στη συνέχεια, να επιβεβαιώνεται περαιτέρω υπό τις συνθήκες δοκιμασίας. Η υπό δοκιμή τελική συγκέντρωση στη δοκιμασία δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 1 mM. Οι δοκιμές προσδιορισμού εύρους περιλαμβάνουν μάρτυρα με διαλύτη και τουλάχιστον 8 λογαριθμικές, διαδοχικές αραιώσεις, που ξεκινούν από τη μέγιστη αποδεκτή συγκέντρωση (π.χ. 1 mM ή χαμηλότερη, με βάση το όριο διαλυτότητας), και καταγραφή της παρουσίας θολερότητας ή ιζήματος (βλ. επίσης παράγραφο 35 του προσαρτήματος 3). Αφού προσδιοριστεί το εύρος συγκεντρώσεων για τις δοκιμές, θα πρέπει να

▼M8

ελέγχεται υπό δοκιμή χημική ουσία με χρήση 8 λογαριθμικών συγκεντρώσεων διατεταγμένων σε κατάλληλα διαστήματα, όπως έχουν καθοριστεί στην προηγούμενη δοκιμή προσδιορισμού εύρους. Οι συγκεντρώσεις που ελέγχονται στο δεύτερο και το τρίτο πείραμα θα πρέπει να προσαρμόζονται περαιτέρω κατά περίπτωση, με σκοπό τη βελτίωση του χαρακτηρισμού της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης, εφόσον απαιτείται.

33. Οι αραιώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να παρασκευάζονται στον κατάλληλο διαλύτη (βλ. παράγραφο 25 του προσαρτήματος 3). Εάν η υψηλότερη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας δεν είναι διαλυτή ούτε σε DMSO ούτε σε αιθανόλη, και η προσθήκη περισσότερου διαλύτη θα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του διαλύτη στον τελικό σωλήνα πάνω από το αποδεκτό όριο, επιτρέπεται η μείωση της υψηλότερης συγκέντρωσης έως την επόμενη χαμηλότερη συγκέντρωση. Σε αυτή την περίπτωση, μπορεί να προστεθεί μία επιπλέον συγκέντρωση στο χαμηλό άκρο της σειράς συγκεντρώσεων. Οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις της σειράς θα πρέπει να παραμείνουν αμετάβλητες.

34. Τα διαλύματα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να παρακολουθούνται στενά όταν προστίθενται στην κοιλότητα δοκιμασίας, καθότι η υπό δοκιμή χημική ουσία μπορεί να σχηματίσει ίζημα κατά την προσθήκη της στην κοιλότητα δοκιμασίας. Τα δεδομένα για όλες τις κοιλότητες που περιέχουν ίζημα θα πρέπει να αποκλείονται από την προσαρμογή της καμπύλης, και θα πρέπει να καταγράφεται ο λόγος του αποκλεισμού τους.

35. Εάν υπάρχουν ήδη διαθέσιμες πληροφορίες από άλλες πηγές που παρέχουν τον λογάριθμο (IC_{50}) μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας, ίσως είναι σκόπιμο τα διαστήματα των αραιώσεων να διαμορφωθούν με γεωμετρικό τρόπο πιο κοντά γύρω από τον αναμενόμενο λογάριθμο (IC_{50}) (δηλ. 0,5 λογαριθμικές μονάδες). Τα τελικά αποτελέσματα θα πρέπει να εμφανίζουν επαρκή διασπορά συγκεντρώσεων εκατέρωθεν του λογάριθμου (IC_{50}), περιλαμβανομένης της μέγιστης και της ελάχιστης τιμής, κατά τρόπον ώστε να είναι εφικτός ο επαρκής χαρακτηρισμός της καμπύλης δέσμευσης.

Οργάνωση τρυβλίων δοκιμασίας

36. Θα πρέπει να προετοιμάζονται επισημασμένα τρυβλία μικροτιτλοδότησης για εξαπλές επωάσεις, για τον μάρτυρα με διαλύτη, την υψηλότερη συγκέντρωση του οιστρογόνου αναφοράς (E2) που χρησιμεύει επίσης ως δείκτης μη ειδικής δέσμευσης (NSB), και τον μάρτυρα με ρυθμιστικό διάλυμα, και για τριπλές επωάσεις για καθεμία από τις οκτώ συγκεντρώσεις του μάρτυρα μη δεσμευόμενης ουσίας (οκτυλοτριαιθοξυσιλάνιο), τις επτά χαμηλότερες συγκεντρώσεις για το οιστρογόνο αναφοράς (E2), τις οκτώ συγκεντρώσεις της ασθενώς δεσμευόμενης ουσίας (νορεθυνοδρέλη ή νορεθινδρόνη), και τις οκτώ συγκεντρώσεις κάθε υπό δοκιμή χημικής ουσίας (TC). Ένα παράδειγμα διαγράμματος διάταξης τρυβλίων για τις πλήρεις καμπύλες συγκέντρωσης που αφορούν το οιστρογόνο αναφοράς και τους μάρτυρες παρέχεται στον πίνακα 4 παρακάτω. Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες χρησιμοποιούνται πρόσθετα τρυβλία μικροτιτλοδότησης, τα οποία θα πρέπει να περιλαμβάνουν μάρτυρες τρυβλίων [δηλαδή i) μια υψηλή (μέγιστη εκτόπιση) και μία μέτρια (περίπου ίση με την IC_{50}) συγκέντρωση E2 και ασθενώς δεσμευόμενης ουσίας, εις τριπλούν, ii) μάρτυρα με διαλύτη (ως συνολική δέσμευση) και μη ειδική δέσμευση, καθένα εκ των οποίων σε έξι επαναλήψεις (πίνακας 5). Παράδειγμα φύλλου εργασίας διάταξης τρυβλίου μικροτιτλοδότησης δοκιμασίας ανταγωνιστικής δέσμευσης με χρήση τριών άγνωστων υπό δοκιμή χημικών ουσιών παρέχεται στο προσάρτημα 3.3. Οι συγκεντρώσεις που αναφέρονται στο φύλλο εργασίας καθώς και στους πίνακες 4 και 5 αφορούν τις τελικές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται σε κάθε κοιλότητα δοκιμασίας. Η μέγιστη συγκέντρωση για την E2 θα πρέπει να είναι 1×10^{-7} M, ενώ όσον αφορά την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία θα πρέπει να χρησιμοποιείται η υψηλότερη συγκέντρωση που χρησιμοποιείται για την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία στο τρυβλίο 1. Η συγκέντρωση IC_{50} θα πρέπει να καθορίζεται από το εργαστήριο βάσει της βάσης ιστορικών δεδομένων για τους μάρτυρες. Η τιμή αναμένεται να είναι παρεμφερής με την τιμή που παρατηρήθηκε στις μελέτες επικύρωσης (βλ. πίνακα 1).

▼**M8**

Πίνακας 4

Διάταξη τρυβλίου μικροτιτλοδότησης δοκιμασίας ανταγωνιστικής δέσμευσης [1] [2]**, πλήρεις καμπύλες συγκέντρωσης για το οιστρογόνο αναφοράς και τους μάρτυρες (τρυβλίο 1)**

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
	Μάρτυρας με ρυθμιστικό διάλυμα και θετικός μάρτυρας (E2)			Ασθενώς θετική (Νορεθυνοδρέλη)			Αρνητικός μάρτυρας (OTES)			TB και NSB		
A	Τυφλό (*)			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			TB (μάρτυρας με διαλύτη) (2,05 % DMSO)		
B	E2 (1×10^{-11} M)			1×10^{-8} M			1×10^{-9} M					
Γ	E2 (1×10^{-10} M)			$1\times10^{-7,5}$ M			1×10^{-8} M			NSB (10^{-6} M E2)		
Δ	E2 ($1\times10^{-9,5}$ M)			1×10^{-7} M			1×10^{-7} M					
E	E2 (1×10^{-9} M)			$1\times10^{-6,5}$ M			1×10^{-6} M			Μάρτυρας με ρυθμιστικό διάλυμα		
ΣΤ	E2 ($1\times10^{-8,5}$ M)			1×10^{-6} M			1×10^{-5} M					
Z	E2 (1×10^{-8} M)			$1\times10^{-5,5}$ M			1×10^{-4} M			Τυφλό (για ραδιοσήμανση) (**)		
H	E2 (1×10^{-7} M)			$1\times10^{-4,5}$ M			1×10^{-3} M					

([1]) Παράδειγμα διάταξης για το τρυβλίο μικροτιτλοδότησης προτύπων που πρέπει να χρησιμοποιείται με κάθε πείραμα.
([2]) Επισημαίνεται ότι αυτό το τρυβλίο μικροτιτλοδότησης διαμορφώνεται με χρήση των αραιώσεων που δημιουργούνται στο τρυβλίο αραίωσης που περιγράφεται για τα πρότυπα στις προηγούμενες ενότητες.
Στο παράδειγμα, η ασθενώς δεσμευόμενη ουσία είναι η νορεθυνοδρέλη (NE)
(*) πραγματικό τυφλό, μη χρησιμοποιούμενη κοιλότητα
(**) τυφλό, δεν χρησιμοποιείται κατά την επώαση, αλλά χρησιμοποιείται για την επιβεβαίωση της συνολικής προστιθέμενης ραδιενέργειας.

Πίνακας 5

Διάταξη τρυβλίου μικροτιτλοδότησης δοκιμασίας ανταγωνιστικής δέσμευσης, πρόσθετα τρυβλία για υπό δοκιμή χημικές (TC) και μάρτυρες τρυβλίου

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Υπό δοκιμή χημική ουσία 1 (TC-1)			Υπό δοκιμή χημική ουσία 2 (TC-2)			Υπό δοκιμή χημική ουσία 3 (TC-3)			Μάρτυρες		
A	TC-1 (1×10^{-10} M)			TC-2 (1×10^{-10} M)			TC-3 (1×10^{-10} M)			E2 (1×10^{-7}M)		
B	TC-1 (1×10^{-9} M)			TC-2 (1×10^{-9} M)			TC-3 (1×10^{-9} M)			E_2 (IC_{50})		
Γ	TC-1 (1×10^{-8} M)			TC-2 (1×10^{-8} M)			TC-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1\times10_{-4,5}$M)		
Δ	TC-1 (1×10^{-7} M)			TC-2 (1×10^{-7} M)			TC-3 (1×10^{-7} M)			NE (IC_{50})		
E	TC-1 (1×10^{-6} M)			TC-2 (1×10^{-6} M)			TC-3 (1×10^{-6} M)			NSB (10^{-6} M E2)		
ΣΤ	TC-1 (1×10^{-5} M)			TC-2 (1×10^{-5} M)			TC-3 (1×10^{-5} M)					
Z	TC-1 (1×10^{-4} M)			TC-2 (1×10^{-4} M)			TC-3 (1×10^{-4} M)			TB (μάρτυρας με διαλύτη)		
H	TC-1 (1×10^{-3} M)			TC-2 (1×10^{-3} M)			TC-3 (1×10^{-3} M)					

Στο παράδειγμα, η ασθενώς δεσμευόμενη ουσία είναι η νορεθυνοδρέλη (NE)

▼M8

Ολοκλήρωση της δοκιμασίας ανταγωνιστικής δέσμευσης

37. Με εξαίρεση τις κοιλότητες για τη συνολική δέσμευση και τα τυφλά (για ραδιοσήμανση), όπως φαίνεται στον πίνακα 6, θα πρέπει να τοποθετούνται 50 μl του ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας σε κάθε κοιλότητα και θα πρέπει να αναμιγνύονται με 10 μl του μάρτυρα με διαλύτη, του οιστρογόνου αναφοράς (E2), της ασθενώς δεσμευόμενης ουσίας, της μη δεσμευόμενης ουσίας και των υπό δοκιμή χημικών ουσιών, αντίστοιχα, και 10 μl διαλύματος [^{3}H]17β-οιστραδιόλης 5 nM. Στη συνέχεια, σε κάθε τρυβλίο προστίθενται και αναμιγνύονται ήπια 30 μl παγόψυχρου διαλύματος υποδοχέα. Το διάλυμα hrERα θα πρέπει να είναι το τελευταίο αντιδραστήριο που προστίθεται. Τα τρυβλία μικροτιτλοδότησης δοκιμασίας θα πρέπει να επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου (22° έως 28°C) επί 2 ώρες.

Πίνακας 6

Όγκος στοιχείων δοκιμασίας για τη δοκιμασία ανταγωνιστικής δέσμευσης hrER, τρυβλία μικροτιτλοδότησης

Στάδια παρασκευής		Άλλες κοιλότητες εκτός των κοιλοτήτων ΤΒ	Κοιλότητες ΤΒ	Τυφλό (για ραδιοσήμανση)
Όγκος στοιχείων για τις παραπάνω κοιλότητες αντίδρασης και σειρά προσθήκης	Ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμασίας σε θερμοκρασία δωματίου	50 μl	60 μl	90 μl
	Μη ραδιοσημασμένη E2, ασθενώς δεσμευόμενη ουσία, μη δεσμευόμενη ουσία, διαλύτης και υπό δοκιμή χημικές ουσίες (*)	10 μl	—	—
	[3H]17β-οιστραδιόλη ώστε να προκύπτει τελική συγκέντρωση 0,5 nM (δηλ. 5 nM)	10 μl	10 μl	10 μl
	συγκέντρωση hrERα όπως καθορίστηκε (βλ. παραγράφους 12-13)	30 μl	30 μl	—
Συνολικός όγκος σε κάθε κοιλότητα δοκιμασίας		100 μl	100 μl	100 μl

(*) κατάλληλα παρασκευασμένα για επίτευξη τελικής συγκέντρωσης εντός της αποδεκτής συγκέντρωσης διαλύτη

38. Στη συνέχεια, θα πρέπει να πραγματοποιείται ποσοτικός προσδιορισμός της δεσμευμένης στον hrERα [^{3}H]17β-οιστραδιόλης, μετά τον διαχωρισμό της δεσμευμένης στον hrERα [^{3}H]17β-οιστραδιόλης από την ελεύθερη [^{3}H]17β-οιστραδιόλη, διά της προσθήκης 100 μl παγόψυχρου εναιωρήματος DCC σε κάθε κοιλότητα, όπως περιγράφεται στις παραγράφους 21-23 του προσαρτήματος 3 για τη δοκιμασία δέσμευσης κορεσμού.

39. Οι κοιλότητες G10-12 και H10-12 [που προσδιορίζονται ως «τυφλό (για ραδιοσήμανση)» στον πίνακα 4] αντιπροσωπεύουν τις dpm της [^{3}H]-ραδιοσημασμένης οιστραδιόλης σε 10 μl. Η ποσότητα των 10 μl θα πρέπει να προστίθεται απευθείας στο υγρό σπινθηρισμού.

Κριτήρια αποδοχής

Δοκιμασία δέσμευσης κορεσμού

40. Η καμπύλη ειδικής δέσμευσης θα πρέπει να φθάνει σε ένα πλατώ όταν χρησιμοποιούνται αυξανόμενες συγκεντρώσεις [^{3}H]17β-οιστραδιόλης, γεγονός που υποδεικνύει τον κορεσμό του hrERα με το πρόσδεμα.

41. Η ειδική δέσμευση σε 0,5 nM [^{3}H]17β-οιστραδιόλης θα πρέπει να βρίσκεται εντός του αποδεκτού φάσματος 30 % έως 50 % της μέσης μετρηθείσας συνολικής ραδιενέργειας που προστέθηκε στη διάρκεια των σειρών δοκιμών. Περιστασιακές ελαφρές αποκλίσεις εκτός του εν λόγω φάσματος είναι αποδεκτές, αλλά εάν οι σειρές δοκιμών βρίσκονται μονίμως εκτός του φάσματος ή μια συγκεκριμένη σειρά δοκιμών βρίσκεται αρκετά έξω από αυτό, η συγκέντρωση πρωτεΐνης θα πρέπει να προσαρμοστεί και η δοκιμασία κορεσμού να επαναληφθεί.

▼**M8**

42. Από τα δεδομένα θα πρέπει να προκύπτει γραμμικό διάγραμμα Scatchard.

43. Η μη ειδική δέσμευση δεν θα πρέπει να είναι υπέρμετρη. Η τιμή της μη ειδικής δέσμευσης θα πρέπει να αντιστοιχεί κατά κανόνα σε <35 % της συνολικής δέσμευσης. Ωστόσο, ο λόγος μπορεί περιστασιακά να υπερβαίνει το εν λόγω όριο, όταν μετρώνται ιδιαίτερα χαμηλές dpm για τη χαμηλότερη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης.

Δοκιμασία ανταγωνιστικής δέσμευσης

44. Οι αυξανόμενες συγκεντρώσεις μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης θα πρέπει να εκτοπίζουν την [^{3}H]17β-οιστραδιόλη από τον υποδοχέα κατά τρόπο που συνάδει με ανταγωνιστική δέσμευση μίας θέσης.

45. Η τιμή IC_{50} για το οιστρογόνο αναφοράς (δηλ. την 17β-οιστραδιόλη) θα πρέπει να είναι κατά προσέγγιση ίση με τη γραμμομοριακή συγκέντρωση της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης συν την Kd που προσδιορίζεται από τη δοκιμασία δέσμευσης κορεσμού.

46. Η συνολική ειδική δέσμευση θα πρέπει να εμπίπτει σταθερά εντός του αποδεκτού φάσματος 40 ± 10 % όταν η μέση μετρηθείσα συγκέντρωση συνολικής ραδιενέργειας που προστέθηκε σε κάθε κοιλότητα ήταν 0,5 nM στη διάρκεια όλων των σειρών δοκιμών. Περιστασιακές ελαφρές αποκλίσεις εκτός του εν λόγω φάσματος είναι αποδεκτές, αλλά εάν οι σειρές δοκιμών βρίσκονται μονίμως εκτός του φάσματος ή μια συγκεκριμένη σειρά δοκιμών βρίσκεται αρκετά έξω από αυτό, η συγκέντρωση πρωτεΐνης θα πρέπει να προσαρμοστεί.

47. Ο διαλύτης δεν θα πρέπει να αλλοιώνει την ευαισθησία ή την αναπαραγωγιμότητα της δοκιμασίας. Τα αποτελέσματα του μάρτυρα με διαλύτη (κοιλότητες TB) συγκρίνονται με τον μάρτυρα με ρυθμιστικό διάλυμα προκειμένου να επαληθευτεί ότι ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης δεν επηρεάζει το σύστημα δοκιμασίας. Τα αποτελέσματα της συνολικής δέσμευσης (TB) και του μάρτυρα με ρυθμιστικό διάλυμα θα πρέπει να είναι συγκρίσιμα, εάν δεν υπάρχει επίδραση του διαλύτη στη δοκιμασία.

48. Η μη δεσμευόμενη ουσία δεν θα πρέπει να εκτοπίζει ποσοστό άνω του 25 % της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης από τον hrERα, όταν ελέγχεται σε συγκέντρωση έως 10^{-3} M (OTES) ή 10^{-4} M (DBP).

49. Για το οιστρογόνο αναφοράς και δύο ασθενώς δεσμευόμενες ουσίες (π.χ. νορεθυνοδρέλη, νορεθινδρόνη) αναπτύχθηκαν κριτήρια επιδόσεων με χρήση δεδομένων από τη μελέτη επικύρωσης της δοκιμασίας δέσμευσης hrER CERI (παράρτημα N της παραπομπής 2). Παρέχονται διαστήματα εμπιστοσύνης 95 % για τη μέση τιμή +/- SD (n) για όλες τις σειρές δοκιμών μάρτυρα στα τέσσερα εργαστήρια που συμμετείχαν στη μελέτη επικύρωσης. Υπολογίστηκαν διαστήματα εμπιστοσύνης 95 % για τις παραμέτρους προσαρμογής της καμπύλης (δηλ. μέγιστη τιμή, ελάχιστη τιμή, κλίση Hill και $logIC_{50}$) για το οιστρογόνο αναφοράς και τις ασθενώς δεσμευόμενες ουσίες, και για το log_{10}RBA των ασθενώς δεσμευόμενων ουσιών σε σχέση με το οιστρογόνο αναφοράς. Στον πίνακα 1 φαίνονται οι αναμενόμενες κλίμακες τιμών για τις παραμέτρους προσαρμογής της καμπύλης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως κριτήρια επιδόσεων. Στην πράξη, η κλίμακα τιμών της IC_{50} μπορεί να ποικίλλει ελαφρώς με βάση την Kd του σκευάσματος υποδοχέα που προκύπτει πειραματικά και τη συγκέντρωση προσδέματος που χρησιμοποιήθηκε για τη δοκιμασία.

50. Δεν αναπτύχθηκαν κριτήρια επιδόσεων για τις παραμέτρους προσαρμογής της καμπύλης για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες λόγω του ευρέος φάσματος των πιθανών υπό δοκιμή χημικών ουσιών και του φάσματος δυνητικών συγγενειών και εκβάσεων (π.χ. πλήρης καμπύλη, μερική καμπύλη, καμία προσαρμογή καμπύλης). Ωστόσο, η εξέταση των αποτελεσμάτων από κάθε σειρά δοκιμών για μια υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να πραγματοποιείται με βάση την επαγγελματική κρίση. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται

▼M8

επαρκές εύρος συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ώστε να προσδιορίζεται με σαφήνεια η μέγιστη τιμή (π.χ. 90 - 100 % δέσμευσης) της καμπύλης ανταγωνιστικής δέσμευσης. Η μεταβλητότητα μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων σε κάθε συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας καθώς και μεταξύ των 3 μη παράλληλων σειρών δοκιμών θα πρέπει να είναι εντός εύλογων ορίων και να τεκμηριώνεται επιστημονικά. Οι μάρτυρες από κάθε σειρά δοκιμών για μια υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να προσεγγίζουν τα μέτρα επιδόσεων που αναφέρονται για τη συγκεκριμένη δοκιμασία CERI και πρέπει να είναι σύμφωνοι με τα ιστορικά δεδομένα για τους μάρτυρες από το συγκεκριμένο εργαστήριο.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Δοκιμασία δέσμευσης κορεσμού

51. Μετράται τόσο η συνολική όσο και η μη ειδική δέσμευση. Από τις τιμές αυτές υπολογίζεται η ειδική δέσμευση αυξανόμενων συγκεντρώσεων [^{3}H]17β-οιστραδιόλης υπό συνθήκες ισορροπίας, με αφαίρεση της μη ειδικής δέσμευσης από τη συνολική δέσμευση. Ένα διάγραμμα της ειδικής δέσμευσης έναντι της συγκέντρωσης [^{3}H]17β-οιστραδιόλης αναμένεται ότι θα φθάνει σε πλατώ όσον αφορά τη μέγιστη ειδική δέσμευση, το οποίο υποδεικνύει τον κορεσμό του hrERα με την [^{3}H]17β-οιστραδιόλη. Επιπλέον, η ανάλυση των δεδομένων θα πρέπει να τεκμηριώνει τη δέσμευση της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης σε μία μοναδική θέση δέσμευσης υψηλής συγγένειας. Η μη ειδική, η συνολική και η ειδική δέσμευση θα πρέπει να παρουσιάζονται σε καμπύλη δέσμευσης κορεσμού. Στο πλαίσιο περαιτέρω ανάλυσης των εν λόγω δεδομένων θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί ανάλυση μη γραμμικής παλινδρόμησης (π.χ. BioSoft, McPherson, 1985, Motulsky, 1995), με τελική παρουσίαση των δεδομένων υπό μορφή ανάλυσης Scatchard.

52. Η ανάλυση δεδομένων θα πρέπει να προσδιορίζει τις Bmax και Kd αποκλειστικά από τα δεδομένα συνολικής δέσμευσης, βάσει της παραδοχής ότι η μη ειδική δέσμευση είναι γραμμική, εκτός εάν αιτιολογείται η χρήση διαφορετικής μεθόδου. Επιπλέον, κατά τον προσδιορισμό της βέλτιστης προσαρμογής, θα πρέπει να χρησιμοποιείται ανάλυση εύρωστης παλινδρόμησης, εκτός εάν παρέχονται οι λόγοι για τη μη χρήση της. Θα πρέπει να αναφέρεται η επιλεγμένη μέθοδος για την εύρωστη παλινδρόμηση. Κατά τον προσδιορισμό των Bmax και Kd από δεδομένα δέσμευσης κορεσμού, θα πρέπει να εφαρμόζεται διόρθωση ως προς την εξάντληση του προσδέματος (π.χ. με χρήση της μεθόδου Swillens 1995).

Δοκιμασία ανταγωνιστικής δέσμευσης

53. Η καμπύλη ανταγωνιστικής δέσμευσης χαράσσεται ως ειδική δέσμευση [^{3}H]17β-οιστραδιόλης έναντι της συγκέντρωσης (μονάδες log10) του ανταγωνιστή. Η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που αναστέλλει το 50 % της μέγιστης ειδικής δέσμευσης [^{3}H]17β-οιστραδιόλης είναι η τιμή IC_{50}.

54. Οι εκτιμήσεις των τιμών λογάριθμου (IC_{50}) για τους θετικούς μάρτυρες (οιστρογόνο αναφοράς και ασθενώς δεσμευόμενη ουσία) θα πρέπει να προσδιορίζονται με χρήση λογισμικού μη γραμμικής προσαρμογής καμπύλης κατάλληλου για την προσαρμογή εξίσωσης Hill τεσσάρων παραμέτρων (π.χ. BioSoft, McPherson, 1985, Motulsky, 1995). Κατά την προσαρμογή των εν λόγω καμπυλών, η μέγιστη τιμή, η ελάχιστη τιμή, η κλίση και ο λογάριθμος (IC_{50}) θα πρέπει, γενικά, να μην περιορίζονται. Κατά τον προσδιορισμό της βέλτιστης προσαρμογής, θα πρέπει να χρησιμοποιείται ανάλυση εύρωστης παλινδρόμησης, εκτός εάν παρέχονται οι λόγοι για τη μη χρήση της. Δεν θα πρέπει να εφαρμόζεται διόρθωση ως προς την εξάντληση του προσδέματος. Μετά την αρχική ανάλυση, κάθε καμπύλη δέσμευσης θα πρέπει να ελέγχεται ώστε να διασφαλίζεται η κατάλληλη προσαρμογή στο μοντέλο. Η σχετική συγγένεια δέσμευσης (RBA) για την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία θα πρέπει να υπολογίζεται ως ποσοστό του λογάριθμου (IC_{50}) για την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία σε σχέση με τον λογάριθμο (IC_{50}) για τη 17β-οιστραδιόλη. Τα αποτελέσματα από τους θετικούς μάρτυρες και τον μάρτυρα μη δεσμευόμενης ουσίας θα πρέπει να αξιολογούνται με χρήση των μέτρων των επιδόσεων δοκιμασίας των παραγράφων 44-49 του παρόντος προσαρτήματος 3.

▼**M8**

55. Τα δεδομένα για το σύνολο των υπό δοκιμή χημικών ουσιών θα πρέπει να αναλύονται με χρήση κλιμακωτής προσέγγισης ώστε να διασφαλίζεται η ορθή ανάλυσή τους και η σωστή ταξινόμηση κάθε καμπύλης ανταγωνιστικής δέσμευσης. Συνιστάται κάθε σειρά δοκιμών για υπό δοκιμή χημική ουσία να υποβάλλεται αρχικά σε τυποποιημένη ανάλυση δεδομένων πανομοιότυπη με την ανάλυση που χρησιμοποιείται για το οιστρογόνο αναφοράς και την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία (βλ. παράγραφο 54 του παρόντος προσαρτήματος 3). Μετά την αρχική ανάλυση, θα πρέπει να γίνεται τεχνική επανεξέταση των παραμέτρων προσαρμογής της καμπύλης και να εξετάζεται οπτικά η ποιότητα της προσαρμογής των δεδομένων δέσμευσης στην προκύπτουσα καμπύλη ανταγωνιστικής δέσμευσης για κάθε σειρά δοκιμών. Εάν, κατά την τεχνική επανεξέταση, παρατηρηθεί εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση μείωση του ποσοστού της ειδικά δεσμευμένης [^{3}H]17β-οιστραδιόλης, χαμηλή μεταβλητότητα μεταξύ των τεχνικών πανομοιότυπων δειγμάτων σε κάθε συγκέντρωση υπό δοκιμή χημικής ουσίας, και συμφωνία των παραμέτρων προσαρμογής μεταξύ των τριών σειρών δοκιμών, αυτό αποτελεί ουσιαστική ένδειξη ότι η δοκιμασία και οι αναλύσεις δεδομένων διεξήχθησαν ορθά.

Ερμηνεία των δεδομένων

56. Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής, μια υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται δεσμευόμενη στον hrERα εάν είναι εφικτή η προσαρμογή μιας καμπύλης δέσμευσης και το χαμηλότερο σημείο της καμπύλης απόκρισης εντός της κλίμακας των δεδομένων είναι χαμηλότερο από 50 % (σχήμα 1).

57. Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής, μια υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται μη δεσμευόμενη στον hrERα εάν:

— είναι εφικτή η προσαρμογή μιας καμπύλης δέσμευσης και το χαμηλότερο σημείο της προσαρμοσμένης καμπύλης απόκρισης εντός της κλίμακας των δεδομένων υπερβαίνει το 75 %, ή

— δεν είναι εφικτή η προσαρμογή καμπύλης δέσμευσης και το χαμηλότερο μη εξομαλυμένο μέσο εκατοστιαίο ποσοστό δέσμευσης μεταξύ των ομάδων συγκέντρωσης στα δεδομένα υπερβαίνει το 75 %.

58. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες θεωρούνται αμφίβολες εάν δεν πληρούται καμία από τις ανωτέρω προϋποθέσεις (π.χ. το χαμηλότερο σημείο της προσαρμοσμένης καμπύλης απόκρισης βρίσκεται μεταξύ 76 και 51 %).

Πίνακας 7

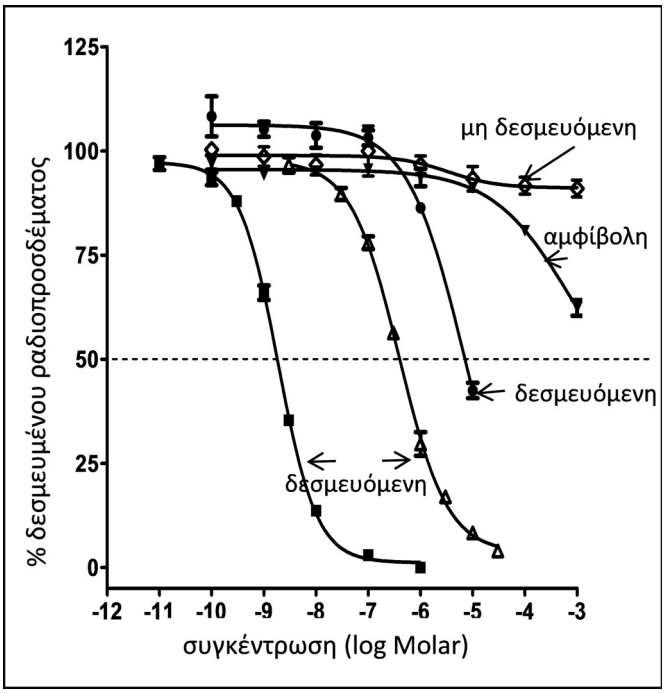
Κριτήρια ταξινόμησης βάσει της καμπύλης ανταγωνιστικής δέσμευσης για υπό δοκιμή χημική ουσία

Ταξινόμηση	Κριτήρια
Δεσμευόμενη[α]	Είναι εφικτή η προσαρμογή καμπύλης δέσμευσης. Το **χαμηλότερο σημείο της καμπύλης απόκρισης εντός της κλίμακας των δεδομένων είναι χαμηλότερο από 50 %.**
Μη δεσμευόμενη[β]	Εάν είναι εφικτή η προσαρμογή καμπύλης δέσμευσης, το **χαμηλότερο σημείο της προσαρμοσμένης καμπύλης απόκρισης εντός της κλίμακας των δεδομένων υπερβαίνει το 75 %**. Εάν δεν είναι εφικτή η προσαρμογή καμπύλης δέσμευσης, το **χαμηλότερο μη εξομαλυμένο εκατοστιαίο ποσοστό δέσμευσης μεταξύ των ομάδων συγκέντρωσης στα δεδομένα υπερβαίνει το 75 %.**
Αμφίβολη[γ]	Οποιαδήποτε ελέγξιμη σειρά δοκιμών η οποία δεν αντιστοιχεί ούτε σε δεσμευόμενη ούτε σε μη δεσμευόμενη ουσία (π.χ. το χαμηλότερο σημείο της προσαρμοσμένης καμπύλης απόκρισης βρίσκεται μεταξύ 76 – 51 %).

▼**M8**

Σχήμα 1

Παραδείγματα ταξινόμησης υπό δοκιμή χημικής ουσίας με χρήση καμπύλης ανταγωνιστικής δέσμευσης



59. Πολλές σειρές δοκιμών που διεξάγονται σε ένα εργαστήριο για υπό δοκιμή χημική ουσία συνδυάζονται διά της απόδοσης αριθμητικών τιμών σε κάθε σειρά δοκιμών και διά της εξαγωγής του μέσου όρου των σειρών δοκιμών, όπως φαίνεται στον πίνακα 8. Τα αποτελέσματα των συνδυασμένων σειρών δοκιμών σε κάθε εργαστήριο συγκρίνονται με την αναμενόμενη ταξινόμηση για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία.

Πίνακας 8

Μέθοδος ταξινόμησης υπό δοκιμή χημικής ουσίας με χρήση πολλών σειρών δοκιμών σε ένα εργαστήριο

Για την απόδοση τιμής σε κάθε σειρά δοκιμών:

Ταξινόμηση	**Αριθμητική τιμή**
Δεσμευόμενη	2
Αμφίβολη	1
Μη δεσμευόμενη	0

Για την ταξινόμηση του μέσου όρου αριθμητικών τιμών στις σειρές δοκιμών:

Ταξινόμηση	**Αριθμητική τιμή**
Δεσμευόμενη	Μέσος όρος ≥ 1,5
Αμφίβολη	0,5 ≤ μέσος όρος < 1,5
Μη δεσμευόμενη	Μέσος όρος < 0,5

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

60. Βλ. παράγραφο 24 της ενότητας «ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ hrER» της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

▼**M8**

Προσάρτημα 3.1

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΟΡΩΝ

[^{3}H]E2: 17β-οιστραδιόλη ραδιοσημασμένη με τρίτιο

DCC: επιχρισμένος με δεξτράνη ενεργός άνθρακας

E_2: μη ραδιοσημασμένη 17β-οιστραδιόλη (αδρανής)

Ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμασίας: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, με 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM $NaVO_3$, 10 % γλυκερόλη, 0,2 mM λευπεπτίνης, 1 mM διθειοθρεϊτόλης και 10 mg/ml αλβουμίνης βόειου ορού

hrERα: ανασυνδυασμένος ανθρώπινος υποδοχέας οιστρογόνων α (περιοχή δέσμευσης προσδέματος)

Πανομοιότυπο δείγμα: μία από πολλές κοιλότητες με το ίδιο περιεχόμενο στις ίδιες συγκεντρώσεις, οι οποίες υποβάλλονται ταυτόχρονα σε δοκιμή στο πλαίσιο μεμονωμένης σειράς δοκιμών. Στο παρόν πρωτόκολλο, κάθε συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας υποβάλλεται σε δοκιμή εις τριπλούν· δηλαδή υπάρχουν τρία πανομοιότυπα δείγματα που υποβάλλονται ταυτόχρονα σε δοκιμή για κάθε συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Σειρά δοκιμών: πλήρης σειρά ταυτόχρονα εξεταζόμενων κοιλοτήτων δοκιμασίας τρυβλίων μικροτιτλοδότησης, που παρέχει όλες τις πληροφορίες που είναι απαραίτητες για τον χαρακτηρισμό της δέσμευσης μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον hrERα (δηλαδή συνολική [^{3}H]17β-οιστραδιόλη που προστίθεται στην κοιλότητα δοκιμασίας, μέγιστη δέσμευση [^{3}H]17β-οιστραδιόλης στον hrERα, μη ειδική δέσμευση, και συνολική δέσμευση σε διάφορες συγκεντρώσεις υπό δοκιμή χημικής ουσίας). Μια σειρά δοκιμών μπορεί να περιλαμβάνει ακόμη και μία μόνο κοιλότητα δοκιμασίας (πανομοιότυπο δείγμα) ανά συγκέντρωση αλλά, δεδομένου ότι στο παρόν πρωτόκολλο απαιτείται η διεξαγωγή της δοκιμασίας εις τριπλούν, μία σειρά δοκιμών περιλαμβάνει τρεις κοιλότητες δοκιμασίας ανά συγκέντρωση. Επιπλέον, στο παρόν πρωτόκολλο απαιτούνται τρεις ανεξάρτητες (δηλ. μη παράλληλες) σειρές δοκιμών ανά χημική ουσία.

▼**M8**

Προσάρτημα 3.2

ΔΙΑΤΑΞΗ ΚΟΙΛΟΤΗΤΩΝ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ

Τρυβλίο	**Θέση**	**Πανομοιότυπο δείγμα**	**Τύπος κοιλότητας**	**Κωδικός κοιλότητας**	**Κωδικός συγκέντρωσης**	**Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)**	**Αποθεματικό διάλυμα hrER (ml)**	**Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)**	**Όγκος υγιηθέτη (σημασμένης E2) (μL)**	**Όγκος από το τρυβλίο αραίωσης (μL)**	**Τελικός όγκος (μl)**	**Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)**
S	A1	1	Τυφλό	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	Τυφλό	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	Τυφλό	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B2	2	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B3	3	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	C1	1	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C2	2	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C3	3	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	D1	1	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D2	2	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D3	3	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	E1	1	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E2	2	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E3	3	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	F1	1	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F2	2	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F3	3	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	G1	1	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08

▼**M8**

Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κυττάρου	Κωδικός κυττάρου	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (ml)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (µl)	Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (µL)	Όγκος από το τρυβλίο φράγματος (µL)	Τελικός όγκος (µl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
S	G2	2	μη ραδιοση-μασμένη E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G3	3	μη ραδιοση-μασμένη E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	H1	1	μη ραδιοση-μασμένο E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H2	2	μη ραδιοση-μασμένη E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H3	3	μη ραδιοση-μασμένη E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	A4	1	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A5	2	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A6	3	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B4	1	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B5	2	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B6	3	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C4	1	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP3	3.16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C5	2	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C6	3	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	D4	1	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D5	2	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D6	3	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E4	1	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E5	2	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E6	3	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07

▼**M8**

Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (ml)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)	Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (μL)	Όγκος από το τρυβλίο φράισμης (μL)	Τελικός όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
S	F4	1	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F5	2	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F6	3	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	G4	1	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G5	2	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G6	3	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	H4	1	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H5	2	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H6	3	νορεθυνο-δρέλη	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	A7	1	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	A8	2	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	A9	3	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	B7	1	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B8	2	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B9	3	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	C7	1	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C8	2	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C9	3	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	D7	1	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D8	2	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D9	3	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E7	1	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E8	2	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E9	3	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

▼**M8**

Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (ml)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)	Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (μL)	Όγκος από το τρυβλίο φράγματος (μL)	Τελικός όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
S	F7	1	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	G7	1	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	G8	2	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	G9	3	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	H7	1	OTES	N	OTES8-DBP7	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	H8	2	OTES	N	OTES88	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	H9	3	OTES	N	OTES8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	A10	1	συνολική δέσμευση	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
S	A11	2	συνολική δέσμευση	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
S	A12	3	συνολική δέσμευση	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
S	B10	4	συνολική δέσμευση	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—
S	B11	5	συνολική δέσμευση	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
S	B12	6	συνολική δέσμευση	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—
S	C10	1	μη ραδιοση-μασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C11	2	μη ραδιοση-μασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C12	3	μη ραδιοση-μασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D10	4	μη ραδιοση-μασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D11	5	μη ραδιοση-μασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

▼**M8**

Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (ml)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)	Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (μL)	Όγκος από το τρυβλίο αραίωσης (μL)	Τελικός όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
S	D12	6	μη ραδιοσημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E10	1	Μάρτυρας με ρυθμιστικό διάλυμα	BC	BC1	—	—	100	—	—	100	—
S	E11	2	Μάρτυρας με ρυθμιστικό διάλυμα	BC	BC2	—	—	100	—	—	100	—
S	E12	3	Μάρτυρας με ρυθμιστικό διάλυμα	BC	BC3	—	—	100	—	—	100	—
S	F10	4	Μάρτυρας με ρυθμιστικό διάλυμα	BC	BC4	—	—	100	—	—	100	—
S	F11	5	Μάρτυρας με ρυθμιστικό διάλυμα	BC	BC5	—	—	100	—	—	100	—
S	F12	6	Μάρτυρας με ρυθμιστικό διάλυμα	BC	BC6	—	—	100	—	—	100	—
S	G10 (*)	1	Τυφλό (για ραδιοσήμανση)	Ραδιοσημασμένο	H1	—	90	—	10	—	100	—
S	G11 (*)	2	Τυφλό (για ραδιοσήμανση)	Ραδιοσημασμένο	H2	—	90	—	10	—	100	—
S	G12 (*)	3	Τυφλό (για ραδιοσήμανση)	Ραδιοσημασμένο	H3	—	90	—	10	—	100	—
S	H10 (*)	4	Τυφλό (για ραδιοσήμανση)	Ραδιοσημασμένο	H4	—	90	—	10	—	100	—

▼**M8**

Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (ml)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)	Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (μL)	Όγκος από το τρυβλίο αραίωσης (μL)	Τελικός όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
S	H11 (*)	5	Τυφλό (για ραδιοσήμανση)	Ραδιοσημασμένο	H5	—	90	—	10	—	100	—
S	H12	6	Τυφλό (για ραδιοσήμανση)	Ραδιοσημασμένο	H6	—	90	—	10	—	100	—
P1	A1	1	Άγνωστο 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A2	2	Άγνωστο 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A3	3	Άγνωστο 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B1	1	Άγνωστο 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B2	2	Άγνωστο 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B3	3	Άγνωστο 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C1	1	Άγνωστο 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C2	2	Άγνωστο 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C3	3	Άγνωστο 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D1	1	Άγνωστο 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D2	2	Άγνωστο 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D3	3	Άγνωστο 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E1	1	Άγνωστο 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E2	2	Άγνωστο 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E3	3	Άγνωστο 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F1	1	Άγνωστο 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F2	2	Άγνωστο 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F3	3	Άγνωστο 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G1	1	Άγνωστο 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G2	2	Άγνωστο 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G3	3	Άγνωστο 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H1	1	Άγνωστο 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H2	2	Άγνωστο 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03

▼**M8**

Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (ml)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)	Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (μL)	Όγκος από το τρυβλίο αφύτωσης (μL)	Τελικός όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
P1	H3	3	Άγνωστο 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A4	1	Άγνωστο 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A5	2	Άγνωστο 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A6	3	Άγνωστο 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B4	1	Άγνωστο 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B5	2	Άγνωστο 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B6	3	Άγνωστο 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C4	1	Άγνωστο 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C5	2	Άγνωστο 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C6	3	Άγνωστο 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D4	1	Άγνωστο 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D5	2	Άγνωστο 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D6	3	Άγνωστο 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E4	1	Άγνωστο 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E5	2	Άγνωστο 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E6	3	Άγνωστο 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F4	1	Άγνωστο 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F5	2	Άγνωστο 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F6	3	Άγνωστο 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G4	1	Άγνωστο 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G5	2	Άγνωστο 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G6	3	Άγνωστο 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H4	1	Άγνωστο 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H5	2	Άγνωστο 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H6	3	Άγνωστο 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A7	1	Άγνωστο 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A8	2	Άγνωστο 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10

▼**M8**

Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (ml)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (µl)	Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (µL)	Όγκος από το τρυβλίο φράγματος (µL)	Τελικός όγκος (µl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
P1	A9	3	Άγνωστο 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B7	1	Άγνωστο 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B8	2	Άγνωστο 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B9	3	Άγνωστο 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C7	1	Άγνωστο 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C8	2	Άγνωστο 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C9	3	Άγνωστο 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D7	1	Άγνωστο 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D8	2	Άγνωστο 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D9	3	Άγνωστο 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E7	1	Άγνωστο 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E8	2	Άγνωστο 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E9	3	Άγνωστο 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F7	1	Άγνωστο 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F8	2	Άγνωστο 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F9	3	Άγνωστο 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G7	1	Άγνωστο 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G8	2	Άγνωστο 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G9	3	Άγνωστο 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H7	1	Άγνωστο 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H8	2	Άγνωστο 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H9	3	Άγνωστο 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A10	1	Μάρτυρας E2 (μέγ.)	S	E2max1	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A11	2	Μάρτυρας E2 (μέγ.)	S	E2max2	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A12	3	Μάρτυρας E2 (μέγ.)	S	E2max3	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	B10	1	Μάρτυρας E2 (IC50)	S	E2IC501	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50

▼**M8**

Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (ml)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)	Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (μL)	Όγκος από το τρυβλίο αραίωσης (μL)	Τελικός όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
P1	B11	2	Μάρτυρας E2 (IC50)	S	E2IC502	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B12	3	Μάρτυρας E2 (IC50)	S	E2IC503	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	C10	1	Μάρτυρας NE (μέγ.)	S	Nemax1	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C11	2	Μάρτυρας NE (μέγ.)	S	Nemax2	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C12	3	Μάρτυρας NE (μέγ.)	S	Nemax3	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	D10	1	Μάρτυρας NE (IC50)	S	NEIC501	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D11	2	Μάρτυρας NE (IC50)	S	NEIC502	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D12	3	Μάρτυρας NE (IC50)	S	NEIC503	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	E10	1	μη ραδιοση-μασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E11	2	μη ραδιοση-μασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E12	3	μη ραδιοση-μασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F10	4	μη ραδιοση-μασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F11	5	μη ραδιοση-μασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F12	6	μη ραδιοση-μασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	G10	1	συνολική δέσμευση	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
P1	G11	2	συνολική δέσμευση	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
P1	G12	3	συνολική δέσμευση	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—

▼**M8**

Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (ml)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)	Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (μL)	Όγκος από το τρυβλίο αραίωσης (μL)	Τελικός όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
P1	H10	4	συνολική δέσμευση	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—
P1	H11	5	συνολική δέσμευση	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
P1	H12	6	συνολική δέσμευση	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—

(*) Επισημαίνεται ότι οι «ραδιοσημασμένες» κοιλότητες είναι κενές κατά την επώαση. Τα 10 μl προστίθενται μόνο για τη μέτρηση του σπινθηρισμού.

▼**M8**

Προσάρτημα 4

ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΤΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ HRER

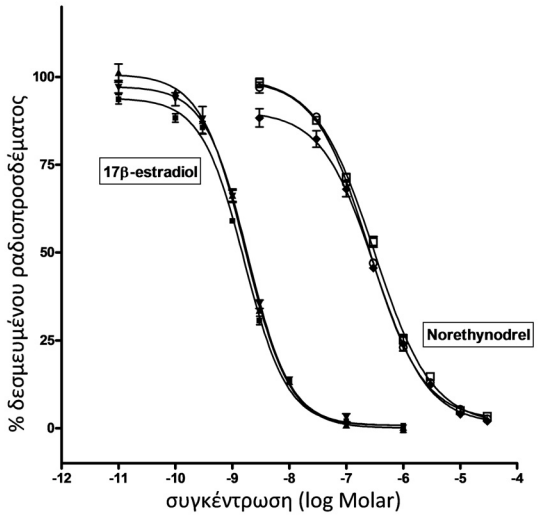
1. Η δοκιμασία ανταγωνιστικής δέσμευσης hrERα μετρά τη δέσμευση μιας μεμονωμένης συγκέντρωσης [^{3}H]17β- οιστραδιόλης παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Η καμπύλη ανταγωνιστικής δέσμευσης χαράσσεται ως ειδική δέσμευση [^{3}H]17β-οιστραδιόλης έναντι της συγκέντρωσης (μονάδες log10) του ανταγωνιστή. Η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που αναστέλλει το 50 % της μέγιστης ειδικής δέσμευσης [^{3}H]17β-οιστραδιόλης είναι η IC_{50}.

   Ανάλυση δεδομένων για το οιστρογόνο αναφοράς και την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία (1)

2. Τα δεδομένα από τις σειρές δοκιμών μάρτυρα (δηλ. η εκατοστιαία ειδική δέσμευση [^{3}H]17β-οιστραδιόλης και η λογαριθμική συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας) μετασχηματίζονται για περαιτέρω ανάλυση. Οι εκτιμήσεις των τιμών log(IC_{50}) για τους θετικούς μάρτυρες (οιστρογόνο αναφοράς και ασθενώς δεσμευόμενη ουσία) θα πρέπει να προσδιορίζονται με χρήση λογισμικού μη γραμμικής προσαρμογής καμπύλης κατάλληλου για την προσαρμογή εξίσωσης Hill τεσσάρων παραμέτρων (π.χ. BioSoft, GraphPad Prism) (2). Κατά την προσαρμογή των καμπυλών, η μέγιστη τιμή, η ελάχιστη τιμή, η κλίση και ο λογάριθμος (IC_{50}) μπορούν κατά κανόνα να αφεθούν χωρίς περιορισμό. Κατά τον προσδιορισμό της βέλτιστης προσαρμογής, θα πρέπει να χρησιμοποιείται ανάλυση εύρωστης παλινδρόμησης, εκτός εάν παρέχονται οι λόγοι για τη μη χρήση της. Θα πρέπει να αναφέρεται η επιλεγμένη μέθοδος για την εύρωστη παλινδρόμηση. Για τις δοκιμασίες hrER FW ή CERI δεν χρειάζεται διόρθωση ως προς την εξάντληση του προσδέματος, αλλά μπορεί να εξεταστεί ως ενδεχόμενο, εάν χρειαστεί. Μετά την αρχική ανάλυση, κάθε καμπύλη δέσμευσης θα πρέπει να ελέγχεται ώστε να διασφαλίζεται η κατάλληλη προσαρμογή στο μοντέλο. Η σχετική συγγένεια δέσμευσης (RBA) για την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία μπορεί να υπολογιστεί ως ποσοστό του λογάριθμου (IC_{50}) για την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία σε σχέση με τον λογάριθμο (IC_{50}) για τη 17β-οιστραδιόλη. Τα αποτελέσματα για τους θετικούς μάρτυρες και τον μάρτυρα μη δεσμευόμενης ουσίας θα πρέπει να αξιολογούνται με βάση τα μέτρα επιδόσεων της δοκιμασίας και τα κριτήρια αποδοχής που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών (παράγραφος 20), προσάρτημα 2 (δοκιμασία FW, παράγραφοι 41-51) και προσάρτημα 3 (δοκιμασία CERI, παράγραφοι 41-51). Παραδείγματα 3 σειρών δοκιμών για το οιστρογόνο αναφοράς και την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία φαίνονται στο σχήμα 1.

Σχήμα 1

Παραδείγματα των καμπυλών ανταγωνιστικής δέσμευσης για το οιστρογόνο αναφοράς και τον μάρτυρα ασθενώς δεσμευόμενης ουσίας



▼**M8**

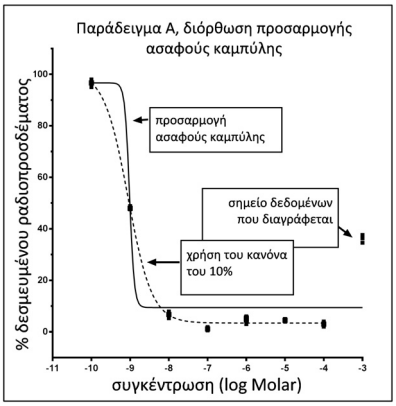
Ανάλυση δεδομένων για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες

3. Τα δεδομένα για το σύνολο των υπό δοκιμή χημικών ουσιών θα πρέπει να αναλύονται με χρήση κλιμακωτής προσέγγισης ώστε να διασφαλίζεται η ορθή ανάλυσή τους και η σωστή ταξινόμηση κάθε καμπύλης ανταγωνιστικής δέσμευσης. Κάθε σειρά δοκιμών για υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να υποβάλλεται αρχικά σε τυποποιημένη ανάλυση δεδομένων πανομοιότυπη με την ανάλυση που χρησιμοποιείται για το οιστρογόνο αναφοράς και την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία. Μετά την αρχική ανάλυση, θα πρέπει να γίνεται τεχνική επανεξέταση των παραμέτρων προσαρμογής της καμπύλης και να εξετάζεται οπτικά η ποιότητα της προσαρμογής των δεδομένων δέσμευσης στην προκύπτουσα καμπύλη ανταγωνιστικής δέσμευσης για κάθε σειρά δοκιμών. Εάν, κατά την τεχνική επανεξέταση, παρατηρηθεί εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση μείωση του ποσοστού της ειδικά δεσμευμένης [^{3}H]17β-οιστραδιόλης, χαμηλή μεταβλητότητα μεταξύ των τεχνικών πανομοιότυπων δειγμάτων σε κάθε συγκέντρωση χημικής ουσίας, και συμφωνία των παραμέτρων προσαρμογής μεταξύ των τριών σειρών δοκιμών, αυτό αποτελεί ουσιαστική ένδειξη ότι η δοκιμασία και οι αναλύσεις δεδομένων διεξήχθησαν ορθά. Η επανεξέταση των αποτελεσμάτων από κάθε σειρά δοκιμών για υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να βασίζεται σε επαγγελματική κρίση, και τα δεδομένα που χρησιμοποιούνται για την ταξινόμηση κάθε υπό δοκιμή χημικής ουσίας ως δεσμευόμενη ή μη δεσμευόμενη θα πρέπει να είναι επιστημονικά τεκμηριωμένα.

4. Περιστασιακά, μπορεί να υπάρχουν παραδείγματα δεδομένων που χρήζουν μεγαλύτερης προσοχής προκειμένου να αναλυθούν και να ερμηνευτούν δεόντως τα δεδομένα δέσμευσης hrER. Σε προηγούμενες μελέτες είχαν παρουσιαστεί περιπτώσεις στις οποίες η ανάλυση και η ερμηνεία των δεδομένων ανταγωνιστικής δέσμευσης υποδοχέα περιπλέκεται λόγω ανόδου της εκατοστιαίας ειδικής δέσμευσης κατά τις δοκιμές χημικών ουσιών στις υψηλότερες συγκεντρώσεις (σχήμα 2). Πρόκειται για γνωστό ζήτημα που προκύπτει όταν χρησιμοποιούνται πρωτόκολλα για μια σειρά δοκιμασιών ανταγωνιστικής δέσμευσης υποδοχέα (3). Σε αυτές τις περιπτώσεις, στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρείται εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση απόκριση, αλλά καθώς η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας προσεγγίζει το όριο διαλυτότητας, η εκτόπιση της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης παύει να μειώνεται. Σε αυτές τις περιπτώσεις, τα δεδομένα για τις υψηλότερες συγκεντρώσεις υποδεικνύουν ότι η δοκιμασία έχει φθάσει στο βιολογικό όριό της. Για παράδειγμα, το φαινόμενο αυτό συνδέεται πολλές φορές με τη χημική αδιαλυτότητα και κατακρήμνιση σε υψηλές συγκεντρώσεις, ή μπορεί επίσης να αντικατοπτρίζει την υπέρβαση της ικανότητας του επιχρισμένου με δεξτράνη ενεργού άνθρακα να παγιδεύει το αδέσμευτο ραδιοσημασμένο πρόσδεμα κατά τη διαδικασία διαχωρισμού στις υψηλότερες συγκεντρώσεις των χημικών ουσιών. Η συμπερίληψη αυτού του είδους των σημείων δεδομένων κατά την προσαρμογή δεδομένων ανταγωνιστικής δέσμευσης σε σιγμοειδή καμπύλη μπορεί ενίοτε να οδηγήσει σε εσφαλμένη ταξινόμηση του δυναμικού δέσμευσης μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον ER (σχήμα 2). Για την αποφυγή σφάλματος, το πρωτόκολλο για τις δοκιμασίες δέσμευσης hrER FW και CERI περιλαμβάνει τη δυνατότητα αποκλεισμού σημείων δεδομένων από τις αναλύσεις σε περιπτώσεις κατά τις οποίες ο μέσος όρος των πανομοιότυπων δειγμάτων για την εκατοστιαία ειδική δέσμευση της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης υπερβαίνει κατά 10 % ή περισσότερο τη μέση τιμή που παρατηρείται σε χαμηλότερη συγκέντρωση (ο λεγόμενος «κανόνας του 10 %»). Ο κανόνας αυτός μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο μία φορά για μια ορισμένη καμπύλη και τα δεδομένα που απομένουν πρέπει να καλύπτουν τουλάχιστον 6 συγκεντρώσεις προκειμένου να είναι εφικτή η σωστή ταξινόμηση της καμπύλης.

Σχήμα 2

Παραδείγματα καμπυλών ανταγωνιστικής δέσμευσης με και χωρίς τη χρήση του κανόνα του 10 %

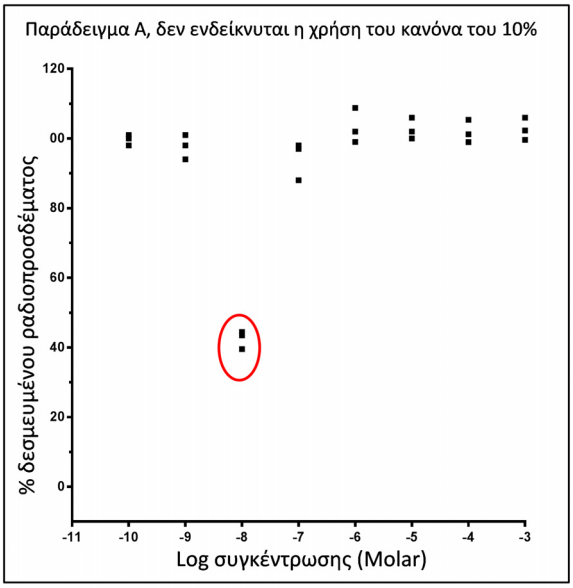


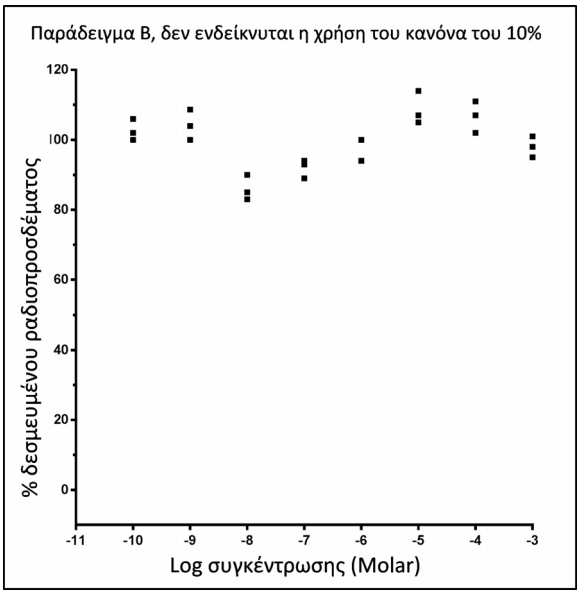
▼**M8**

5. Η ορθή χρήση του κανόνα του 10 % για τη διόρθωση τέτοιων καμπυλών θα πρέπει να εξετάζεται προσεκτικά, και συνιστάται να εφαρμόζεται μόνο σε εκείνες τις περιπτώσεις στις οποίες υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις για ουσία δεσμευόμενη στον hrER. Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων για τη μελέτη επικύρωσης της δοκιμασίας hrER FW, παρατηρήθηκε ότι ο κανόνας του 10 % είχε ενίοτε μια ακούσια και απρόβλεπτη συνέπεια. Οι χημικές ουσίες που δεν αλληλεπιδρούσαν με τον υποδοχέα (αληθείς μη δεσμευόμενες ουσίες) εμφάνιζαν συχνά μεταβλητότητα γύρω από τη δέσμευση ραδιοσημασμένου προσδέματος 100 % η οποία ήταν μεγαλύτερη από το 10 % σε όλες τις συγκεντρώσεις που υποβάλλονταν σε δοκιμή. Εάν η χαμηλότερη τιμή συνέβαινε να βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση, τα δεδομένα από όλες τις υψηλότερες συγκεντρώσεις θα μπορούσαν ενδεχομένως να αποκλειστούν από την ανάλυση εάν εφαρμοζόταν ο κανόνας του 10 %, παρότι οι συγκεντρώσεις αυτές θα ήταν χρήσιμες για τον χαρακτηρισμό της χημικής ουσίας ως μη δεσμευόμενης. Στο σχήμα 3 φαίνονται παραδείγματα στα οποία δεν αρμόζει η χρήση του κανόνα του 10 %.

Σχήμα 3

Παραδείγματα δεδομένων ανταγωνιστικής δέσμευσης στα οποία δεν αρμόζει η χρήση του κανόνα του 10 %





▼**M8**

Παραπομπές

(1) OECD (2015). *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα)*, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) Motulsky H. and Christopoulos A. (2003). *The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression*. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, pp 187-191. www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf

(3) Laws SC, Yavanhxay S, Cooper RL, Eldridge JC. (2006). *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors*. Toxicological Sci. 94(1):46-56.

▼M8

Β.71 *IN VITRO* ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΠΟΥ ΑΦΟΡΟΥΝ ΤΟ ΒΑΣΙΚΟ ΣΥΜΒΑΝ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΔΕΝΔΡΙΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΠΟΡΕΙΑ ΔΥΣΜΕΝΟΥΣ ΕΚΒΑΣΗΣ (AOP) ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μέθοδος δοκιμών που βασίζεται στο βασικό συμβάν της ενεργοποίησης των δενδριτικών κυττάρων

1. Ευαισθητοποιητικές του δέρματος ονομάζονται οι ουσίες οι οποίες, όταν έρχονται επαφή με το δέρμα, προκαλούν αλλεργική αντίδραση όπως ορίζεται στο Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα των Ηνωμένων Εθνών για την Ταξινόμηση και Επισήμανση των Χημικών Ουσιών (GHS του ΟΗΕ) (1) και στον κανονισμό (ΕΕ) αριθ. 1272/2008 της Ευρωπαϊκής Ένωσης για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων (CLP) ([1]). Υπάρχει γενική συμφωνία για τα βασικά υποκείμενα βιολογικά συμβάντα στη δερματική ευαισθητοποίηση. Οι υπάρχουσες γνώσεις σχετικά με τους χημικούς και βιολογικούς μηχανισμούς που συνδέονται με τη δερματική ευαισθητοποίηση έχουν συνοψιστεί με τη μορφή μιας πορείας δυσμενούς έκβασης (Adverse Outcome Pathway, AOP) στο πλαίσιο του προγράμματος AOP του ΟΟΣΑ (2) – από το μοριακό εναρκτήριο συμβάν μέχρι τα ενδιάμεσα συμβάντα και τη δυσμενή επίδραση, δηλαδή την αλλεργική δερματίτιδα εξ επαφής. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, το μοριακό εναρκτήριο συμβάν (δηλ. το πρώτο βασικό συμβάν) είναι η ομοιοπολική δέσμευση ηλεκτρονιόφιλων ουσιών σε πυρηνόφιλα κέντρα των πρωτεϊνών του δέρματος. Το δεύτερο βασικό συμβάν στην εν λόγω AOP σημειώνεται στα κερατινοκύτταρα και περιλαμβάνει φλεγμονώδεις αποκρίσεις, καθώς και αλλαγές στην έκφραση γονιδίων που συνδέονται με συγκεκριμένες πορείες κυτταρικής σηματοδότησης, όπως εκείνες που εξαρτώνται από το στοιχείο απόκρισης στα αντιοξειδωτικά/ηλεκτρονιόφιλα (Antioxidant Response Element, ARE). Το τρίτο βασικό συμβάν είναι η ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων (DC), που συνήθως αξιολογείται με βάση την έκφραση ειδικών δεικτών της κυτταρικής επιφάνειας, χημειοκινών και κυτταροκινών. Το τέταρτο βασικό συμβάν είναι η ενεργοποίηση και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων Τ, που αξιολογείται έμμεσα με τη δοκιμασία επιχώριων λεμφαδένων σε ποντικό (LLNA) (3).

2. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 442Ε του ΟΟΣΑ (2017). Περιγράφει *in vitro* δοκιμασίες που αφορούν τους μηχανισμούς που περιγράφονται σε σχέση με το βασικό συμβάν για την ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων της AOP για την ευαισθητοποίηση του δέρματος (2). Η μέθοδος δοκιμών περιλαμβάνει δοκιμές που προορίζονται για την υποστήριξη της διάκρισης ανάμεσα σε ευαισθητοποιητικές και μη ευαισθητοποιητικές του δέρματος ουσίες, σύμφωνα με το GHS του ΟΗΕ και τον κανονισμό CLP.

   Οι δοκιμές που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών είναι οι ακόλουθες:

   — δοκιμή ενεργοποίησης ανθρώπινης κυτταρικής σειράς (h-CLAT)

   — δοκιμή ενεργοποίησης κυτταρικής σειράς U937 (U-SENS™)

   — δοκιμασία γονιδίου αναφοράς ιντερλευκίνης 8 (δοκιμασία IL-8 Luc)

3. Οι δοκιμές που περιλαμβάνονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών και στην αντίστοιχη TG του ΟΟΣΑ ενδέχεται να διαφέρουν ως προς τη διαδικασία που χρησιμοποιείται για την παραγωγή των δεδομένων και ως προς τις μετρούμενες ενδείξεις, αλλά μπορούν να χρησιμοποιούνται αδιακρίτως για τη συμμόρφωση προς τις εθνικές απαιτήσεις για αποτελέσματα δοκιμών σχετικά με το βασικό συμβάν για την ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων της AOP για την ευαισθητοποίηση του δέρματος, με παράλληλη αξιοποίηση της αμοιβαίας αποδοχής δεδομένων του ΟΟΣΑ.

([1]) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων, την τροποποίηση και την κατάργηση των οδηγιών 67/548/ΕΟΚ και 1999/45/ΕΚ και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006, ΕΕ L 353 της 31.12.2008

▼M8

Ιστορικό και αρχές των δοκιμών που περιλαμβάνονται στη μέθοδο δοκιμών με βάση το βασικό συμβάν

4. Η αξιολόγηση της δερματικής ευαισθητοποίησης περιλαμβάνει συνήθως τη χρήση πειραματόζωων. Στις κλασικές μεθόδους στις οποίες χρησιμοποιούνται ινδικά χοιρίδια, όπως η δοκιμή Magnusson Kligman με μεγιστοποίηση σε ινδικά χοιρίδια (GPMT) και η δοκιμή Buehler (μέθοδος δοκιμών B.6) (4), αξιολογούνται τόσο το στάδιο επαγωγής όσο και το στάδιο πρόκλησης δερματικής ευαισθητοποίησης. Οι δοκιμές σε ποντικό, η LLNA (μέθοδος δοκιμών B.42) (3) και οι δύο τροποποιήσεις της χωρίς τη χρήση ραδιενέργειας, η LLNA: DA (μέθοδος δοκιμών B.50) (5) και η LLNA: BrdU-ELISA (μέθοδος δοκιμών B.51) (6), αξιολογούν αποκλειστικά την επαγωγική απόκριση και έχουν επίσης κριθεί αποδεκτές, δεδομένου ότι προσφέρουν ένα πλεονέκτημα έναντι των δοκιμών σε ινδικά χοιρίδια όσον αφορά την καλή μεταχείριση των ζώων, σε συνδυασμό με την αντικειμενική μέτρηση του επαγωγικού σταδίου της δερματικής ευαισθητοποίησης.

5. Πρόσφατα εγκρίθηκαν μέθοδοι δοκιμών μηχανιστικής βάσης *in chemico* και *in vitro* που αφορούν το πρώτο βασικό συμβάν [μέθοδος δοκιμών B.59, Άμεση ανάλυση πεπτιδικής δραστικότητας (7)] και το δεύτερο βασικό συμβάν [μέθοδος δοκιμών B.60, Μέθοδος δοκιμών ARE-Nrf2/λουσιφεράσης (8)] της ΑΟΡ ευαισθητοποίησης του δέρματος για την υποστήριξη της αξιολόγησης του δυναμικού επικινδυνότητας των χημικών ουσιών για ευαισθητοποίηση του δέρματος.

6. Οι δοκιμές που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών προσδιορίζουν ποσοτικά είτε τη μεταβολή στην έκφραση δεικτών της κυτταρικής επιφάνειας που συνδέονται με τη διεργασία ενεργοποίησης των μονοκυττάρων και των δενδριτικών κυττάρων έπειτα από έκθεση σε ευαισθητοποιητικά (π.χ. CD54, CD86) είτε τις μεταβολές στην έκφραση της IL-8, μιας κυτταροκίνης που σχετίζεται με την ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων. Έχει αναφερθεί ότι τα ευαισθητοποιητικά του δέρματος επάγουν την έκφραση δεικτών της κυτταρικής μεμβράνης, όπως οι CD40, CD54, CD80, CD83 και CD86, επιπροσθέτως προς την επαγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως οι IL-1β και TNF-α, και αρκετών χημειοκινών, περιλαμβανομένης της IL-8 (CXCL8) και της CCL3 (9) (10) (11) (12), που σχετίζονται με την ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων (2).

7. Ωστόσο, δεδομένου ότι η ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων αντιπροσωπεύει ένα μόνο βασικό συμβάν της ΑΟΡ ευαισθητοποίησης του δέρματος (2) (13), οι πληροφορίες που παράγονται από δοκιμές που μετρούν μόνο δείκτες ενεργοποίησης των δενδριτικών κυττάρων μπορεί να μην επαρκούν για την εξαγωγή συμπεράσματος σχετικά με την παρουσία ή την απουσία δυναμικού δερματικής ευαισθητοποίησης των χημικών ουσιών. Ως εκ τούτου, προτείνεται η χρήση των δεδομένων που παράγονται με τις δοκιμές της παρούσας μεθόδου δοκιμών για την υποστήριξη της διάκρισης μεταξύ ευαισθητοποιητικών (κατηγορία 1 κατά GHS του ΟΗΕ/κανονισμός CLP) και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος, όταν χρησιμοποιούνται στο πλαίσιο ολοκληρωμένων προσεγγίσεων για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση (IATA), σε συνδυασμό με άλλες συμπληρωματικές πληροφορίες, π.χ. που προκύπτουν από *in vitro* δοκιμασίες που αφορούν άλλα βασικά συμβάντα της ΑΟΡ ευαισθητοποίησης του δέρματος καθώς και μεθόδους χωρίς δοκιμές, περιλαμβανομένης της σύγκρισης με χημικώς ανάλογες ουσίες (13). Παραδείγματα της χρήσης των δεδομένων που παράγονται με τις εν λόγω δοκιμές στο πλαίσιο καθορισμένων προσεγγίσεων, δηλαδή τυποποιημένων προσεγγίσεων τόσο σε σχέση με το σύνολο των χρησιμοποιούμενων πηγών πληροφοριών όσο και στο πλαίσιο της διαδικασίας που εφαρμόζεται στα δεδομένα για την πραγματοποίηση προβλέψεων, έχουν δημοσιευτεί (13) και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως χρήσιμα στοιχεία στο πλαίσιο της IATA.

8. Οι δοκιμές που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν καθαυτές, ούτε για την ταξινόμηση ευαισθητοποιητικών του δέρματος στις υποκατηγορίες 1A και 1B, όπως ορίζονται στο GHS του ΟΗΕ / στον κανονισμό CLP, για τις αρχές που εφαρμόζουν τις εν λόγω προαιρετικές υποκατηγορίες, ούτε για την πρόβλεψη της ισχύος δράσης κατά τη λήψη αποφάσεων αξιολόγησης της ασφάλειας. Εντούτοις, ανάλογα με το κανονιστικό πλαίσιο, τα θετικά αποτελέσματα που προκύπτουν με τις παρούσες μεθόδους μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως έχουν για την ταξινόμηση μιας χημικής ουσίας στην κατηγορία 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP.

▼M8

9. Ο όρος «υπό δοκιμή χημική ουσία» χρησιμοποιείται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών για να δηλώσει την ύλη που υποβάλλεται στη δοκιμή ([1]) και δεν σχετίζεται με την εφαρμοσιμότητα των δοκιμών για τον έλεγχο μονοσυστατικών ουσιών, πολυσυστατικών ουσιών και/ή μειγμάτων. Επί του παρόντος, υπάρχουν περιορισμένες διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με την εφαρμοσιμότητα των δοκιμών σε πολυσυστατικές ουσίες/μείγματα (14) (15). Οι δοκιμές είναι πάντως τεχνικά εφαρμόσιμες στον έλεγχο πολυσυστατικών ουσιών και μειγμάτων. Ωστόσο, πριν από τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών σε μείγμα για την παραγωγή δεδομένων για συγκεκριμένο κανονιστικό σκοπό, θα πρέπει να εξετάζεται αν –και, εάν ναι, για ποιον λόγο– μπορεί να αποδώσει αποτελέσματα κατάλληλα για τον επιδιωκόμενο σκοπό ([2]). Τέτοια εξέταση δεν χρειάζεται όταν οι κανονιστικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τον έλεγχο του μείγματος. Επιπλέον, κατά τον έλεγχο πολυσυστατικών ουσιών ή μειγμάτων, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η πιθανή παρεμπόδιση των παρατηρούμενων αποκρίσεων από κυτταροτοξικά συστατικά.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html.

(2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En.

(3) Κεφάλαιο B.42 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμασία επιχώριων λεμφαδένων.

(4) Κεφάλαιο B.6 του παρόντος παραρτήματος: Ευαισθητοποίηση του δέρματος.

(5) Κεφάλαιο B.50 του παρόντος παραρτήματος: Ευαισθητοποίηση του δέρματος: Δοκιμασία επιχώριων λεμφαδένων: DA.

(6) Κεφάλαιο B.51 του παρόντος παραρτήματος: Ευαισθητοποίηση του δέρματος: Δοκιμασία επιχώριων λεμφαδένων: BrdU-ELISA.

(7) Κεφάλαιο B.59 του παρόντος παραρτήματος: Ευαισθητοποίηση του δέρματος in chemico: Άμεση ανάλυση πεπτιδικής δραστικότητας (DPRA).

(8) Κεφάλαιο B.60 του παρόντος παραρτήματος: Ευαισθητοποίηση του δέρματος *in vitro*: Μέθοδος δοκιμών ARE-Nrf2/λουσιφεράσης.

(9) Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu Rev Immunol 9:271-96.

(10) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, and Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. J Exp Med 180:1841-7.

(11) Aiba S, Terunuma A, Manome H, and Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. Eur J Immunol 27:3031-8.

([1]) Τον Ιούνιο του 2013, η κοινή συνεδρίαση του ΟΟΣΑ συμφώνησε ότι, όπου είναι δυνατόν, ο όρος «υπό δοκιμή χημική ουσία» που δηλώνει την ύλη που υποβάλλεται σε δοκιμή θα πρέπει να χρησιμοποιείται με μεγαλύτερη συνέπεια στις νέες και επικαιροποιημένες κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών του ΟΟΣΑ.

([2]) Η διατύπωση αυτή προτάθηκε και εγκρίθηκε κατά τη συνεδρίαση του WNT του Απριλίου 2014.

▼**M8**

(12) Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, and Tagami. H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl2 and DNCB. J Invest Dermatol 120:390-8.

(13) OECD (2016). Series on Testing & Assessment No 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: https://community.oecd.org/community/iatass.

(14) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. Sci. 38, 275-284.

(15) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

▼**M8**

Προσάρτημα 1

ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ *IN VITRO*: ΔΟΚΙΜΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ (H-CLAT)

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

1. Η h-CLAT χρησιμεύει στον ποσοτικό προσδιορισμό των μεταβολών στην έκφραση δεικτών της κυτταρικής επιφάνειας που συνδέονται με τη διεργασία ενεργοποίησης των μονοκυττάρων και των δενδριτικών κυττάρων (DC) (δείκτες CD86 και CD54), στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά μονοκυτταρικής λευχαιμίας THP-1, κατόπιν έκθεσης σε ευαισθητοποιητικά (1)(2). Στη συνέχεια, τα μετρηθέντα επίπεδα έκφρασης των δεικτών CD86 και CD54 χρησιμοποιούνται για την υποστήριξη της διάκρισης μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος.

2. Η h-CLAT έχει αξιολογηθεί σε μελέτη επικύρωσης του εργαστηρίου αναφοράς της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τις εναλλακτικές μεθόδους αντί των δοκιμών σε ζώα (EURL ECVAM) και σε επακόλουθη ανεξάρτητη αξιολόγηση από ομοτίμους από τη Συμβουλευτική Επιστημονική Επιτροπή EURL ECVAM (ESAC). Αφού έλαβε υπόψη όλα τα διαθέσιμα στοιχεία και τις απόψεις των ρυθμιστικών αρχών και των ενδιαφερόμενων μερών, το EURL ECVAM (3) συνέστησε τη χρήση της h-CLAT στο πλαίσιο IATA για την υποστήριξη της διάκρισης μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών με σκοπό την ταξινόμηση και επισήμανση του κινδύνου. Παραδείγματα σχετικά με τη χρήση δεδομένων h-CLAT σε συνδυασμό με άλλα στοιχεία έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11).

3. Διαπιστώθηκε ότι η h-CLAT μπορεί να εφαρμοστεί σε εργαστήρια που διαθέτουν εμπειρία στη χρήση τεχνικών κυτταροκαλλιέργειας και ανάλυσης κυτταρομετρίας ροής. Ο βαθμός αναπαραγωγιμότητας των προβλέψεων που αναμένεται να παρέχει η δοκιμή είναι της τάξης του 80 % ενδοεργαστηριακά και διεργαστηριακά (3)(12). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη επικύρωσης (13) και άλλες δημοσιευμένες μελέτες (14) υποδεικνύουν συνολικά ότι, σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της LLNA, η ορθότητα της διάκρισης μεταξύ ευαισθητοποιητικών (κατηγορίας 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP) και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος είναι 85 % (N=142), με ευαισθησία 93 % (94/101) και ειδικότητα 66 % (27/41) [βάσει εκ νέου ανάλυσης του EURL ECVAM (12) στο πλαίσιο της οποίας ελήφθησαν υπόψη όλα τα υπάρχοντα δεδομένα και δεν ελήφθησαν υπόψη τα αρνητικά αποτελέσματα για τις χημικές ουσίες με Log Kow άνω του 3,5, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4]. Οι ψευδοαρνητικές προβλέψεις με την h-CLAT αφορούν πιθανότατα χημικές ουσίες που εμφανίζουν χαμηλή έως μέτρια ισχύ ευαισθητοποίησης του δέρματος (υποκατηγορία 1B κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP) παρά ουσίες που εμφανίζουν υψηλή ισχύ ευαισθητοποίησης του δέρματος (υποκατηγορία 1A κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP) (4)(13)(15). Συνολικά, τα στοιχεία αυτά δείχνουν τη χρησιμότητα της μεθόδου h-CLAT ως εργαλείου που συμβάλλει στον προσδιορισμό της επικινδυνότητας ως προς την ευαισθητοποίηση του δέρματος. Ωστόσο, οι τιμές ορθότητας που παρέχονται εδώ για την h-CLAT ως αυτοτελή δοκιμή είναι απλώς ενδεικτικές, δεδομένου ότι η δοκιμή θα πρέπει να εξετάζεται σε συνδυασμό με άλλες πηγές πληροφοριών στο πλαίσιο IATA και σύμφωνα με τις πληροφορίες στις παραγράφους 7 και 8 της γενικής εισαγωγής. Επιπλέον, κατά την αξιολόγηση των μεθόδων δοκιμών ευαισθητοποίησης του δέρματος χωρίς χρήση ζώων, θα πρέπει να μη λησμονείται ότι η δοκιμασία LLNA, καθώς και άλλες δοκιμές σε ζώα, ενδέχεται να μην αντικατοπτρίζουν πλήρως την κατάσταση στον άνθρωπο.

4. Με βάση το σύνολο των διαθέσιμων δεδομένων, η μέθοδος δοκιμών h-CLAT είναι εφαρμόσιμη σε υπό δοκιμή χημικές ουσίες που καλύπτουν ποικιλία οργανικών λειτουργικών ομάδων, μηχανισμών αντίδρασης, επιπέδων ισχύος ευαισθητοποίησης του δέρματος (όπως προσδιορίζονται σε μελέτες *in vivo*) και φυσικοχημικών ιδιοτήτων (3)(14)(15). Η μέθοδος δοκιμών h-CLAT είναι εφαρμόσιμη σε υπό δοκιμή χημικές ουσίες που είναι διαλυτές ή σχηματίζουν σταθερή διασπορά (δηλ. κολλοειδές ή εναιώρημα στο οποίο η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν καθιζάνει ούτε διαχωρίζεται από τον διαλύτη/φορέα σε διαφορετικές φάσεις) σε κατάλληλο διαλύτη/φορέα (βλ. παράγραφο 14). Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες με Log Kow άνω του 3,5 τείνουν να δώσουν ψευδοαρνητικά αποτελέσματα (14). Ως εκ τούτου, τα αρνητικά αποτελέσματα με υπό δοκιμή χημικές ουσίες με Log Kow άνω του 3,5 δεν

▼M8

θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη. Αντιθέτως, τα θετικά αποτελέσματα που προκύπτουν με υπό δοκιμή χημικές ουσίες με Log Kow άνω του 3,5 μπορούν να χρησιμοποιούνται για την υποστήριξη του χαρακτηρισμού της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ως ευαισθητοποιητικού. Επιπλέον, λόγω της περιορισμένης μεταβολικής ικανότητας της χρησιμοποιούμενης κυτταρικής σειράς (16) και λόγω των πειραματικών συνθηκών, τα μεταβολικά προαπτένια (δηλ. οι ουσίες που απαιτούν ενζυμική ενεργοποίηση, π.χ. μέσω των ενζύμων P450) και τα αβιοτικά προαπτένια (δηλ. οι ουσίες που ενεργοποιούνται με οξείδωση), και ιδίως όσα χαρακτηρίζονται από χαμηλή ταχύτητα οξείδωσης, μπορεί επίσης να δώσουν αρνητικά αποτελέσματα στην h-CLAT (15). Παρότι οι φθορίζουσες ουσίες μπορούν να αξιολογηθούν με την h-CLAT (17), οι ισχυρά φθορίζουσες ουσίες που εκπέμπουν στο ίδιο μήκος κύματος με την ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC) ή το ιωδιούχο προπίδιο (PI) παρεμποδίζουν την κυτταρομετρική ανίχνευση ροής και, ως εκ τούτου, δεν μπορούν να αξιολογηθούν σωστά με χρήση συζευγμένων με FITC αντισωμάτων ή PI. Σε αυτή την περίπτωση, μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλα σημασμένα με φθοριοχρώματα αντισώματα ή άλλοι δείκτες κυτταροτοξικότητας, αντίστοιχα, εφόσον μπορεί να καταδειχθεί ότι παρέχουν ανάλογα αποτελέσματα με τα σημασμένα με FITC αντισώματα (βλ. παράγραφο 24) ή το PI (βλ. παράγραφο 18) π.χ. μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας του προσαρτήματος 1-2. Υπό το πρίσμα των ανωτέρω, τα αρνητικά αποτελέσματα θα πρέπει να ερμηνεύονται στο πλαίσιο των αναφερόμενων περιορισμών και σε συνάρτηση με άλλες πηγές πληροφοριών στο πλαίσιο ΙΑΤΑ. Εάν υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι η μέθοδος δοκιμών h-CLAT δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε άλλες ειδικές κατηγορίες χημικών ουσιών, η μέθοδος δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τις συγκεκριμένες κατηγορίες.

5. Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, η μέθοδος h-CLAT υποστηρίζει τη διάκριση μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος. Ωστόσο, μπορεί ενδεχομένως να συμβάλει στην εκτίμηση της ευαισθητοποιητικής ισχύος (4)(5)(9), όταν χρησιμοποιείται σε ολοκληρωμένες προσεγγίσεις, όπως οι ΙΑΤΑ. Απαιτούνται πάντως περισσότερες εργασίες, κατά προτίμηση με βάση δεδομένα για τον άνθρωπο, για να διαπιστωθεί ο τρόπος με τον οποίο τα αποτελέσματα της h-CLAT θα μπορούσαν ενδεχομένως να τροφοδοτήσουν την εκτίμηση της ευαισθητοποιητικής ισχύος.

6. Οι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

7. Η μέθοδος h-CLAT είναι μια *in vitro* δοκιμασία με την οποία προσδιορίζονται ποσοτικά οι μεταβολές της έκφρασης κάποιων δεικτών της κυτταρικής επιφάνειας (CD86 και CD54) σε ανθρώπινη κυτταρική σειρά μονοκυτταρικής λευχαιμίας, στα κύτταρα THP-1, μετά από έκθεση 24 ωρών στην υπό δοκιμή χημική ουσία. Τα εν λόγω επιφανειακά μόρια αποτελούν τυπικούς δείκτες της ενεργοποίησης των μονοκυττάρων THP-1 και μπορούν να μιμούνται την ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων, η οποία διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην προδιέγερση των Τ κυττάρων. Οι μεταβολές της έκφρασης επιφανειακών δεικτών μετρώνται με κυτταρομετρία ροής μετά από χρώση των κυττάρων με αντισώματα σημασμένα με φθοριοχρώματα. Ταυτόχρονα, διεξάγεται επίσης μέτρηση της κυτταροτοξικότητας προκειμένου να διαπιστωθεί εάν αυξάνεται η έκφραση των επιφανειακών δεικτών σε υποκυτταροτοξικές συγκεντρώσεις. Η σχετική ένταση φθορισμού των επιφανειακών δεικτών σε σύγκριση με τον μάρτυρα με διαλύτη/φορέα υπολογίζεται και χρησιμοποιείται στο μοντέλο πρόβλεψης (βλ. παράγραφο 26) για να υποστηριχθεί η διάκριση μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών ουσιών.

ΑΠΟΔΕΙΞΗ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

8. Πριν χρησιμοποιήσουν στην καθημερινή πρακτική τη δοκιμή που περιγράφεται στο παρόν προσάρτημα της μεθόδου δοκιμών Β.71, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα, χρησιμοποιώντας τις 10 ουσίες ελέγχου ικανότητας που απαριθμούνται στο προσάρτημα 1.2. Επιπλέον, οι χρήστες της δοκιμής θα πρέπει να διατηρούν βάση ιστορικών δεδομένων με τα δεδομένα που προκύπτουν από τους ελέγχους δραστικότητας (βλ. παράγραφο 11) και με τους θετικούς μάρτυρες και τους μάρτυρες με διαλύτη/φορέα (βλ. παραγράφους 20-22), και θα πρέπει να χρησιμοποιούν τα εν λόγω δεδομένα για να βεβαιώνονται για τη διαχρονική αναπαραγωγιμότητα της δοκιμής στο εργαστήριό τους.

▼M8

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

9. Η παρούσα δοκιμή βασίζεται στο πρωτόκολλο αριθ. 158 της υπηρεσίας βάσης δεδομένων h-CLAT για τις εναλλακτικές μεθόδους αντί των πειραμάτων σε ζώα (DB-ALM) (18), το οποίο είναι αντίστοιχο του πρωτοκόλλου που χρησιμοποήθηκε στη μελέτη επικύρωσης που συντονίστηκε από το EURL ECVAM. Συνιστάται να χρησιμοποιείται αυτό το πρωτόκολλο κατά την εφαρμογή και χρήση της μεθόδου h-CLAT στο εργαστήριο. Στις επόμενες παραγράφους περιγράφονται τα βασικά στοιχεία και διαδικασίες για τη μέθοδο h-CLAT, η οποία περιλαμβάνει δύο στάδια: *δοκιμασία προσδιορισμού δόσης* και *μέτρηση έκφρασης CD86/CD54*.

Προπαρασκευή των κυττάρων

10. Για την εφαρμογή της μεθόδου h-CLAT θα πρέπει να χρησιμοποιείται η ανθρώπινη κυτταρική σειρά μονοκυτταρικής λευχαιμίας THP-1. Συνιστάται τα κύτταρα (TIB-202™) να λαμβάνονται από επαρκώς εξειδικευμένη τράπεζα κυττάρων, όπως η American Type Culture Collection.

11. Τα κύτταρα THP-1 καλλιεργούνται στους 37°C και σε ατμόσφαιρα με ύγρανση και 5 % CO_2 σε θρεπτικό μέσο RPMI-1640 συμπληρωμένο με 10 % βόειου εμβρυϊκού ορού (FBS), 0,05 mM 2-μερκαπτοαιθανόλης, 100 μονάδες/ml πενικιλίνης και 100 μg/ml στρεπτομυκίνης. Η χρήση πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας μπορεί να παραλειφθεί. Ωστόσο, σε αυτή την περίπτωση, οι χρήστες θα πρέπει να βεβαιώνονται ότι η απουσία αντιβιοτικών από το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας δεν επηρεάζει τα αποτελέσματα, π.χ. μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας που απαριθμούνται στο προσάρτημα 1.2. Σε κάθε περίπτωση, για τον περιορισμό του κινδύνου μόλυνσης στο ελάχιστο, θα πρέπει να ακολουθούνται οι ορθές πρακτικές καλλιέργειας κυττάρων, ανεξάρτητα από την παρουσία ή μη αντιβιοτικών στο θρεπτικό μέσο κυττάρων. Τα κύτταρα THP-1 εμβολιάζονται συνήθως κάθε 2-3 ημέρες σε πυκνότητα 0,1 έως 0,2 × 10^6 κύτταρα/ml. Θα πρέπει να διατηρούνται σε πυκνότητες από 0,1 έως 1,0 × 10^6 κύτταρα/ml. Πριν από τη χρήση τους στις δοκιμές, θα πρέπει να ελέγχεται εάν τα κύτταρα πληρούν τα κριτήρια, μέσω της διεξαγωγής ελέγχου δραστικότητας. Ο έλεγχος δραστικότητας των κυττάρων θα πρέπει να διενεργείται με χρήση των θετικών μαρτύρων 2,4-δινιτροχλωροβενζόλιο (DNCB) (αριθ. CAS 97-00-7, καθαρότητα ≥ 99 %) και θειικό νικέλιο ($NiSO_4$) (αριθ. CAS 10101-97-0, καθαρότητα ≥ 99 %) και του αρνητικού μάρτυρα γαλακτικό οξύ (LA) (αριθ. CAS 50-21-5, ≥ καθαρότητα 85 %), δύο εβδομάδες μετά την απόψυξη. Αμφότερα τα DNCB και $NiSO_4$ θα πρέπει να επάγουν θετική απόκριση και των δύο δεικτών κυτταρικής επιφάνειας CD86 και CD54, ενώ το LA θα πρέπει να επάγει αρνητική απόκριση και των δύο δεικτών. Για τη δοκιμασία πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο κύτταρα που έχουν υποβληθεί επιτυχώς στον έλεγχο δραστικότητας. Τα κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιάζονται έως δύο μήνες μετά την απόψυξη. Ο αριθμός των ανακαλλιεργειών δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τις 30. Ο έλεγχος δραστικότητας θα πρέπει να διενεργείται σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφονται στις παραγράφους 20-24.

12. Για τη δοκιμή, κύτταρα THP-1 εμβολιάζονται σε πυκνότητα είτε 0,1 × 10^6 κύτταρα/ml είτε 0,2 × 10^6 κύτταρα/ml και προκαλλιεργούνται σε φιάλες καλλιέργειας επί 72 ώρες ή επί 48 ώρες αντίστοιχα. Είναι σημαντικό η πυκνότητα των κυττάρων στη φιάλη καλλιέργειας αμέσως μετά την περίοδο προκαλλιέργειας να είναι κατά το δυνατόν συνεπής σε κάθε πείραμα (με χρήση μίας από τις δύο συνθήκες προκαλλιέργειας που περιγράφονται ανωτέρω), διότι η πυκνότητα των κυττάρων στη φιάλη καλλιέργειας αμέσως μετά την προκαλλιέργεια μπορεί να επηρεάσει την έκφραση των CD86/CD54 που επάγεται από τα αλλεργιογόνα (19). Την ημέρα της δοκιμής, κύτταρα που έχουν συλλεχθεί από τη φιάλη καλλιέργειας επανεναιωρούνται με πρόσφατα παρασκευασμένο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας σε πυκνότητα 2 × 10^6 κύτταρα/ml. Στη συνέχεια, τα κύτταρα κατανέμονται σε τρυβλίο επίπεδης βάσης 24 κοιλοτήτων (500 μl, 1 × 10^6 κύτταρα/κοιλότητα) ή τρυβλίο επίπεδης βάσης 96 κοιλοτήτων (80 μl, 1,6 × 10^5 κύτταρα/κοιλότητα).

Δοκιμασία προσδιορισμού δόσης

13. Διεξάγεται *δοκιμασία προσδιορισμού δόσης* για τον προσδιορισμό της CV75, η οποία είναι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που δίνει κυτταρική βιωσιμότητα (CV) 75 % σε σύγκριση με τον μάρτυρα με διαλύτη/φορέα. Η τιμή CV75 χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των υπό δοκιμή χημικών ουσιών για τη μέτρηση της έκφρασης των *CD86/CD54* (βλ. παραγράφους 20-24).

▼**M8**

Παρασκευή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων

14. Η παρασκευή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων γίνεται την ημέρα της δοκιμής. Για τη μέθοδο h-CLAT, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες διαλύονται ή διασπείρονται σταθερώς (βλ. επίσης παράγραφο 4) σε αλατούχο διάλυμα ή θρεπτικό μέσο, ως πρώτη επιλογή, ή σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO, καθαρότητας ≥ 99 %), ως δεύτερη επιλογή σε περίπτωση που η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν είναι διαλυτή ή δεν διασπείρεται σταθερώς στους δύο προηγούμενους διαλύτες/φορείς, σε τελικές συγκεντρώσεις 100 mg/ml (σε αλατούχο διάλυμα ή θρεπτικό μέσο) ή 500 mg/ml (σε DMSO). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι διαλύτες/φορείς, πέραν των όσων περιγράφονται ανωτέρω, εφόσον η χρήση τους τεκμηριώνεται επαρκώς επιστημονικά. Θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον τελικό διαλύτη/φορέα.

15. Ξεκινώντας από αποθεματικά διαλύματα των υπό δοκιμή χημικών ουσιών 100 mg/ml (σε αλατούχο διάλυμα ή θρεπτικό μέσο) ή 500 mg/ml (σε DMSO), γίνονται οι εξής αραιώσεις:

— για διαλύτη/φορέα αλατούχο διάλυμα ή θρεπτικό μέσο: παρασκευάζονται οκτώ αποθεματικά διαλύματα (οκτώ συγκεντρώσεις), με διαδοχικές αραιώσεις 2x με χρήση του αντίστοιχου διαλύτη/φορέα. Στη συνέχεια, αυτά τα αποθεματικά διαλύματα αραιώνονται περαιτέρω 50x σε θρεπτικό μέσο (διαλύματα εργασίας). Εάν η ανώτερη τελική συγκέντρωση στο τρυβλίο των 1 000 μg/ml είναι μη τοξική, η μέγιστη συγκέντρωση θα πρέπει να επαναπροσδιοριστεί με νέα δοκιμή κυτταροτοξικότητας. Η τελική συγκέντρωση στο τρυβλίο δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 5 000 μg/ml για υπό δοκιμή χημικές ουσίες διαλυμένες ή σταθερώς διεσπαρμένες σε αλατούχο διάλυμα ή θρεπτικό μέσο.

— για διαλύτη/φορέα DMSO: παρασκευάζονται οκτώ αποθεματικά διαλύματα (οκτώ συγκεντρώσεις), με διαδοχικές αραιώσεις 2x με χρήση του αντίστοιχου διαλύτη/φορέα. Στη συνέχεια, αυτά τα αποθεματικά διαλύματα αραιώνονται 250x σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (διαλύματα εργασίας). Η τελική συγκέντρωση στο τρυβλίο δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 1 000 μg/ml, ακόμη κι αν είναι μη τοξική.

Τα διαλύματα εργασίας χρησιμοποιούνται τελικά για την έκθεση, με προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος εργασίας στον όγκο του εναιωρήματος κυττάρων THP-1 στο τρυβλίο (βλ. επίσης παράγραφο 17) ώστε να πραγματοποιηθεί νέα αραίωση 2x (η τελική κλίμακα συγκεντρώσεων στο τρυβλίο είναι συνήθως 7,81–1 000 μg/ml).

16. Ο μάρτυρας με διαλύτη/φορέα που χρησιμοποιείται στη μέθοδο h-CLAT είναι θρεπτικό μέσο καλλιέργειας [για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες που διαλύονται ή διασπείρονται σταθερά (βλ. παράγραφο 4) είτε σε θρεπτικό μέσο είτε σε αλατούχο διάλυμα] ή DMSO (για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που διαλύονται ή διασπείρονται σταθερά σε DMSO) που υποβάλλεται σε δοκιμή σε μία τελική συγκέντρωση 0,2 % στο τρυβλίο. Υποβάλλεται στην ίδια αραίωση που περιγράφεται για τα διαλύματα εργασίας στην παράγραφο 15.

Εφαρμογή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων

17. Το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ή τα διαλύματα εργασίας που περιγράφονται στις παραγράφους 15 και 16 αναμιγνύονται 1:1 (κ.ό.) με τα εναιωρήματα κυττάρων που παρασκευάστηκαν στο τρυβλίο επίπεδης βάσης 24 ή 96 κοιλοτήτων (βλ. παράγραφο 12). Στη συνέχεια, τα υπό αγωγή τρυβλία επωάζονται επί 24±0,5 ώρες στους 37°C με 5 % CO_2. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για την αποφυγή της εξάτμισης των πτητικών υπό δοκιμή χημικών ουσιών, καθώς και της διασταυρούμενης μόλυνσης των μικροκοιλοτήτων από τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες, π.χ. με στεγανοποίηση του τρυβλίου πριν από την επώαση με τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες (20).

▼**M8**

Χρώση με ιωδιούχο προπίδιο (PI)

18. Μετά από 24±0,5 ώρες έκθεσης, τα κύτταρα μεταφέρονται στα σωληνάρια δειγμάτων και συλλέγονται μέσω φυγοκέντρησης. Τα υπερκείμενα υγρά απορρίπτονται και τα εναπομείναντα κύτταρα εναιωρούνται εκ νέου με 200 μl (στην περίπτωση του τρυβλίου 96 κοιλοτήτων) ή 600 μl (στην περίπτωση του τρυβλίου 24 κοιλοτήτων) φωσφορικού αλατούχου ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει 0,1 % αλβουμίνης βόειου ορού (ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης). 200 μl κυτταρικού εναιωρήματος μεταφέρονται σε τρυβλίο στρογγυλής βάσης 96 κοιλοτήτων (στην περίπτωση του τρυβλίου 96 κοιλοτήτων) ή σε μικροσωληνάριο (στην περίπτωση του τρυβλίου 24 κοιλοτήτων) και εκπλένονται δύο φορές με 200 μl (στην περίπτωση του τρυβλίου 96 κοιλοτήτων) ή 600 μl (στην περίπτωση του τρυβλίου 24 κοιλοτήτων) ρυθμιστικού διαλύματος χρώσης. Τέλος, τα κύτταρα εναιωρούνται εκ νέου σε ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης (π.χ. 400 μl) και προστίθεται διάλυμα PI (π.χ. 20 μl) (για παράδειγμα, η τελική συγκέντρωση του PI είναι 0,625 μg/ml). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι δείκτες κυτταροτοξικότητας, όπως 7-αμινοακτινομυκίνη D (7-AAD), κυανό του τρυπανίου ή άλλοι δείκτες, εάν μπορεί να αποδειχθεί ότι οι εναλλακτικές χρώσεις αποδίδουν παρεμφερή με το PI αποτελέσματα, για παράδειγμα μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας του προσαρτήματος 1.2.

Μέτρηση κυτταροτοξικότητας μέσω κυτταρομετρίας ροής και εκτίμηση της τιμής CV75

19. Η πρόσληψη του PI αναλύεται με χρήση κυτταρομετρίας ροής με τον δίαυλο καταγραφής FL-3. Καταγράφονται συνολικά 10 000 ζώντα κύτταρα (αρνητικά για PI). Η κυτταρική βιωσιμότητα μπορεί να υπολογίζεται με χρήση της ακόλουθης εξίσωσης από το πρόγραμμα ανάλυσης του κυτταρόμετρου. Όταν η κυτταρική βιωσιμότητα είναι χαμηλή, θα πρέπει να καταγράφονται έως 30 000 κύτταρα, περιλαμβανομένων των νεκρών κυττάρων. Εναλλακτικά, μπορούν να καταγράφονται δεδομένα επί ένα λεπτό μετά την έναρξη της ανάλυσης.

$$\textit{βιωσιμότητα} = \frac{\textit{αριθμός ζωντανών κυττάρων}}{\textit{συνολικός αριθμός μετρηθέντων κυττάρων}} \times 100$$

Η τιμή CV75 (βλ. παράγραφο 13), δηλαδή η συγκέντρωση από την οποία προκύπτει 75 % επιβίωση κυττάρων THP-1 (25 % κυτταροτοξικότητα), υπολογίζεται μέσω λογαριθμικής-γραμμικής παρεκβολής με χρήση της ακόλουθης εξίσωσης:

$$Log\ CV75 = \frac{(75 - c) \times Log(b) - (75 - a) \times Log(d)}{a - c}$$

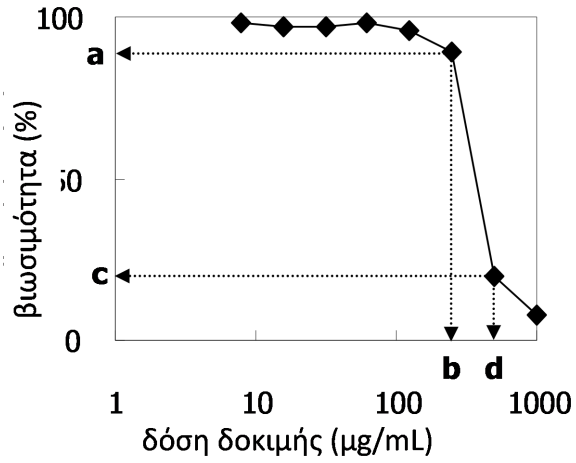
όπου:

a είναι η ελάχιστη τιμή κυτταρικής βιωσιμότητας άνω του 75 %

c είναι η μέγιστη τιμή κυτταρικής βιωσιμότητας κάτω του 75 %

b και d είναι οι συγκεντρώσεις που εμφανίζουν την τιμή κυτταρικής βιωσιμότητας a και c αντίστοιχα

▼**M8**



Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες προσεγγίσεις για τον υπολογισμό της τιμής CV75, εφόσον αποδεικνύεται ότι δεν έχουν επιπτώσεις στα αποτελέσματα (π.χ. μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας).

Μέτρηση έκφρασης των CD86/CD54

Παρασκευή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων

20. Χρησιμοποιείται ο κατάλληλος διαλύτης/φορέας (αλατούχο διάλυμα, θρεπτικό μέσο ή DMSO, βλ. παράγραφο 14) για τη διάλυση ή τη σταθερή διασπορά των υπό δοκιμή χημικών ουσιών. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες αραιώνονται πρώτα στη συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο 100πλάσιο (για αλατούχο διάλυμα ή θρεπτικό μέσο) ή το 500πλάσιο (για DMSO) της τιμής 1,2 × CV75 που προσδιορίστηκε στη δοκιμασία προσδιορισμού δόσης (βλ. παράγραφο 19). Εάν δεν είναι εφικτός ο προσδιορισμός της τιμής CV75 (εάν δηλαδή δεν παρατηρείται επαρκής κυτταροτοξικότητα στη δοκιμασία προσδιορισμού δόσης), ως αρχική συγκέντρωση θα πρέπει να χρησιμοποιείται η υψηλότερη διαλυτή ή σταθερώς διασπειρόμενη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που παρασκευάζεται με κάθε διαλύτη/φορέα. Επισημαίνεται ότι η τελική συγκέντρωση στο τρυβλίο δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 5 000 μg/ml (σε περίπτωση αλατούχου διαλύματος ή θρεπτικού μέσου) ή τα 1 000 μg/ml (σε περίπτωση DMSO). Στη συνέχεια πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις 1,2x με χρήση του αντίστοιχου διαλύτη/φορέα προκειμένου να σχηματιστούν τα αποθεματικά διαλύματα [οκτώ συγκεντρώσεις από 100×1,2 × CV75 έως 100×0,335 × CV75 (για αλατούχο διάλυμα ή θρεπτικό μέσο) ή από 500×1,2 × CV75 έως 500×0,335 × CV75 (για DMSO)] που θα υποβληθούν σε δοκιμή με τη μέθοδο h-CLAT (βλ. πρωτόκολλο DB-ALM αριθ. 158 για ένα παράδειγμα δοσολογικού σχήματος). Στη συνέχεια, τα αποθεματικά διαλύματα αραιώνονται περαιτέρω 50x (για αλατούχο διάλυμα ή θρεπτικό μέσο) ή 250x (για DMSO) στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (διαλύματα εργασίας). Αυτά τα διαλύματα εργασίας χρησιμοποιούνται τελικά για την έκθεση με έναν περαιτέρω τελικό συντελεστή αραίωσης 2x στο τρυβλίο. Εάν τα αποτελέσματα δεν πληρούν τα κριτήρια αποδοχής που περιγράφονται στις παραγράφους 29 και 30 αναφορικά με την κυτταρική βιωσιμότητα, η δοκιμασία προσδιορισμού δόσης μπορεί να επαναληφθεί για τον προσδιορισμό της τιμής CV75 με μεγαλύτερη ακρίβεια. Επισημαίνεται ότι για τη μέτρηση της έκφρασης των CD86/CD54 μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο τρυβλία 24 κοιλοτήτων.

21. Ο μάρτυρας με διαλύτη/φορέα παρασκευάζεται σύμφωνα με τα όσα περιγράφονται στην παράγραφο 16. Ο θετικός μάρτυρας που χρησιμοποιείται στη μέθοδο h-CLAT είναι το DNCB (βλ. παράγραφο 11), για τον οποίο παρασκευάζονται αποθεματικά διαλύματα σε DMSO, τα οποία αραιώνονται σύμφωνα με τα όσα περιγράφονται στην παράγραφο 20. Το DNCB θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας για τη μέτρηση της έκφρασης των CD86/CD54 σε μία τελική συγκέντρωση στο τρυβλίο (συνήθως 4,0 μg/ml). Για την επίτευξη συγκέντρωσης DNCB 4,0 μg/ml στο τρυβλίο,

▼M8

παρασκευάζεται αποθεματικό διάλυμα DNCB 2 mg/ml σε DMSO, το οποίο αραιώνεται περαιτέρω 250x με θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ώστε να προκύψει διάλυμα εργασίας 8 μg/ml. Εναλλακτικά, η τιμή CV75 του DNCB, η οποία προσδιορίζεται σε κάθε εγκατάσταση δοκιμών, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως η συγκέντρωση θετικού μάρτυρα. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι κατάλληλοι θετικοί μάρτυρες, εάν υπάρχουν διαθέσιμα ιστορικά δεδομένα από τα οποία μπορούν να προκύψουν συγκρίσιμα κριτήρια αποδοχής σειρών δοκιμών. Για τους θετικούς μάρτυρες, η τελική συγκέντρωση στο τρυβλίο δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 5 000 μg/ml (σε περίπτωση αλατούχου διαλύματος ή θρεπτικού μέσου) ή τα 1 000 μg/ml (σε περίπτωση DMSO). Τα κριτήρια αποδοχής σειρών δοκιμών είναι τα ίδια με τα κριτήρια που περιγράφονται για την υπό δοκιμή χημική ουσία (βλ. παράγραφο 29), με εξαίρεση το τελευταίο κριτήριο αποδοχής, δεδομένου ότι ο θετικός μάρτυρας υποβάλλεται σε δοκιμή σε μία μοναδική συγκέντρωση.

Εφαρμογή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων

22. Για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία και μάρτυρα, για την επίτευξη πρόβλεψης απαιτείται η διεξαγωγή ενός πειράματος. Κάθε πείραμα περιλαμβάνει τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες σειρές δοκιμών για τη μέτρηση της έκφρασης των CD86/CD54 (βλ. παραγράφους 26-28). Κάθε ανεξάρτητη σειρά δοκιμών διεξάγεται σε διαφορετική ημέρα, ή την ίδια ημέρα υπό την προϋπόθεση ότι για κάθε σειρά δοκιμών: α) παρασκευάζονται ανεξάρτητα πρόσφατα αποθεματικά διαλύματα και διαλύματα εργασίας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και διαλύματα αντισωμάτων, και β) χρησιμοποιούνται ανεξαρτήτως συλλεχθέντα κύτταρα (δηλ. τα κύτταρα συλλέγονται από διαφορετικές φιάλες καλλιέργειας)· ωστόσο, τα κύτταρα μπορούν να προέρχονται από την ίδια ανακαλλιέργεια. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες και οι μάρτυρες που παρασκευάζονται ως διαλύματα εργασίας (500 μl) αναμιγνύονται με 500 μl εναιωρηθέντων κυττάρων ($1x10^6$ κύτταρα) σε αναλογία 1:1, και τα κύτταρα επωάζονται επί 24±0,5 ώρες, σύμφωνα με τα όσα περιγράφονται στις παραγράφους 20 και 21. Σε κάθε σειρά δοκιμών αρκεί μία μοναδική δοκιμή για κάθε συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και του μάρτυρα, αφού μια πρόβλεψη λαμβάνεται από τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες σειρές δοκιμών.

Χρώση και ανάλυση κυττάρων

23. Μετά από 24±0,5 ώρες έκθεσης, τα κύτταρα μεταφέρονται από το τρυβλίο 24 κοιλοτήτων σε σωληνάρια δειγμάτων, συλλέγονται με φυγοκέντρηση και, στη συνέχεια, εκπλένονται δύο φορές με 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος χρώσης (μπορούν να γίνουν και άλλες πλύσεις εάν χρειάζεται). Μετά την έκπλυση, τα κύτταρα παρεμποδίζονται με 600 μl παρεμποδιστικού διαλύματος [ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης που περιέχει 0,01 % κ.ό. σφαιρίνη (κλάσμα Cohn II, III, ανθρώπινο, SIGMA, #G2388-10G ή ισοδύναμο)] και επωάζονται στους 4°C επί 15 λεπτά. Μετά την παρεμπόδιση, τα κύτταρα διαχωρίζονται σε τρία κλάσματα 180 μl σε τρυβλίο στρογγυλής βάσης 96 κοιλοτήτων ή μικροσωληνάριο.

24. Μετά τη φυγοκέντρηση, πραγματοποιείται χρώση των κυττάρων με 50 μl σημασμένου με FITC αντισώματος αντι-CD86 ή αντι-CD54 ή αντισώματος ποντικού IgG1 (ισοτύπου) στους 4°C επί 30 λεπτά. Τα αντισώματα που περιγράφονται στο πρωτόκολλο h-CLAT DB-ALM αριθ. 158 (18) θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μετά από αραίωση 3:25 κ.ό. [γιατον CD86 (BD-Pharmingen, #555657, κλώνος: Fun-1)] ή 3:50 κ.ό. [για τον CD54 (DAKO, #F7143, κλώνος: 6.5B5) και το IgG1 (DAKO, #X0927)] με ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης. Οι εν λόγω συντελεστές αραίωσης αντισωμάτων καθορίστηκαν από τους φορείς ανάπτυξης της δοκιμής ως οι συντελεστές που παρέχουν τον βέλτιστο λόγο σήματος προς θόρυβο. Με βάση την εμπειρία των φορέων ανάπτυξης της δοκιμής, η ένταση του φθορισμού των αντισωμάτων είναι συνήθως παρεμφερής μεταξύ των διαφόρων παρτίδων. Ωστόσο, οι χρήστες μπορούν να εξετάσουν το ενδεχόμενο να τιτλοδοτήσουν τα αντισώματα υπό τις συνθήκες του δικού τους εργαστηρίου προκειμένου να καθορίσουν τις βέλτιστες συγκεντρώσεις προς χρήση. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα σημασμένα με φθοριοχρώματα αντισώματα αντι-CD86 και/ή αντι-CD54, εφόσον μπορεί να αποδειχθεί ότι αποδίδουν ανάλογα αποτελέσματα με αυτά των συζευγμένων με FITC αντισωμάτων, για παράδειγμα, μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας του προσαρτήματος 1.2. Πρέπει να σημειωθεί ότι η αλλαγή του κλώνου ή του προμηθευτή των

▼M8

αντισωμάτων, όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο h-CLAT DB-ALM αριθ. 158 (18), μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα. Αφού εκπλυθούν δύο φορές με 150 μl ρυθμιστικού διαλύματος χρώσης, τα κύτταρα εναιωρούνται εκ νέου σε ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης (π.χ. 400 μl) και προστίθεται το διάλυμα PI (π.χ. 20 μl για την επίτευξη τελικής συγκέντρωσης 0,625 μg/ml) ή άλλο διάλυμα δείκτη κυτταροτοξικότητας (βλ. παράγραφος 18). Τα επίπεδα έκφρασης των CD86 και CD54 αναλύονται με χρήση κυτταρομετρίας ροής.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αξιολόγηση των δεδομένων

25. Η έκφραση των CD86 και CD54 αναλύεται με κυτταρομετρία ροής με τον δίαυλο καταγραφής FL-1. Με βάση τον γεωμετρικό μέσο όρο έντασης φθορισμού (MFI), υπολογίζεται η σχετική ένταση φθορισμού (RFI) των CD86 και CD54 για τα κύτταρα θετικού μάρτυρα (ctrl) και τα υπό αγωγή με τη χημική ουσία κύτταρα σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

$$RFI = \frac{MFI\ κυττάρων\ υπό\ αγωγή - MFI\ κυττάρων\ ισοτυπικού\ μάρτυρα\ υπό\ αγωγή}{MFI\ κυττάρων/μάρτυρα\ φορέα/διαλύτη - MFI\ κυττάρων/ισοτυπικού\ μάρτυρα\ φορέα/διαλύτη} \times 100$$

Η κυτταρική βιωσιμότητα από τα κύτταρα ισοτυπικού μάρτυρα (ctrl) [που υποβάλλονται σε χρώση με αντισώματα IgG1 (ισοτύπου) ποντικού] υπολογίζεται επίσης σύμφωνα με την εξίσωση που περιγράφεται στην παράγραφο 19.

Μοντέλο πρόβλεψης

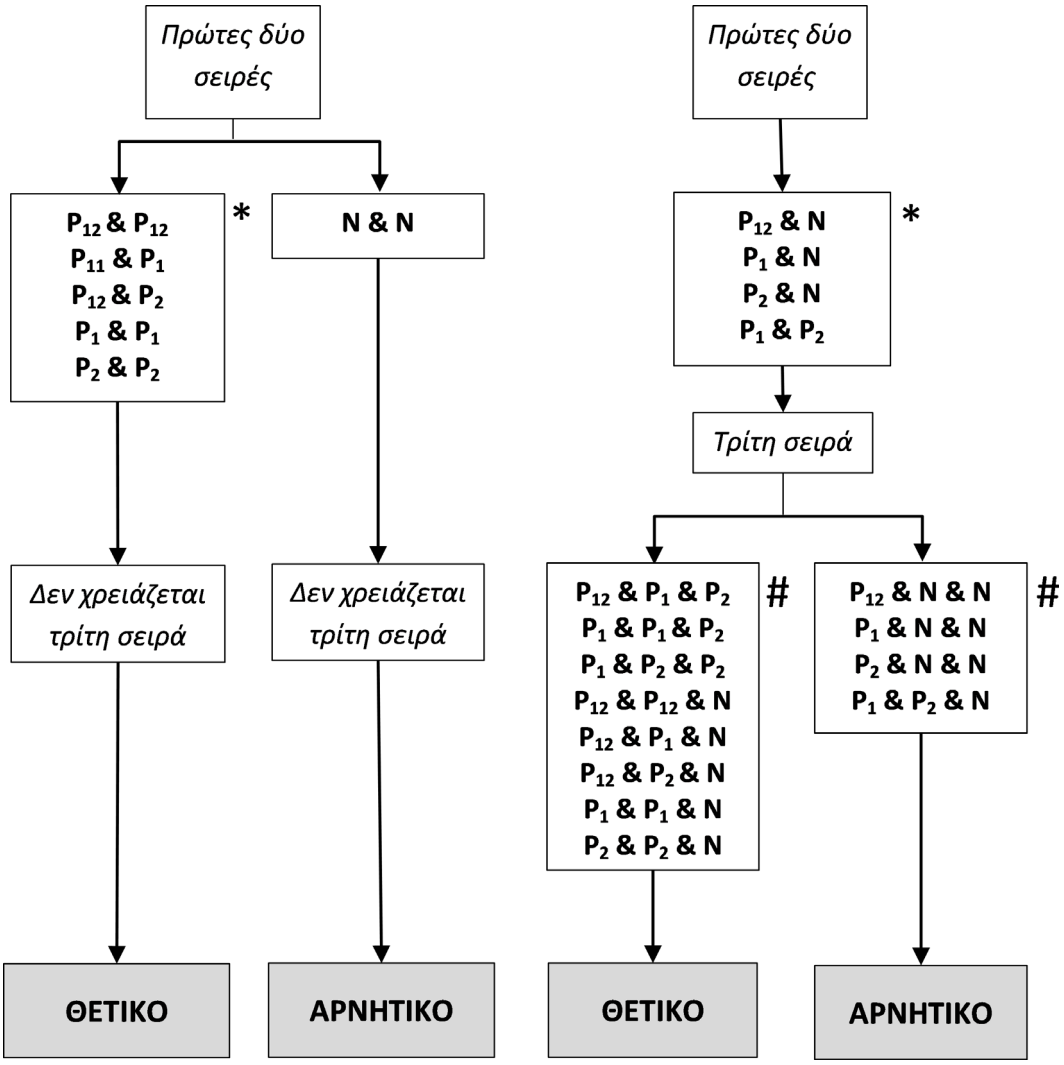
26. Για τη μέτρηση της έκφρασης των CD86/CD54, κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία ελέγχεται σε τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες σειρές δοκιμών για να προκύψει μία συγκεκριμένη πρόβλεψη (ΘΕΤΙΚΗ ή ΑΡΝΗΤΙΚΗ). Μια πρόβλεψη h-CLAT θεωρείται ΘΕΤΙΚΗ εφόσον πληρούται τουλάχιστον μία από τις ακόλουθες προϋποθέσεις σε 2 από 2 ή τουλάχιστον σε 2 από 3 ανεξάρτητες σειρές δοκιμών, διαφορετικά η πρόβλεψη h-CLAT θεωρείται ΑΡΝΗΤΙΚΗ (σχήμα 1):

— η RFI του CD86 είναι ίση ή μεγαλύτερη από 150 % σε οποιαδήποτε ελεγχθείσα συγκέντρωση (με κυτταρική βιωσιμότητα ≥ 50 %),

— η RFI του CD54 είναι ίση ή μεγαλύτερη από 200 % σε οποιαδήποτε ελεγχθείσα συγκέντρωση (με κυτταρική βιωσιμότητα ≥ 50 %).

27. Με βάση τα παραπάνω, εάν οι πρώτες δύο σειρές δοκιμών είναι αμφότερες θετικές για τον CD54 και/ή είναι αμφότερες θετικές για τον CD54, η πρόβλεψη h-CLAT θεωρείται ΘΕΤΙΚΗ και δεν χρειάζεται τρίτη σειρά δοκιμών. Παρομοίως, εάν οι πρώτες δύο σειρές δοκιμών είναι αρνητικές και για τους δύο δείκτες, η πρόβλεψη h-CLAT θεωρείται ΑΡΝΗΤΙΚΗ (λαμβανομένων δεόντως υπόψη των πληροφοριών στην παράγραφο 30) χωρίς να χρειάζεται τρίτη σειρά δοκιμών. Εάν, ωστόσο, οι δύο πρώτες σειρές δοκιμών δε συμφωνούν για τουλάχιστον έναν από τους δείκτες (CD54 ή CD86), τότε χρειάζεται τρίτη σειρά δοκιμών και η τελική πρόβλεψη προκύπτει κατά πλειοψηφία (2 στις 3). Από αυτή την άποψη, θα πρέπει να επισημανθεί ότι εάν διεξάγονται δύο ανεξάρτητες σειρές δοκιμών, εκ των οποίων η μία είναι θετική μόνο για τον CD86 (στο εξής αναφερόμενη ως P_1) και η άλλη είναι θετική μόνο για τον CD54 (στο εξής αναφερόμενη ως P_2), απαιτείται η διεξαγωγή τρίτης σειράς δοκιμών. Εάν η εν λόγω τρίτη σειρά δοκιμών είναι αρνητική και για τους δύο δείκτες (στο εξής αναφερόμενη ως N), η πρόβλεψη h-CLAT θεωρείται ΑΡΝΗΤΙΚΗ. Από την άλλη πλευρά, εάν η τρίτη σειρά δοκιμών είναι θετική για οποιονδήποτε από τους δύο δείκτες (P_1 ή P_2) ή και για τους δύο δείκτες (στο εξής αναφερόμενη ως P_{12}), η πρόβλεψη h-CLAT θεωρείται ΘΕΤΙΚΗ.

▼**M8**



Σχήμα 1: Μοντέλο πρόβλεψης που χρησιμοποιείται στη μέθοδο h-CLAT. Οι προβλέψεις βάσει της μεθόδου h-CLAT θα πρέπει να εξετάζονται στο πλαίσιο IATA και σύμφωνα με τις πληροφορίες στις παραγράφους 7 και 8 της γενικής εισαγωγής.

P_1: σειρά δοκιμών με θετικό μόνο τον CD86· P_2: σειρά δοκιμών με θετικό μόνο τον CD54· P_{12}: σειρά δοκιμών με θετικούς αμφότερους τους CD86 και CD54· N: σειρά δοκιμών χωρίς θετικό ούτε τον CD86 ούτε τον CD54.

* Σε αυτά τα πλαίσια παρουσιάζονται οι σχετικοί συνδυασμοί αποτελεσμάτων από τις δύο πρώτες σειρές δοκιμών, ανεξαρτήτως της σειράς με την οποία μπορεί να λαμβάνονται.

Σε αυτά τα πλαίσια παρουσιάζονται οι σχετικοί συνδυασμοί αποτελεσμάτων από τις τρεις σειρές δοκιμών με βάση τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τις δύο πρώτες σειρές δοκιμών που παρουσιάζονται στο προηγούμενο πλαίσιο, χωρίς, ωστόσο, να αντικατοπτρίζουν τη σειρά με την οποία μπορεί να λαμβάνονται.

28. Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες για τις οποίες η πρόβλεψη είναι ΘΕΤΙΚΗ με την h-CLAT, μπορούν να προσδιορίζονται, προαιρετικά, δύο τιμές αποτελεσματικών συγκεντρώσεων (EC), η τιμή EC150 για τον CD86 και η τιμή EC200 για τον CD54, δηλ. η συγκέντρωση στην οποία οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες επήγαγαν RFI 150 ή 200. Οι εν λόγω τιμές EC μπορούν δυνητικά να συμβάλουν στην εκτίμηση της ευαισθητοποιητικής ισχύος (9) όταν χρησιμοποιούνται σε ολοκληρωμένες προσεγγίσεις, όπως οι IATA (4) (5) (6) (7) (8). Μπορούν να υπολογιστούν βάσει των ακόλουθων εξισώσεων:

▼M8

$$EC\ 150\ (for\ CD86) = B_{conc} + [(150 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

$$EC\ 200\ (for\ CD86) = B_{conc} + [(200 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

όπου:

A_{conc} είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση σε μg/ml με RFI > 150 (CD86) ή 200 (CD54)

B_{conc} είναι η υψηλότερη συγκέντρωση σε μg/ml με RFI > 150 (CD86) ή 200 (CD54)

A_{RFI} είναι η RFI στη χαμηλότερη συγκέντρωση με RFI > 150 (CD86) ή 200 (CD54)

B_{RFI} είναι η RFI στην υψηλότερη συγκέντρωση με RFI < 150 (CD86) ή 200 (CD54)

Για τον υπολογισμό των τιμών των EC150 και EC200 με μεγαλύτερη ακρίβεια, ενδέχεται να απαιτείται η διεξαγωγή τριών ανεξάρτητων σειρών δοκιμών για τη μέτρηση της έκφρασης των CD86/CD54. Στη συνέχεια, οι τελικές τιμές EC150 και EC200 προσδιορίζονται ως η διάμεση τιμή των EC που υπολογίστηκαν από τις τρεις ανεξάρτητες σειρές δοκιμών. Σε περίπτωση που μόνο δύο από τις τρεις ανεξάρτητες σειρές δοκιμών πληρούν τα κριτήρια θετικότητας (βλ. παραγράφους 26-27), υιοθετείται η υψηλότερη EC150 ή EC200 από τις δύο υπολογισθείσες τιμές.

Κριτήρια αποδοχής

29. Όταν χρησιμοποιείται η μέθοδος h-CLAT, θα πρέπει να πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια αποδοχής (22) (27).

— Οι κυτταρικές βιωσιμότητες του θρεπτικού μέσου και των μαρτύρων με διαλύτη/φορέα θα πρέπει να υπερβαίνουν το 90 %.

— Στον μάρτυρα με διαλύτη/φορέα, οι τιμές RFI αμφότερων των CD86 και CD54 δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν τα κριτήρια χαρακτηρισμού ως θετικών (CD86 RFI ≥ 150 % και CD54 RFI ≥ 200 %). Οι τιμές RFI του μάρτυρα με διαλύτη/φορέα υπολογίζονται με χρήση του τύπου που περιγράφεται στην παράγραφο 25 [το «MFI χημικής ουσίας» θα πρέπει να αντικατασταθεί από το «MFI διαλύτη/φορέα», και το «MFI διαλύτη/φορέα» θα πρέπει να αντικατασταθεί από το «MFI μάρτυρα (θρεπτικού μέσου)»].

— Για τους μάρτυρες θρεπτικού μέσου και διαλύτη/φορέα, ο λόγος MFI τόσο του CD86 όσο και του CD54 προς τον ισοτυπικό μάρτυρα θα πρέπει να είναι > 105 %.

— Στον θετικό μάρτυρα (DNCB), οι τιμές RFI για τους CD86 και CD54 θα πρέπει να πληρούν τα κριτήρια θετικότητας (CD86 RFI ≥ 150 και CD54 RFI ≥ 200), και η κυτταρική βιωσιμότητα θα πρέπει να υπερβαίνει το 50 %.

— Για την υπό δοκιμή χημική ουσία, η κυτταρική βιωσιμότητα θα πρέπει να υπερβαίνει το 50 % σε τουλάχιστον τέσσερις ελεγχθείσες συγκεντρώσεις σε κάθε σειρά δοκιμών.

30. Αρνητικά αποτελέσματα είναι αποδεκτά μόνο για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες που παρουσιάζουν κυτταρική βιωσιμότητα κάτω από 90 % στην υψηλότερη ελεγχθείσα συγκέντρωση (δηλ. 1,2 × CV75, σύμφωνα με το σχήμα διαδοχικών αραιώσεων που περιγράφεται στην παράγραφο 20). Εάν η κυτταρική βιωσιμότητα σε 1,2 × CV75 είναι ίση ή μεγαλύτερη από 90 %, το αρνητικό αποτέλεσμα θα πρέπει να απορρίπτεται. Σε αυτή την περίπτωση, συνιστάται η βελτιστοποίηση των επιλεγμένων δόσεων μέσω επανάληψης του προσδιορισμού της CV75. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι όταν ως μέγιστη συγκέντρωση δοκιμής μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας χρησιμοποιούνται τα 5 000 μg/ml σε αλατούχο διάλυμα (ή σε θρεπτικό μέσο ή άλλους διαλύτες/φορείς), τα 1 000 μg/ml σε DMSO ή η υψηλότερη διαλυτή συγκέντρωση, ένα αρνητικό αποτέλεσμα είναι αποδεκτό ακόμη κι αν η κυτταρική βιωσιμότητα υπερβαίνει το 90 %.

▼M8

Έκθεση δοκιμής

31. Στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται τα ακόλουθα στοιχεία.

Υπό δοκιμή χημική ουσία

Μονοσυστατική ουσία

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία,

— φυσική εμφάνιση, Log Kow, υδατοδιαλυτότητα, διαλυτότητα σε DMSO, μοριακό βάρος και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

— κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),

— ελεγχθείσα συγκέντρωση/-εις,

— συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη/φορέα για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία.

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγμα

— χαρακτηρισμός, στο μέτρο του δυνατού, π.χ. χημική ταυτότητα (βλ. ανωτέρω), καθαρότητα, ποσότητα και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες (βλ. ανωτέρω) των συστατικών, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα, διαλυτότητα σε DMSO και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— μοριακό βάρος ή φαινόμενο μοριακό βάρος στην περίπτωση των μειγμάτων/πολυμερών γνωστής σύνθεσης ή άλλες πληροφορίες που έχουν σημασία για τη διεξαγωγή της μελέτης,

— κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),

— ελεγχθείσα συγκέντρωση/-εις,

— συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη/φορέα για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία.

Έλεγχοι

Θετικός μάρτυρας

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία,

— φυσική εμφάνιση, Log K_{ow}, υδατοδιαλυτότητα, διαλυτότητα σε DMSO, μοριακό βάρος και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, στο μέτρο του δυνατού και ανάλογα με την περίπτωση,

— καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

▼**M8**

— κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),

— ελεγχθείσα συγκέντρωση/-εις,

— συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— παραπομπή σε ιστορικά αποτελέσματα θετικών μαρτύρων που καταδεικνύουν την εφαρμογή κατάλληλων κριτηρίων αποδοχής των μετρήσεων, εάν ισχύει.

Αρνητικός μάρτυρας και μάρτυρας με διαλύτη/φορέα

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία,

— καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

— φυσική εμφάνιση, μοριακό βάρος, καθώς και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, σε περίπτωση χρήσης άλλου διαλύτη/φορέα εκτός εκείνων που αναφέρονται στην κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών και εφόσον είναι διαθέσιμα,

— συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη/φορέα για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία.

Συνθήκες δοκιμής

— όνομα και διεύθυνση του χορηγού, της εγκατάστασης δοκιμών και του διευθυντή της μελέτης,

— περιγραφή της χρησιμοποιηθείσας δοκιμής,

— κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε, συνθήκες φύλαξης και προέλευσή της (π.χ. εγκατάσταση προέλευσης),

— χρησιμοποιηθείσα μέθοδος κυτταρομετρίας ροής (π.χ. μοντέλο), περιλαμβανομένων των χρησιμοποιηθέντων οργάνων, σφαιρίνης, αντισωμάτων και δεικτών κυτταροτοξικότητας,

— η διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε για να αποδειχθεί η τεχνική ικανότητα του εργαστηρίου να διεξάγει τη δοκιμή μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας, και η διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε για να αποδειχθεί η διαχρονική αναπαραγωγιμότητα της διεξαγωγής της δοκιμής, π.χ. ιστορικά δεδομένα για μάρτυρες και/ή ιστορικά δεδομένα ελέγχων δραστικότητας.

Κριτήρια αποδοχής της δοκιμής

— κυτταρική βιωσιμότητα, τιμές MFI και RFI που ελήφθησαν με τον μάρτυρα με διαλύτη/φορέα σε σύγκριση με τα αποδεκτά πεδία τιμών,

— κυτταρική βιωσιμότητα και τιμές RFI που ελήφθησαν με τον θετικό μάρτυρα σε σύγκριση με τα αποδεκτά πεδία τιμών,

— κυτταρική βιωσιμότητα όλων των ελεγχθεισών συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

▼**M8**

Διαδικασία δοκιμής

— αριθμός σειρών δοκιμών που χρησιμοποιήθηκαν,

— συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, χρόνος εφαρμογής και έκθεσης που χρησιμοποιήθηκε (εάν διαφέρει από τον συνιστώμενο),

— περιγραφή των χρησιμοποιούμενων κριτηρίων αξιολόγησης και λήψης αποφάσεων,

— περιγραφή τυχόν τροποποιήσεων της διαδικασίας δοκιμής.

Αποτελέσματα

— δεδομένα υπό μορφή πίνακα, περιλαμβανομένης της CV75 (κατά περίπτωση), των επιμέρους γεωμετρικών τιμών MFI, RFI, των τιμών κυτταρικής βιωσιμότητας, των τιμών EC150/EC200 (κατά περίπτωση) που υπολογίστηκαν για την υπό δοκιμή χημική ουσία και για τον θετικό μάρτυρα σε κάθε σειρά δοκιμών, και ένδειξη της κατάταξης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σύμφωνα με το μοντέλο πρόβλεψης,

— περιγραφή κάθε άλλης σχετικής παρατήρησης, κατά περίπτωση.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

— εξέταση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν με τη μέθοδο δοκιμών h-CLAT,

— εξέταση των αποτελεσμάτων δοκιμής στο πλαίσιο της IATA, εάν υπάρχουν σχετικές πληροφορίες.

Συμπεράσματα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006). Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. Toxicol. *In Vitro* 20, 767-773.

(2) Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. Toxicol. *In Vitro* 21, 428-437.

(3) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

(4) Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. J Appl Toxicol. 35, 1318-1332.

(5) Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. J Appl Toxicol. 35, 1333-1347.

(6) Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potencials. Regul Toxicol Parmacol. 63, 489-504.

▼**M8**

(7) Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol. 69, 371-379.

(8) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Parmacol. 71, 337-351.

(9) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. Arch Toxicol. 89, 2355-2383.

(10) Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. J Appl Toxicol. DOI 10.1002/jat.3281.

(11) Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. Toxicol. *In Vitro* 26, 1150-60.

(12) EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Διαθέσιμο στη διεύθυνση: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing

(13) EC EURL ECVAM (2012). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report Accessible at: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

(14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. J. Toxicol. Sci. 38, 599-609.

(15) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. Sci. 38, 275-284.

(16) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch Toxicol 87, 1683-1969.

(17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6^{th} report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81-88.

(18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

▼**M8**

(19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamato K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70-82.

(20) Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, , Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89-96.

(21) OECD (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France, 2005, 96 pp.

(22) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Μέρος 1: Series on Testing and Assessment No. Series on Testing and Assessment No 168. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/ MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En

(23) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).

(25) Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27-35.

▼**M8**

Προσάρτημα 1.1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ορθότητα: ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της δοκιμής και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί κριτήριο επιδόσεων της δοκιμής και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς τη «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας δοκιμής (21).

AOP (Adverse Outcome Pathway): πορεία δυσμενούς έκβασης: αλληλουχία συμβάντων, από τη χημική δομή της στοχευόμενης χημικής ουσίας ή ομάδας ομοειδών χημικών ουσιών και το μοριακό εναρκτήριο συμβάν μέχρι την εξεταζόμενη έκβαση *in vivo* (22).

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

CV75: η εκτιμώμενη συγκέντρωση που παρουσιάζει κυτταρική βιωσιμότητα 75 %.

EC150: οι συγκεντρώσεις που παρουσιάζουν την τιμή RFI 150 για την έκφραση του CD86

EC200: οι συγκεντρώσεις που παρουσιάζουν την τιμή RFI 200 για την έκφραση του CD54

Κυτταρομετρία ροής: κυτταρομετρική τεχνική κατά την οποία κύτταρα εναιωρημένα εντός υγρού διασχίζουν ένα-ένα την εστία μιας φωτεινής δέσμης διέγερσης, η οποία σκεδάζεται με τρόπους χαρακτηριστικούς των κυττάρων και των συστατικών τους· τα κύτταρα σημαίνονται συχνά με φθορίζοντες δείκτες οι οποίοι πρώτα απορροφούν και κατόπιν επανεκπέμπουν το φως σε διαφορετική συχνότητα.

Επικινδυνότητα: εγγενής ιδιότητα ενός παράγοντα ή μιας κατάστασης που μπορεί να έχει δυσμενείς επιδράσεις όταν ένας οργανισμός, ένα σύστημα ή ένας (υπο)πληθυσμός εκτίθεται στον παράγοντα.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment): ολοκληρωμένη προσέγγιση για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση: δομημένη προσέγγιση που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της επικινδυνότητας (δυναμικό), τον χαρακτηρισμό της επικινδυνότητας (ισχύς) και/ή την εκτίμηση της ασφάλειας (δυναμικό/ισχύς και έκθεση) μιας χημικής ουσίας ή ομάδας χημικών ουσιών, στην οποία ενσωματώνονται και σταθμίζονται στρατηγικά όλα τα σχετικά δεδομένα, με σκοπό την τροφοδότηση κανονιστικών αποφάσεων σχετικά με τη δυνητική επικινδυνότητα και/ή τον κίνδυνο και/ή την ανάγκη για περαιτέρω στοχευμένες και, ως εκ τούτου, ελάχιστες δοκιμές.

Μάρτυρας θρεπτικού μέσου: πανομοιότυπο δείγμα που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και δεν υποβάλλεται σε αγωγή. Το δείγμα αυτό υποβάλλεται σε δοκιμή μαζί με τα δείγματα που έχουν υποβληθεί σε αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία και με άλλα δείγματα μάρτυρες, ούτως ώστε να διαπιστώνεται αν ο διαλύτης/φορέας αλληλεπιδρά με το σύστημα δοκιμής.

Μείγμα: ένα μείγμα ή διάλυμα που αποτελείται από δύο ή περισσότερες ουσίες.

Μονοσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας ένα κύριο συστατικό περιέχεται σε ποσοστό τουλάχιστον 80 % κ.β.

Πολυσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας περισσότερα από ένα κύρια συστατικά περιέχονται σε συγκέντρωση ≥ 10 % κ.β. και < 80 % κ.β. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα μεταποιητικών διεργασιών. Η διαφορά μεταξύ μείγματος και πολυσυστατικής ουσίας είναι ότι το μείγμα λαμβάνεται με ανάμειξη δύο ή περισσότερων ουσιών, χωρίς χημική αντίδραση. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα χημικών αντιδράσεων.

▼M8

Θετικός μάρτυρας: πανομοιότυπο δείγμα που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και υποβάλλεται σε αγωγή με ουσία που είναι γνωστό ότι προκαλεί θετική απόκριση. Για να διασφαλίζεται η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας της απόκρισης του θετικού μάρτυρα σε συνάρτηση με τον χρόνο, το μέγεθος της θετικής απόκρισης δεν θα πρέπει να είναι υπερβολικό.

Αβιοτικά προαπτένια: χημικές ουσίες που καθίστανται ευαισθητοποιητικές μέσω αβιοτικού μετασχηματισμού.

Μεταβολικά προαπτένια: χημικές ουσίες που χρειάζονται ενζυμική ενεργοποίηση για να εκδηλώσουν το δυναμικό δερματικής ευαισθητοποίησής τους.

Σχετική ένταση φθορισμού (RFI): οι σχετικές τιμές του γεωμετρικού μέσου όρου έντασης φθορισμού (MFI) σε κύτταρα που υποβάλλονται σε αγωγή σε με υπό δοκιμή χημική ουσία σε σύγκριση με την MFI σε κύτταρα που υποβάλλονται σε αγωγή με διαλύτη/φορέα.

Καταλληλότητα: περιγραφή της σχέσης της δοκιμής με την υπό μελέτη επίδραση και του κατά πόσον αυτή είναι αρμόζουσα και χρήσιμη για συγκεκριμένο σκοπό. Πρόκειται για τον βαθμό στον οποίο η δοκιμή μετρά ή προβλέπει σωστά τη βιολογική επίδραση υπό μελέτη. Η καταλληλότητα εμπεριέχει συνεκτίμηση της ορθότητας (συμφωνίας) της δοκιμής (21).

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια δοκιμή μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, καθώς και της ενδοεργαστηριακής επαναληψιμότητας (21).

Σειρά δοκιμών: η σειρά περιλαμβάνει μία ή περισσότερες υπό δοκιμή χημικές ουσίες που υποβάλλονται σε δοκιμή ταυτόχρονα με μάρτυρα με διαλύτη/φορέα και θετικό μάρτυρα.

Ευαισθησία: το ποσοστό του συνόλου των θετικών/δραστικών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, και είναι σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των δοκιμών (21).

Ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης: αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων που περιέχει 0,1 % αλβουμίνη βόειου ορού.

Μάρτυρας με διαλύτη/φορέα: δείγμα που δεν υποβάλλεται σε αγωγή και περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής, εκτός της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, αλλά περιλαμβανομένου του διαλύτη/φορέα που χρησιμοποιείται. Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της βασικής απόκρισης των δειγμάτων που υποβάλλονται σε αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία διαλυμένη ή σταθερώς διεσπαρμένη στον ίδιο διαλύτη/φορέα. Όταν το εν λόγω δείγμα υποβάλλεται σε δοκιμή με παράλληλο μάρτυρα θρεπτικού μέσου, καταδεικνύει επίσης αν ο διαλύτης/φορέας αλληλεπιδρά με το σύστημα δοκιμής.

Ειδικότητα: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών/αδρανών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, και είναι σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των δοκιμών (21).

Ουσία: ένα χημικό στοιχείο και οι ενώσεις του σε φυσική κατάσταση ή όπως λαμβάνονται με οποιαδήποτε παραγωγική διεργασία, στα οποία συμπεριλαμβάνονται όλα τα πρόσθετα που απαιτούνται για να διατηρείται η σταθερότητά του, καθώς και τυχόν προσμείξεις που προκύπτουν από τη χρησιμοποιούμενη διεργασία, αλλά από τα οποία εξαιρούνται οι διαλύτες που είναι δυνατόν να διαχωριστούν χωρίς να επηρεαστεί η σταθερότητα της ουσίας ούτε να μεταβληθεί η σύνθεσή της.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με χρήση της παρούσας μεθόδου.

▼**M8**

Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Προϊόντων των Ηνωμένων Εθνών (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) (GHS του ΟΗΕ): σύστημα που προτείνει την ταξινόμηση των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) με βάση τυποποιημένα είδη και βαθμούς φυσικής επικινδυνότητας και επικινδυνότητας για την υγεία και το περιβάλλον και καλύπτει τα αντίστοιχα στοιχεία γνωστοποίησης, όπως εικονογράμματα, προειδοποιητικές λέξεις, δηλώσεις επικινδυνότητας, δηλώσεις προφύλαξης και δελτία δεδομένων ασφαλείας, με τα οποία γνωστοποιούνται πληροφορίες σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις με σκοπό την προστασία των ανθρώπων (εργοδοτών, εργαζομένων, μεταφορέων, καταναλωτών και διασωστών) και του περιβάλλοντος (23).

UVCB: ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, πολύπλοκα προϊόντα αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά.

Έγκυρη δοκιμή: δοκιμή που θεωρείται επαρκούς καταλληλότητας και αξιοπιστίας για συγκεκριμένο σκοπό και βασίζεται σε επιστημονικά τεκμηριωμένες αρχές. Μια δοκιμή δεν είναι ποτέ έγκυρη με την απόλυτη σημασία του όρου, αλλά μόνο σε σχέση με καθορισμένο σκοπό (21).

▼**M8**

Προσάρτημα 1.2

ΟΥΣΙΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

Πριν εντάξουν στην καθημερινή πρακτική τη δοκιμή που περιγράφεται στο παρόν προσάρτημα της μεθόδου δοκιμών B.71, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα επιτυγχάνοντας σωστά την αναμενόμενη πρόβλεψη βάσει της μεθόδου h-CLAT για τις 10 συνιστώμενες ουσίες του πίνακα 1, καθώς και τιμές CV75, EC150 και EC200 εντός του αντίστοιχου εύρους τιμών αναφοράς για τουλάχιστον 8 από τις 10 ουσίες ελέγχου ικανότητας. Αυτές οι ουσίες ελέγχου ικανότητας επιλέχθηκαν ως αντιπροσωπευτικές του φάσματος αποκρίσεων από τις πηγές κινδύνου δερματικής ευαισθητοποίησης. Άλλα κριτήρια επιλογής ήταν ότι οι ουσίες θα πρέπει να είναι εμπορικά διαθέσιμες, και ότι θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμα *in vivo* δεδομένα αναφοράς υψηλής ποιότητας καθώς και *in vitro* δεδομένα υψηλής ποιότητας που προκύπτουν με τη μέθοδο h-CLAT. Επίσης, για τη μέθοδο h-CLAT υπάρχουν διαθέσιμα δημοσιευμένα δεδομένα αναφοράς (3) (14).

Πίνακας 1

Συνιστώμενες ουσίες για την απόδειξη τεχνικής ικανότητας όσον αφορά τη μέθοδο h-CLAT

Ουσίες ελέγχου ικανότητας	Αριθμός CAS	Φυσική κατάσταση	Πρόβλεψη *in vivo* (1)	CV75 Πεδίο τιμών αναφοράς σε μg/ml (2)	Αποτελέσματα h-CLAT για τον CD86 (πεδίο τιμών αναφοράς EC150 σε μg/ml) (2)	Αποτελέσματα h-CLAT για τον CD54 (πεδίο τιμών αναφοράς EC200 σε μg/ml) (2)
2,4-Δινιτροχλωροβενζόλιο	97-00-7	Στερεό	Ευαισθητοποιητικό (εξαιρετικά ισχυρό)	2-12	Θετικό (0,5-10)	Θετικό (0,5-15)
4-Φαινυλενοδιαμίνη	106-50-3	Στερεό	Ευαισθητοποιητικό (ισχυρό)	5-95	Θετικό (<40)	Αρνητικό (>1,5) (3)
Θειικό νικέλιο	10101-97-0	Στερεό	Ευαισθητοποιητικό (μετρίως ισχυρό)	30-500	Θετικό (<100)	Θετικό (10-100)
2-Μερκαπτοβενζοθειαζόλιο	149-30-4	Στερεό	Ευαισθητοποιητικό (μετρίως ισχυρό)	30-400	Αρνητικό (>10) (3)	Θετικό (10-140)
R(+)-Λεμονένιο	5989-27-5	Υγρό	Ευαισθητοποιητικό (ασθενές)	>20	Αρνητικό (>5) (3)	Θετικό (<250)
Ιμιδαζολιδινυλουρία	39236-46-9	Στερεό	Ευαισθητοποιητικό (ασθενές)	25-100	Θετικό (20-90)	Θετικό (20-75)
Ισοπροπανόλη	67-63-0	Υγρό	Μη ευαισθητοποιητικό	>5 000	Αρνητικό (>5 000)	Αρνητικό (>5 000)
Γλυκερίνη	56-81-5	Υγρό	Μη ευαισθητοποιητικό	>5 000	Αρνητικό (>5 000)	Αρνητικό (>5 000)
Γαλακτικό οξύ	50-21-5	Υγρό	Μη ευαισθητοποιητικό	1500-5 000	Αρνητικό (>5 000)	Αρνητικό (>5 000)
4-Αμινοβενζοϊκό οξύ	150-13-0	Στερεό	Μη ευαισθητοποιητικό	>1 000	Αρνητικό (>1 000)	Αρνητικό (>1 000)

Συντομογραφίες: Αριθμός CAS = αριθμός μητρώου της υπηρεσίας Chemical Abstract Service

(1) Η πρόβλεψη για την επικινδυνότητα *in vivo* (και την ισχύ) βασίζεται σε δεδομένα από LLNA (3) (14). Η *in vivo* ισχύς συνάγεται με εφαρμογή των κριτηρίων που έχει προτείνει το ECETOC (24).

(2) Βάσει των ιστορικών τιμών που παρατηρήθηκαν (13) (25).

(3) Καθώς τα ιστορικά αποτελέσματα για τον εν λόγω δείκτη είναι στην πλειονότητά τους αρνητικά, αναμένεται, κατά βάση, αρνητικό αποτέλεσμα. Το παρεχόμενο πεδίο τιμών καθορίστηκε με βάση τα ελάχιστα ιστορικά θετικά αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν. Σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος, η τιμή EC θα πρέπει να περιλαμβάνεται εντός του αναφερθέντος πεδίου τιμών αναφοράς.

▼**M8**

Προσάρτημα 2

ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ *IN VITRO*: ΔΟΚΙΜΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ U937 (U-SENS™)

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

1. Η δοκιμή U-SENS™ χρησιμεύει στον ποσοτικό προσδιορισμό των μεταβολών στην έκφραση ενός δείκτη της κυτταρικής επιφάνειας που συνδέεται με τη διεργασία ενεργοποίησης των μονοκυττάρων και των δενδριτικών κυττάρων (DC) (τον δείκτη CD86), στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά ιστιοκυτταρικού λεμφώματος, κατόπιν έκθεσης σε ευαισθητοποιητικά (1). Στη συνέχεια, τα μετρηθέντα επίπεδα έκφρασης του δείκτη CD86 στην κυτταρική σειρά U937 χρησιμοποιούνται για την υποστήριξη της διάκρισης μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος.

2. Η δοκιμή U-SENS™ έχει αξιολογηθεί στο πλαίσιο μελέτης επικύρωσης (2) που συντόνισε η L'Oreal, και υποβλήθηκε σε επακόλουθη αξιολόγηση από ομοτίμους από τη Συμβουλευτική Επιστημονική Επιτροπή (ESAC) του εργαστηρίου αναφοράς της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τις εναλλακτικές μεθόδους αντί των δοκιμών σε ζώα (EURL ECVAM) (3). Αφού έλαβε υπόψη όλα τα διαθέσιμα στοιχεία και τις απόψεις των ρυθμιστικών αρχών και των ενδιαφερόμενων μερών, το EURL ECVAM (4) συνέστησε τη χρήση της U-SENS™ στο πλαίσιο IATA για την υποστήριξη της διάκρισης μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών με σκοπό την ταξινόμηση και επισήμανση της επικινδυνότητας. Στο έγγραφο καθοδήγησης για την αναφορά των δομημένων προσεγγίσεων αναφορικά με την ολοκλήρωση δεδομένων και τις επιμέρους πηγές πληροφοριών των IATA για την ευαισθητοποίηση του δέρματος, ο ΟΟΣΑ εξετάζει σειρά περιπτωσιολογικών μελετών που περιγράφουν διάφορες στρατηγικές δοκιμών και μοντέλων πρόβλεψης. Μία από τις διαφορετικές καθορισμένες προσεγγίσεις βασίζεται στη δοκιμασία U-SENS (5). Παραδείγματα της χρήσης των δεδομένων της U-SENS™ σε συνδυασμό με άλλες πληροφορίες, περιλαμβανομένων των ιστορικών δεδομένων και των υπαρχόντων έγκυρων δεδομένων για τον άνθρωπο (6), έχουν επίσης αναφερθεί σε άλλες δημοσιευμένες εργασίες (4) (5) (7).

3. Διαπιστώθηκε ότι η δοκιμή U-SENS™ μπορεί να εφαρμοστεί σε εργαστήρια που διαθέτουν εμπειρία στη χρήση τεχνικών κυτταροκαλλιέργειας και ανάλυσης κυτταρομετρίας ροής. Ο βαθμός αναπαραγωγιμότητας των προβλέψεων που αναμένεται να παρέχει η δοκιμή είναι της τάξης του 90 % και του 84 % ενδοεργαστηριακά και διεργαστηριακά, αντίστοιχα (8). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη επικύρωσης (8) και άλλες δημοσιευμένες μελέτες (1) υποδεικνύουν συνολικά ότι, σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της LLNA, η ορθότητα της διάκρισης μεταξύ ευαισθητοποιητικών (κατηγορία 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP) και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος είναι 86 % (N=166), με ευαισθησία 91 % (118/129) και ειδικότητα 65 % (24/37). Σε σύγκριση με τα αποτελέσματα για τον άνθρωπο, η ορθότητα της διάκρισης μεταξύ ευαισθητοποιητικών (κατηγορία 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP) και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος είναι 77 % (N=101), με ευαισθησία 100 % (58/58) και ειδικότητα 47 % (20/43). Οι ψευδοαρνητικές προβλέψεις με την U-SENS™ σε σύγκριση με την LLNA είναι πιθανότερο να προκύπτουν με χημικές ουσίες που εμφανίζουν χαμηλή έως μέτρια ισχύ ευαισθητοποίησης του δέρματος (υποκατηγορία 1B κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP) παρά με χημικές ουσίες που εμφανίζουν υψηλή ισχύ ευαισθητοποίησης του δέρματος (υποκατηγορία 1A κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP) (1) (8) (9). Συνολικά, τα στοιχεία αυτά δείχνουν τη χρησιμότητα της δοκιμής U-SENS™ ως εργαλείου που συμβάλλει στον προσδιορισμό της επικινδυνότητας ευαισθητοποίησης του δέρματος. Ωστόσο, οι τιμές ορθότητας που παρέχονται εδώ για την U-SENS™ ως αυτοτελή δοκιμή είναι απλώς ενδεικτικές, δεδομένου ότι η δοκιμή θα πρέπει να εξετάζεται σε συνδυασμό με άλλες πηγές πληροφοριών στο πλαίσιο IATA και σύμφωνα με τις πληροφορίες στις παραγράφους 7 και 8 της γενικής εισαγωγής. Επιπλέον, κατά την αξιολόγηση των μεθόδων δοκιμών ευαισθητοποίησης του δέρματος χωρίς χρήση ζώων, θα πρέπει να μη λησμονείται ότι η δοκιμασία LLNA, καθώς και άλλες δοκιμές σε ζώα, ενδέχεται να μην αντικατοπτρίζουν πλήρως την κατάσταση στον άνθρωπο.

▼**M8**

4. Βάσει των επί του παρόντος διαθέσιμων δεδομένων, διαπιστώθηκε ότι η δοκιμή U-SENS™ μπορεί να εφαρμόζεται σε υπό δοκιμή χημικές ουσίες (περιλαμβανομένων των συστατικών καλλυντικών προϊόντων, π.χ. συντηρητικών, επιφανειοδραστικών, δραστικών ουσιών, χρωστικών) που καλύπτουν ποικιλία οργανικών λειτουργικών ομάδων, φυσικοχημικών ιδιοτήτων, επιπέδων ισχύος ευαισθητοποίησης του δέρματος (όπως καθορίζονται στις *in vivo* μελέτες) καθώς και το φάσμα μηχανισμών αντίδρασης που είναι γνωστό ότι συνδέονται με την ευαισθητοποίηση του δέρματος (δηλ. δέκτης Michael, σχηματισμός βάσης Schiff, παράγοντας μεταφοράς ακυλίου, πυρηνόφιλη διμοριακή υποκατάσταση [SN2], ή πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση [SNAr]) (1) (8) (9) (10). Η δοκιμή U-SENS™ είναι εφαρμόσιμη σε υπό δοκιμή χημικές ουσίες που είναι διαλυτές ή σχηματίζουν σταθερή διασπορά (δηλ. κολλοειδές ή εναιώρημα στο οποίο η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν καθιζάνει ούτε διαχωρίζεται από τον διαλύτη/φορέα σε διαφορετικές φάσεις) σε κατάλληλο διαλύτη/φορέα (βλ. παράγραφο 13). Οι χημικές ουσίες του συνόλου δεδομένων που είχαν χαρακτηριστεί αβιοτικά προαπτένια (δηλαδή ουσίες που ενεργοποιούνται με οξείδωση) ή μεταβολικά προαπτένια (δηλαδή ουσίες που χρειάζονται ενζυμική ενεργοποίηση, π.χ. μέσω των ενζύμων P450) προβλέφθηκαν σωστά με τη δοκιμή U-SENS™ (1) (10). Ουσίες που προκαλούν ρήξη της μεμβράνης μπορούν να οδηγήσουν σε ψευδοθετικά αποτελέσματα λόγω μη ειδικής αύξησης της έκφρασης τουCD86, καθώς 3 από τα 7 ψευδοθετικά αποτελέσματα σε σχέση με την *in vivo* ταξινόμηση αναφοράς αφορούσαν επιφανειοδραστικές ουσίες (1). Δεδομένων των παραπάνω, τα θετικά αποτελέσματα με επιφανειοδραστικές ουσίες θα πρέπει να εξετάζονται με επιφύλαξη, ενώ τα αρνητικά αποτελέσματα με τέτοιες ουσίες μπορούν να χρησιμοποιούνται για την υποστήριξη του χαρακτηρισμού της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ως μη ευαισθητοποιητικής. Παρότι οι φθορίζουσες ουσίες μπορούν να αξιολογηθούν με την U-SENS™ (1), οι ισχυρά φθορίζουσες ουσίες που εκπέμπουν στο ίδιο μήκος κύματος με την ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC) ή το ιωδιούχο προπίδιο (PI) παρεμποδίζουν την ανίχνευση με κυτταρομετρία ροής και, ως εκ τούτου, δεν μπορούν να αξιολογηθούν σωστά με χρήση συζευγμένων με FITC αντισωμάτων (δυνητικά ψευδοαρνητικά) ή PI (μη μετρήσιμη βιωσιμότητα). Σε αυτή την περίπτωση, μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλα σημασμένα με φθοριοχρώματα αντισώματα ή άλλοι δείκτες κυτταροτοξικότητας, αντίστοιχα, εφόσον μπορεί να καταδειχθεί ότι παρέχουν ανάλογα αποτελέσματα με τα σημασμένα με FITC αντισώματα ή το PI (βλ. παράγραφο 18), π.χ. μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας του προσαρτήματος 2.2. Υπό το πρίσμα των ανωτέρω, τα θετικά αποτελέσματα με επιφανειοδραστικές ουσίες και τα αρνητικά αποτελέσματα με ισχυρά φθορίζουσες ουσίες θα πρέπει να ερμηνεύονται στο πλαίσιο των αναφερόμενων περιορισμών και σε συνάρτηση με άλλες πηγές πληροφοριών στο πλαίσιο IATA. Εάν υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι η δοκιμή U-SENS™ δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε άλλες ειδικές κατηγορίες υπό δοκιμή χημικών ουσιών, η δοκιμή δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τις συγκεκριμένες κατηγορίες.

5. Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, η μέθοδος U-SENS™ υποστηρίζει τη διάκριση μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος. Ωστόσο, μπορεί ενδεχομένως να συμβάλει στην εκτίμηση της ευαισθητοποιητικής ισχύος, όταν χρησιμοποιείται σε ολοκληρωμένες προσεγγίσεις, όπως οι IATA. Απαιτούνται πάντως περισσότερες εργασίες, κατά προτίμηση με βάση δεδομένα για τον άνθρωπο, για να διαπιστωθεί ο τρόπος με τον οποίο τα αποτελέσματα της U-SENS™ θα μπορούσαν ενδεχομένως να τροφοδοτήσουν την εκτίμηση της ευαισθητοποιητικής ισχύος.

6. Οι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 2.1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

7. Η δοκιμή U-SENS™ είναι μια *in vitro* δοκιμασία με την οποία προσδιορίζονται ποσοτικά οι μεταβολές της έκφρασης του δείκτη κυτταρικής επιφάνειας CD86 σε ανθρώπινη κυτταρική σειρά ιστιοκυτταρικού λεμφώματος, στα κύτταρα U937, μετά από έκθεση 45±3 ωρών στην υπό δοκιμή χημική ουσία. Ο επιφανειακός δείκτης CD86 αποτελεί τυπικό δείκτη ενεργοποίησης των U937. Ο δείκτης CD86 είναι γνωστό ότι αποτελεί συνδιεγερτικό μόριο που μπορεί να μιμείται τη μονοκυτταρική ενεργοποίηση, η οποία παίζει κρίσιμο ρόλο στην προδιέγερση των Τ κυττάρων. Οι μεταβολές της έκφρασης του δείκτη κυτταρικής επιφάνειας CD86 μετρώνται με κυτταρομετρία ροής μετά από χρώση των κυττάρων συνήθως με αντισώματα σημασμένα με ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC). Ταυτόχρονα, διεξάγεται επίσης

▼M8

μέτρηση της κυτταροτοξικότητας (π.χ. με χρήση PI) προκειμένου να διαπιστωθεί εάν αυξάνεται η έκφραση του δείκτη κυτταρικής επιφάνειας CD86 σε υποκυτταροτοξικές συγκεντρώσεις. Ο δείκτης διέγερσης (S.I.) του δείκτη κυτταρικής επιφάνειας CD86 υπολογίζεται σε σύγκριση με τον μάρτυρα με διαλύτη/φορέα και χρησιμοποιείται στο μοντέλο πρόβλεψης (βλ. παράγραφο 19) για να υποστηριχθεί η διάκριση μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών ουσιών.

ΑΠΟΔΕΙΞΗ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

8. Πριν χρησιμοποιήσουν στην καθημερινή πρακτική τη δοκιμή που περιγράφεται στο παρόν προσάρτημα της μεθόδου δοκιμών B.71, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα, χρησιμοποιώντας τις 10 ουσίες ελέγχου ικανότητας του προσαρτήματος 2.2 σύμφωνα με τις ορθές πρακτικές *in vitro* μεθόδων (11). Επιπλέον, οι χρήστες της δοκιμής θα πρέπει να διατηρούν βάση ιστορικών δεδομένων με τα δεδομένα που προκύπτουν από τους ελέγχους δραστικότητας (βλ. παράγραφο 11) και με τους θετικούς μάρτυρες και τους μάρτυρες με διαλύτη/φορέα (βλ. παραγράφους 15-16), και θα πρέπει να χρησιμοποιούν τα εν λόγω δεδομένα για να βεβαιώνονται για τη διαχρονική αναπαραγωγιμότητα της δοκιμής στο εργαστήριό τους.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

9. Η παρούσα δοκιμή βασίζεται στο πρωτόκολλο αριθ. 183 της υπηρεσίας βάσης δεδομένων U-SENS™ για τις εναλλακτικές μεθόδους αντί των πειραμάτων σε ζώα (DB-ALM) (12). Κατά την καθιέρωση και τη χρήση της δοκιμής U-SENS™ στο εργαστήριο, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οι τυποποιημένες διαδικασίες λειτουργίας (SOP). Μπορεί να χρησιμοποιείται αυτοματοποιημένο σύστημα για τη διεξαγωγή της U-SENS™, εφόσον μπορεί να αποδειχθεί ότι παράγει ανάλογα αποτελέσματα, για παράδειγμα μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας του προσαρτήματος 2.2. Στις επόμενες παραγράφους περιγράφονται τα βασικά στοιχεία και διαδικασίες για τη δοκιμή U-SENS™.

Προπαρασκευή των κυττάρων

10. Για τη διεξαγωγή της δοκιμής U-SENS™ θα πρέπει να χρησιμοποιείται η ανθρώπινη κυτταρική σειρά ιστιοκυτταρικού λεμφώματος U937 (13). Τα κύτταρα (κλώνος CRL1593.2) θα πρέπει να λαμβάνονται από επαρκώς εξειδικευμένη τράπεζα κυττάρων, όπως η American Type Culture Collection.

11. Τα κύτταρα U937 καλλιεργούνται στους 37°C και σε ατμόσφαιρα με ύγρανση και 5 % CO_2 σε θρεπτικό μέσο RPMI-1 640, συμπληρωμένο με 10 % ορού εμβρύων μόσχων (FCS), 2 mM L-γλουταμίνης, 100 μονάδες/ml πενικιλίνης και 100 μg/ml στρεπτομυκίνης (πλήρες θρεπτικό μέσο). Τα κύτταρα U937 ανακαλλιεργούνται συνήθως κάθε 2-3 ημέρες σε πυκνότητα 1,5 έως 3 × 10^5 κύτταρα/ml αντίστοιχα. Η κυτταρική πυκνότητα δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 2 × 10^6 κύτταρα/ml και η κυτταρική βιωσιμότητα που μετράται με αποκλεισμό της χρωστικής Trypan Blue θα πρέπει να είναι ≥ 90 % (δεν θα πρέπει να εφαρμόζεται κατά την πρώτη ανακαλλιέργεια μετά την απόψυξη). Πριν από τη χρήση τους στη δοκιμή, θα πρέπει να ελέγχεται εάν κάθε παρτίδα κυττάρων, FCS ή αντισωμάτων πληροί τα κριτήρια μέσω της διεξαγωγής ελέγχου δραστικότητας. Ο έλεγχος δραστικότητας των κυττάρων θα πρέπει να διενεργείται με χρήση του θετικού μάρτυρα, του πικρυλοσουλφονικού οξέος (2,4,6-τρινιτροβενζολοσουλφονικό οξύ: TNBS) (αριθ. CAS 2 508-19-2, καθαρότητα ≥ 99 %) και του αρνητικού μάρτυρα γαλακτικό οξύ (LA) (αριθ. CAS 50-21-5, καθαρότητα ≥ 85 %), τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα μετά την απόψυξη. Για τον έλεγχο δραστικότητας, θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή έξι τελικές συγκεντρώσεις για καθέναν από τους 2 μάρτυρες (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100 μg/ml και LA: 1, 10, 20, 50, 100, 200 μg/ml). Το TNBS διαλυμένο σε πλήρες θρεπτικό μέσο θα πρέπει να δίνει θετική απόκριση του CD86 σχετιζόμενη με τη συγκέντρωση (π.χ. όταν μια θετική συγκέντρωση, CD86 S.I. ≥ 150, ακολουθείται από συγκέντρωση με αυξανόμενο S.I του CD86), και το LA διαλυμένο σε πλήρες θρεπτικό μέσο θα πρέπει να δίνει αρνητική απόκριση του CD86 (βλ. παράγραφο 21). Για τη δοκιμασία πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο η παρτίδα κυττάρων που έχει υποβληθεί επιτυχώς 2 φορές στον έλεγχο δραστικότητας. Τα κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιάζονται έως επτά εβδομάδες μετά την απόψυξη. Ο αριθμός των ανακαλλιεργειών δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τις 21. Ο έλεγχος δραστικότητας θα πρέπει να διενεργείται σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφονται στις παραγράφους 18-22.

▼M8

12. Όσον αφορά τη δοκιμή, τα κύτταρα U937 εμβολιάζονται σε πυκνότητα είτε 3×10^5 κύτταρα/ml είτε 6×10^5 κύτταρα/ml, και προκαλλιεργούνται σε φιάλες καλλιέργειας επί 2 ημέρες ή επί 1 ημέρα αντίστοιχα. Μπορούν να εφαρμοστούν και συνθήκες προκαλλιέργειας διαφορετικές από εκείνες που περιγράφονται ανωτέρω, εφόσον αυτό τεκμηριώνεται επαρκώς επιστημονικά και εφόσον μπορεί να αποδειχθεί ότι αποδίδουν ανάλογα αποτελέσματα, για παράδειγμα μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας του προσαρτήματος 2.2. Την ημέρα της δοκιμής, κύτταρα που έχουν συλλεχθεί από την φιάλη καλλιέργειας εναιωρούνται εκ νέου με πρόσφατα παρασκευασθέν θρεπτικό μέσο καλλιέργειας σε πυκνότητα 5×10^5 κύτταρα/ml. Στη συνέχεια, τα κύτταρα κατανέμονται σε τρυβλίο επίπεδης βάσης 96 κοιλοτήτων με 100 μl (τελική κυτταρική πυκνότητα $0,5 \times 10^5$ κύτταρα/κοιλότητα).

Προετοιμασία των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων

13. Πριν από τη δοκιμή διεξάγεται αξιολόγηση της διαλυτότητας. Για αυτόν τον σκοπό, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες διαλύονται ή διασπείρονται σταθερώς σε συγκέντρωση 50 mg/ml σε πλήρες θρεπτικό μέσο, ως πρώτη επιλογή, ή σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO, καθαρότητα ≥ 99 %), ως δεύτερη επιλογή διαλύτη/φορέα εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν είναι διαλυτή στον διαλύτη/φορέα πλήρους θρεπτικού μέσου. Για τη δοκιμή, η υπό δοκιμή χημική ουσία διαλύεται σε τελική συγκέντρωση 0,4 mg/ml σε πλήρες θρεπτικό μέσο, εφόσον είναι διαλυτή στον συγκεκριμένο διαλύτη/φορέα. Εάν η χημική ουσία είναι διαλυτή μόνο σε DMSO, διαλύεται σε συγκέντρωση 50 mg/ml. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι διαλύτες/φορείς, πέραν των όσων περιγράφονται ανωτέρω, εφόσον η χρήση τους τεκμηριώνεται επαρκώς επιστημονικά. Θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον τελικό διαλύτη/φορέα.

14. Η προετοιμασία των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων γίνεται την ημέρα της δοκιμής. Λόγω του ότι δεν διεξάγεται δοκιμασία προσδιορισμού δόσης, για την πρώτη σειρά δοκιμών θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή 6 τελικές συγκεντρώσεις (1, 10, 20, 50, 100 και 200 μg/ml) στον αντίστοιχο διαλύτη/φορέα, είτε σε πλήρες θρεπτικό μέσο είτε σε DMSO 0,4 % σε θρεπτικό μέσο. Για τις επόμενες σειρές δοκιμών, ξεκινώντας από τα 0,4 mg/ml σε πλήρες θρεπτικό μέσο ή τα 50 mg/ml σε DMSO, παρασκευάζονται διαλύματα των υπό δοκιμή χημικών ουσιών, τουλάχιστον 4 διαλύματα εργασίας (δηλ. τουλάχιστον 4 συγκεντρώσεις), με χρήση του αντίστοιχου διαλύτη/φορέα. Τα διαλύματα εργασίας χρησιμοποιούνται τελικώς για την αγωγή, με προσθήκη ίσου όγκου εναιωρήματος κυττάρων U937 (βλ. παράγραφο 11 ανωτέρω) στον όγκο του διαλύματος εργασίας στο τρυβλίο ώστε να πραγματοποιηθεί νέα αραίωση 2x (12). Οι συγκεντρώσεις (τουλάχιστον 4 συγκεντρώσεις) για κάθε επόμενη σειρά δοκιμών επιλέγονται με βάση τα επιμέρους αποτελέσματα όλων των προηγούμενων σειρών δοκιμών (8). Οι χρησιμοποιήσιμες τελικές συγκεντρώσεις είναι 1, 2, 3, 4, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 και 200 μg/ml. Η μέγιστη τελική συγκέντρωση είναι 200 μg/ml. Στην περίπτωση που παρατηρηθεί θετική τιμή του CD86 στο 1 μg/ml, αξιολογείται συγκέντρωση 0,1 μg/ml προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που δεν επάγει CD86 άνω του θετικού ορίου. Για κάθε σειρά δοκιμών, υπολογίζεται η EC150 (συγκέντρωση στην οποία μια υπό δοκιμή χημική ουσία φθάνει το θετικό όριο CD86του 150 %, βλ. παράγραφο 19), εφόσον παρατηρηθεί θετική απόκριση του CD86 που σχετίζεται με τη συγκέντρωση. Σε περίπτωση που η υπό δοκιμή χημική ουσία επάγει θετική απόκριση του CD86 που δεν σχετίζεται με τη συγκέντρωση, μπορεί να μην είναι σκόπιμο να υπολογίζεται η EC150, όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο U-SENS™ DB-ALM αριθ. 183 (12). Για κάθε σειρά δοκιμών, υπολογίζεται η CV70 (συγκέντρωση στην οποία μια χημική ουσία φθάνει το όριο κυτταροτοξικότητας του 70 %, βλ. παράγραφο 19), όποτε αυτό είναι εφικτό (12). Για τη διερεύνηση της επίδρασης της απόκρισης βάσει συγκέντρωσης λόγω αύξησης του CD86, οποιεσδήποτε από τις κατάλληλες συγκεντρώσεις θα πρέπει να επιλέγονται έτσι ώστε να είναι ομοιόμορφα κατανεμημένες μεταξύ της EC150 (ή της υψηλότερης αρνητικής μη κυτταροτοξικής συγκέντρωσης του CD86) και της CV70 (ή της υψηλότερης επιτρεπόμενης συγκέντρωσης, δηλαδή 200 μg/ml). Θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή τουλάχιστον 4 συγκεντρώσεις ανά σειρά δοκιμών, με τουλάχιστον 2 εξ αυτών να είναι κοινές με την προηγούμενη σειρά/-ές δοκιμών, για λόγους σύγκρισης.

▼M8

15. Ο διαλύτης/φορέας που χρησιμοποιείται στη δοκιμή U-SENS™ είναι πλήρες θρεπτικό μέσο (για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που διαλύονται ή διασπείρονται σταθερώς σε πλήρες θρεπτικό μέσο) (βλ. παράγραφο 4) ή DMSO 0,4 % σε πλήρες θρεπτικό μέσο (για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που διαλύονται ή διασπείρονται σταθερώς σε DMSO).

16. Ο θετικός μάρτυρας που χρησιμοποιείται στη δοκιμή U-SENS™ είναι TNBS (βλ. παράγραφο 11), παρασκευαζόμενο σε πλήρες θρεπτικό μέσο. Το TNBS θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας για τη μέτρηση της έκφρασης του CD86 σε μία τελική συγκέντρωση στο τρυβλίο (50 μg/ml) που δίδει κυτταρική βιωσιμότητα > 70 %. Για την επίτευξη συγκέντρωσης TNBS 50 μg/ml στο τρυβλίο, παρασκευάζεται αποθεματικό διάλυμα TNBS 1 M (δηλ. 293 mg/ml) σε πλήρες θρεπτικό μέσο, το οποίο αραιώνεται περαιτέρω 2 930x με πλήρες θρεπτικό μέσο ώστε να προκύψει διάλυμα εργασίας 100 μg/ml. Ως αρνητικός μάρτυρας θα πρέπει να χρησιμοποιείται γαλακτικό οξύ (LA, CAS 50-21-5) σε 200 μg/ml διαλυμένο σε πλήρες θρεπτικό μέσο (από αποθεματικό διάλυμα 0,4 mg/ml). Σε κάθε τρυβλίο κάθε σειράς δοκιμών, παρασκευάζονται τρία πανομοιότυπα δείγματα μάρτυρα πλήρους θρεπτικού μέσου χωρίς αγωγή, μάρτυρα με διαλύτη/φορέα και αρνητικών και θετικών μαρτύρων (12). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι κατάλληλοι θετικοί μάρτυρες, εάν υπάρχουν διαθέσιμα ιστορικά δεδομένα από τα οποία μπορούν να προκύψουν συγκρίσιμα κριτήρια αποδοχής σειρών δοκιμών. Τα κριτήρια αποδοχής σειρών δοκιμών είναι τα ίδια με εκείνα που περιγράφονται για την υπό δοκιμή χημική ουσία (βλ. παράγραφο 12).

Εφαρμογή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων

17. Ο μάρτυρας με διαλύτη/φορέα ή τα διαλύματα εργασίας που περιγράφονται στις παραγράφους 14-16 αναμιγνύονται 1:1 (κ.ό.) με τα εναιωρήματα κυττάρων που παρασκευάστηκαν στο τρυβλίο επίπεδης βάσης 96 κοιλοτήτων (βλ. παράγραφο 12). Στη συνέχεια, τα υπό αγωγή τρυβλία επωάζονται επί 45±3 ώρες στους 37°C με 5 % CO_2. Πριν από την επώαση, τα τρυβλία καλύπτονται με ημιπερατή μεμβράνη ώστε να αποφεύγεται η εξάτμιση των πτητικών υπό δοκιμή χημικών ουσιών και η διασταυρούμενη μόλυνση μεταξύ των κυττάρων που υποβάλλονται σε αγωγή με τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες (12).

Χρώση των κυττάρων

18. Μετά από 45±3 ώρες έκθεσης, τα κύτταρα μεταφέρονται στο τρυβλίο μικροτιτλοδότησης σχήματος V και συλλέγονται μέσω φυγοκέντρησης. Η παρεμπόδιση λόγω διαλυτότητας ορίζεται ως παρουσία κρυστάλλων ή σταγόνων ορατών στο μικροσκόπιο μετά την πάροδο 45 ± 3 ωρών από την αγωγή (πριν από τη χρώση των κυττάρων). Τα υπερκείμενα υγρά απορρίπτονται και τα εναπομείναντα κύτταρα εκπλένονται μία φορά με 100 μl παγόψυχρου αλατούχου ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PBS) που περιέχει 5 % ορού εμβρύων μόσχων (ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης). Μετά τη φυγοκέντρηση, τα κύτταρα εναιωρούνται εκ νέου με 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος χρώσης και υποβάλλονται σε χρώση με 5 μl (π.χ. 0,25 μg) σημασμένων με FITC αντισωμάτων αντι-CD86 ή αντισωμάτων IgG1 (ισοτύπου) ποντικού σε θερμοκρασία 4°C επί 30 λεπτά, προστατευμένα από το φως. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τα αντισώματα που περιγράφονται στο πρωτόκολλο U-SENS™ DB-ALM αριθ. 183 (12) (για τον CD86: BD-PharMingen #5556 57, κλώνος: Fun-1 ή Caltag/Invitrogen # MHCD8601, κλώνος: BU63, και για το IgG1: BD-PharMingen #5557 48, ή Caltag/Invitrogen # GM4992). Με βάση την εμπειρία των φορέων ανάπτυξης της δοκιμής, η ένταση του φθορισμού των αντισωμάτων είναι συνήθως παρεμφερής μεταξύ των διαφόρων παρτίδων. Για τη δοκιμασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί άλλος κλώνος ή προμηθευτής των αντισωμάτων που υποβλήθηκαν επιτυχώς στον έλεγχο δραστικότητας (βλ. παράγραφο 11). Ωστόσο, οι χρήστες μπορούν να εξετάσουν το ενδεχόμενο να τιτλοδοτήσουν τα αντισώματα υπό τις συνθήκες του δικού τους εργαστηρίου προκειμένου να καθορίσουν τη βέλτιστη συγκέντρωση προς χρήση. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί και άλλο σύστημα ανίχνευσης, π.χ. σημασμένα με φθοριοχρώματα αντισώματα αντι-CD86, εφόσον μπορεί να αποδειχθεί ότι αποδίδει ανάλογα αποτελέσματα με αυτά των συζευγμένων με FITC αντισωμάτων, για παράδειγμα, μέσω δοκιμών των ουσιώνελέγχου ικανότητας του προσαρτήματος 2.2. Μετά από έκπλυση

▼M8

δύο φορές με 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος και μία φορά με 100 μl παγόψυχρου PBS, τα κύτταρα εναιωρούνται εκ νέου σε παγόψυχρο PBS (π.χ. 125 μl για δείγματα που αναλύονται με μη αυτόματο τρόπο, σωληνάριο προς σωληνάριο, ή 50 μl όταν χρησιμοποιείται τρυβλίο αυτόματης δειγματοληψίας) και προστίθεται διάλυμα PI (τελική συγκέντρωση 3 μg/ml). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι δείκτες κυτταροτοξικότητας, όπως 7-αμινοακτινομυκίνη D (7-AAD) ή Trypan Blue, εάν μπορεί να αποδειχθεί ότι οι εναλλακτικές χρώσεις αποδίδουν αποτελέσματα παρεμφερή με το PI, για παράδειγμα μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας του προσαρτήματος 2.2.

Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής

19. Το επίπεδο έκφρασης του CD86 και η κυτταρική βιωσιμότητα αναλύονται με χρήση κυτταρομετρίας ροής. Τα κύτταρα αναπαρίστανται σε στικτόγραμμα μεγέθους (FSC) και κοκκίωσης (SSC) ρυθμισμένου σε λογαριθμική κλίμακα προκειμένου να προσδιοριστεί με σαφήνεια ο πληθυσμός σε ένα πρώτο παράθυρο επιλογής R1 και να εξαλειφθούν τα κατάλοιπα κυττάρων. Για κάθε κοιλότητα καταγράφεται συνολικός στόχος 10 000 κυττάρων στο παράθυρο επιλογής R1. Τα κύτταρα από το ίδιο παράθυρο επιλογής R1 αναπαρίστανται σε στικτόγραμμα FL3 ή FL4 / SSC. Τα βιώσιμα κύτταρα ανιχνεύονται με την τοποθέτηση δεύτερου παραθύρου επιλογής R2 για την επιλογή του πληθυσμού των αρνητικών στο ιωδιούχο προπίδιο κυττάρων (δίαυλος FL3 ή FL4). Η κυτταρική βιωσιμότητα μπορεί να υπολογίζεται με χρήση της ακόλουθης εξίσωσης από το πρόγραμμα ανάλυσης του κυτταρόμετρου. Όταν η κυτταρική βιωσιμότητα είναι χαμηλή, μπορούν να καταγράφονται έως 20 000 κύτταρα, περιλαμβανομένων των νεκρών κυττάρων. Εναλλακτικά, μπορούν να καταγράφονται δεδομένα επί ένα λεπτό μετά την έναρξη της ανάλυσης.

$$\textit{βιωσιμότητα} = \frac{\textit{αριθμός ζωντανών κυττάρων}}{\textit{αριθμός ζωντανών κυττάρων}} \times 100$$

Στη συνέχεια, μετράται το ποσοστό των θετικών στο FL1 κυττάρων μεταξύ των εν λόγω βιώσιμων κυττάρων που επιλέγονται στο παράθυρο επιλογής R2 (εντός του R1). Η έκφραση κυτταρικής επιφάνειας του CD86 αναλύεται σε στικτόγραμμα FL1 / SSC με επιλογή των βιώσιμων κυττάρων (R2).

Για τις κοιλότητες πλήρους θρεπτικού μέσου/IgG1, ο δείκτης ανάλυσης ορίζεται κοντά στον βασικό πληθυσμό ούτως ώστε οι μάρτυρες με πλήρες θρεπτικό μέσο να έχουν IgG1 εντός της ζώνης στόχου 0,6 έως 0,9 %.

Η παρεμπόδιση λόγω χρώματος ορίζεται ως μετατόπιση του στικτογράμματος της σημασμένης με FITC IgG1 (S.I. γεωμετρικού μέσου IgG1 FL1 ≥ 150 %).

Ο δείκτης διέγερσης (S.I.) του CD86 για τα κύτταρα μάρτυρες (χωρίς αγωγή ή σε DMSO 0,4 %) και τα υποβληθέντα σε αγωγή κύτταρα υπολογίζεται σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:.

$$S.I. = \frac{\textit{\% κυττάρων } CD86^{+} \textit{υπό αγωγή} - \textit{\% κυττάρων } IgG1^{+} \textit{υπό αγωγή}}{\textit{\% κυττάρων } CD86^{+} \textit{μάρτυρα} - \textit{\% κυττάρων } IgG1^{+} \textit{μάρτυρα}} \times 100$$

% των κυττάρων μάρτυρα χωρίς αγωγή $IgG1^{+}$: αναφέρεται ως ποσοστό των θετικών στο FL1 κυττάρων IgG1 που ορίζεται με τον δείκτη ανάλυσης (αποδεκτό εύρος ≥ 0,6 % και < 1,5 %, βλ. παράγραφο 22) μεταξύ των βιώσιμων κυττάρων χωρίς αγωγή.

% των κυττάρων μάρτυρα / κυττάρων χωρίς αγωγή $IgG1^{+}/CD86^{+}$: αναφέρεται ως ποσοστό των θετικών στο FL1 κυττάρων IgG1/CD86 που μετρώνται χωρίς μετακίνηση του δείκτη ανάλυσης μεταξύ των βιώσιμων κυττάρων μάρτυρα / κυττάρων χωρίς αγωγή.

▼**M8**

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αξιολόγηση των δεδομένων

20. Στη δοκιμή U-SENS™ υπολογίζονται οι ακόλουθες παράμετροι: Η τιμή CV70, δηλαδή η συγκέντρωση που δίνει 70 % επιβίωση των κυττάρων U937 (30 % κυτταροτοξικότητα), και η τιμή EC150, δηλαδή η συγκέντρωση στην οποία οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες επάγουν δείκτη διέγερσης (S.I.) CD86 150 %.

Η CV70 υπολογίζεται με λογαριθμική-γραμμική παρεκβολή με χρήση της ακόλουθης εξίσωσης:

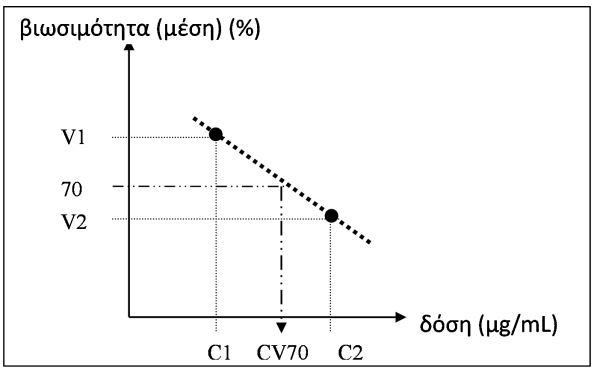
$CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 – V2) * (C2 – C1)]$

όπου:

V1 είναι η ελάχιστη τιμή κυτταρικής βιωσιμότητας άνω του 70 %

V2 είναι η μέγιστη τιμή κυτταρικής βιωσιμότητας κάτω του 70 %

C1 και C2 είναι οι συγκεντρώσεις που εμφανίζουν την τιμή κυτταρικής βιωσιμότητας V1 και V2 αντίστοιχα



Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες προσεγγίσεις για τον υπολογισμό της τιμής CV70, εφόσον αποδεικνύεται ότι δεν έχουν επιπτώσεις στα αποτελέσματα (π.χ. μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας).

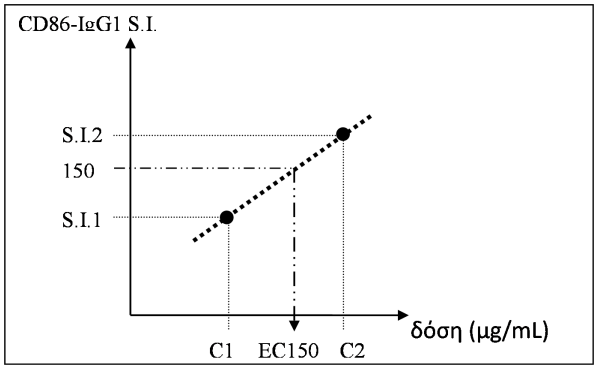
Η EC150 υπολογίζεται με λογαριθμική-γραμμική παρεκβολή με χρήση της ακόλουθης εξίσωσης:

$EC150 = C1 + [(150 – S.I.1) / (S.I.2 – S.I.1) * (C2 – C1)]$

Όπου:

C1 είναι η υψηλότερη συγκέντρωση σε μg/ml με S.I. του CD86 < 150 % (S.I. 1)

C2 είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση σε μg/ml με S.I. του CD86 ≥ 150 % (S.I. 2)



▼**M8**

Οι τιμές EC150 και CV70 υπολογίζονται

— για κάθε σειρά δοκιμών: οι επιμέρους τιμές EC150 και CV70 χρησιμοποιούνται ως εργαλεία για τη διερεύνηση της επίδρασης της απόκρισης βάσει συγκέντρωσης από την αύξηση του CD86 (βλ. παράγραφο 14),

— με βάση τις μέσες βιωσιμότητες, προσδιορίζεται η συνολική CV70 (12),

— με βάση τον μέσο S.I. των τιμών CD86, προσδιορίζεται η συνολική EC150 για την υπό δοκιμή χημική ουσία που έχει προβλεφθεί ως ΘΕΤΙΚΗ με τη δοκιμή U-SENS™ (βλ. παράγραφο 21) (12).

Μοντέλο πρόβλεψης

21. Για τη μέτρηση της έκφρασης του CD86, κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία ελέγχεται σε τουλάχιστον τέσσερις συγκεντρώσεις και σε τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες σειρές δοκιμών (που διεξάγονται σε διαφορετική ημέρα) για την πραγματοποίηση μιας μεμονωμένης πρόβλεψης (ΑΡΝΗΤΙΚΗ ή ΘΕΤΙΚΗ).

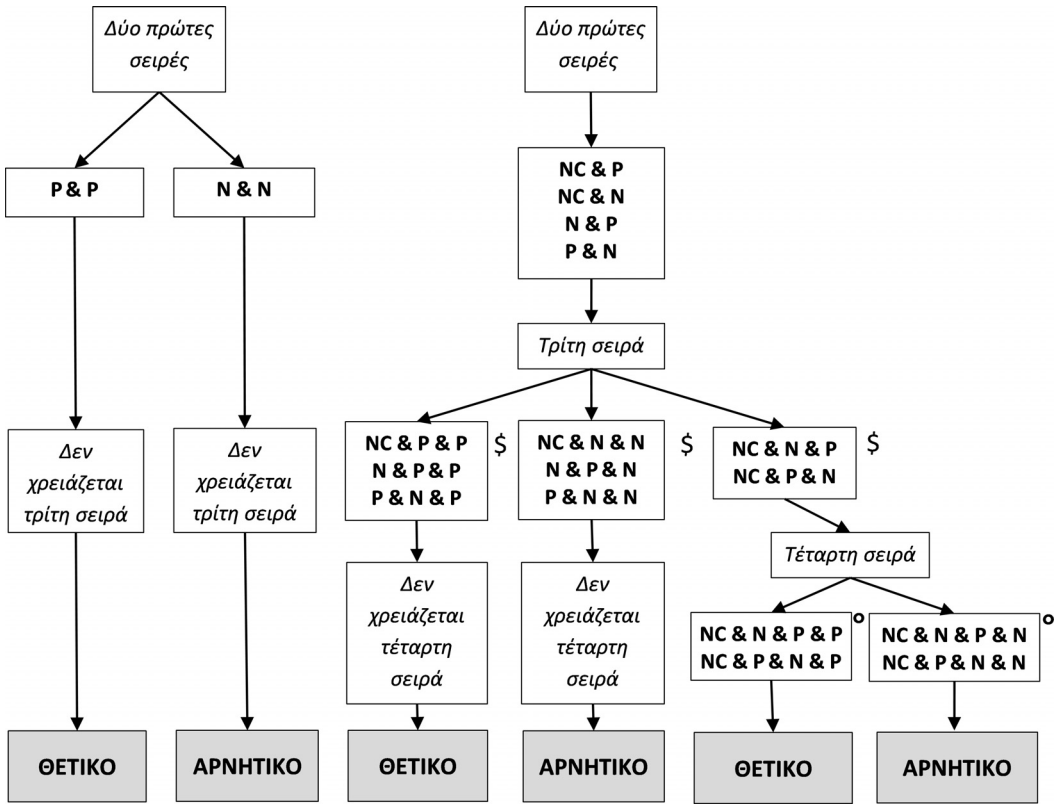
— Το επιμέρους συμπέρασμα μιας σειράς δοκιμών U-SENS™ θεωρείται αρνητικό (στο εξής αναφέρεται ως Α), εάν ο S.I. του CD86 είναι μικρότερος από 150 % σε όλες τις μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις (κυτταρική βιωσιμότητα ≥ 70 %) και εάν δεν παρατηρείται καμία παρεμπόδιση (κυτταροτοξικότητα, διαλυτότητα: βλ. παράγραφο 18, ή χρώμα: βλ. παράγραφο 19, ανεξάρτητα από τις μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις στις οποίες ανιχνεύεται η παρεμπόδιση). Σε όλες τις υπόλοιπες περιπτώσεις: ο S.I. του CD86 είναι ίσος ή μεγαλύτερος από 150 % και/ή παρατηρούνται παρεμποδίσεις, το επιμέρους συμπέρασμα μιας σειράς δοκιμών U-SENS™ θεωρείται θετικό (στο εξής αναφέρεται ως Θ).

— Μια πρόβλεψη U-SENS™ θεωρείται ΑΡΝΗΤΙΚΗ εάν είναι αρνητικές (Α) τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες σειρές δοκιμών (σχήμα 1). Εάν οι δύο πρώτες σειρές δοκιμών είναι και οι δύο αρνητικές (Α), η πρόβλεψη U-SENS™ θεωρείται ΑΡΝΗΤΙΚΗ και δεν χρειάζεται τρίτη σειρά δοκιμών.

— Μια πρόβλεψη U-SENS™ θεωρείται ΘΕΤΙΚΗ εάν είναι θετικές (Θ) τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες σειρές δοκιμών (σχήμα 1). Εάν οι δύο πρώτες σειρές δοκιμών είναι και οι δύο θετικές (Θ), η πρόβλεψη U-SENS™ θεωρείται ΘΕΤΙΚΗ και δεν χρειάζεται τρίτη σειρά δοκιμών.

— Λόγω του ότι δεν διεξάγεται δοκιμασία προσδιορισμού δόσης, υπάρχει μία εξαίρεση σε περίπτωση που, στην πρώτη σειρά δοκιμών, ο S.I. του CD86 είναι ίσος ή μεγαλύτερος από 150 % μόνο στην υψηλότερη μη κυτταροτοξική συγκέντρωση. Τότε, η σειρά δοκιμών θεωρείται ΜΗ ΚΑΤΑΛΗΚΤΙΚΗ (ΜΚ), και θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή πρόσθετες συγκεντρώσεις (μεταξύ της υψηλότερης μη κυτταροτοξικής συγκέντρωσης και της χαμηλότερης κυτταροτοξικής συγκέντρωσης - βλ. παράγραφο 20). Σε περίπτωση που μια σειρά δοκιμών χαρακτηριστεί ΜΚ, θα πρέπει να διεξάγονται τουλάχιστον 2 πρόσθετες σειρές δοκιμών, και μία τέταρτη σε περίπτωση που οι σειρές 2 και 3 δεν συμφωνούν (Α και/ή Θ, ανεξαρτήτως) (σχήμα 1). Οι επακόλουθες σειρές δοκιμών θα θεωρούνται θετικές ακόμη και εάν μία μόνο μη κυτταροτοξική συγκέντρωση δίδει CD86 ίσο ή άνω του 150 %, δεδομένου ότι η τιμή της συγκέντρωσης έχει προσαρμοστεί για τη συγκεκριμένη υπό δοκιμή χημική ουσία. Η τελική συγκέντρωση θα βασίζεται στο αποτέλεσμα των τριών ή τεσσάρων επιμέρους σειρών δοκιμών κατά πλειοψηφία (δηλ. 2 από 3 ή 2 από 4) (σχήμα 1).

▼**M8**



Σχήμα 1: Το μοντέλο πρόβλεψης που χρησιμοποιείται στη δοκιμή U-SENS™. Οι προβλέψεις βάσει δοκιμής U-SENS™ θα πρέπει να εξετάζονται στο πλαίσιο IATA και σύμφωνα με τις πληροφορίες στην παράγραφο 4 και στις παραγράφους 7, 8 και 9 της γενικής εισαγωγής.

N: δοκιμασία στην οποία δεν παρατηρείται θετικό CD86 ή παρεμπόδιση.

P: δοκιμασία στην οποία παρατηρείται θετικό CD86 και/ή παρεμπόδιση.

NC: μη καταληκτική. Η πρώτη μη καταληκτική σειρά δοκιμών όταν το CD86 είναι θετικό μόνο στην υψηλότερη μη κυτταροτοξική συγκέντρωση.

#: εάν χαρακτηριστεί «μη καταληκτική» μόνο η πρώτη σειρά δοκιμών τότε αυτομάτως επιβάλλεται η διεξαγωγή τρίτης σειράς δοκιμών προκειμένου να επιτευχθεί πλειοψηφική αναλογία θετικών (P) ή αρνητικών (N) συμπερασμάτων σε τουλάχιστον 2 από 3 ανεξάρτητες σειρές δοκιμών.

$: στα πλαίσια αυτά παρουσιάζονται οι σχετικοί συνδυασμοί αποτελεσμάτων από τις τρεις σειρές δοκιμών με βάση τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τις δύο πρώτες σειρές δοκιμών που παρουσιάζονται στο προηγούμενο πλαίσιο.

°: στα πλαίσια αυτά παρουσιάζονται οι σχετικοί συνδυασμοί αποτελεσμάτων από τις τέσσερις σειρές δοκιμών με βάση τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τις τρεις πρώτες σειρές δοκιμών που παρουσιάζονται στο προηγούμενο πλαίσιο.

Κριτήρια αποδοχής

22. Όταν χρησιμοποιείται η δοκιμή U-SENS™, θα πρέπει να πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια αποδοχής (12).

— Στο τέλος της περιόδου έκθεσης 45±3 ωρών, η μέση βιωσιμότητα των εις τριπλούν επιστρωμένων κυττάρων U937 χωρίς αγωγή θα πρέπει να είναι > 90 %, χωρίς να παρατηρείται ολίσθηση της έκφρασης CD86. Η βασική έκφραση του CD86 στα κύτταρα U937 χωρίς αγωγή θα πρέπει να είναι ≥ 2 % και ≤ 25 %.

▼M8

— Όταν ως διαλύτης χρησιμοποιείται DMSO, η εγκυρότητα του μάρτυρα με φορέα DMSO εκτιμάται μέσω υπολογισμού τιμής S.I. για το DMSO σε σύγκριση με τα κύτταρα χωρίς αγωγή, και η μέση βιωσιμότητα των επιστρωμένων εις τριπλούν κυττάρων πρέπει να είναι > 90 %. Ο μάρτυρας με φορέα DMSO είναι έγκυρος εάν η μέση τιμή S.I. του CD86 εις τριπλούν είναι μικρότερη από το 250 % της μέσης τιμής S.I. του CD86 εις τριπλούν των κυττάρων U937 χωρίς αγωγή.

— Οι σειρές δοκιμών θεωρούνται έγκυρες εάν τουλάχιστον δύο από τρεις τιμές IgG1 κυττάρων U937 χωρίς αγωγή είναι ≥ 0,6 % και < 1,5 %.

— Ο παράλληλος αρνητικός μάρτυρας (γαλακτικό οξύ) θεωρείται έγκυρος εάν τουλάχιστον δύο από τα τρία πανομοιότυπα δείγματα είναι αρνητικά (S.I. CD86 < 150 %) και χωρίς κυτταροτοξικότητα (κυτταρική βιωσιμότητα ≥ 70 %).

— Ο θετικός μάρτυρας (TNBS) θεωρείται έγκυρος εάν τουλάχιστον δύο από τα τρία πανομοιότυπα δείγματα είναι θετικά (S.I. CD86 < 150 %) και χωρίς κυτταροτοξικότητα (κυτταρική βιωσιμότητα ≥ 70 %).

Έκθεση δοκιμής

23. Στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται τα ακόλουθα στοιχεία.

Υπό δοκιμή χημική ουσία

Μονοσυστατική ουσία

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία,

— φυσική εμφάνιση, διαλυτότητα πλήρους θρεπτικού μέσου, διαλυτότητα σε DMSO, μοριακό βάρος και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

— κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),

— ελεγχθείσα συγκέντρωση/-εις,

— συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη/φορέα για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία.

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγμα:

— χαρακτηρισμός, στο μέτρο του δυνατού, π.χ. χημική ταυτότητα (βλ. ανωτέρω), καθαρότητα, ποσότητα και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες (βλ. ανωτέρω) των συστατικών, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— φυσική εμφάνιση, διαλυτότητα πλήρους θρεπτικού μέσου, διαλυτότητα σε DMSO και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— μοριακό βάρος ή φαινόμενο μοριακό βάρος στην περίπτωση των μειγμάτων/πολυμερών γνωστής σύνθεσης ή άλλες πληροφορίες που έχουν σημασία για τη διεξαγωγή της μελέτης,

— κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),

— ελεγχθείσα συγκέντρωση/-εις,

— συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη/φορέα για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία.

▼**M8**

Μάρτυρες

Θετικός μάρτυρας

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία,

— φυσική εμφάνιση, διαλυτότητα σε DMSO, μοριακό βάρος και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, στο μέτρο του δυνατού και ανάλογα με την περίπτωση,

— καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

— κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),

— ελεγχθείσα συγκέντρωση/-εις,

— συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— παραπομπή σε ιστορικά αποτελέσματα θετικών μαρτύρων που καταδεικνύουν την εφαρμογή κατάλληλων κριτηρίων αποδοχής των μετρήσεων, εάν ισχύει.

Αρνητικός μάρτυρας και μάρτυρας με διαλύτη/φορέα

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία,

— καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

— φυσική εμφάνιση, μοριακό βάρος, καθώς και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, σε περίπτωση χρήσης άλλου διαλύτη/φορέα εκτός εκείνων που αναφέρονται στην κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών και εφόσον είναι διαθέσιμα,

— συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη/φορέα για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία.

Συνθήκες δοκιμής

— όνομα και διεύθυνση του χορηγού, της εγκατάστασης δοκιμών και του διευθυντή της μελέτης,

— περιγραφή της χρησιμοποιούμενης δοκιμής,

— κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε, συνθήκες φύλαξης και προέλευσή της (π.χ. εγκατάσταση προέλευσης),

— χρησιμοποιηθείσα μέθοδος κυτταρομετρίας ροής (π.χ. μοντέλο), περιλαμβανομένων των χρησιμοποιηθέντων οργάνων, αντισωμάτων και δεικτών κυτταροτοξικότητας,

— η διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε για να αποδειχθεί η τεχνική ικανότητα του εργαστηρίου να διεξάγει τη δοκιμή μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας, και η διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε για να αποδειχθεί η διαχρονική αναπαραγωγιμότητα της διεξαγωγής της δοκιμής, π.χ. ιστορικά δεδομένα για μάρτυρες και/ή ιστορικά δεδομένα ελέγχων δραστικότητας.

Κριτήρια αποδοχής της δοκιμής

— κυτταρική βιωσιμότητα και τιμές S.I. CD86 που ελήφθησαν με τον μάρτυρα με διαλύτη/φορέα σε σύγκριση με τα αποδεκτά πεδία τιμών,

▼**M8**

— κυτταρική βιωσιμότητα και τιμές S.I. που ελήφθησαν με τον θετικό μάρτυρα σε σύγκριση με τα αποδεκτά πεδία τιμών,

— κυτταρική βιωσιμότητα όλων των ελεγχθεισών συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Διαδικασία δοκιμής

— αριθμός σειρών δοκιμών που χρησιμοποιήθηκαν,

— συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, χρόνος εφαρμογής και έκθεσης που χρησιμοποιήθηκε (εάν διαφέρει από τον συνιστώμενο),

— διάρκεια της έκθεσης,

— περιγραφή των χρησιμοποιούμενων κριτηρίων αξιολόγησης και λήψης αποφάσεων,

— περιγραφή τυχόν τροποποιήσεων της διαδικασίας δοκιμής.

Αποτελέσματα

— δεδομένα υπό μορφή πίνακα, περιλαμβανομένης της CV70 (κατά περίπτωση), του S.I., των τιμών κυτταρικής βιωσιμότητας, των τιμών EC150 (κατά περίπτωση) που υπολογίστηκαν για την υπό δοκιμή χημική ουσία και για τον θετικό μάρτυρα σε κάθε σειρά δοκιμών, και ένδειξη της κατάταξης της υπό δοκιμή χημικής ουσία σύμφωνα με το μοντέλο πρόβλεψης,

— περιγραφή κάθε άλλης σχετικής παρατήρησης, κατά περίπτωση.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

— εξέταση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν με τη δοκιμή U-SENS™,

— εξέταση των αποτελεσμάτων δοκιμής στο πλαίσιο της IATA, εάν υπάρχουν σχετικές πληροφορίες.

Συμπεράσματα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

(2) EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations

(3) EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28 178 EL· doi 10.2 787/8157 37. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705].

(4) EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28 553 EL· doi 10.2 760/5889 55. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing.

(5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014.*Cosmetics* 3, 14.

▼**M8**

(6) OECD (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337-351.

(8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373-382.

(9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehnl, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259-270.

(10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1 683-1 696.

(11) OECD. (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS™), 33pp. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: .[http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/]

(13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565-577.

(14) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(15) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York & Geneva: United Nations Publications. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(16) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Μέρος 1: Series on Testing and Assessment No. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(17) ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Brussels. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

▼**M8**

Προσάρτημα 2.1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ορθότητα: ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της δοκιμής και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί κριτήριο επιδόσεων της δοκιμής και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς τη «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας δοκιμής (14).

AOP (Adverse Outcome Pathway): πορεία δυσμενούς έκβασης αλληλουχία συμβάντων, από τη χημική δομή της στοχευόμενης χημικής ουσίας ή ομάδας ομοειδών χημικών ουσιών και το μοριακό εναρκτήριο συμβάν μέχρι την εξεταζόμενη έκβαση *in vivo* (15).

Απόκριση συγκέντρωσης CD86: η απόκριση εξαρτάται από τη συγκέντρωση (απόκριση συγκέντρωσης) όταν μια θετική συγκέντρωση (S.I. CD86 ≥ 150) ακολουθείται από συγκέντρωση με αυξανόμενο S.I. CD86.

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

CV70: η εκτιμώμενη συγκέντρωση που παρουσιάζει κυτταρική βιωσιμότητα 70 %.

Ολίσθηση: ολίσθηση υφίσταται όταν i) η διορθωμένη τιμή %$CD86^+$ του πανομοιότυπου δείγματος 3 του μάρτυρα χωρίς αγωγή είναι μικρότερη από το 50 % του μέσου όρου της διορθωμένης τιμής %$CD86^+$ των πανομοιότυπων δειγμάτων 1 και 2 του μάρτυρα χωρίς αγωγή, και όταν ii) η διορθωμένη τιμή %$CD86^+$ του πανομοιότυπου δείγματος 3 του αρνητικού μάρτυρα είναι μικρότερη από το 50 % του μέσου όρου της διορθωμένης τιμής %$CD86^+$ των πανομοιότυπων δειγμάτων 1 και 2 του αρνητικού μάρτυρα.

EC150: οι εκτιμώμενες συγκεντρώσεις που εμφανίζουν S.I. 150 % της έκφρασης του CD86.

Κυτταρομετρία ροής: κυτταρομετρική τεχνική κατά την οποία κύτταρα εναιωρημένα εντός υγρού διασχίζουν ένα-ένα την εστία μιας φωτεινής δέσμης διέγερσης, η οποία σκεδάζεται με τρόπους χαρακτηριστικούς των κυττάρων και των συστατικών τους· τα κύτταρα σημαίνονται συχνά με φθορίζοντες δείκτες οι οποίοι πρώτα απορροφούν και κατόπιν επανεκπέμπουν το φως σε διαφορετική συχνότητα.

Επικινδυνότητα: εγγενής ιδιότητα ενός παράγοντα ή μιας κατάστασης που μπορεί να έχει δυσμενείς επιδράσεις όταν ένας οργανισμός, ένα σύστημα ή ένας (υπο)πληθυσμός εκτίθεται στον παράγοντα.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment): ολοκληρωμένη προσέγγιση για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση δομημένη προσέγγιση που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της επικινδυνότητας (δυναμικό), τον χαρακτηρισμό της επικινδυνότητας (ισχύς) και/ή την εκτίμηση της ασφάλειας (δυναμικό/ισχύς και έκθεση) μιας χημικής ουσίας ή ομάδας χημικών ουσιών, στην οποία ενσωματώνονται και σταθμίζονται στρατηγικά όλα τα σχετικά δεδομένα, με σκοπό την τροφοδότηση κανονιστικών αποφάσεων σχετικά με τη δυνητική επικινδυνότητα και/ή τον κίνδυνο και/ή την ανάγκη για περαιτέρω στοχευμένες και, ως εκ τούτου, ελάχιστες δοκιμές.

Μείγμα: ένα μείγμα ή διάλυμα που αποτελείται από δύο ή περισσότερες ουσίες.

Μονοσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας ένα κύριο συστατικό περιέχεται σε ποσοστό τουλάχιστον 80 % κ.β.

Πολυσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας περισσότερα από ένα κύρια συστατικά περιέχονται σε συγκέντρωση ≥ 10 % κ.β. και < 80 % κ.β. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα μεταποιητικών διεργασιών. Η διαφορά μεταξύ μείγματος και πολυσυστατικής ουσίας είναι ότι το μείγμα λαμβάνεται με ανάμειξη δύο ή περισσότερων ουσιών, χωρίς χημική αντίδραση. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα χημικών αντιδράσεων.

▼M8

Θετικός μάρτυρας: πανομοιότυπο δείγμα που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και υποβάλλεται σε αγωγή με ουσία που είναι γνωστό ότι προκαλεί θετική απόκριση. Για να διασφαλίζεται η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας της απόκρισης του θετικού μάρτυρα σε συνάρτηση με τον χρόνο, το μέγεθος της θετικής απόκρισης δεν θα πρέπει να είναι υπερβολικό.

Αβιοτικά προαπτένια: χημικές ουσίες που καθίστανται ευαισθητοποιητικές μέσω αβιοτικού μετασχηματισμού, π.χ. μέσω οξείδωσης.

Μεταβολικά προαπτένια: χημικές ουσίες που χρειάζονται ενζυμική ενεργοποίηση για να εκδηλώσουν το δυναμικό δερματικής ευαισθητοποίησής τους.

Καταλληλότητα: περιγραφή της σχέσης της δοκιμής με την υπό μελέτη επίδραση και του κατά πόσον αυτή έχει σημασία και είναι χρήσιμη για συγκεκριμένο σκοπό. Πρόκειται για τον βαθμό στον οποίο η δοκιμή μετρά ή προβλέπει σωστά τη βιολογική επίδραση υπό μελέτη. Η καταλληλότητα εμπεριέχει συνεκτίμηση της ορθότητας (συμφωνίας) της δοκιμής (14).

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια δοκιμή μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, καθώς και της ενδοεργαστηριακής επαναληψιμότητας (14).

Σειρά δοκιμών: μια σειρά περιλαμβάνει μία ή περισσότερες υπό δοκιμή χημικές ουσίες που υποβάλλονται σε δοκιμή ταυτόχρονα με μάρτυρα με διαλύτη/φορέα και με θετικό μάρτυρα.

Ευαισθησία: το ποσοστό του συνόλου των θετικών/δραστικών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, και είναι σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των δοκιμών (14).

S.I.: δείκτης διέγερσης. Οι σχετικές τιμές του γεωμετρικού μέσου όρου έντασης φθορισμού σε κύτταρα που υποβάλλονται σε αγωγή με υπό δοκιμή χημική ουσία σε σύγκριση με κύτταρα που υποβάλλονται σε αγωγή με διαλύτη/φορέα.

Μάρτυρας με διαλύτη/φορέα: δείγμα που δεν υποβάλλεται σε αγωγή και περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής, εκτός της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, αλλά περιλαμβανομένου του διαλύτη/φορέα που χρησιμοποιείται. Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της βασικής απόκρισης των δειγμάτων που υποβάλλονται σε αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία διαλυμένη ή σταθερώς διεσπαρμένη στον ίδιο διαλύτη/φορέα. Όταν το εν λόγω δείγμα υποβάλλεται σε δοκιμή με παράλληλο μάρτυρα θρεπτικού μέσου, καταδεικνύει επίσης αν ο διαλύτης/φορέας αλληλεπιδρά με το σύστημα δοκιμής.

Ειδικότητα: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών/αδρανών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο ορθότητας της δοκιμής με την οποία λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας της δοκιμής (14).

Ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης: αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων που περιέχει 5 % ορού εμβρύων μόσχων.

Ουσία: ένα χημικό στοιχείο και οι ενώσεις του σε φυσική κατάσταση ή όπως λαμβάνονται με οποιαδήποτε παραγωγική διεργασία, στα οποία συμπεριλαμβάνονται όλα τα πρόσθετα που απαιτούνται για να διατηρείται η σταθερότητά του, καθώς και τυχόν προσμείξεις που προκύπτουν από τη χρησιμοποιούμενη διεργασία, αλλά από τα οποία εξαιρούνται οι διαλύτες που είναι δυνατόν να διαχωριστούν χωρίς να επηρεαστεί η σταθερότητα της ουσίας ούτε να μεταβληθεί η σύνθεσή της.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με χρήση της παρούσας δοκιμής.

▼**M8**

Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Προϊόντων των Ηνωμένων Εθνών (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) (GHS του ΟΗΕ): σύστημα που προτείνει την ταξινόμηση των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) με βάση τυποποιημένα είδη και βαθμούς φυσικής επικινδυνότητας και επικινδυνότητας για την υγεία και το περιβάλλον και καλύπτει τα αντίστοιχα στοιχεία γνωστοποίησης, όπως εικονογράμματα, προειδοποιητικές λέξεις, δηλώσεις επικινδυνότητας, δηλώσεις προφύλαξης και δελτία δεδομένων ασφαλείας, με τα οποία γνωστοποιούνται πληροφορίες σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις με σκοπό την προστασία των ανθρώπων (εργοδοτών, εργαζομένων, μεταφορέων, καταναλωτών και διασωστών) και του περιβάλλοντος (16).

UVCB: ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, πολύπλοκα προϊόντα αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά.

Έγκυρη δοκιμή: δοκιμή που θεωρείται επαρκούς καταλληλότητας και αξιοπιστίας για συγκεκριμένο σκοπό και βασίζεται σε επιστημονικά τεκμηριωμένες αρχές. Μια δοκιμή δεν είναι ποτέ έγκυρη με την απόλυτη σημασία του όρου, αλλά μόνο σε σχέση με καθορισμένο σκοπό (14).

▼**M8**

Προσάρτημα 2.2

ΟΥΣΙΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

Πριν εντάξουν στην καθημερινή πρακτική τη δοκιμή που περιγράφεται στο παρόν προσάρτημα της μεθόδου δοκιμών B.71, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα επιτυγχάνοντας σωστά την αναμενόμενη πρόβλεψη βάσει της δοκιμής U-SENS™ για τις 10 συνιστώμενες ουσίες στον πίνακα 1, καθώς και τιμές CV70 και EC150 εντός του αντίστοιχου εύρους τιμών αναφοράς για 8 τουλάχιστον από τις 10 ουσίες ελέγχου ικανότητας. Αυτές οι ουσίες ελέγχου ικανότητας επιλέχθηκαν ως αντιπροσωπευτικές του φάσματος αποκρίσεων από τις πηγές κινδύνου δερματικής ευαισθητοποίησης. Άλλα κριτήρια επιλογής ήταν ότι οι ουσίες θα πρέπει να είναι διαθέσιμες στο εμπόριο και ότι θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμα *in vivo* δεδομένα αναφοράς υψηλής ποιότητας καθώς και *in vitro* δεδομένα υψηλής ποιότητας που προκύπτουν με τη δοκιμή U-SENS™. Επίσης, για τη δοκιμή U-SENS™ υπάρχουν διαθέσιμα δημοσιευμένα δεδομένα αναφοράς (1) (8).

Πίνακας 1

Συνιστώμενες ουσίες για την απόδειξη τεχνικής ικανότητας όσον αφορά τη δοκιμή U-SENS™

Ουσίες ελέγχου ικανότητας	Αριθμός CAS	Φυσική κατάσταση	*Πρόβλεψη* in vivo (1)	U-SENS Διαλύτης/φορέας	U-SENS Πεδίο τιμών αναφοράς CV70 σε μg/ml (2)	U-SENS Πεδίο τιμών αναφοράς EC150 σε μg/ml (2)
4-Φαινυλενοδιαμίνη	106-50-3	Στερεό	Ευαισθητοποιητικό (ισχυρό)	Πλήρες θρεπτικό μέσο (3)	<30	Θετικό (≤10)
Πικρυλοσουλφονικό οξύ	2508-19-2	Υγρό	Ευαισθητοποιητικό (ισχυρό)	Πλήρες θρεπτικό μέσο	>50	Θετικό (≤50)
Μηλεϊνικό διαιθύλιο	141-05-9.	Υγρό	Ευαισθητοποιητικό (μετρίως ισχυρό)	DMSO	10-100	Θετικό (≤20)
Ρεσορκινόλη	108-46-3	Στερεό	Ευαισθητοποιητικό (μετρίως ισχυρό)	Πλήρες θρεπτικό μέσο	>100	Θετικό (≤50)
Κινναμωμική αλκοόλη	104-54-1	Στερεό	Ευαισθητοποιητικό (ασθενές)	DMSO	>100	Θετικό (10-100)
4-Αλλυλανισόλη	140-67-0	Υγρό	Ευαισθητοποιητικό (ασθενές)	DMSO	>100	Θετικό (<200)
Σακχαρίνη	81-07-2	Στερεό	Μη ευαισθητοποιητικό	DMSO	>200	Αρνητικό (>200)
Γλυκερίνη	56-81-5	Υγρό	Μη ευαισθητοποιητικό	Πλήρες θρεπτικό μέσο	>200	Αρνητικό (>200)
Γαλακτικό οξύ	50-21-5	Υγρό	Μη ευαισθητοποιητικό	Πλήρες θρεπτικό μέσο	>200	Αρνητικό (>200)
Σαλικυλικό οξύ	69-72-7	Στερεό	Μη ευαισθητοποιητικό	DMSO	>200	Αρνητικό (>200)

Συντομογραφίες: Αριθμός CAS = αριθμός μητρώου της υπηρεσίας Chemical Abstract Service

(1) Η πρόβλεψη για την επικινδυνότητα *in vivo* (και την ισχύ) βασίζεται σε δεδομένα από LLNA (1) (8). Η *in vivo* ισχύς προκύπτει με χρήση των κριτηρίων που προτείνει το ECETOC (17).

(2) Βάσει των ιστορικών τιμών που παρατηρήθηκαν (1) (8).

(3) Πλήρες θρεπτικό μέσο: θρεπτικό μέσο RPMI-1640, συμπληρωμένο με 10 % ορού εμβρύων μόσχων, 2 mM L-γλουταμίνης, 100 μονάδες/ml πενικιλίνης και 100 μg/ml στρεπτομυκίνης (8).

▼**M8**

Προσάρτημα 3

IN VITRO ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ: ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ IL-8 LUC

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

1. Σε αντίθεση με τις δοκιμασίες που αναλύουν την έκφραση δεικτών κυτταρικής επιφάνειας, η δοκιμασία IL8-Luc προσδιορίζει ποσοτικά τις αλλαγές στην έκφραση της IL-8, μιας κυτταροκίνης που συνδέεται με την ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων (DC). Στην κυτταρική σειρά έκφρασης γονιδίου αναφοράς IL-8 που προέκυψε από την THP-1 (THP-G8, που δημιουργήθηκε από την ανθρώπινη κυτταρική σειρά οξείας μονοκυτταρικής λευχαιμίας THP-1), η έκφραση της IL-8 μετράται μετά από έκθεση σε ευαισθητοποιητικές ουσίες (1). Στη συνέχεια, η έκφραση της λουσιφεράσης χρησιμοποιείται για την υποστήριξη της διάκρισης μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος.

2. Η δοκιμασία IL-8 Luc έχει αξιολογηθεί στο πλαίσιο μελέτης επικύρωσης (2) που διεξήγαγε το Ιαπωνικό Κέντρο για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (JaCVAM), το ιαπωνικό **Υπουργείο Οικονομίας, Εμπορίου και Βιομηχανίας** (METI), και η Ιαπωνική Εταιρεία Εναλλακτικών Μεθόδων προς τα Πειράματα σε Ζώα (JSAAE), και η οποία υποβλήθηκε στη συνέχεια σε ανεξάρτητη αξιολόγηση από ομοτίμους (3) υπό την αιγίδα του JaCVAM και του ιαπωνικού Υπουργείου Υγείας, Εργασίας και Κοινωνικής Πρόνοιας (MHLW), με την υποστήριξη της **Διεθνούς Συνεργασίας για τις Εναλλακτικές Μεθόδους Δοκιμών** (ICATM). Λαμβανομένου υπόψη του συνόλου των διαθέσιμων στοιχείων και των απόψεων των ρυθμιστικών αρχών και των ενδιαφερόμενων μερών, η δοκιμασία IL-8 Luc θεωρείται χρήσιμη στο πλαίσιο IATA για τη διάκριση μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών ουσιών με σκοπό την ταξινόμηση και επισήμανση επικινδυνότητας. Παραδείγματα σχετικά με τη χρήση δεδομένων δοκιμασίας IL-8 Luc σε συνδυασμό με άλλα στοιχεία έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία (4) (5) (6).

3. Η δοκιμασία IL-8 Luc αποδείχθηκε ότι μπορεί να εφαρμοστεί σε εργαστήρια που διαθέτουν εμπειρία στην κυτταροκαλλιέργεια και τη μέτρηση λουσιφεράσης. Η αναπαραγωγιμότητα εντός και μεταξύ των εργαστηρίων ήταν 87,7 % και 87,5 %, αντίστοιχα (2). Τα δεδομένα που προέκυψαν από τη μελέτη επικύρωσης (2) και άλλες δημοσιευμένες εργασίες (1) (6) δείχνουν ότι, σε σύγκριση με την LLNA, με τη δοκιμασία IL-8 Luc 118 από τις 143 χημικές ουσίες κρίθηκαν θετικές ή αρνητικές ενώ για 25 χημικές ουσίες η δοκιμή δεν ήταν καταληκτική, και η ορθότητα της δοκιμασίας IL-8 Luc όσον αφορά τη διάκριση μεταξύ ευαισθητοποιητικών (κατηγορία 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP) και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος ουσιών (καμία κατηγορία κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP) είναι 86 % (101/118), με ευαισθησία 96 % (92/96) και ειδικότητα 41 % (9/22). Με εξαίρεση τις ουσίες που δεν εμπίπτουν στο πεδίο εφαρμογής όπως περιγράφεται κατωτέρω (παράγραφος 5), με τη δοκιμασία IL-8 Luc 113 από τις 136 χημικές ουσίες κρίθηκαν θετικές ή αρνητικές ενώ για 23 χημικές ουσίες η δοκιμή δεν ήταν καταληκτική, και η ορθότητα της δοκιμασίας IL-8 Luc είναι 89 % (101/113), με ευαισθησία 96 % (92/96) και ειδικότητα 53 % (9/17). Με χρήση δεδομένων για τον άνθρωπο από τους Urbisch et al. (7), με τη δοκιμασία IL-8 Luc 76 από τις 90 χημικές ουσίες κρίθηκαν θετικές ή αρνητικές ενώ για 14 χημικές ουσίες η δοκιμή δεν ήταν καταληκτική, και η ορθότητα της δοκιμασίας είναι 80 % (61/76), η ευαισθησία 93 % (54/58) και η ειδικότητα 39 % (7/18). Με εξαίρεση τις ουσίες που δεν εμπίπτουν στο πεδίο εφαρμογής της, με τη δοκιμασία IL-8 Luc 71 από τις 84 χημικές ουσίες κρίθηκαν θετικές ή αρνητικές ενώ για 13 χημικές ουσίες η δοκιμή δεν ήταν καταληκτική, και η ορθότητα της δοκιμασίας είναι 86 % (61/71) με ευαισθησία 93 % (54/58) και ειδικότητα 54 % (7/13). Οι ψευδοαρνητικές προβλέψεις με τη δοκιμασία IL-8 Luc αφορούν πιθανότατα χημικές ουσίες που εμφανίζουν χαμηλή έως μέτρια ισχύ ευαισθητοποίησης του δέρματος (υποκατηγορία 1B κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP) παρά ουσίες με υψηλή ισχύ (υποκατηγορία 1A κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP) (6). Συνολικά, τα στοιχεία υποστηρίζουν τον ρόλο της δοκιμασίας IL-8 Luc στον

▼M8

προσδιορισμό της επικινδυνότητας ευαισθητοποίησης του δέρματος. Οι τιμές ορθότητας που παρέχονται για τη δοκιμασία IL-8 Luc ως αυτοτελή δοκιμή είναι απλώς ενδεικτικές, δεδομένου ότι η δοκιμή θα πρέπει να εξετάζεται σε συνδυασμό με άλλες πηγές πληροφοριών στο πλαίσιο IATA και σύμφωνα με τις πληροφορίες στις παραγράφους 7 και 8 της γενικής εισαγωγής. Επιπλέον, κατά την αξιολόγηση των δοκιμών ευαισθητοποίησης του δέρματος χωρίς χρήση ζώων, θα πρέπει να μη λησμονείται ότι η δοκιμασία LLNA, καθώς και άλλες δοκιμές σε ζώα, ενδέχεται να μην αντικατοπτρίζουν πλήρως την κατάσταση στον άνθρωπο.

4. Με βάση το σύνολο των διαθέσιμων δεδομένων, η δοκιμασία IL-8 Luc είναι εφαρμόσιμη σε υπό δοκιμή χημικές ουσίες που καλύπτουν ποικιλία οργανικών λειτουργικών ομάδων, μηχανισμών αντίδρασης, επιπέδων ισχύος ευαισθητοποίησης του δέρματος (όπως προσδιορίζονται σε μελέτες *in vivo*) και φυσικοχημικών ιδιοτήτων (2) (6).

5. Παρότι στη δοκιμασία IL-8 Luc χρησιμοποιείται ως διαλύτης το X-VIVO™ 15, με τη δοκιμασία IL-8 Luc αξιολογήθηκαν σωστά χημικές ουσίες με Log K_{ow} >3,5 καθώς και χημικές ουσίες με διαλυτότητα γύρω στα 100 μg/ml, όπως υπολογίστηκε με το EPI Suite™, ενώ οι επιδόσεις της όσον αφορά την ανίχνευση ευαισθητοποιητικών ουσιών με χαμηλή υδατοδιαλυτότητα είναι καλύτερες σε σχέση με τις αντίστοιχες της δοκιμασίας IL-8 Luc με χρήση διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) ως διαλύτη (2). Ωστόσο, αρνητικά αποτελέσματα για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν διαλύονται σε 20 mg/ml ενδέχεται να έχουν ως αποτέλεσμα ψευδοαρνητικά αποτελέσματα, λόγω της μη διαλυτότητάς τους στο X-VIVO™ 15. Ως εκ τούτου, τα αρνητικά αποτελέσματα για τις εν λόγω χημικές ουσίες δεν θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη. Στη μελέτη επικύρωσης διαπιστώθηκε υψηλό ποσοστό ψευδοαρνητικών αποτελεσμάτων για τους ανυδρίτες. Επιπλέον, λόγω της περιορισμένης μεταβολικής ικανότητας της κυτταρικής σειράς (8) και των πειραματικών συνθηκών, τα μεταβολικά προαπτένια (ουσίες που χρειάζονται μεταβολική ενεργοποίηση) και τα αβιοτικά προαπτένια (ουσίες που ενεργοποιούνται με οξείδωση από τον αέρα) ενδέχεται να δώσουν αρνητικά αποτελέσματα στη δοκιμασία. Ωστόσο, αν και τα αρνητικά αποτελέσματα για τα μεταβολικά/αβιοτικά προαπτένια για τα οποία υπάρχουν οι σχετικές υπόνοιες θα πρέπει να ερμηνεύονται με επιφύλαξη, με τη δοκιμασία IL-8 Luc κρίθηκαν σωστά 11 από 11 αβιοτικά προαπτένια, 6/6 μεταβολικά προαπτένια, και 6/8 αβιοτικά/μεταβολικά προαπτένια στο σύνολο δεδομένων της δοκιμασίας IL-8 Luc (2). Με βάση την πρόσφατη ολοκληρωμένη επισκόπηση τριών δοκιμών χωρίς χρήση ζώων (της DPRA, της KeratinoSens™ και της h-CLAT) ως προς την ικανότητά τους να ανιχνεύουν τα αβιοτικά και μεταβολικά προαπτένια (9), και βάσει του γεγονότος ότι τα κύτταρα THP-G8 που χρησιμοποιούνται στη δοκιμασία IL-8 Luc αποτελούν κυτταρική σειρά που προκύπτει από την THP-1 που χρησιμοποιείται στην h-CLAT, η δοκιμασία IL-8 Luc μπορεί επίσης να συμβάλει, σε συνδυασμό με άλλες δοκιμές, στην ενίσχυση της ευαισθησίας των δοκιμών χωρίς χρήση ζώων όσον αφορά την ανίχνευση των αβιοτικών και μεταβολικών προαπτενίων. Οι επιφανειοδραστικές ουσίες που έχουν δοκιμαστεί μέχρι σήμερα έδωσαν (ψευδο)θετικά αποτελέσματα, ανεξάρτητα από το είδος τους (π.χ. κατιονικές, ανιονικές ή μη ιονικές). Τέλος, οι χημικές ουσίες που παρεμποδίζουν τη λουσιφεράση μπορεί να προκαλέσουν σύγχυση ως προς τη δράση/μέτρησή της, προκαλώντας είτε φαινομενική αναστολή είτε αυξημένη φωταύγεια (10). Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι συγκεντρώσεις φυτοοιστρογόνων ανώτερες του 1 μM παρεμπόδιζαν τα σήματα φωταύγειας σε άλλες δοκιμασίες με λουσιφεράση ως γονίδιο αναφοράς, λόγω υπερενεργοποίησης του γονιδίου αναφοράς. Κατά συνέπεια, θα πρέπει να εξετάζεται με προσοχή η έκφραση της λουσιφεράσης σε υψηλές συγκεντρώσεις φυτοοιστρογόνων ή ενώσεων για τις οποίες υπάρχουν υπόνοιες ότι προκαλούν ενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης ανάλογη με εκείνη που οφείλεται στα φυτοοιστρογόνα (11). Με βάση τα παραπάνω, τα επιφανειοδραστικά, οι ανυδρίτες και οι χημικές ουσίες που παρεμποδίζουν τη λουσιφεράση δεν εμπίπτουν στο πεδίο εφαρμογής της παρούσας δοκιμασίας. Εάν υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι η δοκιμασία IL-8 Luc δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε άλλες ειδικές κατηγορίες υπό δοκιμή χημικών ουσιών, η δοκιμή δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τις συγκεκριμένες κατηγορίες.

6. Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, η μέθοδος IL-8 Luc υποστηρίζει τη διάκριση μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος. Για να προσδιοριστεί το κατά πόσον τα αποτελέσματα της IL-8 Luc μπορούν να συμβάλουν στην εκτίμηση της ισχύος, όταν αυτή πραγματοποιείται σε συνδυασμό με άλλες πηγές πληροφοριών, απαιτούνται περαιτέρω εργασίες, κατά προτίμηση με βάση δεδομένα για τον άνθρωπο.

▼**M8**

7. Οι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 3.1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

8. Στη δοκιμασία IL-8 Luc γίνεται χρήση ανθρώπινης κυτταρικής σειράς μονοκυτταρικής λευχαιμίας, της THP-1, η οποία ελήφθη από τη συλλογή American Type Culture Collection (Manassas, VA, ΗΠΑ). Με χρήση της εν λόγω κυτταρικής σειράς, το τμήμα δερματολογίας της ιατρικής σχολής του πανεπιστημίου του Tohoku δημιούργησε μια κυτταρική σειρά γονιδίου αναφοράς IL-8 προερχόμενη από την THP-1, την THP-G8, η οποία φέρει τα γονίδια σταθερής λουσιφεράσης πορτοκαλί χρώματος (SLO) και σταθερής λουσιφεράσης κόκκινου χρώματος (SLR) υπό τον έλεγχο των υποκινητών της IL-8 και της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΰδης (GAPDH) αντίστοιχα (1). Αυτό επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό της επαγωγής του γονιδίου λουσιφεράσης μέσω ανίχνευσης της φωταύγειας από καθιερωμένα φωταυγή υποστρώματα λουσιφεράσης ως δείκτη της δραστικότητας της IL-8 και της GAPDH στα κύτταρα μετά από έκθεση σε ευαισθητοποιητικές χημικές ουσίες.

9. Το σύστημα δοκιμασίας δύο χρωμάτων περιλαμβάνει λουσιφεράση που εκπέμπει πορτοκαλί χρώμα (SLO, λmax = 580 nm) (12) για τη γονιδιακή έκφραση του υποκινητή IL-8, και λουσιφεράση που εκπέμπει κόκκινο χρώμα (SLR, λmax = 630 nm) (13) για τη γονιδιακή έκφραση του υποκινητή εσωτερικού μάρτυρα, GAPDH. Οι δύο λουσιφεράσες εκπέμπουν διαφορετικά χρώματα όταν αντιδρούν με την d-λουσιφερίνη της πυγολαμπίδας και η φωταύγειά τους μετράται ταυτόχρονα σε αντίδραση ενός σταδίου, μέσω διαχωρισμού του φωτός που εκπέμπεται από το μείγμα της δοκιμασίας με χρήση οπτικού φίλτρου (14) (προσάρτημα 3.2).

10. Τα κύτταρα THP-G8 υποβάλλονται σε αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία επί 16 ώρες και, στη συνέχεια, μετράται η δραστικότητα της λουσιφεράσης SLO (SLO-LA) που αντικατοπτρίζει τη δραστικότητα του υποκινητή IL-8 και η δραστικότητα της λουσιφεράσης SLR (SLR-LA) που αντικατοπτρίζει τη δραστικότητα του υποκινητή GAPDH. Προκειμένου να διευκολυνθεί η κατανόηση των συντομογραφιών, τα SLO-LA και SLR-LA αναφέρονται ως IL8LA και GAPLA αντίστοιχα. Στον πίνακα 1 παρέχεται περιγραφή των όρων που σχετίζονται με τη δραστικότητα της λουσιφεράσης στη δοκιμασία IL-8 Luc. Οι μετρηθείσες τιμές χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της κανονικοποιημένης IL8LA (nIL8LA), η οποία αντιστοιχεί στον λόγο IL8LA προς GAPLA· της επαγωγής της nIL8LA (Ind-IL8LA), η οποία αντιστοιχεί στον λόγο των αριθμητικών μέσων όρων των εις τετραπλούν μετρηθεισών τιμών της nIL8LA των κυττάρων THP-G8 που υποβλήθηκαν σε αγωγή με υπό δοκιμή χημική ουσία προς τις τιμές της nIL8LA των κυττάρων THP-G8 χωρίς αγωγή· και της αναστολής της GAPLA (Inh-GAPLA), η οποία αντιστοιχεί στον λόγο των αριθμητικών μέσων όρων των εις τετραπλούν μετρηθεισών τιμών της GAPLA των κυττάρων THP-G8 που υποβλήθηκαν σε αγωγή με υπό δοκιμή χημική ουσία προς τις τιμές της GAPLA των κυττάρων THP-G8 χωρίς αγωγή, η οποία χρησιμοποιείται ως δείκτης κυτταροτοξικότητας.

Πίνακας 1

Περιγραφή των όρων που σχετίζονται με τη δράση της λουσιφεράσης στη δοκιμασία IL-8 Luc

Συντομογραφίες	Ορισμός
GAPLA	δραστικότητα της λουσιφεράσης SLR που αντικατοπτρίζει τη δραστικότητα του υποκινητή GAPDH
IL8LA	δραστικότητα της λουσιφεράσης SLO που αντικατοπτρίζει τη δραστικότητα του υποκινητή IL-8
nIL8LA	IL8LA / GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA των κυττάρων THP-G8 που υποβάλλονται σε αγωγή με χημικές ουσίες / nIL8LA κυττάρων χωρίς αγωγή

▼**M8**

Συντομογραφίες	Ορισμός
Inh-GAPLA	GAPLA των κυττάρων THP-G8 που υποβάλλονται σε αγωγή με χημικές ουσίες / GAPLA κυττάρων χωρίς αγωγή
CV05	η χαμηλότερη συγκέντρωση της χημικής ουσίας στην οποία η Inh-GAPLA καθίσταται < 0,05.

11. Υπάρχουν διαθέσιμα πρότυπα επιδόσεων (PS) (15) που διευκολύνουν την επικύρωση των τροποποιημένων *in vitro* δοκιμών λουσιφεράσης IL-8 που είναι παρεμφερείς με τη δοκιμασία IL-8 Luc και επιτρέπουν την έγκαιρη τροποποίηση της κατευθυντήριας γραμμής δοκιμών 442E του ΟΟΣΑ, ούτως ώστε να τις συμπεριλάβει. Η αμοιβαία αποδοχή δεδομένων (Mutual Acceptance of Data/MAD) του ΟΟΣΑ είναι διασφαλισμένη μόνο για δοκιμές που έχουν επικυρωθεί σύμφωνα με τα πρότυπα επιδόσεων, εφόσον αυτές έχουν κριθεί από τον ΟΟΣΑ και έχουν περιληφθεί στην κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 442E (16).

ΑΠΟΔΕΙΞΗ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

12. Πριν χρησιμοποιήσουν στην καθημερινή πρακτική τη δοκιμή που περιγράφεται στο παρόν προσάρτημα της μεθόδου δοκιμών B.71, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα, χρησιμοποιώντας τις 10 ουσίες ελέγχου ικανότητας του προσαρτήματος 3.3 σύμφωνα με τις ορθές πρακτικές *in vitro* μεθόδων (17). Επιπλέον, οι χρήστες της δοκιμής θα πρέπει να διατηρούν βάση ιστορικών δεδομένων με τα δεδομένα που προκύπτουν από τους ελέγχους δραστικότητας (βλ. παράγραφο 15) και με τους θετικούς μάρτυρες και τους μάρτυρες με διαλύτη/φορέα (βλ. παραγράφους 21-24), και θα πρέπει να χρησιμοποιούν τα εν λόγω δεδομένα για να βεβαιώνονται για τη διαχρονική αναπαραγωγιμότητα της δοκιμής στο εργαστήριό τους.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

13. Υπάρχει διαθέσιμη τυποποιημένη διαδικασία λειτουργίας (SOP) για τη δοκιμασία IL-8 Luc, η οποία θα πρέπει να χρησιμοποιείται κατά τη διεξαγωγή της (18). Τα εργαστήρια που επιθυμούν να διεξάγουν τη δοκιμή μπορούν ναπρομηθευτούν την ανασυνδυασμένη κυτταρική σειρά THP-G8 από την GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Ιαπωνία, κατόπιν υπογραφής συμφωνίας μεταφοράς υλικού (ΣΜΥ) σύμφωνα με τις προϋποθέσεις του υποδείγματος του ΟΟΣΑ. Στις επόμενες παραγράφους περιγράφονται τα βασικά στοιχεία και διαδικασίες της δοκιμασίας.

Προπαρασκευή των κυττάρων

14. Για τη διεξαγωγή της δοκιμασίας IL-8 Luc θα πρέπει να χρησιμοποιείται η κυτταρική σειρά THP-G8 από την GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Ιαπωνία (βλ. παραγράφους 8 και 13). Κατά την παραλαβή, τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται (2 έως 4 ανακαλλιέργειες) και φυλάσσονται στην κατάψυξη ως ομοιογενές απόθεμα. Τα κύτταρα του αποθέματος αυτού μπορούν να πολλαπλασιάζονται μέχρι και επί 12 ανακαλλιέργειες ή επί 6 εβδομάδες. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό είναι το RPMI-1 640 που περιέχει 10 % βόειου εμβρυϊκού ορού (FBS), αντιβιοτικό/αντιμυκητιακό διάλυμα (100 U/ml πενικιλίνης G, 100 μg/ml στρεπτομυκίνης και 0,25 μg/ml αμφοτερικίνης B σε αλατούχο διάλυμα 0,85 %) (π.χ. GIBCO αρ. κατ. 15 240-062), 0,15 μg/ml πουρομυκίνης (π.χ. CAS:58-58-2) και 300 μg/ml G418 (π.χ. CAS:108 321-42-2).

15. Πριν από τη χρήση τους στη δοκιμή, θα πρέπει να ελέγχεται εάν τα κύτταρα πληρούν τα κριτήρια μέσω της διεξαγωγής ελέγχου δραστικότητας. Ο εν λόγω έλεγχος θα πρέπει να διεξάγεται 1-2 εβδομάδες ή 2-4 ανακαλλιέργειες μετά την απόψυξη, με χρήση του θετικού μάρτυρα 1-βρωμομεθυλο-4-νιτροβενζόλιο (4-NBB) (CAS:100-11-8, καθαρότητα ≥ 99 %) και του αρνητικού μάρτυρα γαλακτικό οξύ (LA) (CAS:50-21-5, καθαρότητα ≥ 85 %). Το 4-NBB θα πρέπει να επάγει θετική απόκριση στην Ind-IL8LA (≥1,4), ενώ το LA θα πρέπει να επάγει αρνητική απόκριση στην Ind-IL8LA (<1,4). Για τη δοκιμασία χρησιμοποιούνται μόνο τα κύτταρα που έχουν υποβληθεί επιτυχώς στον έλεγχο δραστικότητας. Ο έλεγχος θα πρέπει να διενεργείται σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφονται στις παραγράφους 22-24.

▼M8

16. Για τη δοκιμή, τα κύτταρα THP-G8 εμβολιάζονται σε πυκνότητα 2 έως 5 × 10^5 κύτταρα/ml και προκαλλιεργούνται σε φιάλες καλλιέργειας επί 48 έως 96 ώρες. Την ημέρα διεξαγωγής της δοκιμής, τα κύτταρα που συλλέγονται από τη φιάλη καλλιέργειας εκπλένονται με RPMI-1 640 που περιέχει 10 % FBS χωρίς αντιβιοτικά και, στη συνέχεια, επανεναιωρούνται με RPMI-1 640 που περιέχει 10 % FBS χωρίς αντιβιοτικά σε πυκνότητα 1 × 10^6 κύτταρα/ml. Στη συνέχεια, τα κύτταρα κατανέμονται σε μαύρο τρυβλίο επίπεδης βάσης 96 κοιλοτήτων (π.χ. Costar αρ. κατ. 3603) με 50 μl (5 × 10^4 κύτταρα/κοιλότητα).

Παρασκευή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων

17. Η παρασκευή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων γίνεται την ημέρα της δοκιμής. Για τη δοκιμασία IL-8 Luc, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες διαλύονται σε X-VIVO™ 15, ένα θρεπτικό μέσο του εμπορίου χωρίς ορό (Lonza, 04-418Q), σε τελική συγκέντρωση 20 mg/ml. Προστίθεται X-VIVO™ 15 σε 20 mg της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (ανεξάρτητα από τη διαλυτότητα της χημικής ουσίας) σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης και συμπληρώνεται μέχρι όγκου 1 ml και, στη συνέχεια, το διάλυμα περιδινείται έντονα και ανακινείται σε περιστρεφόμενο αναδευτήρα σε μέγιστη ταχύτητα 8 σ.α.λ. επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος 20°C περίπου. Επιπλέον, σε περίπτωση στερεών χημικών ουσιών που εξακολουθούν να μη διαλύονται, το σωληνάριο υποβάλλεται σε υπερήχηση μέχρις ότου η χημική ουσία διαλυθεί πλήρως ή διασπαρεί σταθερά. Για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που είναι διαλυτές σε X-VIVO™ 15, το διάλυμα αραιώνεται 5 φορές με X-VIVO™ 15 και χρησιμοποιείται ως αποθεματικό διάλυμα X-VIVO™ 15 της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (4 mg/ml). Για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν είναι διαλυτές σε X-VIVO™ 15, το μείγμα περιστρέφεται εκ νέου επί τουλάχιστον 30 λεπτά, και, στη συνέχεια, φυγοκεντρείται στις 15000 σ.α.λ. (≈20000*g*) επί 5 λεπτά· το προκύπτον υπερκείμενο υγρό χρησιμοποιείται ως αποθεματικό διάλυμα X-VIVO™ 15 της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Η χρήση άλλων διαλυτών, όπως DMSO, νερού, ή του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας, θα πρέπει να τεκμηριώνεται επιστημονικά. Η αναλυτική διαδικασία για τη διάλυση χημικών ουσιών φαίνεται στο προσάρτημα 3.5. Τα διαλύματα X-VIVO™ 15 που περιγράφονται στις παραγράφους 18-23 αναμιγνύονται 1:1 (κ.ό.) με τα εναιωρήματα κυττάρων που παρασκευάστηκαν στο μαύρο τρυβλίο επίπεδης βάσης 96 κοιλοτήτων (βλ. παράγραφο 16).

18. Ο σκοπός της πρώτης σειράς δοκιμών είναι ο προσδιορισμός της κυτταροτοξικής συγκέντρωσης και η εξέταση της ισχύος δερματικής ευαισθητοποίησης των χημικών ουσιών. Με χρήση X-VIVO™ 15, πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις των αποθεματικών διαλυμάτων X-VIVO™ 15 των υπό δοκιμή χημικών ουσιών με συντελεστή αραίωσης 2 (βλ. προσάρτημα 3.5) και με χρήση τρυβλίου δοκιμασίας 96 κοιλοτήτων (π.χ. Costar αρ. κατ. EW-01729-03). Στη συνέχεια, προστίθενται 50 μl/κοιλότητα αραιωμένου διαλύματος σε 50 μl του εναιωρήματος κυττάρων σε μαύρο τρυβλίο επίπεδης βάσης 96 κοιλοτήτων. Έτσι, για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που είναι διαλυτές σε X-VIVO™ 15, οι τελικές συγκεντρώσεις των υπό δοκιμή χημικών ουσιών κυμαίνονται από 0,002 έως 2 mg/ml (προσάρτημα 3.5). Για υπό δοκιμή ουσίες που δεν είναι διαλυτές σε X-VIVO™ 15 στα 20 mg/ml, ορίζονται μόνο συντελεστές αραίωσης από 2 έως 2^{10}, παρότι οι πραγματικές τελικές συγκεντρώσεις των υπό δοκιμή χημικών ουσιών παραμένουν αμφίβολες και εξαρτώνται από τη συγκέντρωση κορεσμού των υπό δοκιμή χημικών ουσιών στο αποθεματικό διάλυμα X-VIVO™ 15.

19. Σε επακόλουθες σειρές δοκιμών (δεύτερο, τρίτο και τέταρτο πανομοιότυπο δείγμα), το αποθεματικό διάλυμα X-VIVO™ 15 παρασκευάζεται σε συγκέντρωση 4 φορές υψηλότερη από τη συγκέντρωση κυτταρικής βιωσιμότητας 05 (CV05, η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία η Inh-GAPLA καθίσταται < 0,05) στο πρώτο πείραμα. Εάν η Inh-GAPLA δεν μειωθεί κάτω από 0,05 στην υψηλότερη συγκέντρωση κατά την πρώτη σειρά δοκιμών, το αποθεματικό διάλυμα X-VIVO™ 15 παρασκευάζεται στην υψηλότερη συγκέντρωση της πρώτης σειράς δοκιμών. Η συγκέντρωση της CV05 υπολογίζεται διαιρώντας τη συγκέντρωση του αποθεματικού διαλύματος στην πρώτη σειρά δοκιμών με συντελεστή αραίωσης για την CV05 (X) [συντελεστής αραίωσης CV05 (X)· ο συντελεστής αραίωσης που απαιτείται για την αραίωση του αποθεματικού διαλύματος στην CV05] (βλ. προσάρτημα 3.5). Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν είναι διαλυτές σε X-VIVO σε 20 mg/ml, η CV05 προσδιορίζεται βάσει της συγκέντρωσης του αποθεματικού διαλύματος × 1/X. Για τις σειρές δοκιμών 2 έως 4, παρασκευάζεται δεύτερο αποθεματικό διάλυμα ως 4 × CV05 (προσάρτημα 3.5).

▼**M8**

20. Παρασκευάζονται διαδοχικές αραιώσεις των δεύτερων αποθεματικών διαλυμάτων X-VIVO™ 15 με συντελεστή αραίωσης 1,5, με χρήση τρυβλίου δοκιμασίας 96 κοιλοτήτων. Στη συνέχεια, προστίθενται 50 μl/κοιλότητα αραιωμένου διαλύματος σε 50 μl του εναιωρήματος κυττάρων στο μαύρο τρυβλίο επίπεδης βάσης 96 κοιλοτήτων. Κάθε συγκέντρωση κάθε υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να υποβάλλεται σε δοκιμή σε 4 κοιλότητες. Στη συνέχεια, τα μείγματα αναμιγνύονται σε αναδευτήρα τρυβλίων και επωάζονται επί 16 ώρες στους 37°C και με 5 % CO_2 και, κατόπιν, μετράται η δράση της λουσιφεράσης σύμφωνα με τα όσα ορίζονται κατωτέρω.

21. Ο μάρτυρας με διαλύτη είναι το μείγμα 50 μl/κοιλότητα X-VIVO™ 15 και 50 μl/κοιλότητα εναιωρήματος κυττάρων σε RPMI-1640 που περιέχει 10 % FBS.

22. Ο συνιστώμενος θετικός μάρτυρας είναι το 4-NBB. Παρασκευάζονται 20 mg 4-NBB σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης των 1,5 ml, στο οποίο προστίθεται έως 1 ml X-VIVO™ 15. Το σωληνάριο περιδινείται έντονα και ανακινείται σε περιστροφικό αναδευτήρα σε μέγιστη ταχύτητα 8 σ.α.λ. επί τουλάχιστον 30 λεπτά. Μετά από φυγοκέντρηση σε 20000g επί 5 λεπτά, το υπερκείμενο υγρό αραιώνεται κατά 4 φορές με X-VIVO™ 15, και 500 μl του αραιωμένου υπερκείμενου υγρού μεταφέρονται σε κοιλότητα τρυβλίου 96 κοιλοτήτων. Το αραιωμένο υπερκείμενο υγρό αραιώνεται περαιτέρω με X-VIVO™ 15 κατά 2 και 4 φορές, και 50 μl του διαλύματος προστίθενται σε 50 μl εναιωρήματος κυττάρων THP-G8 στις κοιλότητες μαύρου τρυβλίου 96 κοιλοτήτων με επίπεδη βάση (προσάρτημα 3.6). Κάθε συγκέντρωση του θετικού μάρτυρα θα πρέπει να υποβάλλεται σε δοκιμή σε 4 κοιλότητες. Το τρυβλίο αναδεύεται σε αναδευτήρα τρυβλίων και επωάζεται σε επωαστήρα CO_2 επί 16 ώρες (37°C, 5 % CO_2) και, στη συνέχεια, μετράται η δράση της λουσιφεράσης σύμφωνα με τα όσα ορίζονται στην παράγραφο 29.

23. Ο συνιστώμενος αρνητικός μάρτυρας είναι το LA. Παρασκευάζονται 20 mg LA σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης των 1,5 ml, στο οποίο προστίθεται έως 1 ml X-VIVO™ 15 (20 mg/ml). 20 mg/ml διαλύματος LA αραιώνονται κατά 5 φορές με X-VIVO™ 15 (4 mg/ml) και 500 μl από αυτό το διάλυμα 4 mg/ml μεταφέρονται σε κοιλότητα τρυβλίου 96 κοιλοτήτων. Αυτό το διάλυμα αραιώνεται κατά 2 φορές με X-VIVO™ 15 και, στη συνέχεια, αραιώνεται και πάλι κατά 2 φορές για να προκύψουν διαλύματα 2 mg/ml και 1 mg/ml. 50 μl από αυτά τα 3 διαλύματα και τον μάρτυρα με φορέα (X-VIVO™ 15) προστίθενται σε 50 μl εναιωρήματος κυττάρων THP-G8 στις κοιλότητες μαύρου τρυβλίου 96 κοιλοτήτων με επίπεδη βάση. Κάθε συγκέντρωση του αρνητικού μάρτυρα υποβάλλεται σε δοκιμή σε 4 κοιλότητες. Το τρυβλίο αναδεύεται σε αναδευτήρα τρυβλίων και επωάζεται σε επωαστήρα CO_2 επί 16 ώρες (37°C, 5 % CO_2) και, στη συνέχεια, μετράται η δραστικότητα της λουσιφεράσης σύμφωνα με τα όσα ορίζονται στην παράγραφο 29.

24. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι κατάλληλοι θετικοί ή αρνητικοί μάρτυρες, εάν υπάρχουν διαθέσιμα ιστορικά δεδομένα από τα οποία μπορούν να προκύψουν συγκρίσιμα κριτήρια αποδοχής σειρών δοκιμών.

25. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για την αποφυγή της εξάτμισης των πτητικών υπό δοκιμή χημικών ουσιών, καθώς και της διασταυρούμενης μόλυνσης των μικροκοιλοτήτων από τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες, π.χ. με στεγανοποίηση του τρυβλίου πριν από την επώαση με τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες.

26. Για να προκύψει θετική ή αρνητική πρόβλεψη, απαιτείται η διεξαγωγή 2 έως 4 σειρών δοκιμών με τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες και τον μάρτυρα με διαλύτη (βλ. πίνακα 2). Κάθε σειρά δοκιμών πραγματοποιείται διαφορετική ημέρα με πρόσφατο αποθεματικό διάλυμα υπό δοκιμή χημικών ουσιών σε X-VIVO™ 15 και με κύτταρα που έχουν συλλεγεί ανεξάρτητα. Τα κύτταρα μπορούν να προέρχονται από την ίδια ανακαλλιέργεια.

▼M8

Μετρήσεις της δραστικότητας λουσιφεράσης

27. Η φωταύγεια μετράται με χρήση λουμινόμετρου τρυβλίων μικροτιτλοδότησης 96 κοιλοτήτων εξοπλισμένου με οπτικά φίλτρα, π.χ. Phelios (ATTO, Tokyo, Ιαπωνία), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Γερμανία) και η σειρά ARVO (PerkinElmer, Waltham, MA, ΗΠΑ). Το λουμινόμετρο πρέπει να βαθμονομείται για κάθε δοκιμή προκειμένου να διασφαλίζεται η αναπαραγωγιμότητα (19). Για την εν λόγω βαθμονόμηση διατίθενται ανασυνδυασμένες λουσιφεράσες που εκπέμπουν πορτοκαλί και κόκκινο χρώμα.

28. 100 μl προθερμασμένου αντιδραστηρίου δοκιμασίας Tripluc® Luciferase (Tripluc) μεταφέρονται σε κάθε κοιλότητα του τρυβλίου που περιέχει το εναιώρημα κυττάρων που υποβάλλεται σε αγωγή με ή χωρίς τη χημική ουσία. Το τρυβλίο ανακινείται επί 10 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος περίπου 20°C. Το τρυβλίο τοποθετείται στο λουμινόμετρο για να μετρηθεί η δραστικότητα της λουσιφεράσης. Μετράται η βιοφωταύγεια επί 3 δευτερόλεπτα, τόσο απουσία (F0) όσο και παρουσία (F1) του οπτικού φίλτρου. Η χρήση εναλλακτικών συνθηκών θα πρέπει να τεκμηριώνεται επιστημονικά, π.χ. ανάλογα με το μοντέλο του χρησιμοποιούμενου λουμινόμετρου.

29. Οι παράμετροι για κάθε συγκέντρωση υπολογίζονται βάσει των μετρούμενων τιμών, π.χ. των IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, του μέσου όρου ±SD της IL8LA, του μέσου όρου ±SD της GAPLA, του μέσου όρου ±SD της nIL8LA, του μέσου όρου ±SD της Ind-IL8LA, του μέσου όρου ±SD της Inh-GAPLA, του διαστήματος εμπιστοσύνης σε επίπεδο 95 % της Ind-IL8LA. Οι ορισμοί των παραμέτρων που χρησιμοποιούνται στην παρούσα παράγραφο παρέχονται στα προσαρτήματα 3.1 και 3.4.

30. Πριν από τη μέτρηση, η διάκριση των χρωμάτων στο πλαίσιο δοκιμασιών με γονίδια αναφοράς πολλών χρωμάτων πραγματοποιείται συνήθως με χρήση συσκευών ανίχνευσης (λουμινόμετρο και συσκευή ανάγνωσης τρυβλίων) που διαθέτουν οπτικά φίλτρα, όπως φίλτρα αποκοπής (υψιπερατά ή χαμηλοπερατά) ή φίλτρα ζώνης διέλευσης. Πριν από τη δοκιμή, οι συντελεστές περατότητας των φίλτρων για κάθε χρώμα σήματος βιοφωταύγειας θα πρέπει να βαθμονομούνται, σύμφωνα με το προσάρτημα 3.2.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αξιολόγηση των δεδομένων

31. Βάσει των κριτηρίων για τη λήψη απόφασης περί θετικής/αρνητικής πρόβλεψης, σε κάθε σειρά δοκιμών απαιτείται:

— μια δοκιμασία πρόβλεψης IL-8 Luc να κρίνεται θετική εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία έχει Ind-IL8LA ≥ 1,4 και το κατώτερο όριο του διαστήματος εμπιστοσύνης 95 % της Ind-IL8LA είναι ≥ 1,0

— μια δοκιμασία πρόβλεψης IL-8 Luc να κρίνεται αρνητική εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία έχει Ind-IL8LA < 1,4 και/ή το κατώτερο όριο του διαστήματος εμπιστοσύνης 95 % της Ind-IL8LA είναι < 1,0.

Μοντέλο πρόβλεψης

32. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες από τις οποίες προκύπτουν δύο θετικά αποτελέσματα από την 1η, 2η, 3η ή 4η σειρά δοκιμών χαρακτηρίζονται θετικές, ενώ εκείνες από τις οποίες προκύπτουν τρία αρνητικά αποτελέσματα από την 1η, 2η, 3η ή 4η σειρά δοκιμών χαρακτηρίζονται υποτιθέμενες αρνητικές (πίνακας 2). Μεταξύ των υποτιθέμενων αρνητικών χημικών ουσιών, οι χημικές ουσίες που διαλύονται σε 20 mg/ml X-VIVO™ 15 κρίνονται αρνητικές, ενώ οι χημικές ουσίες που δεν διαλύονται σε 20 mg/ml X-VIVO™ 15 δεν θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη (σχήμα 1).

▼**M8**

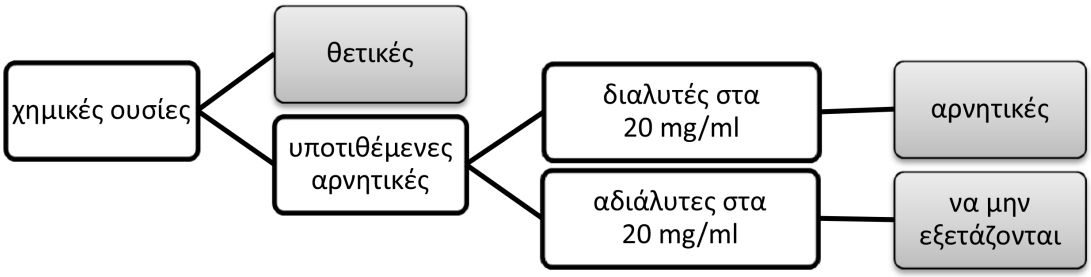
Πίνακας 2

Κριτήρια για τον προσδιορισμό των θετικών και των υποτιθέμενων αρνητικών χημικών ουσιών

1η σειρά δοκιμών	2η σειρά δοκιμών	3η σειρά δοκιμών	4η σειρά δοκιμών	Τελική πρόβλεψη
Θετική	Θετική	–	–	Θετική
	Αρνητική	Θετική	–	Θετική
		Αρνητική	Θετική	Θετική
			Αρνητική	Υποτιθέμενη αρνητική
Αρνητική	Θετική	Θετική	–	Θετική
		Αρνητική	Θετική	Θετική
			Αρνητική	Υποτιθέμενη αρνητική
	Αρνητική	Θετική	Θετική	Θετική
			Αρνητική	Υποτιθέμενη αρνητική
		Αρνητική	–	Υποτιθέμενη αρνητική

Σχήμα 1

Μοντέλο πρόβλεψης για την τελική κρίση



Κριτήρια αποδοχής

33. Όταν χρησιμοποιείται η δοκιμασία IL-8 Luc θα πρέπει να πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια αποδοχής:

— Η Ind-IL8LA θα πρέπει να υπερβαίνει το 5,0 σε μία τουλάχιστον συγκέντρωση του θετικού μάρτυρα 4-NBB σε κάθε σειρά δοκιμών.

— Η Ind-IL8LA θα πρέπει να είναι χαμηλότερη από 1,4 σε όλες τις συγκεντρώσεις του αρνητικού μάρτυρα, του γαλακτικού οξέος, σε κάθε σειρά δοκιμών.

— Δεδομένα από τρυβλία για τα οποία η GAPLA κοιλοτήτων μάρτυρα με κύτταρα και Tripluc αλλά χωρίς χημικές ουσίες είναι μικρότερη από 5 φορές την αντίστοιχη GAPLA κοιλότητας που περιέχει μόνο θρεπτικό μέσο δοκιμής (50 μl/κοιλότητα RPMI-1640 που περιέχει 10 % FBS και 50 μl/κοιλότητα X-VIVO™ 15) θα πρέπει να απορρίπτονται.

— Δεδομένα από τρυβλία για τα οποία η Inh-GAPLA όλων των συγκεντρώσεων των υπό δοκιμή χημικών ουσιών ή των χημικών ουσιών μάρτυρα είναι μικρότερη από 0,05 θα πρέπει να απορρίπτονται. Σε αυτήν την περίπτωση, η πρώτη δοκιμή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται, ώστε η υψηλότερη τελική συγκέντρωση της επαναλαμβανόμενης δοκιμής να είναι η χαμηλότερη τελική συγκέντρωση της προηγούμενης δοκιμής.

▼**M8**

Έκθεση δοκιμής

34. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημικές ουσίες

Μονοσυστατική ουσία:

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία,

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα, μοριακό βάρος και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

— κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),

— διαλυτότητα στο X-VIVO^{TM} 15. Για τις χημικές ουσίες που δεν είναι διαλυτές στο X-VIVO^{TM} 15, κατά πόσον παρατηρείται σχηματισμός ιζήματος ή επίπλευση μετά τη φυγοκέντρηση,

— ελεγχθείσα συγκέντρωση/-εις,

— συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη/φορέα για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία, εάν δεν έχει χρησιμοποιηθεί X-VIVO^{TM} 15.

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγμα:

— χαρακτηρισμός, στο μέτρο του δυνατού, π.χ. χημική ταυτότητα (βλ. ανωτέρω), καθαρότητα, ποσότητα και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες (βλ. ανωτέρω) των συστατικών, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— μοριακό βάρος ή φαινόμενο μοριακό βάρος στην περίπτωση των μειγμάτων/πολυμερών γνωστής σύνθεσης ή άλλες πληροφορίες που έχουν σημασία για τη διεξαγωγή της μελέτης,

— κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),

— διαλυτότητα στο X-VIVO^{TM} 15. Για τις χημικές ουσίες που δεν είναι διαλυτές στο X-VIVO^{TM} 15, κατά πόσον παρατηρείται σχηματισμός ιζήματος ή επίπλευση μετά τη φυγοκέντρηση,

— ελεγχθείσα συγκέντρωση/-εις,

— Συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα.

— αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη/φορέα για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία, εάν δεν έχει χρησιμοποιηθεί X-VIVO^{TM} 15.

Μάρτυρες

Θετικός μάρτυρας:

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία,

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα, μοριακό βάρος και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, στο μέτρο του δυνατού και ανάλογα με την περίπτωση,

▼**M8**

— καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

— κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),

— ελεγχθείσα συγκέντρωση/-εις,

— συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— παραπομπή σε ιστορικά αποτελέσματα θετικών μαρτύρων που καταδεικνύουν την εφαρμογή κατάλληλων κριτηρίων αποδοχής, εάν ισχύει.

Αρνητικός μάρτυρας:

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία,

— καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

— φυσική εμφάνιση, μοριακό βάρος, καθώς και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, σε περίπτωση χρήσης άλλων αρνητικών μαρτύρων εκτός εκείνων που αναφέρονται στην κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών και εφόσον είναι διαθέσιμες,

— συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία.

Συνθήκες δοκιμής

— όνομα και διεύθυνση του χορηγού, της εγκατάστασης δοκιμών και του διευθυντή της μελέτης,

— περιγραφή της χρησιμοποιούμενης δοκιμής,

— κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε, συνθήκες φύλαξης και προέλευσή της (π.χ. εγκατάσταση προέλευσης),

— αριθμός παρτίδας και προέλευση του FBS, όνομα προμηθευτή, αριθμός παρτίδας μαύρου τρυβλίου με επίπεδη βάση 96 κοιλοτήτων, και αριθμός παρτίδας αντιδραστηρίου Tripluc,

— αριθμός ανακαλλιεργειών και πυκνότητα κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν για τη δοκιμή,

— μέθοδος καταμέτρησης κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό πριν από τη δοκιμή και τα μέτρα που εφαρμόστηκαν για να εξασφαλιστεί ομοιογενής κατανομή του αριθμού κυττάρων,

— χρησιμοποιούμενο λουμινόμετρο (π.χ. μοντέλο), με τις ρυθμίσεις του οργάνου, χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα λουσιφεράσης και απόδειξη της ενδεδειγμένης ποιότητας των μετρήσεων φωταύγειας με βάση τη δοκιμή ποιοτικού ελέγχου που περιγράφεται στο προσάρτημα 3.2,

— διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε για την απόδειξη της τεχνικής ικανότητας του εργαστηρίου όσον αφορά την εφαρμογή της δοκιμής (π.χ. με δοκιμές των ουσιών ελέγχου ικανότητας) ή για την απόδειξη της διαχρονικής αναπαραγωγιμότητας των επιδόσεων της δοκιμής.

Διαδικασία δοκιμής

— αριθμός πανομοιότυπων δειγμάτων και σειρών δοκιμών που διεξήχθησαν,

— συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, διαδικασία εφαρμογής και χρόνος έκθεσης (εάν διαφέρουν από τα συνιστώμενα),

▼**M8**

— περιγραφή των χρησιμοποιούμενων κριτηρίων αξιολόγησης και λήψης αποφάσεων,

— περιγραφή των χρησιμοποιούμενων κριτηρίων αποδοχής της μελέτης,

— περιγραφή τυχόν τροποποιήσεων της διαδικασίας δοκιμής.

Αποτελέσματα

— μετρήσεις της IL8LA και της GAPLA,

— υπολογισμοί για τις nIL8LA, Ind-IL8LA, και Inh-GAPLA,

— το διάστημα εμπιστοσύνης 95 % της Ind-IL8LA,

— γραφική παράσταση των καμπυλών δόσης-απόκρισης για την επαγωγή δραστικότητας λουσιφεράσης και τη βιωσιμότητα των κυττάρων,

— περιγραφή κάθε άλλης σχετικής παρατήρησης, κατά περίπτωση.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

— εξέταση των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας IL-8 Luc,

— εξέταση των αποτελεσμάτων δοκιμασίας στο πλαίσιο IATA, εάν υπάρχουν σχετικές πληροφορίες.

Συμπέρασμα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, and Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. Toxicol Sci 124:359-69.

(2) OECD (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(3) OECD (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(4) OECD (2016) Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, and Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol 69:371-9.

(6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. Toxicol *In Vitro* 29:1816-30.

▼**M8**

(7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Pharmacol 71:337-51.

(8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, and Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Alternatives to laboratory animals: ATLA 38:275-84.

(9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? Regul Toxicol Pharmacol, 82:147-155.

(10) Thorne N, Inglese J, and Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646-57.

(11) OECD (2016). Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Paris. http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en.

(12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, and Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1286-91.

(13) Viviani VR, Bechara EJ, and Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. Biochemistry 38:8271-9.

(14) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, and Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. Biotechniques 38:891-4.

(15) OECD (2017). To be published - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OECD, Paris, France

(16) OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No 34. OECD, Paris, France.

(17) OECD (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, Διαθέσιμο στη διεύθυνση http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.

(19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, and Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. Photochem Photobiol 86:1046-9.

▼**M8**

(20) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Series on Testing and Assessment No. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 168. OECD, Paris, France.

(21) United Nations (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

▼**M8**

Προσάρτημα 3.1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ορθότητα: ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της δοκιμής και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί κριτήριο επιδόσεων της δοκιμής και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς τη «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας δοκιμής (16).

AOP (Adverse Outcome Pathway): πορεία δυσμενούς έκβασης: αλληλουχία συμβάντων, από τη χημική δομή της στοχευόμενης χημικής ουσίας ή ομάδας ομοειδών χημικών ουσιών και το μοριακό εναρκτήριο συμβάν μέχρι την εξεταζόμενη έκβαση *in vivo* (20).

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

CV05: κυτταρική βιωσιμότητα 05, δηλ. η ελάχιστη συγκέντρωση στην οποία οι χημικές ουσίες εμφανίζουν Inh-GAPLA κάτω του 0,05.

FInSLO-LA: συντομογραφία που χρησιμοποιήθηκε στην έκθεση επικύρωσης και σε προηγούμενες δημοσιεύσεις σχετικά με τη δοκιμασία IL-8 Luc, η οποία αναφέρεται στην Ind-IL8LA. Για τον ορισμό, βλ. Ind-IL8LA.

GAPLA: η δράση της σταθερής λουσιφεράσης κόκκινου χρώματος (SLR) (λmax = 630 nm), η οποία ρυθμίζεται από τον υποκινητή GAPDH και αντιπροσωπεύει την κυτταρική βιωσιμότητα και τον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων.

Επικινδυνότητα: εγγενής ιδιότητα ενός παράγοντα ή μιας κατάστασης που μπορεί να έχει δυσμενείς επιδράσεις όταν ένας οργανισμός, ένα σύστημα ή ένας (υπο)πληθυσμός εκτίθεται στον παράγοντα.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment): ολοκληρωμένη προσέγγιση για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση: δομημένη προσέγγιση που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της επικινδυνότητας (δυναμικό), τον χαρακτηρισμό της επικινδυνότητας (ισχύς) και/ή την εκτίμηση της ασφάλειας (δυναμικό/ισχύς και έκθεση) μιας χημικής ουσίας ή ομάδας χημικών ουσιών, στην οποία ενσωματώνονται και σταθμίζονται στρατηγικά όλα τα σχετικά δεδομένα, με σκοπό την τροφοδότηση κανονιστικών αποφάσεων σχετικά με τη δυνητική επικινδυνότητα και/ή τον κίνδυνο και/ή την ανάγκη για περαιτέρω στοχευμένες και, ως εκ τούτου, ελάχιστες δοκιμές.

II-SLR-LA: συντομογραφία που χρησιμοποιήθηκε στην έκθεση επικύρωσης και σε προηγούμενες δημοσιεύσεις σχετικά με τη δοκιμασία IL-8 Luc, η οποία αναφέρεται στην Inh-GAPLA. Για τον ορισμό, βλ. Inh-GAPLA.

IL-8 (ιντερλευκίνη 8): κυτταροκίνη που προέρχεται από ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες, κερατινοκύτταρα, μακροφάγα και μονοκύτταρα και η οποία επάγει χημειοταξία των ουδετερόφιλων και των Τ λεμφοκυττάρων.

IL8LA: η δραστικότητα της σταθερής λουσιφεράσης πορτοκαλί χρώματος (SLO) (λmax = 580 nm), η οποία ρυθμίζεται από τον υποκινητή IL-8.

Ind-IL8LA: βαθμός επαγωγής της nIL8LA. Λαμβάνεται με διαίρεση της nIL8LA των κυττάρων THP-G8 που υποβάλλονται σε αγωγή με χημικές ουσίες διά της αντίστοιχης μη διεγερμένων κυττάρων THP-G8 και αντιπροσωπεύει την επαγωγή της δραστικότητας του υποκινητή IL-8 από τις χημικές ουσίες.

Inh-GAPLA: αναστολή της GAPLA. Λαμβάνεται με διαίρεση της GAPLA των κυττάρων THP-G8 που υποβάλλεται σε αγωγή με χημικές ουσίες διά της GAPLA κυττάρων THP-G8 χωρίς αγωγή και αντιπροσωπεύει την κυτταροτοξικότητα των χημικών ουσιών.

Όριο ελάχιστης επαγωγής (MIT): η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία μια χημική ουσία πληροί τα κριτήρια ώστε να χαρακτηριστεί θετική.

▼**M8**

Μείγμα: ένα μείγμα ή διάλυμα που αποτελείται από δύο ή περισσότερες ουσίες.

Μονοσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας ένα κύριο συστατικό περιέχεται σε ποσοστό τουλάχιστον 80 % κ.β.

Πολυσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας περισσότερα από ένα κύρια συστατικά περιέχονται σε συγκέντρωση ≥ 10 % κ.β. και < 80 % κ.β. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα μεταποιητικών διεργασιών. Η διαφορά μεταξύ μείγματος και πολυσυστατικής ουσίας είναι ότι το μείγμα λαμβάνεται με ανάμειξη δύο ή περισσότερων ουσιών, χωρίς χημική αντίδραση. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα χημικών αντιδράσεων.

nIL8LA: η δραστικότητα της λουσιφεράσης SLO που αντικατοπτρίζει τη δραστικότητα του υποκινητή IL-8 (IL8LA), κανονικοποιημένη ως προς τη δραστικότητα της λουσιφεράσης SLR που αντικατοπτρίζει τη δραστικότητα του υποκινητή GAPDH (GAPLA). Αντιπροσωπεύει τη δραστικότητα του υποκινητή IL-8, αφού ληφθεί υπόψη η κυτταρική βιωσιμότητα ή ο αριθμός των κυττάρων.

nSLO-LA: συντομογραφία που χρησιμοποιήθηκε στην έκθεση επικύρωσης και σε προηγούμενες δημοσιεύσεις σχετικά με τη δοκιμασία IL-8 Luc, η οποία αναφέρεται στην nIL8LA. Για τον ορισμό, βλ. nIL8LA.

Θετικός μάρτυρας: πανομοιότυπο δείγμα που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και υποβάλλεται σε αγωγή με ουσία που είναι γνωστό ότι προκαλεί θετική απόκριση. Για να διασφαλίζεται η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας της απόκρισης του θετικού μάρτυρα σε συνάρτηση με τον χρόνο, το μέγεθος της θετικής απόκρισης δεν θα πρέπει να είναι υπερβολικό.

Αβιοτικά προαπτένια: χημικές ουσίες που καθίστανται ευαισθητοποιητικές μέσω αβιοτικού μετασχηματισμού.

Μεταβολικά προαπτένια: χημικές ουσίες που χρειάζονται ενζυμική ενεργοποίηση για να εκδηλώσουν το δυναμικό δερματικής ευαισθητοποίησής τους.

Καταλληλότητα: περιγραφή της σχέσης της δοκιμής με την υπό μελέτη επίδραση και του κατά πόσον αυτή είναι αρμόζουσα και χρήσιμη για συγκεκριμένο σκοπό. Πρόκειται για τον βαθμό στον οποίο η δοκιμή μετρά ή προβλέπει σωστά τη βιολογική επίδραση υπό μελέτη. Η καταλληλότητα εμπεριέχει συνεκτίμηση της ορθότητας (συμφωνίας) της δοκιμής (16).

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια δοκιμή μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, καθώς και της ενδοεργαστηριακής επαναληψιμότητας (16).

Σειρά δοκιμών: μια σειρά περιλαμβάνει μία ή περισσότερες υπό δοκιμή χημικές ουσίες που υποβάλλονται σε δοκιμή ταυτόχρονα με μάρτυρα με διαλύτη/φορέα και με θετικό μάρτυρα.

Ευαισθησία: το ποσοστό του συνόλου των θετικών/δραστικών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, και είναι σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των δοκιμών (16).

SLO-LA: συντομογραφία που χρησιμοποιήθηκε στην έκθεση επικύρωσης και σε προηγούμενες δημοσιεύσεις σχετικά με τη δοκιμασία IL-8 Luc, η οποία αναφέρεται στην IL8LA. Για τον ορισμό, βλ. IL8LA.

SLR-LA: συντομογραφία που χρησιμοποιήθηκε στην έκθεση επικύρωσης και σε προηγούμενες δημοσιεύσεις σχετικά με τη δοκιμασία IL-8 Luc, η οποία αναφέρεται στην GAPLA. Για τον ορισμό, βλ. GAPLA.

▼M8

Μάρτυρας με διαλύτη/φορέα: δείγμα που δεν υποβάλλεται σε αγωγή και περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής, εκτός της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, αλλά περιλαμβανομένου του διαλύτη/φορέα που χρησιμοποιείται. Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της βασικής απόκρισης των δειγμάτων που υποβάλλονται σε αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία διαλυμένη ή σταθερώς διεσπαρμένη στον ίδιο διαλύτη/φορέα. Όταν το εν λόγω δείγμα υποβάλλεται σε δοκιμή με παράλληλο μάρτυρα θρεπτικού μέσου, καταδεικνύει επίσης αν ο διαλύτης/φορέας αλληλεπιδρά με το σύστημα δοκιμής.

Ειδικότητα: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών/αδρανών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, και είναι σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των δοκιμών (16).

Ουσία: ένα χημικό στοιχείο και οι ενώσεις του σε φυσική κατάσταση ή όπως λαμβάνονται με οποιαδήποτε παραγωγική διεργασία, στα οποία συμπεριλαμβάνονται όλα τα πρόσθετα που απαιτούνται για να διατηρείται η σταθερότητά του, καθώς και τυχόν προσμείξεις που προκύπτουν από τη χρησιμοποιούμενη διεργασία, αλλά από τα οποία εξαιρούνται οι διαλύτες που είναι δυνατόν να διαχωριστούν χωρίς να επηρεαστεί η σταθερότητα της ουσίας ούτε να μεταβληθεί η σύνθεσή της.

Επιφανειοδραστική ουσία: ονομάζεται επίσης τασιενεργή ουσία και είναι ουσία, όπως τα απορρυπαντικά, που μπορεί να μειώσει την επιφανειακή τάση ενός υγρού και, ως εκ τούτου, του επιτρέπει να σχηματίζει αφρό ή να διεισδύει σε στερεά· είναι επίσης γνωστή ως διαβρεκτικό μέσο (TG437).

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με χρήση της παρούσας μεθόδου.

THP-G8: κυτταρική σειρά με γονίδιο αναφοράς IL-8, που χρησιμοποιείται στη δοκιμασία IL-8 Luc. Η ανθρώπινη, παρόμοια με μακροφάγα κυτταρική σειρά THP-1 διαμολύνθηκε με τα γονίδια λουσιφεράσης SLO και SLR υπό τον έλεγχο των υποκινητών IL-8 και GAPDH αντίστοιχα.

Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Προϊόντων των Ηνωμένων Εθνών (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) (GHS του ΟΗΕ): σύστημα που προτείνει την ταξινόμηση των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) με βάση τυποποιημένα είδη και βαθμούς φυσικής επικινδυνότητας και επικινδυνότητας για την υγεία και το περιβάλλον και καλύπτει τα αντίστοιχα στοιχεία γνωστοποίησης, όπως εικονογράμματα, προειδοποιητικές λέξεις, δηλώσεις επικινδυνότητας, δηλώσεις προφύλαξης και δελτία δεδομένων ασφαλείας, με τα οποία γνωστοποιούνται πληροφορίες σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις με σκοπό την προστασία των ανθρώπων (εργοδοτών, εργαζομένων, μεταφορέων, καταναλωτών και διασωστών) και του περιβάλλοντος (21).

UVCB: ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, πολύπλοκα προϊόντα αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά.

Έγκυρη μέθοδος δοκιμών: δοκιμή που θεωρείται επαρκούς καταλληλότητας και αξιοπιστίας για συγκεκριμένο σκοπό και βασίζεται σε επιστημονικά τεκμηριωμένες αρχές. Μια δοκιμή δεν είναι ποτέ έγκυρη με την απόλυτη σημασία του όρου, αλλά μόνο σε σχέση με καθορισμένο σκοπό.

▼**M8**

Προσάρτημα 3.2

ΑΡΧΗ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΩΝ ΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΟΠΤΙΚΟΥ ΦΙΛΤΡΟΥ ΓΙΑ ΤΙΣ SLO ΚΑΙ SLR

Το σύστημα δοκιμασίας πολλαπλών γονιδίων αναφοράς Tripluc μπορεί να χρησιμοποιηθεί με λουμινόμετρο τύπου τρυβλίων μικροτιτλοδότησης με σύστημα ανίχνευσης πολλών χρωμάτων, το οποίο μπορεί να διαθέτει οπτικό φίλτρο [π.χ. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)]. Το οπτικό φίλτρο που χρησιμοποιείται στη μέτρηση είναι υψιπερατό ή χαμηλοπερατό φίλτρο 600–620 nm, ή φίλτρο ζώνης διέλευσης 600–700 nm.

Μέτρηση λουσιφερασών δύο χρωμάτων με οπτικό φίλτρο.

Στο παρόν παράδειγμα χρησιμοποιείται το Phelios AB-2350 (ATTO). Το λουμινόμετρο αυτό είναι εξοπλισμένο με υψιπερατό φίλτρο 600 nm (R60 HOYA Co., LP 600 nm, φίλτρο 1) για τον διαχωρισμό της φωταύγειας της SLO (λmax = 580 nm) και της SLR (λmax = 630 nm).

Για τον προσδιορισμό των συντελεστών περατότητας πρώτα του LP 600 nm, με χρήση κεκαθαρμένων ενζύμων λουσιφεράσης SLO και SLR: i) μετράται η ένταση βιοφωταύγειας των SLO και SLR χωρίς φίλτρο (F0), ii) μετράται η ένταση βιοφωταύγειας SLO και SLR που διήλθε μέσω LP 600 nm (φίλτρο 1) και iii) υπολογίζονται οι παρακάτω συντελεστές περατότητας του LP 600 nm για τις SLO και SLR.

Συντελεστές περατότητας		Συντομογραφία	Ορισμός
SLO	Συντελεστές περατότητας φίλτρου 1	κO_{R60}	Ο συντελεστής περατότητας του φίλτρου για την SLO
SLR	Συντελεστές περατότητας φίλτρου 1	κR_{R60}	Ο συντελεστής περατότητας του φίλτρου για την SLR

Όταν οι τιμές έντασης των SLO και SLR σε δείγμα δοκιμής ορίζονται ως O και R, αντίστοιχα, i) η ένταση του φωτός χωρίς φίλτρο (όλο το οπτικό φάσμα) F0 και ii) η ένταση του φωτός που διέρχεται διαμέσου του LP 600 nm (φίλτρο 1) F1 περιγράφονται σύμφωνα με τους ακόλουθους τύπους.

$F0=O+R$

$F1=\kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$

Οι τύποι αυτοί μπορούν να αναδιατυπωθούν ως εξής:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας τους υπολογισθέντες συντελεστές περατότητας (κO_{R60} και κR_{R60}) και τις μετρηθείσες F0 και F1, μπορούν να υπολογιστούν οι τιμές των O και R ως εξής:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

▼**M8**

Υλικά και μέθοδοι για τον προσδιορισμό του συντελεστή περατότητας

1) *Αντιδραστήρια*

Μεμονωμένα κεκαθαρμένα ένζυμα λουσιφεράσης:

Λυοφιλιωμένο κεκαθαρμένο ένζυμο SLO

Λυοφιλιωμένο κεκαθαρμένο ένζυμο SLR

(τα οποία, για την εργασία επικύρωσης, ελήφθησαν από την GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Ιαπωνία με την κυτταρική σειρά THP-G8)

Αντιδραστήριο δοκιμασίας:

αντιδραστήριο δοκιμασίας λουσιφεράσης Tripluc® (για παράδειγμα από TOYOBO, αρ. κατ. MRA-301)

Θρεπτικό μέσο: για τη δοκιμασία λουσιφεράσης (30 ml, φυλασσόμενα σε 2 – 8°C)

Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση στο θρεπτικό μέσο	Απαιτούμενη ποσότητα
RPMI-1640	—	—	27 ml
FBS	—	10 %	3 ml

2) *Παρασκευή διαλύματος ενζύμου*

Διαλύετε λυοφιλιωμένο κεκαθαρμένο ένζυμο λουσιφεράσης σε σωληνάριο προσθέτοντας 200 μl Tris/HCl ή Hepes/HCl 10 ~ 100 mM (pH 7,5 ~ 8,0), συμπληρωμένο με γλυκερίνη 10 % κ.ό., και διαιρείτε το διάλυμα ενζύμου σε κλάσματα 10 μl σε αναλώσιμα σωληνάρια 1,5 ml, τα οποία φυλάσσονται σε καταψύκτη στους -80°C. Το κατεψυγμένο διάλυμα ενζύμου μπορεί να χρησιμοποιείται μέχρι και για 6 μήνες. Κατά τη χρήση, προσθέτετε 1 ml θρεπτικού μέσου για τη δοκιμασία λουσιφεράσης (RPMI-1640 με 10 % FBS) σε κάθε σωληνάριο που περιέχει τα διαλύματα ενζύμου (αραιωμένο διάλυμα ενζύμου) και τα διατηρείτε σε πάγο ώστε να μην αδρανοποιηθούν.

3) *Μέτρηση της βιοφωταύγειας*

Αποψύχετε αντιδραστήριο δοκιμασίας Tripluc® Luciferase (Tripluc) και το διατηρείτε σε θερμοκρασία δωματίου είτε σε υδατόλουτρο είτε σε θερμοκρασία αέρα περιβάλλοντος. Θέστε σε λειτουργία το λουμινόμετρο 30 λεπτά προτού ξεκινήσετε τη μέτρηση ώστε να σταθεροποιηθεί ο φωτοπολλαπλασιαστής. Μεταφέρετε 100 μl του αραιωμένου διαλύματος ενζύμου σε μαύρο τρυβλίο 96 κοιλοτήτων (επίπεδης βάσης) (το δείγμα αναφοράς SLO στις #B1, #B2, #B3, και το δείγμα αναφοράς SLR στις #D1, #D2, #D3). Στη συνέχεια, με χρήση πολυκάναλης πιπέτας μεταφέρετε 100 μl προθερμασμένου Tripluc σε κάθε κοιλότητα του τρυβλίου που περιέχει το αραιωμένο διάλυμα ενζύμου. Ανακινήστε το τρυβλίο επί 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (περίπου 25°C) χρησιμοποιώντας αναδευτήρα τρυβλίων. Αφαιρέστε τις φυσαλίδες από τα διαλύματα σε κοιλότητες, εάν εμφανιστούν. Τοποθετήστε το τρυβλίο στο λουμινόμετρο για να μετρήσετε τη δράση της λουσιφεράσης. Μετράται η βιοφωταύγεια επί 3 δευτερόλεπτα, τόσο απουσία (F0) όσο και παρουσία (F1) του οπτικού φίλτρου.

Ο συντελεστής περατότητας του οπτικού φίλτρου υπολογίζεται ως εξής:

συντελεστής περατότητας (SLO (κO_{R60}))= (#B1 της F1 + #B2 της F1 + #B3 της F1) / (#B1 της F0 + #B2 της F0 + #B3 της F0)

▼**M8**

συντελεστής περατότητας (SLR (κR_{R60}))= (#D1 της F1 + #D2 της F1 + #D3 της F1) / (#D1 της F0 + #D2 της F0 + #D3 της F0)

Οι υπολογισθέντες συντελεστές περατότητας χρησιμοποιούνται για όλες τις μετρήσεις που πραγματοποιούνται με χρήση του ίδιου λουμινόμετρου.

Ποιοτικός έλεγχος του εξοπλισμού

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οι διαδικασίες που περιγράφονται στο πρωτόκολλο IL-8 Luc (18).

▼**M8**

Προσάρτημα 3.3

ΟΥΣΙΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

Πριν εντάξουν στην καθημερινή πρακτική τη δοκιμή που περιγράφεται στο παρόν προσάρτημα της μεθόδου δοκιμών B.71, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα επιτυγχάνοντας την αναμενόμενη πρόβλεψη βάσει της δοκιμασίας IL-8 Luc για τις 9 συνιστώμενες ουσίες στον πίνακα 1, καθώς και τιμές εντός του αντίστοιχου εύρους τιμών αναφοράς για τουλάχιστον 8 από τις 9 ουσίες ελέγχου ικανότητας (που έχουν επιλεγεί έτσι ώστε να αντιπροσωπεύουν το φάσμα αποκρίσεων για τις πηγές κινδύνου ευαισθητοποίησης του δέρματος). Άλλα κριτήρια επιλογής ήταν ότι οι ουσίες θα πρέπει να είναι διαθέσιμες στο εμπόριο και ότι θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμα *in vivo* δεδομένα αναφοράς υψηλής ποιότητας καθώς και *in vitro* δεδομένα υψηλής ποιότητας που προκύπτουν με τη δοκιμασία IL-8 Luc. Επίσης, για τη δοκιμασία IL-8 Luc υπάρχουν διαθέσιμα δημοσιευμένα δεδομένα αναφοράς (6) (1).

Πίνακας 1

Συνιστώμενες ουσίες για την απόδειξη τεχνικής ικανότητας στη δοκιμασία IL-8 Luc

Ουσίες ελέγχου ικανότητας	Αριθ. CAS	Κατάσταση	Διαλυτότητα σε X-VIVO 15 στα 20 mg/ml	Πρόβλεψη *in vivo* (1)	Πρόβλεψη IL-8 Luc (2)	Εύρος αναφοράς (μg/ml) (3)	
						CV05 (4)	IL-8 Luc MIT (5)
2,4-Δινιτροχλωροβενζόλιο	97-00-7	Στερεό	Μη διαλυτή	Ευαισθητοποιητικό (εξαιρετικά ισχυρό)	Θετική	2,3-3,9	0,5-2,3
Φορμαλδεΰδη	50-00-0	Υγρό	Διαλυτή	Ευαισθητοποιητικό (ισχυρό)	Θετική	9-30	4-9
2-Μερκαπτοβενζοθειαζόλιο	149-30-4.	Στερεό	Μη διαλυτή	Ευαισθητοποιητικό (μετρίως ισχυρό)	Θετική	250-290	60-250
Αιθυλενοδιαμίνη	107-15-3	Υγρό	Διαλυτή	Ευαισθητοποιητικό (μετρίως ισχυρό)	Θετική	500-700	0,1-0,4
Διμεθακρυλικός εστέρας της αιθυλενογλυκόλης	97-90-5.	Υγρό	Μη διαλυτή	Ευαισθητοποιητικό (ασθενές)	Θετική	>2000	0,04-0,1
4-Αλλυλανισόλη (εστραγκόλη)	140-67-0	Υγρό	Μη διαλυτή	Ευαισθητοποιητικό (ασθενές)	Θετική	>2000	0,01-0,07
Θειική στρεπτομυκίνη	3810-74-0	Στερεό	Διαλυτή	Μη ευαισθητοποιητικό	Αρνητική	>2000	>2000
Γλυκερίνη	56-81-5	Υγρό	Διαλυτή	Μη ευαισθητοποιητικό	Αρνητική	>2000	>2000
Ισοπροπανόλη	67-63-0	Υγρό	Διαλυτή	Μη ευαισθητοποιητικό	Αρνητική	>2000	>2000

Συντομογραφίες: Αριθ. CAS = αριθμός μητρώου της υπηρεσίας Chemical Abstract Service

(1) Η ισχύς *in vivo* συνάγεται με την εφαρμογή των κριτηρίων που έχει προτείνει το ECETOC (19).

(2) Βάσει των ιστορικών τιμών που παρατηρήθηκαν (1) (6).

(3) Τα CV_{05} και IL-8 Luc MIT υπολογίστηκαν βάσει της υδατοδιαλυτότητας που προέκυψε από το EPI Suite™.

(4) CV_{05}: η ελάχιστη συγκέντρωση στην οποία οι χημικές ουσίες εμφανίζουν Inh-GAPLA κάτω του 0,05.

(5) MIT: οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις στις οποίες μια ουσία πληροί τα κριτήρια ώστε να χαρακτηριστεί θετική.

▼**M8**

Προσάρτημα 3.4

ΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΙ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΚΡΙΣΗΣ

nIL8LA (nSLO-LA)

Μετράται η j-οστή επανάληψη (j = 1-4) της i-οστής συγκέντρωσης (i = 0-11) για τις IL8LA (SLO-LA) και GAPLA (SLR-LA) αντίστοιχα. Η κανονικοποιημένη IL8LA, καλούμενη nIL8LA (nSLO-LA), ορίζεται ως εξής:

$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$

Αυτή είναι η βασική μονάδα μέτρησης στην παρούσα δοκιμασία.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Το κύριο μέτρο στην παρούσα δοκιμασία είναι η πολλαπλάσια αύξηση της μέσης nIL8LA (nSLO-LA) για την επανάληψη στην i-οστή συγκέντρωση σε σύγκριση με την αντίστοιχη στη συγκέντρωση 0, Ind-IL8LA. Αυτή η αναλογία αποτυπώνεται με τον ακόλουθο τύπο:

$$\mathrm{Ind-IL8LA_i} = \left\{(1/4) \times \sum_{\mathrm{j}} \mathrm{nIL8LA_{ij}}\right\} / \left\{(1/4) \times \sum_{\mathrm{j}} \mathrm{nIL8LA_{0j}}\right\}$$

Το κύριο εργαστήριο πρότεινε να αντιστοιχεί τιμή 1,4 σε θετικό αποτέλεσμα για την υπό δοκιμή χημική ουσία. Η εν λόγω τιμή προέκυψε βάσει έρευνας στα ιστορικά δεδομένα του κύριου εργαστηρίου. Στη συνέχεια, η ομάδα διαχείρισης δεδομένων χρησιμοποίησε την εν λόγω τιμή σε όλες τις φάσεις της μελέτης επικύρωσης. Το κύριο αποτέλεσμα, η Ind-IL8LA, είναι ο λόγος 2 αριθμητικών μέσων όρων, όπως φαίνεται στην εξίσωση.

Διάστημα εμπιστοσύνης 95 % (95 % CI)

Για να καταδειχθεί η ακρίβεια αυτού του μέτρου κύριου αποτελέσματος, μπορεί να εκτιμηθεί το διάστημα εμπιστοσύνης 95 % (95 % CI) με βάση τον λόγο. Το κατώτερο όριο του 95 % CI ≥ 1 υποδεικνύει ότι η nIL8LA με την i-οστή συγκέντρωση είναι σημαντικά υψηλότερη από την αντίστοιχη με τον μάρτυρα με διαλύτη. Το 95 % CI μπορεί να εκτιμηθεί με διάφορους τρόπους. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο που είναι γνωστή ως θεώρημα του Fieller. Το διάστημα εμπιστοσύνης 95 % βάσει του θεωρήματος λαμβάνεται σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

$$\left[\frac{-\mathrm{B} - \sqrt{\mathrm{B}^2 - 4\mathrm{AC}}}{2\mathrm{A}}, \frac{-\mathrm{B} + \sqrt{\mathrm{B}^2 - 4\mathrm{AC}}}{2\mathrm{A}}\right],$$

όπου

$$\mathrm{A} = \bar{\mathrm{x}}_0^2 - \mathrm{t}_{0.975(\mathrm{v})}^2 \times \frac{\mathrm{sd}_0^2}{\mathrm{n}_0}$$

$$\mathrm{B} = -2 \times \bar{\mathrm{x}} \times \bar{\mathrm{y}}$$

$$\mathrm{C} = \bar{\mathrm{y}}_{\mathrm{i}}^2 - \mathrm{t}_{0.975(\mathrm{v})}^2 \times \frac{\mathrm{sd}_{\mathrm{yi}}^2}{\mathrm{n}_{\mathrm{yi}}}, \text{ και } \mathrm{n}_0 = 4$$

$\bar{\mathrm{x}}_0 = (1/\mathrm{n}_0) \times \sum_{\mathrm{j}} \mathrm{nIL8LA_{0j}}$

▼**M8**

$sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \overline{x}_0)^2$

$n_{yi} = 4$

$\overline{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij})$

$sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yj} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \overline{y}_i)^2$

$t_{0,975(\nu)}$ είναι το εκατοστημόριο 97,5 της κεντρικής κατανομής t με τον βαθμό ελευθερίας *ν*, όπου

$$\nu = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0}\right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Η Inh-GAPLA είναι ο λόγος της μέσης GAPLA (SLR-LA) για την επανάληψη της i-οστής συγκέντρωσης σε σύγκριση με την αντίστοιχη για τον μάρτυρα με διαλύτη, και αποτυπώνεται με την ακόλουθη εξίσωση

$$Inh - GAPLA_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j} \right\}.$$

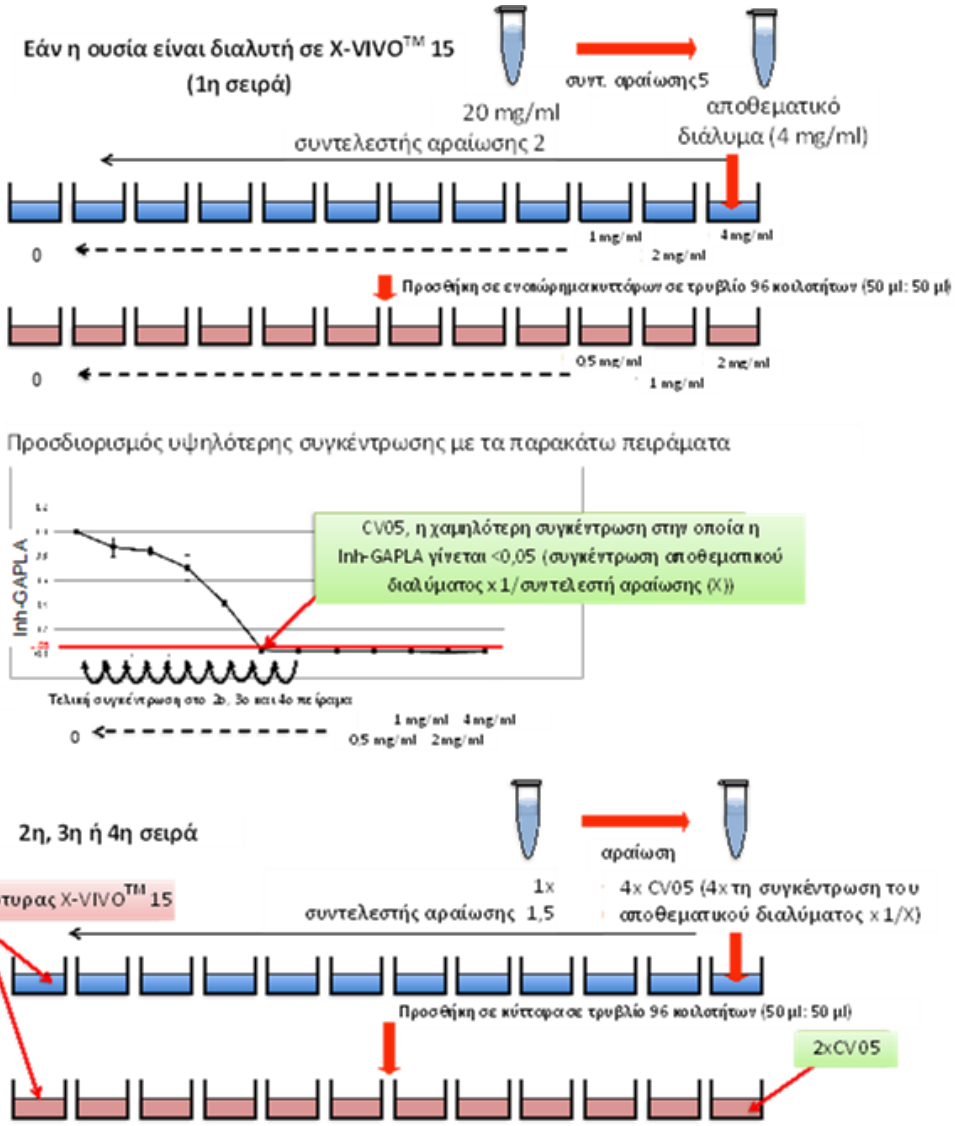
Δεδομένου ότι GAPLA είναι ο παρονομαστής της nIL8LA, μια εξαιρετικά μικρή τιμή προκαλεί μεγάλη μεταβολή της nIL8LA. Ως εκ τούτου, οι τιμές Ind-IL8LA με εξαιρετικά μικρή τιμή Inh-GAPLA (κάτω από 0,05) μπορεί να θεωρηθούν ότι αντιπροσωπεύουν ανεπαρκή βαθμό ακρίβειας.

▼**M8**

Προσάρτημα 3.5

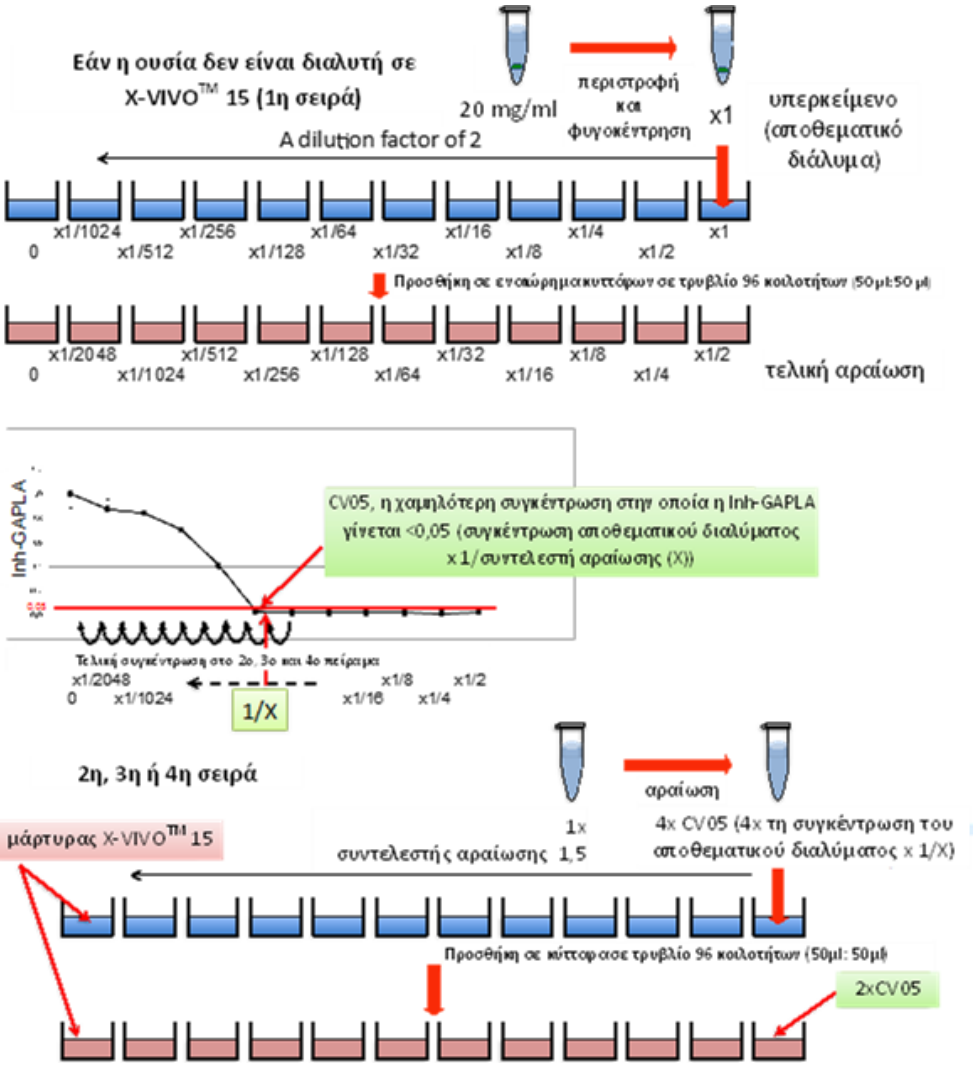
ΤΟ ΣΧΗΜΑ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΛΥΣΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ IL-8 LUC

α) Για χημικές ουσίες που διαλύονται σε X-VIVO™ 15 στα 20 mg/ml



▼**M8**

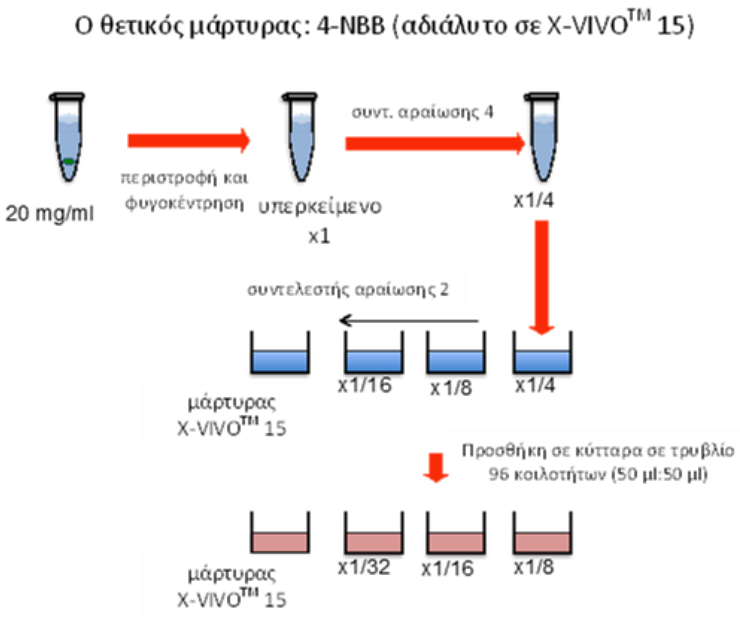
β) Για χημικές ουσίες που δεν διαλύονται σε X-VIVO™ 15 στα 20 mg/ml



▼**M8**

Προσάρτημα 3.6

ΤΟ ΣΧΗΜΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΛΥΣΗ 4-NBB ΓΙΑ ΤΟΝ ΘΕΤΙΚΟ ΜΑΡΤΥΡΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ IL-8 LUC



▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΜΕΡΟΣ Γ: ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Γ.1. ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΓΙΑ ΨΑΡΙΑ

Γ.2. ΔΟΚΙΜΗ ΟΞΕΙΑΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΕ ΔΑΦΝΙΑ

Γ.3. ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΕ ΦΥΚΗ (ΑΛΓΕΣ) ΚΑΙ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑ ΤΩΝ ΓΛΥΚΩΝ ΥΔΑΤΩΝ

Γ.4. ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΤΗΣ «ΑΜΕΣΗΣ» ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΙΜΟΤΗΤΑΣ

ΜΕΡΟΣ I. ΓΕΝΙΚΑ ΘΕΜΑΤΑ

ΜΕΡΟΣ II. ΔΟΚΙΜΗ ΕΛΑΤΤΩΣΗΣ DOC (Μέθοδος Γ.4-Α)

ΜΕΡΟΣ III. ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΔΟΚΙΜΗ ΟΟΣΑ (Μέθοδος Γ.4-Β)

ΜΕΡΟΣ IV. ΔΟΚΙΜΗ ΕΚΛΥΣΗΣ CO_2 (Μέθοδος Γ.4-Γ)

ΜΕΡΟΣ V. ΔΟΚΙΜΗ ΜΑΝΟΜΕΤΡΙΚΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΙΟΜΕΤΡΙΑΣ (Μέθοδος Γ.4-Δ)

ΜΕΡΟΣ VI. ΔΟΚΙΜΗ ΚΛΕΙΣΤΗΣ ΦΙΑΛΗΣ (Μέθοδος Γ.4-Ε)

ΜΕΡΟΣ VII. ΔΟΚΙΜΗ MITI (Μέθοδος Γ.4-Ζ)

Γ.5. ΔΙΑΣΠΑΣΙΜΟΤΗΤΑ — ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΣ ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΟ ΟΞΥΓΟΝΟ

Γ.6. ΔΙΑΣΠΑΣΙΜΟΤΗΤΑ — ΧΗΜΙΚΩΣ ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΟ ΟΞΥΓΟΝΟ

Γ.7. ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ — ΑΒΙΟΤΙΚΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ: ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΩΣ ΣΥΝΑΡΤΗΣΗ ΤΟΥ pH

Γ.8. ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΓΑΙΟΣΚΩΛΗΚΕΣ

Γ.9. ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ — ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ZAHN-WELLENS

Γ.10. ΔΟΚΙΜΗ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗΣ ΑΕΡΟΒΙΑΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΛΥΜΑΤΩΝ: Γ.10-Α: ΜΟΝΑΔΕΣ ΕΝΕΡΓΟΥ ΙΛΥΟΣ — Γ.10-Β: ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΕΣ

Γ.11. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΙΛΥΣ, ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΟΗΣ (ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΚΑΙ ΑΜΜΩΝΙΟΥ)

Γ.12. ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ — ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ SCAS

Γ.13. ΒΙΟΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΣΕ ΨΆΡΙΑ: ΥΔΑΤΙΚΉ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΉ ΈΚΘΕΣΗ

Γ.13. — I Δοκιμή βιοσυγκέντρωσης σε ψάρια με υδατική έκθεση

Γ.13. — II Ελαχιστοποιημένη δοκιμή υδατικής έκθεσης σε ψάρια

Γ.13. — III Δοκιμή βιοσυσσώρευσης σε ψάρια με διατροφική έκθεση

Γ.14. ΔΟΚΙΜΗ ΝΕΑΝΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΨΑΡΙΩΝ

Γ.15. ΨΑΡΙΑ, ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΒΡΑΧΥΠΡΟΘΕΣΜΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΑ ΕΜΒΡΥΑ ΚΑΙ ΤΑ ΛΕΚΙΘΟΦΟΡΑ ΙΧΘΥΔΙΑ (SAC-FRY STAGES)

Γ.16. ΜΕΛΙΣΣΕΣ — ΜΕΛΕΤΗ ΟΞΕΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ

Γ.17. ΜΕΛΙΣΣΕΣ — ΜΕΛΕΤΗ ΟΞΕΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΕΙΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΕΠΑΦΗ

Γ.18. ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ/ΕΚΡΟΦΗΣΗ ΜΕ ΜΕΘΟΔΟ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑΣ ΚΑΤΑ ΠΑΡΤΙΔΑ

▼B

Γ.19.	ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ (K_{OC}) ΤΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΑΣΠΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟΝΟΜΩΝ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)
Γ.20.	ΔΟΚΙΜΉ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΣΕ *DAPHNIA MAGNA*
Γ.21.	ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΕΔΑΦΟΥΣ: ΔΟΚΙΜΗ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ ΑΖΩΤΟΥ
Γ.22.	ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΕΔΑΦΟΥΣ: ΔΟΚΙΜΗ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ ΑΝΘΡΑΚΑ
Γ.23.	ΑΕΡΟΒΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ
Γ.24.	ΑΕΡΟΒΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ ΣΕ ΥΔΑΤΙΚΑ ΙΖΗΜΑΤΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ
Γ.25.	ΑΕΡΟΒΙΑ ΑΝΟΡΓΑΝΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΑ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΑ ΥΔΑΤΑ — ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΤΙΚΗ ΔΟΚΙΜΗ ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ
Γ.26.	ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ LEMNA
Γ.27.	ΔΟΚΙΜΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΧΕΙΡΟΝΟΜΙΔΕΣ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑ ΙΖΗΜΑΤΟΣ- ΝΕΡΟΥ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΟΥ ΙΖΗΜΑΤΟΣ
Γ.28.	ΔΟΚΙΜΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΧΕΙΡΟΝΟΜΙΔΕΣ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑ ΙΖΗΜΑΤΟΣ-ΝΕΡΟΥ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΟΥ ΝΕΡΟΥ
Γ.29.	ΑΜΕΣΗ ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΙΜΟΤΗΤΑ — CO_2 ΣΕ ΣΦΡΑΓΙΣΜΕΝΑ ΔΟΧΕΙΑ (ΔΟΚΙΜΉ ΥΠΕΡΚΕΊΜΕΝΗΣ ΦΆΣΗΣ)
Γ.30.	ΒΙΟΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΣΕ ΧΕΡΣΑΙΟΥΣ ΟΛΙΓΟΧΑΙΤΟΥΣ (OLIGOCHAETA)
Γ.31.	ΔΟΚΙΜΗ ΣΕ ΧΕΡΣΑΙΑ ΦΥΤΑ: ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΑΔΥΣΗΣ ΣΠΟΡΟΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΠΟΡΟΦΥΤΩΝ
Γ.32.	ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΣΕ ENCHYTRAEIDAE
Γ.33.	ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΙΟΣΚΩΛΗΚΩΝ (*EISENIA FETIDA / EISENIA ANDREI*)
Γ.34.	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΑΝΑΕΡΟΒΙΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ — ΜΕΙΩΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΑΕΡΙΟΥ ΑΠΟ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΧΩΝΕΥΣΗ ΙΛΥΟΣ (ΛΥΜΑΤΟΛΑΣΠΗΣ)
Γ.35.	ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ *LUMBRICULUS* με τη χρηση εμβολιασμενου ιζηματος
Γ.36.	ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΑΡΠΑΚΤΙΚΟΥ ΑΚΑΡΕΟΣ [*HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER*] ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ
Γ.37.	ΔΟΚΙΜΗ 21-ΗΜΕΡΩΝ ΣΕ ΨΑΡΙΑ: ΜΙΑ ΒΡΑΧΥΠΡΟΘΕΣΜΗ ΔΟΚΙΜΗ ΔΙΑΛΟΓΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΔΡΟΓΟΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ, ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΑΡΩΜΑΤΑΣΗΣ
Γ.38.	ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΜΕΤΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΑΜΦΙΒΙΩΝ
Γ.39.	ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΟΛΛΕΜΒΟΛΩΝ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ

▼**B**

Γ.40.	ΔΟΚΙΜΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟΝ ΚΥΚΛΟ ΖΩΗΣ ΧΕΙΡΟΝΟΜΙΔΩΝ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑ ΙΖΗΜΑΤΟΣ-ΝΕΡΟΥ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΟΥ ΝΕΡΟΥ Ή ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΈΝΟΥ ΙΖΗΜΑΤΟΣ
Γ.41.	ΔΟΚΙΜΗ ΣΕΞΟΥΑΛΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΨΑΡΙΩΝ
Γ.42.	ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΣΕ ΘΑΛΑΣΣΙΟ ΝΕΡΟ
Γ.43.	ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΧΩΝΕΥΜΕΝΗ ΙΛΥ: ΜΕΣΩ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΑΕΡΙΩΝ
Γ.44.	ΑΠΟΠΛΥΣΗ ΣΕ ΣΤΗΛΕΣ ΕΔΑΦΟΥΣ
Γ.45.	ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΕΚΠΟΜΠΩΝ ΑΠΟ ΞΥΛΟ ΚΑΤΕΡΓΑΣΜΕΝΟ ΜΕ ΣΥΝΤΗΡΗΤΙΚΑ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ: ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΓΙΑ ΞΥΛΙΝΑ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΕΙΝΑΙ ΚΑΛΥΜΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΡΧΟΝΤΑΙ ΣΕ ΕΠΑΦΗ ΜΕ ΓΛΥΚΟ ΝΕΡΟ Η ΘΑΛΑΣΣΙΟ ΝΕΡΟ
Γ.46.	ΒΙΟΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΣΕ ΒΕΝΘΙΚΟΥΣ ΟΛΙΓΟΧΑΙΤΟΥΣ ΠΟΥ ΔΙΑΒΙΟΥΝ ΣΕ ΙΖΗΜΑΤΑ
Γ.47.	ΔΟΚΙΜΉ ΤΟΞΙΚΌΤΗΤΑΣ ΣΤΑ ΑΡΧΙΚΆ ΣΤΆΔΙΑ ΖΩΉΣ ΤΩΝ ΨΑΡΙΏΝ
Γ.48.	ΒΡΑΧΥΠΡΟΘΕΣΜΗ ΔΟΚΙΜΉ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΣΕ ΨΆΡΙΑ
Γ.49.	ΔΟΚΙΜΉ ΟΞΕΊΑΣ ΤΟΞΙΚΌΤΗΤΑΣ ΣΕ ΈΜΒΡΥΑ ΨΑΡΙΏΝ (FET)
Γ.50.	ΔΟΚΙΜΉ ΤΟΞΙΚΌΤΗΤΑΣ ΣΕ *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* ΜΕ ΣΥΣΤΗΜΑ ΧΩΡΊΣ ΊΖΗΜΑ
Γ.51.	ΔΟΚΙΜΉ ΤΟΞΙΚΌΤΗΤΑΣ ΣΕ *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* ΜΕ ΣΎΣΤΗΜΑ ΝΕΡΟΎ-ΙΖΗΜΑΤΟΣ
Γ.52	ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΗ ΔΟΚΙΜΗ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΙΑΣ ΓΕΝΕΑΣ ΣΤΟ ΡΥΖΟΨΑΡΟ (MEOGRT)
Γ.53	ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΥΞΗΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΠΡΟΝΥΜΦΩΝ ΑΜΦΙΒΙΩΝ (LAGDA)

▼B

Γ.1. ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΓΙΑ ΨΑΡΙΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σκοπός της δοκιμής αυτής είναι τα προσδιοριστεί η οξεία θανατηφόρος τοξικότητα μιας ουσίας στα νάρκη στο νερό. Για την εκλογή της πιο κατάλληλης μεθόδου [στατική, ημιστατική ή συνεχούς ροής], που θα εξασφαλίζει ικανοποιητικές σταθερές συγκεντρώσεις της ουσίας κατά τη διάρκεια της δοκιμής, σκόπιμα είναι να έχουμε, όσο το δυνατό, περισσότερες πληροφορίες για την ουσία αυτή όσον αφορά την υδατοδιαλυτότητά της, την τάση ατμών, τη χημική σταθερότητα, τη σταθερά διαστάσεως και τη βιοδιασπασιμότητά της.

Άλλες απαιτούμενες πληροφορίες (π.χ. συντακτικός τύπος, βαθμός καθαρότητας, φύση και περιεκτικότητα σημαντικών ξένων προσμείξεων, παρουσία και ποσότητα προσθέτων, και συντελεστής κατανομής σε n-οκτανόλη/νερά, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη και κατά την προετοιμασία της δοκιμής και στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΛΔΕΣ

Οξεία τοξικότητα είναι το εμφανές δυσμενές αποτέλεσμα που προκαλείται σε έναν οργανισμό μέσα σε μικρό διάστημα (ημέρες), έκθεσης σε μια ουσία. Σ' αυτή τη δοκιμή, η οξεία τοξικότητα εκφράζεται ως η μέση θανατηφόρος συγκέντρωση (LC_{50}), που είναι η συγκέντρωση σε νερό, η οποία σκοτώνει 50 % από την ομάδα ψαριών του πειράματος, μέσα σε μια συνεχή περίοδο έκθεσης η οποία πρέπει να δηλώνεται.

Όλες σε συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας δίνονται σε βάρος κατ' όγκο (χιλιοστόγραμμα ανά λίτρο), καθώς επίσης εκφράζονται και σε βάρος κατά βάρος [$mg.kg^{-1}$].

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Μια ουσία αναφοράς μπορεί να ελέγχεται με σκοπό να αποδειχτεί ότι, κάτω από τις εργαστριακές συνθήκες ελέγχου, η ανταπόκριση των ελεγχόμενων ειδών δεν έχει αλλάξει σημαντικά.

Για τον έλεγχο αυτό δεν καθορίζονται ουσίες αναφοράς.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Είναι δυνατόν να εκτελείται μια οριακή δοκιμή με 100 mg ανά λίτρο, προκειμένου να διαπιστωθεί αν η LC_{50} είναι μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση αυτή.

Τα ψάρια εκτίθενται στην προστιθέμενη ουσία σε μια ορισμένη περιοχή συγκεντρώσεων για διάστημα 96 ωρών. Καταγράφεται η θνησιμότητα για διαστήματα τουλάχιστον 24 ωρών και όπου είναι δυνατόν, υπολογίζονται σε κάθε παρατήρηση οι συγκεντρώσεις προ έχουν σαν αποτέλεσμα το θάνατο του 50 % των ψαριών [LC_{50}].

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Τα ποιοτικά κριτήρια έχουν εφαρμογή και στην οριακή δοκιμή και στη μέθοδο πλήρους δοκιμής.

Η θνησιμότητα στους ελέγχους δεν πρέπει να υπερβαίνει το 10 % (ή το ένα ψάρι, αν χρησιμοποιούνται λιγότερα από δέκα) στο τέλος της δοκιμής.

Η συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου πρέπει καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής να είναι μεγαλύτερη από το 60 % της τιμής κορεσμού με αέρα.

▼B

Οι συγκεντρώσεις της εξεταζόμενης ουσίας πρέπει, σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής, να διατηρείται στο 80 % των αρχικών συγκεντρώσεων.

Σε ουσίες που διαλύονται εύκολα στο περιβάλλον της δοκιμής, παρέχοντας σταθερά διαλύματα δηλ. εκείνες που δεν εξατμίζονται, αποικοδομούνται, υδρολύονται ή προσροφώνται τουλάχιστον σε σημαντικό βαθμό, η αρχική συγκέντρωση μπορεί να λαμβάνεται σαν ισοδύναμη με την ονομαστική συγκέντρωση. Πρέπει να παρουσιάζονται αποδείξεις ότι οι συγκεντρώσεις διατηρούνται σταθερές σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής και ότι τα ποιοτικά κριτήρια ικανοποιούνται.

Για ουσίες που είναι:

(i) ελάχιστα διαλυτές στο περιβάλλον της δοκιμής,

(ii) ικανές να σχηματίζουν σταθερά γαλακτώματα ή διασπορές,

(iii) μη σταθερές σε υδατικά διαλύματα,

σαν αρχική συγκέντρωση θα λαμβάνεται η συγκέντρωση που μετριέται στο διάλυμα (ή, αν αυτό δεν είναι τεχνικά δυνατό, στη στήλη νερού) στην αρχή της δοκιμής. Η συγκέντρωση θα προσδιορίζεται μετά από μία περίοδο εξισορρόπησης αλλά πριν από την εισαγωγή του εξεταζόμενου ψαριού.

Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις, θα πρέπει να γίνονται και άλλες μετρήσεις κατά τη διάρκεια της δοκιμής για να επιβεβαιώνονται οι πραγματικές συγκεντρώσεις έκθεσης ή ότι τηρούνται τα κριτήρια ποιότητος.

Το pH δεν πρέπει να μεταβάλλεται περισσότερο από 1 μονάδα.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τρεις τύποι μεθόδων μπορεί να χρησιμοποιηθούν:

Στατικός έλεγχος:

Έλεγχος τοξικότητας στον οποίο δεν παρουσιάζεται ροή του διαλύματος ελέγχου. (Τα διαλύματα παραμένουν χωρίς να αλλάζουν καθ' όλη τη διάρκεια του ελέγχου.)

Ημιστατικός έλεγχος:

Έλέγχος χωρίς ροή του διαλύματος ελέγχου, στον οποίο όμως κατά τακτά διαστήματα γίνεται ομαδικά αλλαγή των διαλυμάτων ελέγχου μετά από παρατεταμένες περιόδους (π.χ. 24 ώρες).

Έλεγχος συνεχούς ροής:

Έλεγχος τοξικότητας στον οποίο το νερό στους θαλάμους ελέγχου ανανεώνεται σταθερά, ενώ η ελεγχόμενη χημική ουσία μεταφέρεται με το νερό που χρησιμοποιείται για την ανανέωση του περιβάλλοντος ελέγχου.

1.6.1. **Αντιδραστήρια**

1.6.1.1. *Διαλύματα των ελεγχόμενων ουσιών*

Τα αρχικά διαλύματα της απαιτούμενης συγκέντρωσης παρασκευάζονται με διάλυση της ουσίας σε απιονισμένο νερό ή νερό σύμφωνα με την περιγραφή του σημείου 1.6.1.2.

Οι επιλεγόμενες συγκεντρώσεις για τη δοκιμή, παρασκευάζονται αραιώνοντας το αρχικό διάλυμα. Εάν η δοκιμή αναφέρεται σε υψηλές συγκεντρώσεις, η ουσία μπορεί να διαλύεται στο νερό αραίωσης απ' ευθείας.

▼B

Οι ουσίες θα πρέπει κανονικά να εξετάζονται μόνο μέχρι το όριο διαλυτότητας. Για ορισμένες ουσίες (π, χ. ουσίες με μικρή υδατοδιαλυτότητα, ή υψηλό P_{ow}, ή εκείνες που σχηματίζουν μία σταθερή διασπορά παρά αληθινό διάλυμα στο νερό), είναι παραδεκτό να διενεργείται και μία δοκιμή με συγκέντρωση πάνω από το όριο διαλυτότητας της ουσίας για να διασφαλίζεται ότι επιτεύχθηκε πράγματι η μέγιστη διαλυτή/σταθερή συγκέντρωση. Είναι εντούτοις σημαντικό, η συγκέντρωση αυτή να μην παρενοχλεί διαφορετικά το σύστημα δοκιμής (π.χ. δημιουργία μιας μεμβράνης της ουσίας στην επιφάνεια του νερού εμποδίζοντας έτσι την οξυγόνωση του νερού, κ.λπ.).

Για να υποβοηθηθεί η παρασκευή των αρχικών διαλυμάτων ουσιών με μικρή υδατοδιαλυτότητα ή η διασπορά των ουσιών αυτών στο περιβάλλον δοκιμής, μπορούν να χρησιμοποιηθούν υπέρηχοι για την υποβοήθηση της διασποράς, οργανικοί διαλύτες, γαλακτωματοποιητές ή μέσα διασποράς. Όταν χρησιμοποιούνται οι βοηθητικές αυτές ουσίες, όλες οι συγκεντρώσεις δοκιμής θα πρέπει να περιέχουν την ίδια ποσότητα βοηθητικής ουσίας, ενώ επιπλέον ψάρια μάρτυρες θα πρέπει να εκτίθενται στην ίδια συγκέντρωση βοηθητικής ουσίας με εκείνη που χρησιμοποιείται στη σειρά των δοκιμών. Η συγκέντρωση αυτών των βοηθητικών ουσιών θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μικρότερη και σε καμία περίπτωση να μην υπερβαίνει τα 100 mg ανά λίτρο στο περιβάλλον δοκιμής.

Η δοκιμή θα πρέπει να πραγματοποιείται χωρίς ρύθμιση του pH. Αν υπάρχει ένδειξη αξιοσημείωτης μεταβολής του pH, συνιστάται η δοκιμή να επαναλαμβάνεται με ρύθμιση του pH και να αναφέρονται τα αποτελέσματα. Στην περίπτωση αυτή, η τιμή pH του αρχικού διαλύματος θα πρέπει να ρυθμίζεται στην τιμή pH του νερού αραίωσης, εκτός αν υπάρχουν ειδικοί λόγοι που δεν το επιτρέπουν. Για το σκοπό αυτό προτιμούνται το HCl και NaOH. Η ρύθμιση του pH θα πρέπει να γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε η συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας στο αρχικό διάλυμα να μη μεταβάλλεται τουλάχιστον σημαντικά. Εάν εξαιτίας της ρύθμισης του pH προκληθεί κάποια χημική αντίδραση ή φυσική καθίζηση της εξεταζόμενης ουσίας, αυτή πρέπει να αναφέρεται.

1.6.1.2. *Νερό συντήρησης και αραίωσης*

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί πόσιμο νερό του δικτύου ύδρευσης (απαλλαγμένο από επικίνδυνες ενδεχομένως συγκεντρώσεις χλωρίου, βαρέων μετάλλων ή άλλων ουσιών), καλής ποιότητας φυσικό νερό ή νερό από ανασύσταση (βλέπε Προσάρτημα Ι). Πρέπει να προτιμώνται νερά με ολική σκληρότητα μεταξύ 10 και 250 mg ανά λίτρο (όπως $CaC0_3$) και από pH 6,0 έως 8,5.

1.6.2. **Συσκευή**

Όλες οι συσκευές πρέπει να είναι φτιαγμένες από χημικά αδρανές υλικό:

— αυτόματο σύστημα αραίωσης (για τον έλεγχο συνεχούς ροής),

— μετρητή οξυγόνου,

— συσκευή προσδιορισμού της σκληρότητας του νερού,

— κατάλληλα όργανα για τον έλεγχο της θερμοκρασίας,

— πεχάμετρο.

1.6.3. **Ψάρια ελέγχου**

Τα ψάρια θα πρέπει να είναι υγιή και χωρίς καμία εμφανή δυσμορφία.

▼B

Τα χρησιμοποιούμενα είδη θα πρέπει να επιλέγονται με βάση πρακτικά κριτήρια, όπως το αν ανευρίσκονται εύκολα σε όλη τη διάρκεια του χρόνου, την εύκολη συντήρηση, την καταλληλότητά για τη δοκιμή, τη σχετική ευαισθησία ως πρός τίς χημικές ουσίες, και οποιοδήποτε άλλο οικονομικό, βιολογικό ή οικολογικό παράγοντα που έχει σχέση με το θέμα. Κατά την επιλογή του είδους των ψαριών θα πρέπει επίσης να λαμβάνεται υπόψη και η ανάγκη συγκρισιμότητας των λαμβανομένων στοιχείων και η υπάρχουσα διεθνής εναρμόνιση (παραπομπή 1).

Ένας πίνακας ειδών που συνιστώνται για την εκτέλεση της δοκιμής αυτής υπάρχει στο προσάρτημα 2 προτιμούνται η πέστροφα και το είδος Ζέμπρα.

1.6.3.1. *Συντήρηση ψαριών*

Τα ψάρια ελέγχου προέρχονται, κατά προτίμηση, από μία ποσότητα με παρόμοιο μάκρος και ηλικία. Τα ψάρια πρέπει να κρατηθούν για 12 ημέρες τουλάχιστον στις παρακάτω συνθήκες:

Φορτίο:

Ανάλογο με το σύστημα (ανακυκλοφορία ή συνεχής ροή) και το είδος των ψαριών.

Νερό:

Βλέπε σημείο 1.6.1.2.

Φως:

Περίοδος φωτισμού 12 έως 16 ώρες ημερήσια.

Συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου:

80 % τουλάχιστον της τιμής κορεσμού με αέρα.

Διατροφή:

Τρεις φορές την εβδομάδα ή καθημερινά που σταματά 24 ώρες πριν αρχίσει ο έλεγχος.

1.6.3.2. *Θνησιμότητα*

Μετά από μια περίοδο εγκατάστασης 48 ωρών, καταγράφονται οι θάνατοι και εφαρμόζονται τα ακόλουθα κριτήρια:

— για θνησιμότητα μεγαλύτερη του 10 % του πληθυσμού σε επτά ημέρες:

απορρίπτεται όλη η ομάδα,

— για θνησιμότητα μεταξύ 5 έως 10 % του πληθυσμού:

η περίοδος συντήρησης συνεχίζεται για επτά ακόμη ημέρες.

Αν δεν παρατηρηθούν άλλοι θάνατοι, η ομάδα ψαριών εγκρίνεται, αλλιώς πρέπει να απορριφθεί,

— για θνησιμότητα μικρότερη του 5 % του πληθυσμού:

η ομάδα ψαριών εγκρίνεται.

1.6.4. **Προσαρμογή**

Όλα τα ψάρια πρέπει να εκτεθούν σε νερό της ποιότητας και θερμοκρασίας που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί στον έλεγχο για επτά τουλάχιστον ημέρες πριν να χρησιμοποιηθούν.

▼B

1.6.5. **Διαδικασία ελέγχου**

Ένας προκαταρκτικός έλεγχος μπορεί να προηγηθεί του τελικού, με σκοπό την παροχή πληροφοριών για την περιοχή των συγκεντρώσεων που πρέπει να χρησιμοποιηθούν στον κυρίως έλεγχο.

Εκτός από τη σειρά των δοκιμών, διενεργείται και ένας έλεγχος χωρίς την εξεταζόμενη ουσία και, εφόσον συντρέχει λόγος, και ένας έλεγχος με την βοηθητική ουσία.

Ανάλογα με τις φυσικές και χημικές ιδιότητες της εξεταζόμενης ουσίας, θα πρέπει να επιλέγεται ο στατικός, ημιστατικός ή συνεχούς ροής έλεγχος ώστε να πληρούνται τα ποιοτικά κριτήρια.

Τα ψάρια εκτίθενται στην ουσία όπως περιγράφεται παρακάτω:

— Διάρκεια: 96 ώρες

— Αριθμός ζώων: τουλάχιστον 7 για κάθε συγκέντρωση,

— Δεξαμενές: κατάλληλης χωρητικότητας σε σχέση με το φορτίο που συνιστάται,

— Φορτίο: το μέγιστο φορτίο που συνιστάται είναι 1,0 g ανά λίτρο για τον στατικό και ημιστατικό έλεγχο για συστήματα συνεχούς ροής γίνονται αποδεκτές υψηλότερες συγκεντρώσεις,

— Συγκεντρώσεις ελέγχου: πέντε τουλάχιστον συγκεντρώσεις που διαφέρουν μεταξύ τους κατά ένα σταθερό παράγοντα που δεν υπερβαίνει το 2,2 και που καλύπτουν κατά το δυνατόν την περιοχή θνησιμότητας από 0 έως 100 %,

— Νερό: βλέπε σημείο 1.6.1.2.,

— Φως: περίοδος φωτισμού 12 έως 16 ώρες ημερησίως,

— Θερμοκρασία: κατάλληλη για τα είδη ψαριών (προσάρτημα 2) αλλά με προσέγγιση ± 1 °C για κάθε ιδιαίτερο έλεγχο,

— Συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου: όχι λιγότερο από 60 % της τιμή; κορεσμού με αέρα στη θερμοκρασία που έχει επιλεγεί,

— Διατροφή: καθόλου.

Τα ψάρια επιθεωρούνται μετά τις πρώτες 2 έως 4 ώρες και σε διαστήματα 24 ωρών τουλάχιστον. Τα ψάρια θεωρούνται νεκρά όταν άγγιγμα του ουραίου μίσχου δεν προκαλεί αντίδραση και δεν είναι ορατές αναπνευστικές κινήσεις. Τα νεκρά ψάρια απομακρύνονται όταν παρατηρηθούν και οι θάνατοι καταγράφονται. Κρατούνται σημειώσεις των ορατών ανωμαλιών (π.χ. απώλεια ισορροπίας, αλλαγές συμπεριφοράς στην κολύμβηση, αναπνευστική λειτουργία, χρωματισμός κ.λπ.).

Μετρήσεις του pH, του διαλελυμένου οξυγόνου και της θερμοκρασίας πρέπει να γίνονται καθημερινά.

Οριακή δοκιμασία

Χρησιμοποιώντας τις διαδικασίες που περιγράφονται σ' αυτή τη μέθοδο δοκιμής, μπορεί να εκτελεσθεί μία οριακή δοκιμή με 100 mg ανά λίτρο για να διαπιστωθεί αν η LC_{50} είναι μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση αυτή.

Αν η φύση της ουσίας είναι τέτοια ώστε να μην μπορεί να επιτευχθεί στο νερό της δοκιμής συγκέντρωση 100 mg ανά λίτρο, η οριακή δοκιμή θα πρέπει να εκτελείται με συγκέντρωση ίση με τη διαλυτότητα της ουσίας (ή τη μέγιστη συγκέντρωση που οδηγεί σε μια σταθερή διασπορά) στο χρησιμοποιούμενο μέσον (βλ. επίσης 1.6.1.1.).

▼B

Η οριακή δοκιμή θα πρέπει να εκτελείται χρησιμοποιώντας 7 έως 10 ψάρια, με τον ίδιο αριθμό και στον ή στις ομάδες μαρτύρων. (Η διωνυμική θεωρία υπαγορεύει ότι όταν χρησιμοποιούνται 10 ψάρια με θνησιμότητα μηδέν, υπάρχει μία τιμή 99,9 % εμπιστοσύνης ότι η LC_{50} είναι μεγαλύτερη από τη χρησιμοποιηθείσα συγκέντρωση στην οριακή δοκιμή. Με 7, 8 ή 9 ψάρια, η απουσία θνησιμότητας παρέχει μία τιμή 99 %, τουλάχιστον, εμπιστοσύνης ότι η LC_{50} είναι μεγαλύτερη από τη χρησιμοποιηθείσα συγκέντρωση.)

Εάν υφίσταται θνησιμότητα, πρέπει να εκτελεσθεί πλήρης μελέτη. Εάν παρατηρηθούν υποθανατηφόρες επιδράσεις, θα πρέπει να καταγραφούν.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ**

Για κάθε περίοδο για την οποία καταγράφηκαν παρατηρήσεις (24, 48, 72 και 96 ώρες), χαράσσεται καμπύλη ποσοστού θνησιμότητας για κάθε συνιστώμενη περίοδο έκθεσης σαν συνάρτηση της συγκέντρωσης σε λογαριθμικό χαρτί.

Όπου είναι δυνατόν και για κάθε χρόνο παρατήρησης, θα πρέπει να εκτιμώνται η LC_{50} και τα όρια εμπιστοσύνης ($\rho = 0,05$) χρησιμοποιώντας πρότυπες διαδικασίες οι τιμές αυτές θα πρέπει να στρογγυλοποιούνται σε ένα, ή το πολύ δύο σημαντικά ψηφία (παραδείγματα στρογγυλοποίησης σε δύο ψηφία: 170 για 173,5, 0,13 αντί 0,127, 1,2 αντί 1,21).

Στις περιπτώσεις όπου η κλίση της καμπύλης συγκέντρωσης/ποσοστού απόκρισης είναι πολύ μεγάλη για να μπορεί να υπολογισθεί η LC_{50}, είναι αρκετή η γραφική εκτίμηση της τιμής αυτής.

Όταν δύο διαδοχικές συγκεντρώσεις, με σχέση 2,2 δίνουν μόνο 0 και 100 % θνησιμότητα, οι δύο αυτές τιμές αρκούν για να υποδείξουν την περιοχή στην οποία ευρίσκεται η LC_{50}.

Αν παρατηρηθεί ότι η σταθερότητα ή η ομοιογένεια της εξεταζόμενης ουσίας δεν μπορεί να διατηρηθεί, το γεγονός αυτό θα πρέπει να αναφέρεται και να λαμβάνεται υπόψη στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

Η έκθεση δοκιμής πρέπει, αν είναι δυνατόν, να περιέχει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— πληροφορίες για το εξεταζόμενο ψάρι (επιστημονική ονομασία, γένος, προμηθευτή, κάθε τυχόν προκατεργα-σία, μέγεθος και αριθμό ψαριών που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε συγκέντρωση)·

— πηγή νερού αραίωσης και κυριώτερα χημικά χαρακτηριστικά (pH, σκληρότητα, θερμοκρασία)·

— στην περίπτωση ουσίας με χαμηλή υδατοδιαλυτότητα, τη μέθοδο παρασκευής του αρχικού και του διαλύματος δοκιμής

— συγκέντρωση κάθε βοηθητικής ουσίας

— πίνακα των χρησιμοποιηθεισών συγκεντρώσεων και κάθε διαθέσιμη πληροφορία για τη σταθερότητα των συγκεντρώσεων της εξεταζόμενης ουσίας στο διάλυμα δοκιμής

— αν εκτελούνται χημικές αναλύσεις, τις χρησιμοποιηθείσες μεθόδους και τα ληφθέντα αποτελέσματα·

— αποτελέσματα τυχόν οριακής δοκιμασίας, αν έγινε·

— τους λόγους της εκλογής και λεπτομέρειες για τη χρησιμοποιηθείσα διαδικασία ελέγχου (π.χ. στατικός, ημιστατικός, ταχύτητα χορήγησης, ταχύτητα ροής, αν υπήρχε εξαερισμός, φορτίο ψαριών, κ.λπ)·

▼B

— περιγραφή του εξοπλισμού ελέγχου·

— πρόγραμμα φωτισμού·

— συγκεντρώσεις διαλελυμένου οξυγόνου, τιμές pH και θερμοκρασίες των διαλυμάτων δοκιμής κάθε 24 ώρες·

— αποδείξεις τήρησης των ποιοτικών κριτηρίων·

— πίνακα με τη συνολική θνησιμότητα σε κάθε συγκέντρωση και στο μάρτυρα (και μάρτυρα με τη βοηθητική ουσία, αν απαιτείται) σε κάθε χρονική στιγμή των παρατηρήσεων·

— γραφική παράσταση της καμπύλης συγκέντρωσης/ποσοστού απόκρισης στο τέλος της δοκιμής·

— εάν είναι δυνατόν, τις τιμές LC_{50} σε κάθε συνιστώμενο χρόνο παρατήρησης (με όριο εμπιστοσύνης 95 %)·

— στατιστικές μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των τιμών LC_{50}·

— αν χρησιμοποιήθηκε ουσία αναφοράς, τα ληφθέντα αποτελέσματα·

— μέγιστη τιμή συγκέντρωσης που δεν προκαλεί θνησιμότητα στη διάρκεια της δοκιμής·

— χαμηλότερη τιμή συγκέντρωσης στη δοκιμή που προκαλεί 100 % θνησιμότητα στη διάρκεια της δοκιμής.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.

(2) AFNOR — Determination of the acute toxicity of a substance to *Brachydanio rerio* — Static and Flow Through methods — NFT 90-303 June 1985.

(3) AFNOR — Determination of the acute toxicity of a substance to *Salmo gairdneri* — Static and Flow Through methods — NFT 90-305 June 1985.

(4) ISO 7346/1,/2 and/3 — Water Quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish *(Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan — *Teleostei, Cyprinidae).* Parti: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.

(5) Eidgenossisches Department des Innern, Schweiz; Richtlinien fur Probenahme und Normung von Wasserunter-suchungsmethoden — Part II 1974.

(6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (L1) und L (15).

(7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.

(8) NEN 6506 — Water — Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata,* 1980.

(9) Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvenebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.

(10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.

▼B

(11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.

(12) Standard methods for the examination of water and wastewater, 14th edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.

(13) Commission of the European Communities, Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.

(14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Ökotoxikolo-gie, Grundlagen für die Ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

(15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm, Exp. Therap., 1949, vol. 96, 99.

(16) Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.

(17) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793-821.

(18) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res. 1970, vol. 4, 3-32.

(19) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, 65-84.

(20) Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer programm for calculating an LC_{50}. US EPA.

▼B

Προσάρτημα 1

Νερό από ανασύσταση

Παράδειγμα ενός κατάλληλου νερού αραίωσης

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι αναλυτικού βαθμού.

Το νερό πρέπει να είναι καλής ποιότητας απεσταγμένο νερό ή απιονισμένο νερό με αγωγιμότητα μικρότερη από 5 μScm^{-1}.

Η συσκευή απόσταξης του νερού δεν πρέπει να περιέχει κανένα κομμάτι κατασκευασμένο από χαλκό.

Αρχικό διάλυμα

$CaCl_2$. $2H_20$ (υδροχλωριούχο ασβέστιο) διαλύονται σε νερό και συμπληρώνονται με νερό μέχρι 1 λίτρο	11,76 g
$MgS0_4$. $7H_20$ (επτα-υδροθειικό μαγνήσιο) διαλύονται σε νερό και συμπληρώνονται με νερό μέχρι 1 λίτρο	4,93 g
$NaHCO_3$ (όξινο ανθρακικό νάτριο) διαλύονται σε νερό και συμληρώνονται με νερό μέχρι 1 λίτρο	2,59 g
KCl (χλωριούχο κάλιο) διαλύονται σε νερό και συμπληρώνονται με νερό μέχρι 1 λίτρο	0,23 g

Νερό αραίωσης από ανασύσταση

Αναμειγνύονται 25 ml από κάθε ένα από τα τέσσερα αρχικά διαλύματα και συμπληρώνονται με νερό μέχρι 1 λίτρο.

Αερίζεται μέχρις ότου η συγκέντρωση του διαλελυμένου οξυγόνου εξισωθεί με την τιμή κορεσμού με αέρα.

Το pH πρέπει να είναι 7,8 ± 0,2

Το pH διορθώνεται αν είναι ανάγκη με NaOH (καυστικό νάτριο) ή HC1 (υδροχλωρικό οξύ).

Το νερό αραίωσης που παρασκευάζεται έτσι αφήνεται για 12 ώρες περίπου και δεν χρειάζεται περαιτέρω αερισμό.

Το σύνολο των ιόντων Ca και Mg σ' αυτό το διάλυμα είναι 2,5 mmol/l. Η σχέση των ιόντων Ca:Mg ειναι 4:1 και του Na: K είναι 10:1. Η συνολική αλκαλικάτητα του διαλύματος είναι 0,8 mmol/l.

Οποιαδήποτε εκτροπή στην παρασκευή του νερού αραίωσης δεν πρέπει να αλλάζει τη σύσταση ή τις ιδιότητες του νερού.

▼B

Προσάρτημα 2

Είδη ψαριών που συνιστώνται για δοκιμασία

Είδη που συνιστώνται	Περιοχή θερμοκρασιών ελέγχου που συνιστώνται (°C)	Ολικό μήκος ζώων ελέγχου (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprintdaej (Hamilton-Buchanan) Zebra-fish	20 to 24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafi-nesque) Fathead minnow	20 to 24	5,0 ± 2,0
Cypnnus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758} Common carp	20 to 24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae Cyprinodontidae) (Tomminck and Schiegel 1850) Red killifish	20 to 24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Guppy	20 to 24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarcbidae) (Rafi-nesque Linneaus 1758) Bluegill	20 to 24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Wal-baum 1988) Rainbow trout	12 to 17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) Golden orfe	20 to 24	6,0 ± 2,0

Συλλογή

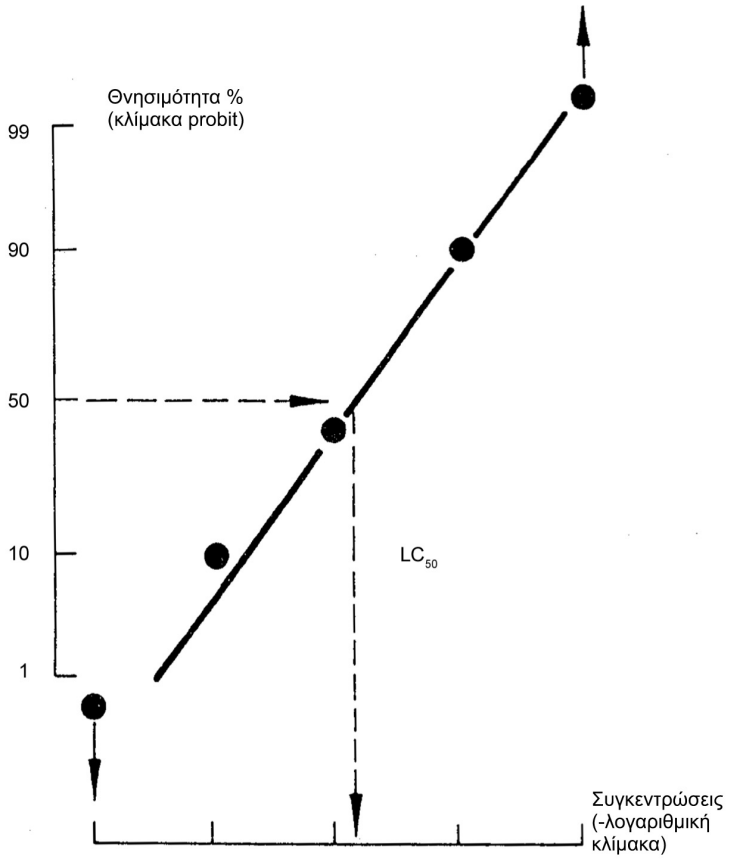
Τα ψάρια που αναφέρονται παραπάνω εκτρέφονται εύκολα ή/και είναι ευρέως διαθέσιμα κατά τη διάρκεια του χρόνου. Είναι δυνατό να τραφούν και καλλιεργηθούν είτε σε ιχθυοτροφεία είτε στο εργαστήριο, με συνθήκες ελεγχόμενες για παθήσεις και παράσιτα, έτσι που τα ζώα ελέγχου να είναι υγιή και από γνωστή καταγωγή. Αυτά τα ψάρια είναι διαθέσιμα σε πολλά μέρη του κόσμου.

▼B

Προσάρτημα 3

Παράδειγμα συγκέντρωσης: εκατοστιαία θνησιμότητα

Παράδειγμα προσδιορισμού LC_{50} με χαρτί log-probit



▼B

Γ.2. ΔΟΚΙΜΗ ΟΞΕΙΑΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΕ ΔΑΦΝΙΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών οξείας ακινητοποίησης είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή TG 202 (2004) του ΟΟΣΑ.

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην παρούσα μέθοδο περιγράφεται δοκιμή οξείας τοξικότητας για την αξιολόγηση των επιδράσεων χημικών ουσιών σε ζώα της οικογένειας των δαφνιίδων. Χρησιμοποιήθηκαν στο μέτρο του δυνατού υφιστάμενες μέθοδοι δοκιμών (1)(2)(3).

1.2. ΟΡΙΣΜΟΊ

Στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου χρησιμοποιούνται οι ακόλουθοι ορισμοί:

EC_{50}: η συγκέντρωση που υπολογίζεται ότι ακινητοποιεί το 50 % των δαφνιίδων κατά τη δηλούμενη περίοδο έκθεσης. Εάν χρησιμοποιείται διαφορετικός ορισμός, αυτό πρέπει να αναφέρεται, με τη σχετική βιβλιογραφική παραπομπή.

Ακινητοποίηση: τα ζώα που δεν μπορούν να κολυμπήσουν μέσα σε 15 δευτερόλεπτα μετά από ήπια ανακίνηση του δοχείου ελέγχου, θεωρούνται ακινητοποιημένα (έστω και αν μπορούν ακόμη να κινούν τις κεραίες τους).

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Νεαρά άτομα της οικογένειας των δαφνιίδων, ηλικίας κάτω των 24 ωρών κατά την έναρξη της δοκιμής, εκτίθενται σε σειρά συγκεντρώσεων της ελεγχόμενης ουσίας για 48 ώρες. Καταγράφεται η ακινητοποίηση στις 24 και 48 ώρες και συγκρίνεται με τιμές μάρτυρες. Τα αποτελέσματα αναλύονται για τον υπολογισμό της EC_{50} στις 48ώρες (βλ. ορισμούς στην ενότητα 1.2). Ο προσδιορισμός της EC_{50} στις 24 ώρες είναι προαιρετικός.

1.4. ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ

Θα πρέπει να είναι γνωστές η υδατοδιαλυτότητα και η τάση ατμών της ελεγχόμενης ουσίας και να υπάρχει αξιόπιστη αναλυτική μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ουσίας στα διαλύματα ελέγχου, μέθοδος της οποίας έχουν αναφερθεί η απόδοση ανάκτησης και το όριο προσδιορισμού. Χρήσιμες πληροφορίες είναι, μεταξύ άλλων, ο συντακτικός τύπος, η καθαρότητα, η σταθερότητα στο νερό ή στο φως, ο συντελεστής κατανομής σε μίγμα n-οκτανόλης/νερού (P_{ow}) και τα αποτελέσματα δοκιμής άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας (βλ. μέθοδο Γ.4).

ΣΗΜ.: Κατευθύνσεις για τον έλεγχο ουσιών που οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες δυσχεραίνουν τον έλεγχό τους, παρέχονται στη δημοσίευση (4).

1.5. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Για να εξακριβωθεί η αξιοπιστία των συνθηκών δοκιμής, είναι δυνατόν να υποβληθεί σε δοκιμή για EC_{50} μια ουσία αναφοράς. Για το σκοπό αυτό, συνιστώνται οι τοξικές ουσίες που έχουν χρησιμοποιηθεί σε διεθνείς κυκλικές δοκιμές (ring tests) (1)(5) ([1]). Η/Οι δοκιμή/-ές με ουσία αναφοράς θα πρέπει να εκτελείται/-ούνται κατά προτίμηση μηνιαίως και τουλάχιστον ανά εξάμηνο.

([1]) Από τα αποτελέσματα των εν λόγω διεργαστηριακών δοκιμών και από ένα τεχνικό διορθωτικό στο πρότυπο ISO 6341 προκύπτει πεδίο τιμών EC_{50} στις 24 ώρες για το διχρωμικό κάλιο ($K_2Cr_2O_7$) 0,6 mg/l έως 1,7 mg/l.

▼B

1.6. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Για να είναι έγκυρη μια δοκιμή, εφαρμόζονται τα ακόλουθα κριτήρια επιδόσεων:

— η ακινητοποίηση στους μάρτυρες, συμπεριλαμβανομένου εκείνου που περιέχει το διαλυτικό μέσο, δεν πρέπει να υπερβαίνει το 10 % των δαφνιίδων,

— η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου στο τέλος της δοκιμής πρέπει να είναι ≥ 3 mg/l, τόσο στα δοχεία μάρτυρες όσο και στα δοχεία ελέγχου.

ΣΗΜ: Όσον αφορά το πρώτο κριτήριο, δεν πρέπει να διαπιστώνονται σε περισσότερο από 10 % των δαφνιίδων μαρτύρων ακινητοποίηση ή άλλα σημεία ασθένειας ή πίεσης, π.χ. αποχρωματισμός, ασυνήθης συμπεριφορά, όπως παγίδευση στην επιφάνεια του νερού.

1.7. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

1.7.1. **Εργαστηριακά σκεύη και όργανα**

Τα δοχεία ελέγχου και τα υπόλοιπα σκεύη που πρόκειται να έλθουν σε επαφή με τα διαλύματα ελέγχου πρέπει να είναι κατασκευασμένα εξ ολοκλήρου από γυαλί ή άλλο χημικώς αδρανές υλικό. Τα δοχεία ελέγχου είναι κατά κανόνα γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες ή ποτήρια ζέσεως και θα πρέπει να καθαρίζονται με πρότυπες εργαστηριακές διαδικασίες, πριν από κάθε χρήση. Τα δοχεία ελέγχου θα πρέπει να πωματίζονται χαλαρά, ώστε να περιορίζεται η απώλεια νερού λόγω εξάτμισης και να μην εισέρχεται σκόνη στα διαλύματα. Οι πτητικές ενώσεις θα πρέπει να ελέγχονται σε τελείως πλήρη, κλειστά δοχεία, αρκετά μεγάλα ώστε να μην παρατηρηθεί μείωση ή έλλειψη οξυγόνου (βλ. ενότητα 1.6 και σημείο 1.8.3 πρώτο εδάφιο).

Επιπλέον, χρησιμοποιούνται ορισμένα από τα ακόλουθα όργανα ή και όλα: μετρητής οξυγόνου (με μικροηλεκτρόδιο ή άλλη κατάλληλη διάταξη για τη μέτρηση του διαλυμένου οξυγόνου σε δείγματα μικρού όγκου), πεχάμετρο, κατάλληλο όργανο για τον έλεγχο της θερμοκρασίας, εξοπλισμός για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ολικού οργανικού άνθρακα (TOC), εξοπλισμός για τον προσδιορισμό του χημικώς απαιτούμενου οξυγόνου (COD), εξοπλισμός για τον προσδιορισμό της σκληρότητας του νερού κ.λπ..

1.7.2. **Ελεγχόμενος οργανισμός**

Προτιμάται το είδος *Daphnia magna* Straus, αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα κατάλληλα είδη δαφνίας (π.χ. *Daphnia pulex*). Τα ζώα θα πρέπει να είναι ηλικίας κάτω των 24 ωρών κατά την έναρξη της δοκιμής και, για να περιορίζεται η διακύμανση, συνιστάται ένθερμα να μην είναι απόγονοι πρώτης γενεάς. Θα πρέπει να προέρχονται από υγιείς μητρικούς οργανισμούς (δηλ. που δεν δείχνουν σημεία πίεσης, όπως υψηλή θνησιμότητα, παρουσία αρσενικών ατόμων και εφιππίων, καθυστέρηση στη γέννηση της πρώτης γενεάς απογόνων, αποχρωματισμό ζώων κ.λπ.). Όλοι οι οργανισμοί που χρησιμοποιούνται για μια συγκεκριμένη δοκιμή θα πρέπει να προέρχονται από καλλιέργειες των ίδιων μητρικών δαφνιίδων. Τα μητρικά ζώα πρέπει να διατηρούνται σε συνθήκες καλλιέργειας (φως, θερμοκρασία, θρεπτικό υλικό) ανάλογες με εκείνες που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή. Εάν το θρεπτικό υλικό για δαφνιίδες που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή διαφέρει από εκείνο που χρησιμοποιείται στην καθημερινή πρακτική για τις καλλιέργειες δαφνιίδων, είναι ορθή πρακτική να προβλέπεται και περίοδος εγκλιματισμού πριν από τη δοκιμή. Για τον σκοπό αυτό, οι απόγονοι δαφνιίδες θα πρέπει να διατηρούνται σε νερό αραίωσης στη θερμοκρασία της δοκιμής τουλάχιστον για 48 ώρες πριν από την έναρξή της.

▼B

1.7.3. **Νερό διατήρησης και αραίωσης**

Είναι αποδεκτό ως νερό διατήρησης και αραίωσης το φυσικό νερό (επιφανειακά ή υπόγεια ύδατα), το νερό από ανασύσταση ή το αποχλωριωμένο νερό του δικτύου, εάν οι δαφνιίδες επιβιώνουν σε αυτό κατά τη διάρκεια των περιόδων καλλιέργειας, εγκλιματισμού και δοκιμής, χωρίς να εμφανίσουν σημεία πίεσης. Οποιοδήποτε νερό ανταποκρίνεται στα χημικά χαρακτηριστικά του αποδεκτού νερού αραίωσης, που παρατίθενται στο παράρτημα 1, είναι κατάλληλο ως νερό ελέγχου. Η ποιότητά του θα πρέπει να παραμένει σταθερή στη διάρκεια της δοκιμής. Νερό από ανασύσταση μπορεί να παρασκευαστεί με την προσθήκη συγκεκριμένων ποσοτήτων αντιδραστηρίων αναγνωρισμένης αναλυτικής καθαρότητας σε απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό. Παραδείγματα νερού από ανασύσταση παρέχονται στις δημοσιεύσεις (1) και (6) και στο παράρτημα 2. Σημειωτέον ότι τα θρεπτικά υλικά που περιέχουν γνωστούς παράγοντες χηλικής συμπλοκοποίησης, όπως τα M4 και M7 που περιγράφονται στο παράρτημα 2, θα πρέπει να αποφεύγονται στην περίπτωση του ελέγχου ουσιών που περιέχουν μέταλλα. Το pH θα πρέπει να κυμαίνεται από 6 έως 9. Για τη *Daphnia magna* συνιστάται σκληρότητα μεταξύ 140 και 250 mg/l (ως $CaCO_3$), ενώ για άλλα είδη δαφνίας μπορεί να ενδείκνυνται χαμηλότερες τιμές σκληρότητας. Το νερό αραίωσης μπορεί να αερίζεται πριν χρησιμοποιηθεί για τη δοκιμή, ώστε η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου να φθάσει το σημείο κορεσμού.

Εάν χρησιμοποιείται φυσικό νερό, οι ποιοτικές παράμετροι θα πρέπει να μετριούνται τουλάχιστον ανά εξάμηνο ή όποτε υπάρχουν υπόνοιες ότι τα χαρακτηριστικά αυτά μπορεί να έχουν μεταβληθεί σημαντικά (βλ. προηγούμενο εδάφιο και παράρτημα 1). Θα πρέπει επίσης να εκτελούνται μετρήσεις των βαρέων μετάλλων (π.χ. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni). Εάν χρησιμοποιείται αποχλωριωμένο νερό του δικτύου, είναι σκόπιμο να εκτελείται καθημερινά ανάλυση χλωρίου. Εάν το νερό αραίωσης προέρχεται από πηγή επιφανειακών ή υπογείων υδάτων, θα πρέπει να μετριούνται η αγωγιμότητα και ο ολικός οργανικός άνθρακας (TOC) ή το χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (COD).

1.7.4. **Διαλύματα ελέγχου**

Τα διαλύματα ελέγχου με τις επιλεγμένες συγκεντρώσεις παρασκευάζονται συνήθως με αραίωση μητρικού διαλύματος. Τα μητρικά διαλύματα θα πρέπει κατά προτίμηση να παρασκευάζονται με διάλυση της ελεγχόμενης ουσίας στο νερό αραίωσης. Θα πρέπει να αποφεύγεται, κατά το δυνατόν, η χρήση διαλυτών, γαλακτωματοποιητών και μέσων διασποράς. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ωστόσο, οι ενώσεις αυτού του είδους ενδέχεται να χρειάζονται για την παρασκευή αρκούντως πυκνού μητρικού διαλύματος. Κατευθύνσεις όσον αφορά κατάλληλους διαλύτες, γαλακτωματοποιητές και μέσα διασποράς παρέχονται στη δημοσίευση (4). Η ελεγχόμενη ουσία στα διαλύματα ελέγχου δεν θα πρέπει σε καμία περίπτωση να υπερβαίνει το όριο διαλυτότητας στο νερό αραίωσης.

Η δοκιμή θα πρέπει να διεξάγεται χωρίς ρύθμιση του pH. Εάν το pH δεν παραμένει εντός του πεδίου τιμών 6-9, είναι δυνατόν να διεξαχθεί δεύτερη δοκιμή με ρύθμιση του pH του μητρικού διαλύματος στην τιμή pH του νερού αραίωσης, πριν από την προσθήκη της ελεγχόμενης ουσίας. Το pH θα πρέπει να ρυθμιστεί με τρόπο ώστε να μην μεταβληθεί σημαντικά η συγκέντρωση του μητρικού διαλύματος και να μην προκληθεί χημική αντίδραση ή καθίζηση της ελεγχόμενης ουσίας. Προτιμώνται το HCl και το NaOH.

▼B

1.8. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.8.1. **Συνθήκες έκθεσης**

1.8.1.1. *Ομάδες ελέγχου και μάρτυρες*

Τα δοχεία ελέγχου πληρούνται με τους κατάλληλους όγκους νερού αραίωσης και διαλυμάτων της ελεγχόμενης ουσίας. Ο λόγος όγκων αέρα/νερού στο δοχείο θα πρέπει να είναι ο ίδιος για την ομάδα ελέγχου και την ομάδα μάρτυρα. Στη συνέχεια, φέρονται στα δοχεία ελέγχου οι δαφνίδες. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 20 ζώα, κατά προτίμηση χωρισμένα σε τέσσερις ομάδες των πέντε ζώων, για κάθε ελεγχόμενη συγκέντρωση και για τους μάρτυρες. Για κάθε ζώο θα πρέπει να προβλέπονται τουλάχιστον 2 ml διαλύματος ελέγχου (δηλ. 10 ml για πέντε δαφνίδες ανά δοχείο ελέγχου). Η δοκιμή μπορεί να εκτελείται με ημιστατικό σύστημα με ανανέωση ή με σύστημα συνεχούς κυκλοφορίας, εάν η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας δεν είναι σταθερή.

Επιπλέον των σειρών ελέγχου, θα πρέπει να διεξάγεται δοκιμή με μία σειρά μάρτυρα που περιέχει νερό αραίωσης και μία ακόμη σειρά μάρτυρα που περιέχει το διαλυτικό μέσο, εφόσον χρησιμοποιείται.

1.8.1.2. *Συγκεντρώσεις ελέγχου*

Εάν δεν υπάρχουν στοιχεία σχετικά με την τοξικότητα της ελεγχόμενης ουσίας, μπορεί να διεξαχθεί διερευνητική δοκιμή για τον προσδιορισμό του εύρους των συγκεντρώσεων της οριστικής δοκιμής. Για τον σκοπό αυτό, οι δαφνίδες εκτίθενται σε σειρά συγκεντρώσεων της ελεγχόμενης ουσίας που απέχουν πολύ μεταξύ τους. Σε κάθε συγκέντρωση ελέγχου θα πρέπει να εκτίθενται πέντε δαφνίδες για 48 ώρες ή μικρότερο διάστημα, χωρίς να χρειάζεται πολλαπλός προσδιορισμός. Η περίοδος έκθεσης μπορεί να συντομευτεί (π.χ. 24 ώρες ή μικρότερο διάστημα), εάν είναι δυνατόν να ληφθούν κατάλληλα δεδομένα για τους σκοπούς της διερευνητικής δοκιμής σε λιγότερο χρόνο.

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις ελέγχου, διατεταγμένες σε γεωμετρική πρόοδο, κατά προτίμηση με λόγο προόδου που να μην υπερβαίνει το 2,2. Εάν έχουν χρησιμοποιηθεί λιγότερες από πέντε συγκεντρώσεις, η επιλογή αυτή θα πρέπει να αιτιολογείται. Κατά προτίμηση, η υψηλότερη από τις συγκεντρώσεις ελέγχου θα πρέπει να προκαλεί ακινητοποίηση 100 %, στη δε χαμηλότερη θα πρέπει να μην παρατηρείται καμία επίδραση.

1.8.1.3. *Συνθήκες επώασης*

Η θερμοκρασία θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 18 °C και 22 °C και, για κάθε επιμέρους δοκιμή, να διατηρείται σταθερή με ακρίβεια ± 1 °C. Συνιστάται φωτοπερίοδος 16/8. Το απόλυτο σκοτάδι είναι επίσης αποδεκτό, ιδίως στην περίπτωση των ασταθών στο φως ουσιών.

Τα δοχεία ελέγχου δεν πρέπει να αερίζονται στη διάρκεια της δοκιμής. Η δοκιμή εκτελείται χωρίς ρύθμιση του pH. Οι δαφνίδες δεν θα πρέπει να τρέφονται στη διάρκεια της δοκιμής.

1.8.1.4. *Διάρκεια*

Η δοκιμή διαρκεί 48 ώρες.

1.8.2. **Παρατηρήσεις**

Κάθε δοχείο της δοκιμής θα πρέπει να ελέγχεται για τον εντοπισμό ακινητοποιημένων δαφνίδων, 24 και 48 ώρες μετά την έναρξη της δοκιμής (βλ. ορισμούς στην ενότητα 1.2). Εκτός από την ακινητοποίηση, θα πρέπει να αναφέρεται η τυχόν αφύσικη συμπεριφορά ή εμφάνιση.

▼B

1.8.3. **Αναλυτικές μετρήσεις**

Το διαλυμένο οξυγόνο και το pH μετριούνται στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής στον ή στους μάρτυρες και στην υψηλότερη συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας. Η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου στους μάρτυρες θα πρέπει να ανταποκρίνεται στο κριτήριο εγκυρότητας (βλ. ενότητα 1.6). Το pH δεν θα πρέπει κατά κανόνα να μεταβάλλεται κατά περισσότερο από 1,5 μονάδα σε καμία δοκιμή. Η θερμοκρασία μετριέται συνήθως στα δοχεία μάρτυρες ή στον αέρα του περιβάλλοντος και θα πρέπει, κατά προτίμηση, να καταγράφεται συνεχώς σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής ή, τουλάχιστον, να σημειώνεται στην αρχή και στο τέλος της.

Θα πρέπει να μετριούνται, τουλάχιστον, η υψηλότερη και η χαμηλότερη συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας, στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής (4). Συνιστάται να βασίζονται τα αποτελέσματα σε συγκεντρώσεις που έχουν μετρηθεί. Εάν, ωστόσο, υπάρχουν στοιχεία που καταδεικνύουν ότι η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας διατηρήθηκε ικανοποιητικά εντός των ορίων ± 20 % της ονομαστικής ή μετρηθείσας αρχικής συγκέντρωσης, σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής, τότε τα αποτελέσματα μπορούν να βασίζονται στις ονομαστικές ή μετρηθείσες αρχικές τιμές.

1.9. ΟΡΙΑΚΗ ΔΟΚΙΜΗ

Εφαρμόζοντας τις διαδικασίες που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο, είναι δυνατόν να διεξαχθεί οριακή δοκιμή με συγκέντρωση ελεγχόμενης ουσίας 100 mg/l ή μέχρι το όριο διαλυτότητάς της στο θρεπτικό υλικό της δοκιμής (αναλόγως του ποια είναι μικρότερη) για να διαπιστωθεί αν η EC_{50} είναι μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση αυτή. Η οριακή δοκιμή θα πρέπει να εκτελείται χρησιμοποιώντας 20 δαφνίδες (κατά προτίμηση χωρισμένες σε τέσσερις ομάδες των πέντε ζώων), με τον ίδιο αριθμό στην ή στις σειρές μάρτυρες. Εάν επέλθει ακινητοποίηση, θα πρέπει να διεξαχθεί πλήρης μελέτη. Η τυχόν παρατηρούμενη αφύσικη συμπεριφορά θα πρέπει να σημειώνεται.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα θα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα, στον οποίο θα εμφαίνεται, για κάθε ομάδα ελέγχου και μάρτυρα, ο αριθμός δαφνιίδων που χρησιμοποιήθηκαν και η ακινητοποίηση σε κάθε παρατήρηση. Χαράσσεται καμπύλη της εκατοστιαίας αναλογίας οργανισμών που ακινητοποιήθηκαν σε 24 και σε 48 ώρες έναντι των συγκεντρώσεων ελέγχου. Τα δεδομένα υποβάλλονται σε στατιστική ανάλυση με κατάλληλες μεθόδους (π.χ. μοντέλο Probit κ.λπ.) για τον υπολογισμό της κλίσης των καμπυλών και της EC_{50} με όριο εμπιστοσύνης 95 % (p = 0,05) (7) (8).

Σε περίπτωση που οι πρότυπες μέθοδοι υπολογισμού της EC_{50}, δεν είναι δυνατόν να εφαρμοστούν στα δεδομένα που προέκυψαν, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται η υψηλότερη συγκέντρωση που δεν προκαλεί ακινητοποίηση και η χαμηλότερη συγκέντρωση που προκαλεί ακινητοποίηση 100 % για τον κατά προσέγγιση υπολογισμό της EC_50 (η οποία θεωρείται ότι ισούται με τον γεωμετρικό μέσο των δύο αυτών συγκεντρώσεων).

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση για τη δοκιμή πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη ουσία:

— φυσική υπόσταση και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες·

▼B

— δεδομένα χημικής ταυτοποίησης, συμπεριλαμβανομένης της καθαρότητας.

Ελεγχόμενο είδος οργανισμού:

— προέλευση και είδος δαφνίας, προμηθευτής του μητρικού οργανισμού (εάν είναι γνωστός) και χρησιμοποιηθείσες συνθήκες καλλιέργειας (όπου συμπεριλαμβάνονται η προέλευση, το είδος και η ποσότητα της τροφής, η συχνότητα διατροφής).

Συνθήκες δοκιμής:

— περιγραφή των δοχείων ελέγχου: τύπος δοχείων, όγκος διαλυμάτων, αριθμός δαφνιίδων ανά δοχείο, αριθμός δοχείων ελέγχου (πολλαπλός προσδιορισμός) ανά συγκέντρωση·

— μέθοδοι παρασκευής του μητρικού διαλύματος και των διαλυμάτων ελέγχου, συμπεριλαμβανομένης της τυχόν χρήσης διαλυτών ή μέσων διασποράς, χρησιμοποιηθείσες συγκεντρώσεις·

— λεπτομέρειες για το νερό αραίωσης: προέλευση και ποιοτικά χαρακτηριστικά του νερού (pH, σκληρότητα, λόγος Ca/Mg, λόγος Na/K, αλκαλικότητα, αγωγιμότητα, κ.λπ.), σύνθεση του νερού από ανασύσταση, εφόσον έχει χρησιμοποιηθεί·

— συνθήκες επώασης: θερμοκρασία, ένταση του φωτός και φωτοπερίοδος, διαλυμένο οξυγόνο, pH, κ.λπ..

Αποτελέσματα:

— αριθμός και εκατοστιαία αναλογία των δαφνιίδων που ακινητοποιήθηκαν ή εμφάνισαν δυσμενείς επιδράσεις (συμπεριλαμβανομένης της αφύσικης συμπεριφοράς) στις ομάδες μάρτυρες και σε κάθε ομάδα ελέγχου, σε κάθε χρονική στιγμή παρατήρησης και περιγραφή του είδους των επιδράσεων που παρατηρήθηκαν·

— αποτελέσματα και ημερομηνία διεξαγωγής της δοκιμής με ουσία αναφοράς, εάν είναι διαθέσιμα·

— ονομαστικές συγκεντρώσεις ελέγχου και το αποτέλεσμα όλων των αναλύσεων που διενεργήθηκαν για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας στα δοχεία ελέγχου· θα πρέπει επίσης να αναφέρονται η απόδοση ανάκτησης της μεθόδου και το όριο προσδιορισμού·

— όλες τις φυσικοχημικές μετρήσεις της θερμοκρασίας, του pH και του διαλυμένου οξυγόνου κατά τη διάρκεια της δοκιμής·

— την τιμή EC_{50} ακινητοποίησης στις 48 ώρες, με διαστήματα εμπιστοσύνης και γραφικές παραστάσεις του προσαρμοσμένου μοντέλου που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό τους, τις κλίσεις των καμπυλών δόσης-απόκρισης και το σχετικό τυπικό σφάλμα· τις στατιστικές διαδικασίες που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της EC_50 (τα ίδια δεδομένα θα πρέπει επίσης να αναφέρονται για ακινητοποίηση στις 24 ώρες, εφόσον έχει μετρηθεί)·

— εξήγηση της ενδεχόμενης απόκλισης από τη μέθοδο δοκιμών και του κατά πόσον η απόκλιση αυτή επηρέασε τα αποτελέσματα της δοκιμής.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. ISO 6341. (1996). Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) — Acute toxicity test. Third edition, 1996.

2. EPA OPPTS 850.1010. (1996). Ecological Effects Test Guidelines — Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.

▼B

3. Environment Canada. (1996) Biological test method. Acute Lethality Test Using *Daphnia* spp. EPS 1/RM/11. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

4. Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris 2000.

5. Επιτροπή των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων. Μελέτη D8369. (1979). Inter-laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to *Daphnia.*

6. Κατευθυντήριες γραμμές του ΟΟΣΑ για τον έλεγχο των χημικών ουσιών. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, που εγκρίθηκε τον Σεπτέμβριο του 1998.

7. Stephan C.E. (1977). Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 — American Society for Testing and Materials. Pp65-84.

8. Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

Παραρτημα 1

ΟΡΙΣΜΕΝΑ ΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΑΠΟΔΕΚΤΟΥ ΝΕΡΟΥ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

Ουσία	Συγκέντρωση
Σωματίδια	< 20 mg/l
Ολικός οργανικός άνθρακας	< 2 mg/l
Μη ιονισμένη αμμωνία	< 1 μg/l
Υπολείμματα χλωρίου	< 10 μg/l
Ολικά οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα	< 50 ng/l
Άθροισμα ολικών οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων και πολυχλωροδιφαινυλίων	< 50 ng/l
Ολικό οργανικό χλώριο	< 25 ng/l

▼B

Παραρτημα 2

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΥ ΝΕΡΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΑΠΟ ΑΝΑΣΥΣΤΑΣΗ

Νερό ελέγχου κατά ISO (1)

Μητρικά διαλύματα (μόνο μίας ουσίας)		Για την παρασκευή του νερού από ανασύσταση, προστίθενται σε 1 λίτρο νερού (*) οι ακόλουθοι όγκοι μητρικών διαλυμάτων
Ουσία	Ποσότητα προστιθέμενη σε 1 λίτρο νερού (*)	
Χλωριούχο ασβέστιο $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	11,76 g	25 ml
Θειικό μαγνήσιο $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	4,93 g	25 ml
Όξινο ανθρακικό νάτριο $NaHCO_3$	2,59 g	25 ml
Χλωριούχο κάλιο KCl	0,23 g	25 ml

(*) Νερό κατάλληλης καθαρότητας, π.χ. απιονισμένο, απεσταγμένο ή καθαρισμένο με αντίστροφη όσμωση, του οποίου η αγωγιμότητα δεν υπερβαίνει κατά προτίμηση τα 10 $\mu S.cm^{-1}$.

Θρεπτικά υλικά Elendt M7 και M4

Εγκλιματισμός στα θρεπτικά υλικά Elendt M4 και M7

Ορισμένα εργαστήρια έχουν συναντήσει δυσκολίες στη μεταφορά της δαφνίας κατευθείαν στα θρεπτικά υλικά M4 και M7. Ωστόσο, αυτές υπερνικήθηκαν ως ένα βαθμό με σταδιακό εγκλιματισμό, δηλαδή μεταφορά από το οικείο θρεπτικό υλικό σε Elendt 30 %, κατόπιν σε Elendt 60 % και τέλος σε Elendt 100 %. Η διάρκεια των περιόδων εγκλιματισμού ενδέχεται να χρειαστεί να φθάσει τον ένα μήνα.

Παρασκευή

Ιχνοστοιχεία

Πρώτα παρασκευάζονται χωριστά μητρικά διαλύματα (I) των επιμέρους ιχνοστοιχείων σε νερό κατάλληλης καθαρότητας, π.χ. απιονισμένο, απεσταγμένο ή καθαρισμένο με αντίστροφη όσμωση. Από τα εν λόγω μητρικά διαλύματα (I) παρασκευάζεται ένα δεύτερο, ενιαίο μητρικό διάλυμα (II), το οποίο περιέχει όλα τα ιχνοστοιχεία (συνδυασμένο διάλυμα), δηλαδή:

Μητρικό/-ά διάλυμα/-τα I (μόνο μίας ουσίας)	Ποσότητα προστιθέμενη σε νερό (mg/l)	Συγκέντρωση (σε σχέση με το θρεπτικό υλικό M4)	Για την παρασκευή του συνδυασμένου μητρικού διαλύματος II, προστίθεται σε νερό η ακόλουθη ποσότητα μητρικού διαλύματος I (ml/l)	
			M4	M7
$H_3 BO_3$	57 190	20 000-πλάσια	1,0	0,25
$MnCl_2.4H_2O$	7 210	20 000-πλάσια	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000-πλάσια	1,0	0,25

▼B

Μητρικό/-ά διάλυμα/-τα Ι (μόνο μίας ουσίας)	Ποσότητα προστιθέμενη σε νερό (mg/l)	Συγκέντρωση (σε σχέση με το θρεπτικό υλικό M4)	Για την παρασκευή του συνδυασμένου μητρικού διαλύματος ΙΙ, προστίθεται σε νερό η ακόλουθη ποσότητα μητρικού διαλύματος Ι (ml/l)	
			M4	M7
RbCl	1 420	20 000-πλάσια	1,0	0,25
$SrCl_2.6H_2O$	3 040	20 000-πλάσια	1,0	0,25
NaBr	320	20 000-πλάσια	1,0	0,25
$Na_2\ MoO_4.2H_2O$	1 230	20 000-πλάσια	1,0	0,25
$CuCl_2.2H_2O$	335	20 000-πλάσια	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000-πλάσια	1,0	1,0
$CoCl_2.6H_2O$	200	20 000-πλάσια	1,0	1,0
KI	65	20 000-πλάσια	1,0	1,0
$Na_2\ SeO_3$	43,8	20 000-πλάσια	1,0	1,0
$NH_4\ VO_3$	11,5	20 000-πλάσια	1,0	1,0
Na_2 EDTA.$2H_2O$	5 000	2 000-πλάσια	—	—
$FeSO_4.7H_2O$	1 991	2 000-πλάσια	—	—

Τα διαλύματα Na_2EDTA και $FeSO_4$ παρασκευάζονται χωριστά, ενώνονται και αποστειρώνονται αμέσως σε αυτόκαυστο.

Με τον τρόπο αυτό λαμβάνονται:

2 l διαλύματος Fe-EDTA		1 000-πλάσια	20,0	5,0

Θρεπτικά υλικά M4 και M7

Τα θρεπτικά υλικά M4 και M7 παρασκευάζονται με χρήση του μητρικού διαλύματος ΙΙ και μητρικών διαλυμάτων μακροθρεπτικών συστατικών και βιταμινών ως εξής:

	Ποσότητα προστιθέμενη σε νερό (mg/l)	Συγκέντρωση (σε σχέση με το υλικό M4)	Προστιθέμενη ποσότητα μητρικού διαλύματος ΙΙ για την παρασκευή του υλικού (ml/l)	
			M4	M7
Μητρικό διάλυμα ΙΙ (συνδυασμός ιχνοστοιχείων)		20-πλάσια	50	50
Μητρικά διαλύματα μακροθρεπτικών συστατικών (μόνο μίας ουσίας)				
$CaCl_2 \cdot 2H_20$	293 800	1 000-πλάσια	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	2 000-πλάσια	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000-πλάσια	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000-πλάσια	1,0	1,0
$Na_2\ SiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	5 000-πλάσια	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000-πλάσια	0,1	0,1
$KH_2\ PO_4$	1 430	10 000-πλάσια	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000-πλάσια	0,1	0,1

▼B

	Ποσότητα προστιθέμενη σε νερό (mg/l)	Συγκέντρωση (σε σχέση με το υλικό M4)	Προστιθέμενη ποσότητα μητρικού διαλύματος II για την παρασκευή του υλικού (ml/l)	
			M4	M7
Μητρικό διάλυμα συνδυασμού βιταμινών	—	10 000-πλάσια	0,1	0,1

Το μητρικό διάλυμα συνδυασμού βιταμινών παρασκευάζεται με την προσθήκη 3 βιταμινών σε 1 λίτρο νερού, όπως εμφαίνεται κατωτέρω:

Υδροχλωρική θειαμίνη	750	10 000-πλάσια		
Κυανοκοβαλαμίνη(B_{12})	10	10 000-πλάσια		
Βιοτίνη	7,5	10 000-πλάσια		

Το μητρικό διάλυμα συνδυασμού βιταμινών φυλάσσεται στην κατάψυξη, χωρισμένο σε μικρές ποσότητες. Οι βιταμίνες προστίθενται στο θρεπτικό υλικό λίγο πριν από τη χρήση του.

ΣΗΜ.: Για να αποφευχθεί η καθίζηση αλάτων κατά την παρασκευή του πλήρους θρεπτικού υλικού, οι κατάλληλες ποσότητες μητρικών διαλυμάτων προστίθενται σε 500 — 800 ml απιονισμένου νερού και κατόπιν συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι το 1 λίτρο.

ΣΗΜ.: Πρώτη δημοσίευση του θρεπτικού υλικού M4: Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructual approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

▼M6

Γ.3. ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΕ ΦΥΚΗ (ΑΛΓΕΣ) ΚΑΙ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑ ΤΩΝ ΓΛΥΚΩΝ ΥΔΑΤΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 201 του ΟΟΣΑ (2006· το παράρτημα διορθώθηκε το 2011). Διαπιστώθηκε ότι η μέθοδος δοκιμών έπρεπε να επεκταθεί, ώστε να συμπεριληφθούν πρόσθετα είδη οργανισμών, και να επικαιροποιηθεί, ώστε να καλυφθούν οι απαιτήσεις που αφορούν την εκτίμηση επικινδυνότητας και την ταξινόμηση των χημικών ουσιών. Η αναθεώρηση αυτή ολοκληρώθηκε με βάση τη μεγάλη πρακτική πείρα, την επιστημονική πρόοδο όσον αφορά τις μελέτες τοξικότητας σε φύκη και την ευρεία κανονιστική χρήση στο διάστημα που μεσολάβησε από την πρώτη έγκριση της μεθόδου.

2. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

3. Σκοπός της παρούσας δοκιμής είναι να προσδιοριστούν οι επιδράσεις μιας χημικής ουσίας στην ανάπτυξη μικροφυκών (μικροαλγών) και/ή κυανοβακτηριδίων των γλυκών υδάτων. Οργανισμοί δοκιμής που βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία σε ασυνεχείς καλλιέργειες κατά κανόνα για χρονικό διάστημα 72 ωρών. Παρά τη σχετικά μικρή διάρκεια της δοκιμής, είναι δυνατόν να εκτιμηθούν οι επιδράσεις σε πολλές γενεές.

4. Η απόκριση του συστήματος είναι η μείωση της ανάπτυξης σε μια σειρά καλλιεργειών φυκών (μονάδες δοκιμής) που εκτίθενται σε διάφορες συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Η απόκριση αξιολογείται σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση έκθεσης, σε σύγκριση με τη μέση ανάπτυξη ταυτόσημων καλλιεργειών ελέγχου που δεν έχουν εκτεθεί στην ουσία. Για την πλήρη έκφραση της απόκρισης του συστήματος στις τοξικές επιδράσεις (βέλτιστη ευαισθησία), οι καλλιέργειες αφήνονται να αναπτυχθούν εκθετικά χωρίς περιορισμούς, σε συνθήκες επάρκειας θρεπτικών στοιχείων και συνεχούς φωτισμού, για επαρκές χρονικό διάστημα, ώστε να μετρηθεί η μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης.

5. Η ανάπτυξη και η αναστολή της ανάπτυξης προσδιορίζονται ποσοτικά με μετρήσεις της βιομάζας φυκών σε συνάρτηση με τον χρόνο. Η βιομάζα φυκών ορίζεται ως το ξηρό βάρος ανά μονάδα όγκου, π.χ. mg φυκών/λίτρο διαλύματος δοκιμής. Ωστόσο, είναι δύσκολο να μετρηθεί το ξηρό βάρος και, για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιούνται παράμετροι υποκατάστασης. Από αυτές τις παραμέτρους, χρησιμοποιείται συχνότερα ο αριθμός κυττάρων. Άλλες παράμετροι που χρησιμοποιούνται ως υποκατάστατα είναι ο κυτταρικός όγκος, ο φθορισμός, η οπτική πυκνότητα κ.λπ. Θα πρέπει να είναι γνωστός ο συντελεστής μετατροπής της μετρούμενης παραμέτρου υποκατάστασης σε βιομάζα.

6. Το τελικό σημείο της δοκιμής είναι η αναστολή της ανάπτυξης, εκφραζόμενη ως η λογαριθμική αύξηση της βιομάζας (μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης) στη διάρκεια της περιόδου έκθεσης. Από τους μέσους ειδικούς ρυθμούς ανάπτυξης που καταγράφονται για μια σειρά διαλυμάτων δοκιμής, προσδιορίζεται η συγκέντρωση που προκαλεί αναστολή του ρυθμού ανάπτυξης κατά συγκεκριμένο ποσοστό x % (π.χ. 50 %) και εκφράζεται ως E_rC_x (π.χ. E_rC_{50}).

7. Μία επιπλέον μεταβλητή απόκρισης που χρησιμοποιείται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών είναι η απόδοση, η οποία ενδέχεται να απαιτείται για τη συμμόρφωση με ειδικές κανονιστικές απαιτήσεις σε ορισμένες χώρες. Η απόδοση ορίζεται ως η βιομάζα στο τέλος της περιόδου έκθεσης μείον τη βιομάζα στην αρχή της περιόδου έκθεσης. Από την απόδοση που καταγράφεται για μια σειρά διαλυμάτων δοκιμής, προσδιορίζεται η συγκέντρωση που προκαλεί αναστολή της απόδοσης κατά συγκεκριμένο ποσοστό x % (π.χ. 50 %) και εκφράζεται ως E_yC_x (π.χ. E_yC_{50}).

8. Επιπροσθέτως, μπορούν να προσδιοριστούν στατιστικά η κατώτατη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης (LOEC) και η συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC).

▼M6

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

9. Στις σχετικές με την υπό δοκιμή χημική ουσία πληροφορίες που μπορεί να είναι χρήσιμες για τον καθορισμό των συνθηκών δοκιμής περιλαμβάνονται ο συντακτικός τύπος, ο βαθμός καθαρότητας, η σταθερότητα στο φως, η σταθερότητα στις συνθήκες της δοκιμής, οι ιδιότητες απορρόφησης του φωτός, η σταθερά pKa και τα αποτελέσματα των μελετών μετατροπής, συμπεριλαμβανομένης της βιοαποικοδομησιμότητας στο νερό.

10. Η υδατοδιαλυτότητα, ο συντελεστής κατανομής σε μείγμα οκτανόλης-νερού (P_{ow}) και η τάση ατμών της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να είναι γνωστά και θα πρέπει να υπάρχει επικυρωμένη μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό της χημικής ουσίας στα διαλύματα δοκιμής, μέθοδος της οποίας η απόδοση ανάκτησης και το όριο ανίχνευσης θα πρέπει να αναφέρονται στην έκθεση.

ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

11. Για να είναι έγκυρη η δοκιμή, πρέπει να πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια επιδόσεων:

— Η βιομάζα στις καλλιέργειες ελέγχου θα πρέπει να έχει αυξηθεί εκθετικά με συντελεστή τουλάχιστον 16 εντός των 72 ωρών που διαρκεί η δοκιμή. Αυτό αντιστοιχεί σε ειδικό ρυθμό ανάπτυξης 0,92 ημέρα^{-1}. Ο ρυθμός ανάπτυξης των συνηθέστερα χρησιμοποιούμενων ειδών είναι συνήθως σημαντικά υψηλότερος (βλ. προσάρτημα 2). Το κριτήριο αυτό μπορεί να μην πληρούται όταν χρησιμοποιούνται είδη βραδύτερης ανάπτυξης από εκείνα που παρατίθενται στο προσάρτημα 2. Στην περίπτωση αυτή, η διάρκεια της δοκιμής πρέπει να παρατείνεται μέχρι να επιτευχθεί τουλάχιστον δεκαεξαπλάσια αύξηση στις καλλιέργειες ελέγχου, ενώ η ανάπτυξη πρέπει να είναι εκθετική σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Η διάρκεια της δοκιμής είναι δυνατόν να συντομευθεί σε τουλάχιστον 48 ώρες, ώστε να διατηρηθεί η απεριόριστη εκθετική ανάπτυξη κατά τη δοκιμή, προκειμένου να επιτευχθεί ο ελάχιστος πολλαπλασιαστής 16.

— Ο μέσος συντελεστής μεταβολής για τους τμηματικούς ειδικούς ρυθμούς ανάπτυξης (ημέρες 0-1, 1-2 και 2-3, στην περίπτωση της δοκιμής 72 ωρών) των καλλιεργειών ελέγχου (βλ. προσάρτημα 1, σημείο «Συντελεστής μεταβολής») δεν πρέπει να υπερβαίνει το 35 %. Ο υπολογισμός του τμηματικού ειδικού ρυθμού ανάπτυξης περιγράφεται στο σημείο 49. Το κριτήριο αυτό εφαρμόζεται στη μέση τιμή των συντελεστών μεταβολής που υπολογίζεται για τις ταυτόσημες καλλιέργειες ελέγχου.

— Στις δοκιμές σε *Pseudokirchneriella subcapitata* και *Desmodesmus subspicatus*, ο συντελεστής μεταβολής των μέσων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης ταυτόσημων καλλιεργειών ελέγχου σε όλη την περίοδο δοκιμής δεν πρέπει να υπερβαίνει το 7 %. Για άλλα είδη που χρησιμοποιούνται σπανιότερα στις δοκιμές, η αντίστοιχη τιμή δεν πρέπει να υπερβαίνει το 10 %.

ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

12. Είναι δυνατόν να υποβληθούν σε δοκιμή μία ή περισσότερες ουσίες αναφοράς, όπως η 3,5-διχλωροφαινόλη που χρησιμοποιήθηκε στη διεθνή δοκιμή δακτυλίου (ring test) (1), προκειμένου να ελεγχθεί η διαδικασία δοκιμής. Το διχρωμικό κάλιο μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως χημική ουσία αναφοράς για τα πράσινα φύκη. Είναι επιθυμητή η υποβολή της χημικής ουσίας αναφοράς σε δοκιμή τουλάχιστον ανά εξάμηνο.

ΕΦΑΡΜΟΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

13. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών εφαρμόζεται με τη μεγαλύτερη ευχέρεια σε υδατοδιαλυτές ουσίες, οι οποίες είναι πιθανόν να παραμείνουν στο νερό υπό τις συνθήκες της δοκιμής. Για τον έλεγχο πτητικών, ισχυρώς απορροφώμενων, έγχρωμων ή δυσδιάλυτων στο νερό χημικών ουσιών ή χημικών ουσιών

▼M6

που μπορεί να επηρεάσουν τη διαθεσιμότητα θρεπτικών ή ανόργανων στοιχείων στο θρεπτικό μέσο δοκιμής, ενδέχεται να απαιτηθούν ορισμένες τροποποιήσεις της περιγραφόμενης διαδικασίας (π.χ. κλειστό σύστημα, εγκλιματισμός των δοκιμαστικών δοχείων). Καθοδήγηση σχετικά με ορισμένες κατάλληλες τροποποιήσεις παρέχεται στις δημοσιεύσεις (2) (3) και (4).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Εργαστηριακός εξοπλισμός

14. Τα δοχεία δοκιμής και ο λοιπός εξοπλισμός που θα έρχονται σε επαφή με τα διαλύματα δοκιμής θα πρέπει να είναι εξ ολοκλήρου από γυαλί ή άλλο χημικώς αδρανές υλικό. Τα στοιχεία του εξοπλισμού πρέπει να εκπλύνονται σχολαστικά, ώστε να εξασφαλίζεται η απουσία παρεμβολής οργανικών ή ανόργανων ξένων προσμείξεων στην ανάπτυξη των φυκών ή στη σύσταση των διαλυμάτων δοκιμής.

15. Κατά κανόνα, τα δοχεία δοκιμής είναι γυάλινες φιάλες, των οποίων οι διαστάσεις επιτρέπουν επαρκή όγκο καλλιέργειας για την εκτέλεση μετρήσεων στη διάρκεια της δοκιμής και επαρκή μεταφορά μάζας CO_2 από την ατμόσφαιρα (βλ. σημείο 30). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο όγκος του υγρού πρέπει να επαρκεί για τους αναλυτικούς προσδιορισμούς (βλ. σημείο 37).

16. Επιπλέον, μπορεί να απαιτηθούν ορισμένα από τα ακόλουθα στοιχεία εξοπλισμού ή και όλα:

— Συσκευή καλλιέργειας: Συνιστάται η χρήση ερμαρίου ή θαλάμου, στο εσωτερικό του οποίου η επιλεγμένη θερμοκρασία επώασης μπορεί να διατηρείται στους ± 2 °C.

— Φωτόμετρα: Αξίζει να επισημανθεί ότι η μέθοδος μέτρησης της φωτεινής έντασης, και ιδίως ο τύπος δέκτη (συλλέκτη), μπορεί να επηρεάσει τη μετρούμενη τιμή. Οι μετρήσεις θα πρέπει να εκτελούνται κατά προτίμηση με σφαιρικό (4 π) δέκτη (ο οποίος αποκρίνεται στο άμεσο και στο ανακλώμενο φως από όλες τις γωνίες πάνω και κάτω από το επίπεδο μέτρησης) ή με δέκτη 2 π (ο οποίος αποκρίνεται στο φως το οποίο εκπέμπεται από όλες τις γωνίες πάνω από το επίπεδο μέτρησης).

— Εξοπλισμός για τον προσδιορισμό της βιομάζας των φυκών: Ο αριθμός κυττάρων –η παράμετρος υποκατάστασης που χρησιμοποιείται συχνότερα για τη βιομάζα των φυκών– μπορεί να καταμετρηθεί με τη βοήθεια ηλεκτρονικού μετρητή σωματιδίων, μικροσκοπίου με θάλαμο καταμέτρησης ή κυτταρόμετρου ροής. Άλλες παράμετροι υποκατάστασης για τη βιομάζα μπορούν να μετρηθούν με κυτταρόμετρο, φθορισμόμετρο, φασματοφωτόμετρο ή χρωματόμετρο. Είναι χρήσιμο να υπολογίζεται ο συντελεστής μετατροπής που συνδέει τον αριθμό κυττάρων με το ξηρό βάρος. Όταν χρησιμοποιείται φασματοφωτόμετρο, ενδέχεται να απαιτούνται κυψελίδες οπτικής διαδρομής τουλάχιστον 4 cm, προκειμένου να λαμβάνονται χρήσιμες μετρήσεις σε χαμηλές συγκεντρώσεις βιομάζας.

Οργανισμοί δοκιμής

17. Μπορούν να χρησιμοποιούνται διάφορα είδη μη ενωμένων μικροφυκών και κυανοβακτηριδίων. Τα στελέχη που παρατίθενται στο προσάρτημα 2 έχουν αποδειχθεί κατάλληλα για χρήση στη διαδικασία δοκιμής που περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών.

18. Εάν χρησιμοποιούνται άλλα είδη, θα πρέπει να αναφέρεται το στέλεχος και/ή η προέλευση. Πρέπει να επιβεβαιώνεται η δυνατότητα διατήρησης της εκθετικής ανάπτυξης των επιλεγμένων φυκών δοκιμής σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής υπό τις επικρατούσες συνθήκες.

Θρεπτικό μέσο

19. Συνιστάται η χρήση δύο εναλλακτικών θρεπτικών μέσων: του μέσου του ΟΟΣΑ και του μέσου ΑΑΡ. Η σύσταση αυτών των μέσων παρατίθεται στο προσάρτημα 3. Αξίζει να σημειωθεί ότι η αρχική τιμή του pH και η ρυθμιστική χωρητικότητα (ικανότητα ρύθμισης της αύξησης του pH) των δύο θρεπτικών μέσων είναι διαφορετικές. Συνεπώς, τα αποτελέσματα των δοκιμών ενδέχεται να διαφέρουν ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο θρεπτικό μέσο, ιδίως κατά τον έλεγχο ιοντιζόμενων ουσιών.

▼M6

20. Η τροποποίηση των θρεπτικών μέσων ενδέχεται να είναι αναγκαία για ορισμένους σκοπούς, π.χ. για τον έλεγχο μετάλλων και παραγόντων χηλικής συμπλοκοποίησης ή για τη διεξαγωγή δοκιμών σε διαφορετικές τιμές pH. Η χρήση τροποποιημένου θρεπτικού μέσου πρέπει να περιγράφεται λεπτομερώς και να αιτιολογείται (3)(4).

Αρχική συγκέντρωση βιομάζας

21. Η αρχική βιομάζα πρέπει να είναι η ίδια σε όλες τις καλλιέργειες δοκιμής και αρκετά μικρή, ώστε να επιτρέπει την εκθετική ανάπτυξη σε όλη τη διάρκεια της περιόδου επώασης, χωρίς τον κίνδυνο να εξαντληθούν τα θρεπτικά στοιχεία. Η αρχική βιομάζα δεν πρέπει να υπερβαίνει το 0,5 mg/l σε ξηρό βάρος. Συνιστώνται οι ακόλουθες αρχικές συγκεντρώσεις κυττάρων:

Pseudokirchneriella subcapitata:	$5 \times 10^3 – 10^4$ κύτταρα/ml
Desmodesmus subspicatus	$2\text{-}5 \times 10^3$ κύτταρα/ml
Navicula pelliculosa	10^4 κύτταρα/ml
Anabaena flos-aquae	10^4 κύτταρα/ml
Synechococcus leopoliensis	$5 \times 10^4 – 10^5$ κύτταρα/ml

Συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας

22. Το εύρος συγκεντρώσεων στο οποίο είναι πιθανόν να σημειωθούν επιδράσεις μπορεί να προσδιοριστεί με βάση τα αποτελέσματα των δοκιμών προσδιορισμού του εύρους τιμών. Για την τελική και οριστική δοκιμή, θα πρέπει να επιλέγονται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις, διατεταγμένες σε γεωμετρική πρόοδο, με λόγο προόδου που να μην υπερβαίνει το 3,2. Στην περίπτωση των υπό δοκιμή χημικών ουσιών με επίπεδη καμπύλη απόκρισης ως προς τη συγκέντρωση, ενδέχεται να δικαιολογείται υψηλότερος λόγος προόδου. Η σειρά των συγκεντρώσεων θα πρέπει κατά προτίμηση να καλύπτει το εύρος που προκαλεί αναστολή του ρυθμού ανάπτυξης των φυκών κατά 5-75 %.

Επαναλήψεις και μάρτυρες

23. Ο σχεδιασμός της δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τρεις επαναλήψεις σε κάθε συγκέντρωση δοκιμής. Εάν δεν απαιτείται προσδιορισμός της NOEC, ο σχεδιασμός της δοκιμής μπορεί να τροποποιηθεί για να αυξηθεί ο αριθμός των συγκεντρώσεων και να μειωθεί ο αριθμός των επαναλήψεων ανά συγκέντρωση. Οι επαναλήψεις για τον μάρτυρα πρέπει να είναι τουλάχιστον τρεις και, ιδανικά, θα πρέπει να είναι διπλάσιες από τις επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση δοκιμής.

24. Είναι δυνατόν να παρασκευαστεί χωριστή σειρά διαλυμάτων δοκιμής για τον αναλυτικό προσδιορισμό των συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (βλ. σημεία 36 και 38).

25. Όταν χρησιμοποιείται διαλύτης για τη διάλυση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, ο σχεδιασμός της δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει πρόσθετους μάρτυρες που να περιέχουν τον διαλύτη στην ίδια συγκέντρωση με εκείνη που χρησιμοποιείται στις καλλιέργειες δοκιμής.

Παρασκευή της ενοφθαλμισμένης καλλιέργειας

26. Για να προσαρμοστούν τα φύκη δοκιμής στις συνθήκες της δοκιμής και για να εξασφαλιστεί ότι βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης όταν χρησιμοποιούνται για τον ενοφθαλμισμό των διαλυμάτων δοκιμής, παρασκευάζεται ενοφθαλμισμένη καλλιέργεια στο θρεπτικό μέσο δοκιμής 2-4 ημέρες πριν από την έναρξη της δοκιμής. Η βιομάζα των φυκών θα πρέπει να ρυθμίζεται κατά τρόπο ώστε η ενοφθαλμισμένη καλλιέργεια να παρουσιάζει εκθετική ανάπτυξη μέχρι την έναρξη της δοκιμής. Η ενοφθαλμισμένη καλλιέργεια επωάζεται υπό τις ίδιες συνθήκες με τις καλλιέργειες δοκιμής. Μετράται η αύξηση της βιομάζας στην ενοφθαλμισμένη καλλιέργεια για

▼M6

να εξασφαλιστεί ότι η ανάπτυξη βρίσκεται στο φυσιολογικό πεδίο τιμών για το στέλεχος δοκιμής υπό τις συνθήκες καλλιέργειας. Παράδειγμα της διαδικασίας για την καλλιέργεια των φυκών παρέχεται στο προσάρτημα 4. Για να αποτρέπεται η σύγχρονη κυτταρική διαίρεση κατά τη διάρκεια της δοκιμής, ενδέχεται να απαιτείται ένα δεύτερο στάδιο πολλαπλασιασμού στην ενοφθαλμισμένη καλλιέργεια.

Παρασκευή των διαλυμάτων δοκιμής

27. Όλα τα διαλύματα δοκιμής πρέπει να περιέχουν τις ίδιες συγκεντρώσεις θρεπτικού μέσου και την ίδια αρχική βιομάζα φυκών δοκιμής. Τα διαλύματα δοκιμής με τις επιλεγμένες συγκεντρώσεις παρασκευάζονται συνήθως με την ανάμειξη ενός διαλύματος παρακαταθήκης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας με θρεπτικό μέσο και ενοφθαλμισμένη καλλιέργεια. Κατά κανόνα, τα διαλύματα παρακαταθήκης παρασκευάζονται με διάλυση της χημικής ουσίας στο θρεπτικό μέσο δοκιμής.

28. Μπορούν να χρησιμοποιούνται διαλύτες –π.χ. ακετόνη, t-βουτυλική αλκοόλη και διμεθυλοφορμαμίδιο– ως φορείς για την προσθήκη, στο θρεπτικό μέσο δοκιμής, δυσδιάλυτων στο νερό χημικών ουσιών (2)(3). Η συγκέντρωση του διαλύτη δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 100 μl/l, ενώ θα πρέπει να προστίθεται διαλύτης στην ίδια συγκέντρωση σε όλες τις καλλιέργειες (συμπεριλαμβανομένων των καλλιεργειών ελέγχου) της σειράς δοκιμών.

Επώαση

29. Τα δοχεία δοκιμής πωματίζονται με διαπερατά από τον αέρα πώματα. Τα δοχεία ανακινούνται και τοποθετούνται στη συσκευή καλλιέργειας. Κατά τη δοκιμή, είναι απαραίτητο να διατηρούνται τα φύκη σε εναιώρημα και να διευκολύνεται η μεταφορά CO_2. Για τον σκοπό αυτό, απαιτείται συνεχής ανατάραξη ή ανάδευση. Οι καλλιέργειες θα πρέπει να διατηρούνται σε θερμοκρασία μεταξύ 21 και 24 °C, με ανοχή ± 2 °C. Για είδη εκτός εκείνων που παρατίθενται στο προσάρτημα 2, π.χ. για τροπικά είδη, μπορεί να ενδείκνυνται υψηλότερες θερμοκρασίες, υπό τον όρο ότι πληρούνται τα κριτήρια εγκυρότητας. Συνιστάται τυχαιοποιημένη τοποθέτηση των φιαλών στον επωαστήρα και καθημερινή αλλαγή των θέσεών τους.

30. Το pH του θρεπτικού μέσου ελέγχου δεν θα πρέπει να αυξάνεται κατά περισσότερο από 1,5 μονάδες στη διάρκεια της δοκιμής. Στην περίπτωση μετάλλων και χημικών ουσιών που ιοντίζονται εν μέρει σε τιμές pH γύρω από το pH της δοκιμής, ενδέχεται να είναι αναγκαίο να περιοριστεί η μεταβολή του pH, προκειμένου να ληφθούν αναπαραγώγιμα και σαφή αποτελέσματα. Μεταβολή του pH < 0,5 μονάδες είναι τεχνικά εφικτή και μπορεί να επιτευχθεί με την εξασφάλιση επαρκούς ταχύτητας μεταφοράς μάζας CO_2 από τον αέρα του περιβάλλοντος στο διάλυμα δοκιμής, π.χ. με αύξηση της ταχύτητας ανατάραξης. Άλλη δυνατότητα είναι η μείωση του απαιτούμενου CO_2 με μείωση της αρχικής βιομάζας ή της διάρκειας της δοκιμής.

31. Η επιφάνεια στην οποία επωάζονται οι καλλιέργειες θα πρέπει να φωτίζεται με συνεχές, ομοιόμορφο φως φθορισμού, π.χ. τύπου «ψυχρό λευκό φως» ή «φως ημέρας». Τα στελέχη των φυκών και των κυανοβακτηριδίων έχουν διαφορετικές απαιτήσεις φωτός. Θα πρέπει να επιλέγεται η φωτεινή ένταση που είναι κατάλληλη για τον χρησιμοποιούμενο οργανισμό δοκιμής. Για τα συνιστώμενα είδη πράσινων φυκών, η φωτεινή ένταση στο επίπεδο των διαλυμάτων δοκιμής πρέπει να επιλέγεται από το εύρος τιμών 60-120 $\mu E \cdot m^{-2} s^{-1}$, μετρούμενη στο αποτελεσματικό από πλευράς φωτοσύνθεσης μήκος κύματος 400-700 nm με κατάλληλο δέκτη. Ορισμένα είδη, ιδίως το *Anabaena flos-aquae*, αναπτύσσονται ικανοποιητικά σε χαμηλότερη φωτεινή ένταση και μπορεί να υποστούν βλάβες σε υψηλή φωτεινή ένταση. Για τα είδη αυτά, θα πρέπει να επιλέγεται μέση φωτεινή ένταση από το εύρος τιμών 40-60 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. (Στην περίπτωση φωτομέτρων που είναι βαθμονομημένα σε lux, το πεδίο τιμών 4 440-8 880 lux, προκειμένου για ψυχρό λευκό φως, αντιστοιχεί περίπου στη συνιστώμενη φωτεινή ένταση των 60-120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$). Η φωτεινή ένταση πρέπει να διατηρείται εντός ± 15 % από τη μέση φωτεινή ένταση στην περιοχή επώασης.

▼M6

Διάρκεια δοκιμής

32. Κατά κανόνα, η δοκιμή διαρκεί 72 ώρες. Ωστόσο, είναι δυνατόν να επιλέγονται μικρότερα ή μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, υπό τον όρο ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια εγκυρότητας που αναφέρονται στο σημείο 11.

Μετρήσεις και αναλυτικοί προσδιορισμοί

33. Η βιομάζα των φυκών σε κάθε φιάλη προσδιορίζεται τουλάχιστον κάθε ημέρα κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Εάν οι μετρήσεις εκτελούνται σε μικρές ποσότητες που αφαιρούνται από το διάλυμα δοκιμής με σιφώνιο, οι τελευταίες δεν θα πρέπει να αναπληρώνονται.

34. Η βιομάζα μετράται με χειρωνακτική καταμέτρηση κυττάρων σε μικροσκόπιο ή με ηλεκτρονικό μετρητή σωματιδίων (σε αριθμό κυττάρων και/ή βιοόγκο). Μπορούν να χρησιμοποιούνται εναλλακτικές τεχνικές, π.χ. κυτταρομετρία ροής, φθορισμός χλωροφύλλης *in vitro* ή *in vivo* (5)(6) ή οπτική πυκνότητα, εάν είναι δυνατόν να αποδειχθεί ικανοποιητική συσχέτιση με τη βιομάζα στο εύρος των τιμών βιομάζας που σημειώνεται στη δοκιμή.

35. Το pH των διαλυμάτων μετράται στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής.

36. Εάν υπάρχει αναλυτική διαδικασία που επιτρέπει τον προσδιορισμό της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο χρησιμοποιούμενο εύρος συγκεντρώσεων, τα διαλύματα δοκιμής θα πρέπει να υποβάλλονται σε ανάλυση ώστε να επαληθεύονται οι αρχικές συγκεντρώσεις και η διατήρηση των συγκεντρώσεων έκθεσης κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

37. Στις περιπτώσεις όπου οι συγκεντρώσεις έκθεσης είναι πιθανό να διαφέρουν από τις ονομαστικές συγκεντρώσεις κατά λιγότερο από 20 % στη διάρκεια της δοκιμής, ενδέχεται να αρκεί η ανάλυση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής, στο χαμηλό και στο υψηλό επίπεδο συγκέντρωσης δοκιμής, καθώς και σε ένα επίπεδο κοντά στην αναμενόμενη EC_{50}. Συνιστάται η ανάλυση όλων των συγκεντρώσεων δοκιμής στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής, όταν οι συγκεντρώσεις είναι απίθανο να παραμείνουν εντός των ορίων του 80-120 % της ονομαστικής συγκέντρωσης. Προκειμένου για πτητικές, ασταθείς ή ισχυρώς προσροφώμενες υπό δοκιμή χημικές ουσίες, συνιστάται πρόσθετη δειγματοληψία για ανάλυση ανά 24 ώρες κατά τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης, ώστε να προσδιορίζεται ακριβέστερα η απώλεια υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Για τις συγκεκριμένες χημικές ουσίες ενδέχεται να χρειάζονται επιπλέον επαναλήψεις. Σε κάθε περίπτωση, οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας αρκεί να προσδιορίζονται μόνο σε ένα δοχείο επανάληψης για κάθε συγκέντρωση δοκιμής (ή στο συνενωμένο περιεχόμενο των δοχείων ανά επανάληψη).

38. Τα θρεπτικά μέσα δοκιμής που παρασκευάζονται ειδικά για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων έκθεσης κατά τη δοκιμή θα πρέπει να υποβάλλονται στην ίδια ακριβώς αγωγή όπως εκείνα που χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή, δηλαδή να εμβολιάζονται με φύκη και να επωάζονται υπό πανομοιότυπες συνθήκες. Εάν απαιτείται ανάλυση της συγκέντρωσης της διαλυμένης υπό δοκιμή χημικής ουσίας, ενδέχεται να είναι αναγκαίος ο διαχωρισμός των φυκών από το θρεπτικό μέσο. Κατά προτίμηση, ο διαχωρισμός θα πρέπει να εκτελείται με φυγοκέντρηση σε χαμηλή ισχύ g, επαρκή για την καθίζηση των φυκών.

39. Εάν υπάρχουν στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας διατηρήθηκε ικανοποιητικά εντός των ορίων της ονομαστικής ή μετρηθείσας αρχικής συγκέντρωσης ± 20 % σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής, η ανάλυση των αποτελεσμάτων μπορεί να βασίζεται στις ονομαστικές ή τις μετρηθείσες αρχικές τιμές. Εάν η απόκλιση από την ονομαστική ή τη μετρηθείσα αρχική συγκέντρωση δεν βρίσκεται εντός του ± 20 %, η ανάλυση των αποτελεσμάτων θα πρέπει να βασίζεται στον γεωμετρικό μέσο όρο των συγκεντρώσεων κατά την έκθεση ή σε μοντέλα που περιγράφουν τη μείωση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (3)(7).

▼M6

40. Η δοκιμή αναστολής της ανάπτυξης φυκών είναι δυναμικότερο σύστημα δοκιμών από την πλειονότητα των υπόλοιπων δοκιμών βραχυπρόθεσμης τοξικότητας σε υδρόβιους οργανισμούς. Κατά συνέπεια, ενδέχεται να είναι δύσκολο να προσδιοριστούν οι πραγματικές συγκεντρώσεις έκθεσης, ιδίως όταν ελέγχονται προσροφώμενες χημικές ουσίες σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Στις περιπτώσεις αυτές, η εξαφάνιση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας από το διάλυμα λόγω προσρόφησης στην αυξανόμενη βιομάζα φυκών δεν συνεπάγεται την απώλειά της από το σύστημα της δοκιμής. Κατά την ανάλυση του αποτελέσματος της δοκιμής, θα πρέπει να εξακριβώνεται κατά πόσον η μείωση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην πορεία της δοκιμής συνοδεύεται από μείωση της αναστολής της ανάπτυξης. Εάν συμβαίνει αυτό, μπορεί να εξεταστεί το ενδεχόμενο να εφαρμοστεί κατάλληλο μοντέλο που να περιγράφει τη μείωση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημική ουσίας (7). Εάν δεν συμβαίνει αυτό, μπορεί να ενδείκνυται να βασίζεται η ανάλυση των αποτελεσμάτων στις αρχικές (ονομαστικές ή μετρηθείσες) συγκεντρώσεις.

Άλλες παρατηρήσεις

41. Θα πρέπει να εκτελείται μικροσκοπική παρατήρηση ώστε να επαληθεύεται η φυσιολογική και υγιής εμφάνιση της ενοφθαλμισμένης καλλιέργειας και να εντοπίζονται τυχόν ανωμαλίες στην εμφάνιση των φυκών (οι οποίες έχουν ενδεχομένως προκληθεί από την έκθεση στην υπό δοκιμή χημική ουσία) στο τέλος της δοκιμής.

Οριακή δοκιμή

42. Σε ορισμένες περιπτώσεις, π.χ. όταν από προκαταρτική δοκιμή έχει προκύψει ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν έχει τοξικές επιδράσεις σε συγκεντρώσεις έως 100 mg/l ή έως το όριο διαλυτότητάς της στο θρεπτικό μέσο δοκιμής (αναλόγως του ποια είναι μικρότερη), είναι δυνατόν να διεξάγεται οριακή δοκιμή, η οποία συνίσταται σε σύγκριση των αποκρίσεων μιας ομάδας ελέγχου και μιας ομάδας αγωγής (συγκέντρωση ίση με 100 mg/l ή με το όριο διαλυτότητας). Συνιστάται ένθερμα να τεκμηριώνεται αυτό με ανάλυση της συγκέντρωσης έκθεσης. Η οριακή δοκιμή υπόκειται σε όλες τις συνθήκες δοκιμής και όλα τα κριτήρια εγκυρότητας που περιγράφονται ανωτέρω, με εξαίρεση τον αριθμό των επαναλήψεων αγωγής, που θα πρέπει να είναι τουλάχιστον έξι. Οι μεταβλητές απόκρισης της ομάδας ελέγχου και της ομάδας αγωγής μπορούν να αναλυθούν με στατιστική δοκιμή σύγκρισης των μέσων όρων, π.χ. δοκιμασία t του Student. Εάν οι διασπορές στις δύο ομάδες είναι άνισες, θα πρέπει να διεξάγεται προσαρμοσμένη δοκιμασία t για άνισες διασπορές.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Χάραξη καμπυλών ανάπτυξης

43. Η βιομάζα των δοχείων δοκιμής μπορεί να εκφράζεται σε μονάδες της παραμέτρου υποκατάστασης που έχει χρησιμοποιηθεί για τις μετρήσεις (π.χ. αριθμός κυττάρων, φθορισμός).

44. Καταχωρίζονται σε πίνακα οι εκτιμώμενες συγκεντρώσεις βιομάζας στις καλλιέργειες δοκιμής και στους μάρτυρες, καθώς και οι συγκεντρώσεις του υλικού δοκιμής και οι χρόνοι μέτρησης, τουλάχιστον σε ακέραιες ώρες, για τη χάραξη των καμπυλών ανάπτυξης. Στο πρώτο αυτό στάδιο μπορεί να φανούν χρήσιμες τόσο η λογαριθμική όσο και η γραμμική κλίμακα, αλλά η λογαριθμική κλίμακα είναι υποχρεωτική και, γενικά, παρουσιάζει ακριβέστερα τις μεταβολές του τύπου ανάπτυξης κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Σημειωτέον ότι το λογαριθμικό διάγραμμα της εκθετικής ανάπτυξης έχει τη μορφή ευθείας γραμμής, της οποίας η κλίση παρέχει τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης.

45. Με τη βοήθεια των διαγραμμάτων, εξετάζεται αν η ανάπτυξη στις καλλιέργειες ελέγχου είναι εκθετική με τον αναμενόμενο ρυθμό σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Εξετάζονται με κριτικό πνεύμα όλα τα σημεία δεδομένων, καθώς και η εμφάνιση των διαγραμμάτων και ελέγχεται η πιθανότητα σφάλματος στα ανεπεξέργαστα δεδομένα και στις διαδικασίες. Ειδικότερα, ελέγχονται τα σημεία δεδομένων που φαίνεται να αποκλίνουν λόγω συστηματικού σφάλματος. Εάν είναι προφανές ότι μπορούν να εντοπιστούν λάθη στη διαδικασία και/ή να θεωρηθούν εξαιρετικά πιθανά, τα αντίστοιχα σημεία

▼M6

δεδομένων σημειώνονται ως ακραίες τιμές και δεν λαμβάνονται υπόψη στη μετέπειτα στατιστική ανάλυση. (Η μηδενική συγκέντρωση φυκών σε ένα από τα δύο ή τρία δοχεία επανάληψης μπορεί να υποδηλώνει εσφαλμένο εμβολιασμό ή ελλιπή καθαρισμό του δοχείου). Στην έκθεση δοκιμής πρέπει να αναφέρονται επακριβώς οι λόγοι απόρριψης ενός σημείου δεδομένων ως ακραίας τιμής. Αποδεκτοί λόγοι είναι μόνο τα (σπάνια) λάθη στη διαδικασία και όχι απλώς ο χαμηλός βαθμός ακρίβειας. Οι στατιστικές διαδικασίες για τον εντοπισμό των ακραίων τιμών έχουν περιορισμένη χρησιμότητα στην επίλυση προβλημάτων αυτού του είδους και δεν μπορούν να υποκαταστήσουν την κρίση του ειδικού. Οι ακραίες τιμές (που σημειώνονται ως τέτοιες) θα πρέπει κατά προτίμηση να συμπεριλαμβάνονται στα σημεία δεδομένων που απεικονίζονται μεταγενέστερα σε γραφικές παραστάσεις ή πίνακες.

Μεταβλητές απόκρισης

46. Σκοπός της δοκιμής είναι να προσδιοριστούν οι επιδράσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην ανάπτυξη φυκών. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών περιγράφονται δύο μεταβλητές απόκρισης, ώστε να ανταποκρίνονται στις διαφορετικές προτιμήσεις και κανονιστικές ανάγκες των κρατών μελών. Για να είναι τα αποτελέσματα των δοκιμών αποδεκτά σε όλα τα κράτη μέλη, οι επιδράσεις θα πρέπει να αξιολογούνται με χρήση και των δύο μεταβλητών απόκρισης α) και β) που περιγράφονται κατωτέρω.

α) Μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης: Αυτή η μεταβλητή απόκρισης υπολογίζεται με βάση τη λογαριθμική αύξηση της βιομάζας στη διάρκεια της δοκιμής, εκφραζόμενη ανά ημέρα.

β) Απόδοση: Αυτή η μεταβλητή απόκρισης αντιστοιχεί στη βιομάζα στο τέλος της δοκιμής μείον την αρχική βιομάζα.

47. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι τιμές τοξικότητας που υπολογίζονται με τη χρήση των ανωτέρω δύο μεταβλητών απόκρισης δεν είναι συγκρίσιμες και η διαφορά αυτή πρέπει να αναγνωρίζεται, όταν χρησιμοποιούνται τα αποτελέσματα της δοκιμής. Εφόσον τηρούνται οι συνθήκες δοκιμής που καθορίζονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, οι τιμές EC_x που προκύπτουν από τον μέσο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (E_rC_x) είναι γενικά υψηλότερες από τα βασιζόμενα στην απόδοση αποτελέσματα (E_yC_x), λόγω της μαθηματικής βάσης της αντίστοιχης προσέγγισης. Αυτό δεν θα πρέπει να ερμηνεύεται ως διαφορά ευαισθησίας μεταξύ των δύο μεταβλητών απόκρισης· πρόκειται απλώς για μαθηματική διαφορά των τιμών. Η έννοια του μέσου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης βασίζεται στον γενικό εκθετικό τύπο ανάπτυξης των φυκών σε απεριόριστες καλλιέργειες, όπου η τοξικότητα εκτιμάται με βάση τις επιδράσεις στον ρυθμό ανάπτυξης, χωρίς να εξαρτάται από την απόλυτη τιμή του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του μάρτυρα ή από την κλίση της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης ή από τη διάρκεια της δοκιμής. Αντίθετα, τα αποτελέσματα που βασίζονται στην απόδοση ως μεταβλητή απόκρισης εξαρτώνται από όλες τις άλλες προαναφερόμενες μεταβλητές. Η E_yC_x εξαρτάται από τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του είδους φυκών που χρησιμοποιείται σε κάθε δοκιμή, καθώς και από τον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης, ο οποίος μπορεί να διαφέρει μεταξύ των ειδών ή ακόμη και μεταξύ διαφορετικών στελεχών φυκών. Η συγκεκριμένη μεταβλητή απόκρισης δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τη σύγκριση της ευαισθησίας σε τοξικούς παράγοντες μεταξύ ειδών φυκών ή ακόμα και μεταξύ διαφορετικών στελεχών. Μολονότι είναι προτιμότερο, από επιστημονική άποψη, να χρησιμοποιείται ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για την εκτίμηση της τοξικότητας, η παρούσα μέθοδος δοκιμών περιλαμβάνει και εκτιμήσεις της τοξικότητας με βάση την απόδοση, προκειμένου να καλυφθούν οι κανονιστικές απαιτήσεις που ισχύουν σήμερα σε ορισμένες χώρες.

Μέσος ρυθμός ανάπτυξης

48. Ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για συγκεκριμένη χρονική περίοδο υπολογίζεται ως η λογαριθμική αύξηση της βιομάζας από την ακόλουθη εξίσωση, η οποία εφαρμόζεται σε κάθε ένα από τα δοχεία ελέγχου και τα δοχεία αγωγής:

▼M6

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} (\text{ημέρα}^{-1}) \qquad [1],$$

όπου:

μ_{i-j} = ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης κατά το χρονικό διάστημα *i* έως j,

X_i = η βιομάζα σε χρόνο *i*, και

X_j = η βιομάζα σε χρόνο *j*.

Για κάθε ομάδα αγωγής και ομάδα ελέγχου υπολογίζεται η μέση τιμή του ρυθμού ανάπτυξης, συνοδευόμενη από εκτίμηση της διασποράς.

49. Υπολογίζεται ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για τη συνολική διάρκεια της δοκιμής (κατά κανόνα, ημέρες 0-3), με χρήση της ονομαστικής ενοφθαλμισμένης βιομάζας ως αρχικής τιμής και όχι της μετρηθείσας αρχικής τιμής, επειδή με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται συνήθως μεγαλύτερη ακρίβεια. Εάν ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της βιομάζας επιτρέπει τον αρκούντως ακριβή προσδιορισμό της μικρής βιομάζας ενοφθαλμίσματος (π.χ. κυτταρόμετρο ροής), μπορεί να χρησιμοποιείται η μετρηθείσα αρχική συγκέντρωση βιομάζας. Υπολογίζεται επίσης ο τμηματικός ρυθμός ανάπτυξης, ως ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για κάθε ημέρα της περιόδου δοκιμής (ημέρες 0-1, 1-2 και 2-3) και εξετάζεται αν ο ρυθμός ανάπτυξης των μαρτύρων παραμένει σταθερός (βλ. κριτήρια εγκυρότητας στο σημείο 11). Εάν την πρώτη ημέρα διαπιστωθεί ειδικός ρυθμός ανάπτυξης σημαντικά χαμηλότερος από τον συνολικό μέσο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης, αυτό μπορεί να αποτελεί ένδειξη λανθάνουσας φάσης. Ενώ στις καλλιέργειες ελέγχου η λανθάνουσα φάση μπορεί να ελαχιστοποιείται και, πρακτικά, να εξαλείφεται με κατάλληλο πολλαπλασιασμό της προκαλλιέργειας, η λανθάνουσα φάση στις εκτιθέμενες καλλιέργειες μπορεί να υποδηλώνει ανάκαμψη μετά το πρώτο τοξικό στρες ή ελαττωμένη έκθεση λόγω απώλειας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (όπου συμπεριλαμβάνεται η ρόφηση στη βιομάζα φυκών) μετά την αρχική έκθεση. Ως εκ τούτου, για την αξιολόγηση των επιδράσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας κατά τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης, μπορεί να υπολογιστεί ο τμηματικός ρυθμός ανάπτυξης. Οι ουσιώδεις διαφορές μεταξύ του τμηματικού και του μέσου ρυθμού ανάπτυξης υποδηλώνουν απόκλιση από τη σταθερή εκθετική ανάπτυξη και δικαιολογούν την ενδελεχή εξέταση των καμπυλών ανάπτυξης.

50. Υπολογίζεται η εκατοστιαία αναστολή του ρυθμού ανάπτυξης για κάθε επανάληψη αγωγής από την εξίσωση [2]:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100 \qquad [2],$$

όπου:

$\%I_r$ = η εκατοστιαία αναστολή του μέσου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης,

μ_C = η μέση τιμή του μέσου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ) στην ομάδα ελέγχου,

μ_T = ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης στην επανάληψη αγωγής.

51. Όταν χρησιμοποιούνται διαλύτες για την παρασκευή των διαλυμάτων δοκιμής, πρέπει να χρησιμοποιούνται στους υπολογισμούς της εκατοστιαίας αναστολής οι μάρτυρες με διαλύτη και όχι οι μάρτυρες χωρίς διαλύτη.

Απόδοση

52. Η απόδοση υπολογίζεται ως η βιομάζα στο τέλος της δοκιμής μείον την αρχική βιομάζα για κάθε μεμονωμένο δοχείο ελέγχου και δοχείο αγωγής. Για κάθε συγκέντρωση δοκιμής και για κάθε μάρτυρα υπολογίζεται η μέση τιμή της απόδοσης, συνοδευόμενη από εκτίμηση της διασποράς. Η εκατοστιαία αναστολή της απόδοσης ($\%\ I_y$) μπορεί να υπολογιστεί για κάθε επανάληψη αγωγής από τον ακόλουθο τύπο:

▼M6

$$\%I_y = \frac{(Y_c - Y_T)}{Y_c} \times 100 \qquad [3]$$

όπου:

% I_y = η εκατοστιαία αναστολή της απόδοσης,

Y_T = η μέση τιμή της απόδοσης στην ομάδα ελέγχου,

Y_T = η τιμή της απόδοσης στην επανάληψη αγωγής.

Χάραξη της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης

53. Σχεδιάζεται διάγραμμα της εκατοστιαίας αναστολής σε συνάρτηση με τον λογάριθμο της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Το διάγραμμα αυτό εξετάζεται ενδελεχώς και απορρίπτονται τα σημεία δεδομένων που ενδεχομένως σημειώθηκαν ως ακραίες τιμές κατά το πρώτο στάδιο. Συνδέονται τα σημεία δεδομένων με ομαλή γραμμή, με το μάτι ή με παρεμβολή με τη βοήθεια υπολογιστή, ώστε να ληφθεί μια πρώτη εικόνα της σχέσης μεταξύ συγκέντρωσης και απόκρισης. Στη συνέχεια, εφαρμόζεται λεπτομερέστερη μέθοδος, κατά προτίμηση στατιστική μέθοδος με τη χρήση υπολογιστή. Ανάλογα με τη σκοπούμενη χρήση, την ποιότητα (ακρίβεια) και τον όγκο των δεδομένων, καθώς και με τη διαθεσιμότητα εργαλείων ανάλυσης δεδομένων, είναι δυνατόν να αποφασιστεί (μερικές φορές, μάλιστα, δικαιολογείται απόλυτα) να τερματιστεί η ανάλυση των δεδομένων στο στάδιο αυτό και απλώς να ληφθούν οι βασικές τιμές EC_{50} και EC_{10} (και/ή EC_{20}) από την προσαρμοσμένη με το μάτι καμπύλη (βλ. επίσης το σημείο κατωτέρω σχετικά με τις διεγερτικές επιδράσεις). Βάσιμοι λόγοι για τη μη εφαρμογή στατιστικής μεθόδου μπορούν να είναι, μεταξύ άλλων, οι εξής:

— Τα δεδομένα δεν είναι κατάλληλα ώστε, εάν εφαρμόζονταν μέθοδοι με τη χρήση υπολογιστή, να παρήγαγαν πιο αξιόπιστα αποτελέσματα από εκείνα που δίνει η κρίση του ειδικού. Στις περιπτώσεις αυτές, μάλιστα, ορισμένα προγράμματα υπολογιστή ενδέχεται να μην προσφέρουν καν αξιόπιστη λύση (οι επαναληπτικές διαδικασίες μπορεί να μην συγκλίνουν κ.λπ.).

— Οι αποκρίσεις ανάπτυξης που οφείλονται σε διέγερση δεν είναι δυνατόν να αντιμετωπιστούν επαρκώς με τη χρήση των διαθέσιμων προγραμμάτων υπολογιστή (βλ. κατωτέρω).

Στατιστικές διαδικασίες

54. Το ζητούμενο είναι να ληφθεί ποσοτική σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης με ανάλυση παλινδρόμησης. Είναι δυνατόν να εφαρμοστεί σταθμισμένη γραμμική παλινδρόμηση, μετά από γραμμικό μετασχηματισμό των δεδομένων απόκρισης –π.χ. σε μονάδες probit ή logit ή Weibull (8)–, αλλά προτιμώνται οι τεχνικές μη γραμμικής παλινδρόμησης, με τις οποίες αντιμετωπίζονται καλύτερα οι αναπόφευκτες ανωμαλίες των δεδομένων και οι αποκλίσεις τους από τις ομαλές κατανομές. Κοντά στις περιοχές είτε της μηδενικής είτε της πλήρους αναστολής, οι ανωμαλίες αυτές ενδέχεται να μεγεθυνθούν από τον μετασχηματισμό και να αλλοιώσουν την ανάλυση (8). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι πρότυπες μέθοδοι ανάλυσης με τη χρήση αποτελεσμάτων μετασχηματισμού probit, logit ή Weibull προορίζονται για δεδομένα που δέχονται μόνο δύο τιμές (π.χ. θνησιμότητα ή επιβίωση) και πρέπει να τροποποιούνται ώστε να μπορούν να εφαρμόζονται σε δεδομένα ανάπτυξης ή βιομάζας. Ειδικές διαδικασίες για τον προσδιορισμό των τιμών EC_x από συνεχή δεδομένα παρατίθενται στις δημοσιεύσεις (9), (10) και (11). Η χρήση της ανάλυσης μη γραμμικής παλινδρόμησης περιγράφεται λεπτομερέστερα στο προσάρτημα 5.

55. Για κάθε μεταβλητή απόκρισης που πρόκειται να αναλυθεί, χρησιμοποιείται η σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης για να υπολογιστούν σημειακές εκτιμήσεις των τιμών EC_x. Όπου είναι δυνατόν, θα πρέπει να προσδιορίζονται, για κάθε εκτίμηση, τα όρια εμπιστοσύνης 95 %. Η καλή προσαρμογή των δεδομένων απόκρισης στο μοντέλο παλινδρόμησης θα πρέπει να αξιολογείται με γραφική ή στατιστική μέθοδο. Η ανάλυση παλινδρόμησης θα πρέπει να εκτελείται με τη χρήση των αποκρίσεων της κάθε επανάληψης και όχι

▼M6

των μέσων όρων των ομάδων αγωγής. Ωστόσο, εάν η μη γραμμική προσαρμογή καμπύλης είναι δύσκολη ή ανέφικτη, λόγω υπερβολικής σκεδαστικότητας των δεδομένων, το πρόβλημα μπορεί να παρακαμφθεί με την εφαρμογή της παλινδρόμησης στους μέσους όρους των ομάδων ως πρακτικό μέσο περιορισμού της επιρροής των ύποπτων ακραίων τιμών. Η χρήση αυτής της εναλλακτικής επιλογής θα πρέπει να αναφέρεται στην έκθεση δοκιμής ως παρέκκλιση από την κανονική διαδικασία, οφειλόμενη στο γεγονός ότι η προσαρμογή της καμπύλης με τις τιμές των επιμέρους επαναλήψεων δεν απέδωσε ικανοποιητικό αποτέλεσμα.

56. Εάν τα διαθέσιμα μοντέλα/μέθοδοι παλινδρόμησης είναι ακατάλληλα για τα δεδομένα, μπορούν επίσης να ληφθούν εκτιμήσεις και όρια εμπιστοσύνης για την EC_{50} με γραμμική παρεμβολή με τη μέθοδο bootstrap (13).

57. Για την εκτίμηση της LOEC και, κατ' επέκταση της NOEC, όσον αφορά τις επιδράσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον ρυθμό ανάπτυξης, είναι αναγκαία η σύγκριση των μέσων όρων των ομάδων αγωγής με τεχνικές ανάλυσης της διασποράς (ANOVA). Στη συνέχεια, ο μέσος όρος για κάθε συγκέντρωση πρέπει να συγκρίνεται με τον μέσο όρο του μάρτυρα με κατάλληλη μέθοδο πολλαπλής σύγκρισης ή δοκιμής τάσης. Χρήσιμη για τον σκοπό αυτό μπορεί να είναι η δοκιμασία Dunnett ή η δοκιμασία Williams (12)(14)(15)(16)(17). Είναι απαραίτητο να κρίνεται αν ευσταθεί η παραδοχή της ANOVA για ομοιογενή διασπορά. Η εκτίμηση αυτή μπορεί να διενεργηθεί γραφικά ή με επίσημη δοκιμή (17). Κατάλληλες δοκιμασίες είναι η δοκιμασία Levene και η δοκιμασία Bartlett. Εάν δεν ισχύει η παραδοχή της ομοιογένειας της διασποράς, αυτό είναι μερικές φορές δυνατόν να διορθωθεί με λογαριθμικό μετασχηματισμό των δεδομένων. Στις περιπτώσεις ακραίας ετερογένειας της διασποράς η οποία δεν είναι δυνατόν να διορθωθεί με μετασχηματισμό, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο ανάλυσης με μεθόδους όπως ο έλεγχος φθίνουσας τάσης κατά Jonckheere. Πρόσθετη καθοδήγηση σχετικά με τον προσδιορισμό της NOEC παρέχεται στη δημοσίευση (11).

58. Οι πρόσφατες επιστημονικές εξελίξεις υπαγόρευσαν τη σύσταση να εγκαταλειφθεί η έννοια της NOEC και να αντικατασταθεί από σημειακές εκτιμήσεις των τιμών EC_x βάσει παλινδρόμησης. Δεν έχει καθοριστεί κατάλληλη τιμή του x για την παρούσα δοκιμή σε φύκη. Φαίνεται να ενδείκνυται ένα εύρος 10 έως 20 % (ανάλογα με την επιλεγμένη μεταβλητή απόκρισης) και, κατά προτίμηση, θα πρέπει να αναφέρονται τόσο η EC_{10} όσο και η EC_{20}.

Διέγερση της ανάπτυξης

59. Μερικές φορές παρατηρείται διέγερση της ανάπτυξης (αρνητική αναστολή) σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε όρμηση («τοξική διέγερση») είτε στην προσθήκη διεγερτικών αυξητικών παραγόντων, μέσω του υλικού δοκιμής, στο ελάχιστο θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται. Σημειωτέον ότι η προσθήκη ανόργανων θρεπτικών στοιχείων δεν προβλέπεται να έχει άμεση επίδραση, επειδή το θρεπτικό μέσο δοκιμής διατηρεί περίσσεια θρεπτικών στοιχείων σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Εάν η διέγερση σε χαμηλή δόση δεν είναι ακραία, συνήθως μπορεί να αγνοηθεί στους υπολογισμούς της EC_{50}. Ωστόσο, εάν είναι ακραία ή εάν πρόκειται να υπολογιστεί τιμή EC_x για χαμηλή τιμή του x, ενδέχεται να χρειαστούν ειδικές διαδικασίες. Η απαλοιφή των αποκρίσεων διέγερσης από την ανάλυση δεδομένων πρέπει, κατά το δυνατόν, να αποφεύγεται και, εάν το διαθέσιμο λογισμικό προσαρμογής καμπυλών δεν μπορεί να δεχθεί ελάσσονα διέγερση, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί η γραμμική παρεμβολή με τη μέθοδο bootstrap. Σε περίπτωση ακραίας διέγερσης, μπορεί να εξεταστεί το ενδεχόμενο χρήσης μοντέλου όρμησης (18).

Μη τοξική αναστολή της ανάπτυξης

60. Τα υλικά δοκιμής που απορροφούν το φως μπορούν να προκαλέσουν μείωση του ρυθμού ανάπτυξης, επειδή η σκίαση περιορίζει τη διαθέσιμη ποσότητα φωτός. Αυτά τα είδη επιδράσεων, που οφείλονται σε φυσικά αίτια, θα πρέπει να διαχωρίζονται από τις τοξικές επιδράσεις με τροποποίηση των συνθηκών δοκιμής και να αναφέρονται χωριστά. Σχετική καθοδήγηση παρέχεται στις δημοσιεύσεις (2) και (3).

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

61. Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

▼**M6**

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

— φυσική υπόσταση και σημαντικές φυσικοχημικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένου του ορίου υδατοδιαλυτότητας·

— δεδομένα χημικής ταυτοποίησης (π.χ. αριθ. CAS), συμπεριλαμβανομένης της καθαρότητας (προσμείξεις).

Υπό δοκιμή είδος:

— στέλεχος, προμηθευτής ή πηγή και χρησιμοποιηθείσες συνθήκες καλλιέργειας.

Συνθήκες δοκιμής:

— ημερομηνία έναρξης της δοκιμής και διάρκεια της δοκιμής·

— περιγραφή του σχεδιασμού της δοκιμής: δοχεία δοκιμής, όγκοι καλλιεργειών, πυκνότητα βιομάζας στην αρχή της δοκιμής·

— σύνθεση του θρεπτικού μέσου·

— συγκεντρώσεις δοκιμής και επαναλήψεις (π.χ. αριθμός επαναλήψεων, αριθμός συγκεντρώσεων δοκιμής και χρησιμοποιηθείσα γεωμετρική πρόοδος)·

— περιγραφή της παρασκευής των διαλυμάτων δοκιμής, συμπεριλαμβανομένης της χρήσης διαλυτών κ.λπ.·

— συσκευή καλλιέργειας·

— φωτεινή ένταση και ποιότητα του φωτός (πηγή, ομοιογένεια)·

— θερμοκρασία·

— ελεγχθείσες συγκεντρώσεις: ονομαστικές συγκεντρώσεις δοκιμής και τυχόν αποτελέσματα των αναλύσεων για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στα δοχεία δοκιμής. Θα πρέπει επίσης να αναφέρονται η απόδοση ανάκτησης της μεθόδου και το όριο ποσοτικού προσδιορισμού στη μήτρα δοκιμής·

— όλες οι παρεκκλίσεις από την παρούσα μέθοδο δοκιμών·

— μέθοδος προσδιορισμού της βιομάζας και απόδειξη συσχέτισης της μετρούμενης παραμέτρου με το ξηρό βάρος.

Αποτελέσματα:

— τιμές pH στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής σε κάθε αγωγή·

— βιομάζα κάθε φιάλης σε κάθε σημείο μέτρησης και μέθοδος μέτρησης της βιομάζας·

— καμπύλες ανάπτυξης (διάγραμμα της βιομάζας συναρτήσει του χρόνου)·

— υπολογισθείσες μεταβλητές απόκρισης για κάθε επανάληψη αγωγής, συνοδευόμενες από τους μέσους όρους και τον συντελεστή μεταβολής για τις επαναλήψεις·

— γραφική παράσταση της σχέσης συγκέντρωσης-επίδρασης·

▼M6

— εκτιμήσεις της τοξικότητας για τις μεταβλητές απόκρισης, π.χ. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20} και τα αντίστοιχα διαστήματα εμπιστοσύνης. Τιμές LOEC και NOEC, εφόσον έχουν υπολογιστεί, και στατιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό αυτό·

— εάν έχει χρησιμοποιηθεί τεχνική ANOVA, το ανιχνεύσιμο μέγεθος της επίδρασης (π.χ. η ελάχιστη σημαντική διαφορά)·

— διέγερση της ανάπτυξης που ενδεχομένως διαπιστώθηκε σε οποιοδήποτε δοχείο αγωγής·

— τυχόν άλλες παρατηρηθείσες επιδράσεις, π.χ. μορφολογικές μεταβολές στα φύκη·

— συζήτηση των αποτελεσμάτων, συμπεριλαμβανομένης τυχόν επιρροής ως προς την έκβαση της δοκιμής λόγω παρακκλίσεων από την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) International Organisation for Standardisation (1993). ISO 8692 Water quality — Algal growth inhibition test (Πρότυπο ΕΛΟΤ EN ISO 8692: Ποιότητα νερού — Δοκιμή παρεμπόδισης ανάπτυξης αλγών γλυκού νερού με μονοκυτταρικές πράσινες άλγες).

(2) International Organisation for Standardisation (1998). ISO/DIS 14442. Water quality — Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster water.

(3) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Παρίσι.

(4) International Organisation for Standardisation (1998). ISO 5667-16 Water quality — Sampling — Part 16: Guidance on Biotesting of Samples (ΕΛΟΤ ISO 5667-16 Ποιότητα νερού — Δειγματοληψία — Μέρος 16: Καθοδήγηση για βιοδοκιμασίες δειγμάτων).

(5) Mayer, P., Cuhel, R. and Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Research* 31: 2525-2531.

(6) Slovacey, R.E. and Hanna, P.J. (1997). In vivo fluorescence determinations of phytoplancton chlorophyll, Limnology & Oceanography 22: 919-925

(7) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. and Batley, G.E. (2003). Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 2073-2079.

(8) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol*. 19: 713-718.

(9) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem*. 11: 157-167.

(10) Bruce, R.D.,and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem*. 11: 1485-1494.

(11) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organisation for Economic Co-operation and Development, Παρίσι.

▼**M6**

(12) Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc*. 50: 1096-1121

(13) Norberg-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

(14) Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491.

(15) Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103-117.

(16) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 519-531.

(17) Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, Νέα Υόρκη.

(18) Brain, P. and Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

▼M6

Προσάρτημα 1

Ορισμοι

Για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου δοκιμών χρησιμοποιούνται οι ακόλουθοι ορισμοί και συντμήσεις:

Βιομάζα: το ξηρό βάρος της ζώσας ύλης την οποία περιέχει ένας πληθυσμός, εκφραζόμενο ως προς δεδομένο όγκο, π.χ. mg φυκών/λίτρο διαλύματος δοκιμής. Η βιομάζα ορίζεται συνήθως ως μάζα, αλλά στην παρούσα μέθοδο δοκιμών η λέξη αυτή χρησιμοποιείται για να δηλώσει μάζα ανά όγκο. Επίσης, στην παρούσα δοκιμή μετρώνται συνήθως υποκατάστατα της βιομάζας, όπως ο αριθμός κυττάρων, ο φθορισμός κ.λπ. Ως εκ τούτου, ο όρος «βιομάζα» αναφέρεται και σε αυτά τα μέτρα υποκατάστασης.

Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Συντελεστής μεταβολής: αδιάστατο μέτρο της μεταβλητότητας μιας παραμέτρου, το οποίο ορίζεται ως ο λόγος της τυπικής απόκλισης προς τον μέσο όρο. Μπορεί επίσης να εκφραστεί σε ποσοστό επί τοις εκατό. Η μέση τιμή του συντελεστή μεταβολής του μέσου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης σε ταυτόσημες καλλιέργειες ελέγχου θα πρέπει να υπολογίζεται ως εξής:

1. Υπολογίζεται ο επί τοις εκατό συντελεστής μεταβολής του μέσου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης από τους ημερήσιους/τμηματικούς ρυθμούς ανάπτυξης για καθεμία από τις ταυτόσημες καλλιέργειες.

2. Εξάγεται ο μέσος όρος όλων των τιμών που υπολογίστηκαν στο σημείο 1, ώστε να προκύψει η μέση τιμή του συντελεστή μεταβολής του ημερήσιου/τμηματικού ειδικού ρυθμού ανάπτυξης στις ταυτόσημες καλλιέργειες ελέγχου.

EC_x: η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, διαλυμένης στο θρεπτικό μέσο δοκιμής, η οποία προκαλεί μείωση της ανάπτυξης του οργανισμού δοκιμής κατά x % (π.χ. 50 %) εντός της δηλούμενης περιόδου έκθεσης (πρέπει να αναφέρεται επακριβώς, εάν διαφέρει από την πλήρη ή κανονική διάρκεια της δοκιμής). Για να δηλώνεται σαφώς αν η τιμή EC έχει προκύψει από τον ρυθμό ανάπτυξης ή από την απόδοση, χρησιμοποιείται το σύμβολο «E_rC» για τον ρυθμό ανάπτυξης και το σύμβολο «E_yC» για την απόδοση.

Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης: το πλήρες συνθετικό μέσο καλλιέργειας στο οποίο αναπτύσσονται τα φύκη δοκιμής, όταν εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία. Η υπό δοκιμή χημική ουσία διαλύεται, κατά κανόνα, στο θρεπτικό μέσο δοκιμής.

Ρυθμός ανάπτυξης (μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης): η λογαριθμική αύξηση της βιομάζας κατά την περίοδο έκθεσης.

Κατώτατη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης (LOEC): η χαμηλότερη ελεγχθείσα συγκέντρωση στην οποία παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της ανάπτυξης (με $p < 0,05$) υπό την επίδραση της χημικής ουσίας, σε σύγκριση με τον μάρτυρα, εντός δεδομένου χρόνου έκθεσης. Ωστόσο, όλες οι συγκεντρώσεις δοκιμής που υπερβαίνουν τη LOEC πρέπει να έχουν βλαβερή επίδραση ίση ή μεγαλύτερη από εκείνη που παρατηρείται στη LOEC. Σε περίπτωση που δεν είναι δυνατόν να πληρούνται οι δύο αυτοί όροι, πρέπει να εξηγείται πλήρως ο τρόπος επιλογής της LOEC (και, κατ' επέκταση, της NOEC).

Συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC): η συγκέντρωση δοκιμής που είναι αμέσως μικρότερη από τη LOEC.

Μεταβλητή απόκρισης: μεταβλητή για την εκτίμηση της τοξικότητας, η οποία προκύπτει, με διάφορες μεθόδους υπολογισμού, από κάθε μετρούμενη παράμετρο που περιγράφει τη βιομάζα. Για την παρούσα μέθοδο δοκιμών, οι ρυθμοί ανάπτυξης και η απόδοση είναι μεταβλητές απόκρισης που προκύπτουν από τη μέτρηση της βιομάζας απευθείας ή μέσω οποιασδήποτε από τις αναφερόμενες παραμέτρους υποκατάστασης.

▼**M6**

Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης: μεταβλητή απόκρισης η οποία ορίζεται ως το πηλίκο της διαφοράς των φυσικών λογαρίθμων μιας παρατηρούμενης παραμέτρου (στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, της βιομάζας) προς το αντίστοιχο χρονικό διάστημα.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Απόδοση: η τιμή μετρούμενης μεταβλητής στο τέλος της περιόδου έκθεσης μείον την τιμή της ίδιας μεταβλητής στην αρχή της περιόδου έκθεσης, διαφορά που εκφράζει την αύξηση της βιομάζας κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

▼**M6**

Προσάρτημα 2

ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΑΠΟΔΕΙΧΘΕΙ ΚΑΤΑΛΛΗΛΑ ΓΙΑ ΤΗ ΔΟΚΙΜΗ

Πράσινα φύκη

Pseudokirchneriella subcapitata (παλαιότερα γνωστό ως *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

Desmodesmus subspicatus (παλαιότερα γνωστό ως *Scenedesmus subspicatus*) 86.81 SAG

Διάτομα

Navicula pelliculosa, UTEX 664

Κυανοβακτηρίδια

Anabaena flos-aquae, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

Synechococcus leopoliensis, UTEX 625, CCAP 1405/1

Πηγές στελεχών

Τα συνιστώμενα στελέχη διατίθενται ως μονοκαλλιέργειες φυκών από τις ακόλουθες συλλογές (με αλφαβητική σειρά):

ATCC: American Type Culture Collection
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209
ΗΠΑ

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa
Institute of Freshwater Ecology,
Windermere Laboratory
Far Sawrey, Amblerside
Cumbria LA22 0LP
ΗΝΩΜΕΝΟ ΒΑΣΙΛΕΙΟ

SAG: Collection of Algal Cultures
Inst. Plant Physiology
University of Göttingen
Nikolausberger Weg 18
37073 Göttingen
ΓΕΡΜΑΝΙΑ

UTEX Culture Collection of Algae
Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology
School of Biological Sciences
the University of Texas at Austin
Austin, Texas 78712
ΗΠΑ.

▼M6

Εμφάνιση και χαρακτηριστικά των συνιστώμενων ειδών

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Εμφάνιση	Καμπύλα, συστραμμένα μεμονωμένα κύτταρα	Ωοειδή, ως επί το πλείστον μεμονωμένα κύτταρα	Ράβδοι ή βέργες	Αλυσίδες ωοειδών κυττάρων	Ράβδοι ή βέργες
Διαστάσεις (μήκος × πλάτος) μm	8-14 × 2-3	7-15 × 3-12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Κυτταρικός όγκος (μm^3/κύτταρο)	40-60 (1)	60-80 (1)	40-50 (1)	30-40 (1)	2,5 (2)
Κυτταρικό ξηρό βάρος (mg/κύτταρο)	$2\text{-}3 \times 10^{-8}$	$3\text{-}4 \times 10^{-8}$	$3\text{-}4 \times 10^{-8}$	$1\text{-}2 \times 10^{-8}$	$2\text{-}3 \times 10^{-9}$
Ρυθμός ανάπτυξης (3) (ημέρα^{-1})	1,5-1,7	1,2-1,5	1,4	1,1-1,4	2,0 – 2,4

(1) Μετρούμενος με ηλεκτρονικό μετρητή σωματιδίων
(2) Υπολογιζόμενος από τις διαστάσεις
(3) Ο συνηθέστερα παρατηρούμενος ρυθμός ανάπτυξης στο θρεπτικό μέσο του ΟΟΣΑ, με φωτεινή ένταση περίπου 70 μE m-2 s-1 και σε θερμοκρασία 21 °C

Ειδικές συστάσεις για την καλλιέργεια και τον χειρισμό των συνιστώμενων για τη δοκιμή ειδών

Pseudokirchneriella subcapitata και Desmodesmus subspicatus

Τα συγκεκριμένα πράσινα φύκη είναι γενικά εύκολο να διατηρηθούν σε διάφορα μέσα καλλιέργειας. Πληροφορίες σχετικά με τα κατάλληλα θρεπτικά μέσα διατίθενται από τις συλλογές καλλιεργειών. Τα κύτταρα είναι κατά κανόνα μεμονωμένα, ενώ η κυτταρική πυκνότητα μπορεί να μετρηθεί εύκολα με ηλεκτρονικό μετρητή σωματιδίων ή μικροσκόπιο.

Anabaena flos-aquae

Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν διάφορα θρεπτικά μέσα για τη διατήρηση μητρικών καλλιεργειών. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να μην αφήνεται η ασυνεχής καλλιέργεια να αναπτυχθεί πέραν της λογαριθμικής φάσης κατά την ανανέωση, επειδή η ανάκτηση είναι δύσκολη στο σημείο αυτό.

Το *Anabaena flos-aquae* σχηματίζει συσσωματώματα από επικαλυπτόμενες αλυσίδες κυττάρων. Το μέγεθος των συσσωματωμάτων αυτών μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας. Όταν χρησιμοποιείται μικροσκοπική καταμέτρηση ή ηλεκτρονικός μετρητής σωματιδίων για τον προσδιορισμό της βιομάζας, ενδέχεται να απαιτείται θραύση των εν λόγω συσσωματωμάτων.

Για τη θραύση των αλυσίδων, προκειμένου να μειωθεί η μεταβλητότητα του αριθμού κυττάρων, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί η επίδραση ηχητικών κυμάτων. Η εφαρμογή ηχητικών κυμάτων για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από το απαιτούμενο για τη θραύση των αλυσίδων σε μικρότερα τεμάχια είναι δυνατόν να καταστρέψει τα κύτταρα. Η ένταση των ηχητικών κυμάτων και η διάρκεια της επίδρασής τους πρέπει να είναι πανομοιότυπες σε κάθε αγωγή.

Καταμετρώνται στο αιμοκυτταρόμετρο αρκετά πεδία (τουλάχιστον 400 κύτταρα) για να διευκολυνθεί η αντιστάθμιση της μεταβλητότητας. Με τον τρόπο αυτό, βελτιώνεται η αξιοπιστία των μικροσκοπικών προσδιορισμών της πυκνότητας.

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ηλεκτρονικός μετρητής σωματιδίων για τον προσδιορισμό του συνολικού κυτταρικού όγκου των φυκών *Anabaena* μετά τη θραύση των αλυσίδων κυττάρων με επιμελή εφαρμογή ηχητικών κυμάτων. Η ενέργεια των ηχητικών κυμάτων πρέπει να ρυθμίζεται, ώστε να αποτρέπεται η διάρρηξη των κυττάρων.

Χρησιμοποιείται μαγνητικός αναδευτήρας (vortex) ή ανάλογη κατάλληλη μέθοδος για να εξασφαλιστούν η καλή ανάμειξη και η ομοιογένεια του εναιωρήματος φυκών με το οποίο εμβολιάζονται τα δοχεία δοκιμής.

▼**M6**

Τα δοχεία δοκιμής θα πρέπει να τοποθετούνται σε περιστροφικές ή παλινδρομικές τράπεζες ανακίνησης, ρυθμισμένες σε ταχύτητα περίπου 150 στροφών ανά λεπτό. Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η περιοδική ανακίνηση, προκειμένου να περιορίζεται η τάση του *Anabaena* να σχηματίζει συστάδες. Εάν σχηματιστούν συστάδες, πρέπει να ληφθεί μέριμνα ώστε τα δείγματα για τις μετρήσεις της βιομάζας να είναι αντιπροσωπευτικά. Για τη διάσπαση των συστάδων των φυκών, μπορεί να χρειαστεί ζωηρή ανακίνηση πριν από τη δειγματοληψία.

Synechococcus leopoliensis

Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν διάφορα θρεπτικά μέσα για τη διατήρηση μητρικών καλλιεργειών. Πληροφορίες σχετικά με τα κατάλληλα θρεπτικά μέσα παρέχονται από τις συλλογές καλλιεργειών.

Το *Synechococcus leopoliensis* αναπτύσσεται σε μεμονωμένα ραβδοειδή κύτταρα. Τα κύτταρα είναι πολύ μικρά, γεγονός που περιπλέκει τη χρήση μικροσκοπικής καταμέτρησης για τον προσδιορισμό της βιομάζας. Οι ηλεκτρονικοί μετρητές σωματιδίων που είναι κατάλληλα εξοπλισμένοι για την καταμέτρηση σωματιδίων μεγέθους περίπου 1 μm είναι χρήσιμοι. Μπορούν επίσης να εφαρμοστούν μετρήσεις φθορισμού *in vitro*.

Navicula pelliculosa

Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν διάφορα θρεπτικά μέσα για τη διατήρηση μητρικών καλλιεργειών. Πληροφορίες σχετικά με τα κατάλληλα θρεπτικά μέσα παρέχονται από τις συλλογές καλλιεργειών. Σημειωτέον ότι το θρεπτικό μέσο απαιτείται να περιέχει πυριτικό άλας.

Το *Navicula pelliculosa* ενδέχεται να σχηματίσει συσσωματώματα υπό ορισμένες συνθήκες καλλιέργειας. Λόγω της παραγωγής λιπιδίων, τα κύτταρα των φυκών τείνουν μερικές φορές να συσσωρεύονται στο επιφανειακό υμένιο. Στις περιπτώσεις αυτές, πρέπει να εφαρμόζονται ειδικά μέτρα κατά τη λήψη των επιμέρους δειγμάτων για τον προσδιορισμό της βιομάζας, ώστε τα δείγματα που λαμβάνονται να είναι αντιπροσωπευτικά. Ενδέχεται να απαιτείται ζωηρή ανατάραξη, π.χ. με τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα.

▼**M6**

Προσάρτημα 3

Θρεπτικά μέσα

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα από τα ακόλουθα δύο θρεπτικά μέσα:

— Το θρεπτικό μέσο του ΟΟΣΑ: το πρωτότυπο θρεπτικό μέσο της κατευθυντήριας γραμμής TG 201 του ΟΟΣΑ, σύμφωνο επίσης με το πρότυπο ISO 8692·

— Το θρεπτικό μέσο AAP της EPA (Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος των ΗΠΑ), σύμφωνο επίσης με την ASTM.

Κατά την παρασκευή των ανωτέρω θρεπτικών μέσων πρέπει να χρησιμοποιούνται χημικές ουσίες καθαρότητας αντιδραστηρίου ή αναλυτικής καθαρότητας και απιονισμένο νερό.

Σύνθεση του θρεπτικού μέσου AAP (US EPA) και του θρεπτικού μέσου της TG 201 του ΟΟΣΑ

Συστατικό	AAP		ΟΟΣΑ	
	mg/l	mM	mg/l	mM
$NaHCO_3$	15,0	0,179	50,0	0,595
$NaNO_3$	25,5	0,300		
NH_4Cl			15,0	0,280
$MgCl_2 \cdot 6(H_2O)$	12,16	0,0598	12,0	0,0590
$CaCl_2 \cdot 2(H_2O)$	4,41	0,0300	18,0	0,122
$MgSO_4 \cdot 7(H_2O)$	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K_2HPO_4	1,044	0,00599		
KH_2PO_4			1,60	0,00919
$FeCl_3 \cdot 6(H_2O)$	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
$Na_2EDTA \cdot 2(H_2O)$	0,300	0,000806	0,100	0.000269*
H_3BO_3	0,186	0,00300	0,185	0,00299
$MnCl_2 \cdot 4(H_2O)$	0,415	0,00201	0,415	0,00210
$ZnCl_2$	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
$CoCl_2 \cdot 6(H_2O)$	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
$Na_2MoO_4 \cdot 2(H_2O)$	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
$CuCl_2 \cdot 2(H_2O)$	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

Η μοριακή αναλογία του EDTA προς τον σίδηρο υπερβαίνει ελαφρά τη μονάδα. Με τον τρόπο αυτό, αποτρέπεται η καθίζηση σιδήρου και, ταυτόχρονα, ελαχιστοποιείται ο σχηματισμός χηλικών συμπλόκων των ιόντων βαρέων μετάλλων.

Στη δοκιμή με το διάτομο *Navicula pelliculosa* πρέπει να προστίθεται $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$ και στα δύο θρεπτικά μέσα, ώστε να επιτυγχάνεται συγκέντρωση 1,4 mg Si/l.

▼**M6**

Το pH του θρεπτικού μέσου επιτυγχάνεται στην κατάσταση ισορροπίας μεταξύ του ανθρακικού συστήματος του μέσου και της μερικής πίεσης του CO_2 στον ατμοσφαιρικό αέρα. Το pH στους 25 °C συνδέεται, κατά προσέγγιση, με τη μοριακή συγκέντρωση όξινων ανθρακικών ιόντων με τη σχέση:

$pH_{eq} = 11{,}30 + \log[HCO_3]$

Με 15 mg $NaHCO_3$/l επιτυγχάνεται $pH_{eq} = 7{,}5$ (θρεπτικό μέσο US EPA) και με 50 mg $NaHCO_3$/l επιτυγχάνεται $pH_{eq} = 8{,}1$ (θρεπτικό μέσο ΟΟΣΑ).

Στοιχειακή σύνθεση των θρεπτικών μέσων δοκιμής

Στοιχείο	AAP	ΟΟΣΑ
	mg/l	mg/l
C	2,144	7,148
N	4,202	3,927
P	0,186	0,285
K	0,469	0,459
Na	11,044	13,704
Ca	1,202	4,905
Mg	2,909	2,913
Fe	0,033	0,017
Mn	0,115	0,115

Παρασκευή του θρεπτικού μέσου του ΟΟΣΑ

Θρεπτικό στοιχείο	Συγκέντρωση στο διάλυμα παρακαταθήκης
Διάλυμα παρακαταθήκης 1: μακροθρεπτικά συστατικά	
NH_4Cl	1,5 g/l
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 g/l
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 g/l
KH_2PO_4	0,16 g/l
Διάλυμα παρακαταθήκης 2: σίδηρος	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 mg/l
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 mg/l
Διάλυμα παρακαταθήκης 3: ιχνοστοιχεία	
H_3BO_3	185 mg/l
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 mg/l
$ZnCl_2$	3 mg/l

▼**M6**

Θρεπτικό στοιχείο	Συγκέντρωση στο διάλυμα παρακαταθήκης
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 mg/l
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 mg/l
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 mg/l
Διάλυμα παρακαταθήκης 4: όξινο ανθρακικό άλας	
$NaHCO_3$	50 g/l
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$	

Τα διαλύματα παρακαταθήκης αποστειρώνονται με διήθηση μέσω μεμβράνης (μέση διάμετρος πόρων 0,2 μm) ή σε αυτόκαυστο (120 °C, 15 λεπτά). Τα διαλύματα φυλάσσονται στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία 4 °C.

Τα διαλύματα παρακαταθήκης 2 και 4 πρέπει να μην αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο αλλά με διήθηση μέσω μεμβράνης.

Παρασκευάζεται θρεπτικό μέσο με την προσθήκη κατάλληλου όγκου των διαλυμάτων παρακαταθήκης 1-4 σε νερό:

Σε 500 ml αποστειρωμένου νερού προστίθενται:

10 ml διαλύματος παρακαταθήκης 1

1 ml διαλύματος παρακαταθήκης 2

1 ml διαλύματος παρακαταθήκης 3

1 ml διαλύματος παρακαταθήκης 4

Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 1 000 ml με αποστειρωμένο νερό.

Το θρεπτικό μέσο αφήνεται να φθάσει σε κατάσταση ισορροπίας με το ατμοσφαιρικό CO_2 για επαρκή χρόνο — εάν είναι απαραίτητο, με τη διοχέτευση φυσαλίδων στείρου φιλτραρισμένου αέρα για μερικές ώρες.

Παρασκευή του θρεπτικού μέσου US EPA

1. Σε περίπου 900 ml απιονισμένου ή απεσταγμένου νερού προστίθεται 1 ml από κάθε διάλυμα παρακαταθήκης *2.1–2.7* και το σύνολο αραιώνεται μέχρι το 1 λίτρο.

2. Τα διαλύματα παρακαταθήκης μακροθρεπτικών συστατικών παρασκευάζονται με διάλυση των ακόλουθων ουσιών σε 500 ml απιονισμένου ή απεσταγμένου νερού. Τα αντιδραστήρια *2.1, 2.2, 2.3* και *2.4* είναι δυνατόν να συνδυαστούν σε ένα ενιαίο διάλυμα παρακαταθήκης.

2.1	$NaNO_3$	12,750 g.
2.2	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	6,082 g.
2.3	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2,205 g.
2.4	Διάλυμα παρακαταθήκης μακροθρεπτικών συστατικών (βλ. 3).	
2.5	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7,350 g.
2.6	K_2HPO_4	0,522 g.
2.7	$NaHCO_3$	7,500 g.
2.8	$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	Βλ. σημείωση 1.

▼**M6**

Σημειωση 1: Χρησιμοποιείται μόνο για τα είδη διατόμων. Μπορεί να προστίθεται κατευθείαν (202,4 mg) ή μέσω διαλύματος παρακαταθήκης, κατά τρόπο ώστε η τελική συγκέντρωση Si στο θρεπτικό μέσο να είναι 20 mg/l.

3. Το διάλυμα παρακαταθήκης μικροθρεπτικών συστατικών παρασκευάζεται με διάλυση των ακόλουθων ουσιών σε 500 ml απιονισμένου ή απεσταγμένου νερού:

3.1	H_3BO_3	92,760 mg.	
3.2	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	207,690 mg.	
3.3	$ZnCl_2$	1,635 mg.	
3.4	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	79,880 mg.	
3.5	CoCl2 · 6H2O	0,714 mg.	
3.6	Na2$MoO_4 \cdot 2H_2O$	3,630 mg.	
3.7	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,006 mg.	
3.8	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	150,000 mg.	[(αιθυλενοδινιτριλο)τετραοξικό νάτριο].
3.9	$Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$	0,005 mg	Βλ. σημείωση 2.

Σημειωση 2: Χρησιμοποιείται μόνο στο θρεπτικό μέσο για μητρικές καλλιέργειες ειδών διατόμων.

4. Ρυθμίζεται το pH στην τιμή 7,5 ± 0,1 με διάλυμα NaOH ή HCl 0,1 *N* ή 1,0 *N*.

5. Το θρεπτικό μέσο διηθείται σε στείρο υποδοχέα μέσω είτε διηθητικής μεμβράνης των 0,22μm, εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί μετρητής σωματιδίων, είτε ηθμού των 0,45μm, εάν δεν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί μετρητής σωματιδίων.

6. Το θρεπτικό μέσο φυλάσσεται στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία περίπου 4 °C, μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

▼M6

Προσάρτημα 4

Παράδειγμά διαδικασίας για την καλλιέργειά φυκών

Γενικές παρατηρήσεις

Σκοπός της καλλιέργειας με την ακόλουθη διαδικασία είναι να ληφθούν καλλιέργειες φυκών για δοκιμές τοξικότητας.

Πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες μέθοδοι, ώστε να εξασφαλίζεται ότι οι καλλιέργειες φυκών δεν θα μολυνθούν από βακτηρίδια. Μπορεί να είναι επιθυμητές οι αξενικές (χωρίς παρουσία ξένων οργανισμών) καλλιέργειες, αλλά πρέπει να παρασκευάζονται και να χρησιμοποιούνται μονοκαλλιέργειες φυκών.

Όλες οι εργασίες πρέπει να εκτελούνται υπό στείρες συνθήκες, ώστε να αποφεύγεται η μόλυνση με βακτηρίδια και άλλα φύκη.

Εξοπλισμός και υλικά

Βλ. μέθοδο δοκιμών: σημείο «Εργαστηριακός εξοπλισμός».

Διαδικασίες για τη λήψη καλλιεργειών φυκών

Παρασκευή θρεπτικών διαλυμάτων (θρεπτικών μέσων):

Όλα τα θρεπτικά άλατα του θρεπτικού μέσου παρασκευάζονται ως συμπυκνωμένα διαλύματα παρακαταθήκης και αποθηκεύονται στο σκοτάδι και υπό ψύξη. Τα διαλύματα αυτά αποστειρώνονται με διήθηση ή σε αυτόκαυστο.

Το θρεπτικό μέσο παρασκευάζεται με την προσθήκη της ενδεδειγμένης ποσότητας διαλύματος παρακαταθήκης σε στείρο απεσταγμένο νερό, με μέριμνα για την αποφυγή μολύνσεων. Όταν πρόκειται για στερεό μέσο, προστίθεται άγαρ σε αναλογία 0,8 τοις εκατό.

Μητρική καλλιέργεια:

Οι μητρικές καλλιέργειες είναι μικρές καλλιέργειες φυκών που μεταφέρονται τακτικά σε πρόσφατα παρασκευασμένο θρεπτικό μέσο για να δράσουν ως αρχικό υλικό δοκιμής. Εάν οι καλλιέργειες δεν χρησιμοποιούνται τακτικά, φέρονται σε σωλήνες με άγαρ υπό κλίση. Μεταφέρονται σε πρόσφατα παρασκευασμένο θρεπτικό μέσο τουλάχιστον ανά δίμηνο.

Οι μητρικές καλλιέργειες αναπτύσσονται σε κωνικές φιάλες που περιέχουν το κατάλληλο θρεπτικό μέσο (όγκος περίπου 100 ml). Όταν τα φύκη επωάζονται στους 20 °C με συνεχή φωτισμό, απαιτείται μεταφορά μία φορά την εβδομάδα.

Κατά τη μεταφορά, ποσότητα «παλαιάς» καλλιέργειας μεταφέρεται με αποστειρωμένα σιφώνια σε φιάλη με πρόσφατα παρασκευασμένο θρεπτικό μέσο, έτσι ώστε με τα είδη ταχείας ανάπτυξης η αρχική συγκέντρωση να είναι περίπου 100 φορές μικρότερη από ό,τι στην παλαιά καλλιέργεια.

Ο ρυθμός ανάπτυξης ενός είδους μπορεί να προσδιοριστεί από την καμπύλη ανάπτυξης. Εάν αυτή είναι γνωστή, μπορεί να εκτιμηθεί η πυκνότητα στην οποία η καλλιέργεια θα πρέπει να μεταφερθεί σε νέο θρεπτικό μέσο. Ο σχετικός υπολογισμός πρέπει να γίνεται προτού η καλλιέργεια φθάσει στη φάση θανάτου.

Προκαλλιέργεια:

Η προκαλλιέργεια προορίζεται να προσφέρει την κατάλληλη ποσότητα φυκών για τον εμβολιασμό των καλλιεργειών δοκιμής. Η προκαλλιέργεια επωάζεται υπό τις συνθήκες δοκιμής και χρησιμοποιείται ενώ βρίσκεται ακόμη στην εκθετική φάση ανάπτυξης, κατά κανόνα έπειτα από περίοδο επώασης 2-4 ημερών. Όταν οι καλλιέργειες φυκών περιέχουν παραμορφωμένα ή ανώμαλα κύτταρα, πρέπει να απορρίπτονται.

▼M6

Προσάρτημα 5

Ανάλυση δεδομένων με μη γραμμική παλινδρόμηση

Γενικές παρατηρήσεις

Η απόκριση κατά τις δοκιμές σε φύκη και τις λοιπές δοκιμές μικροβιακής ανάπτυξης — αύξηση της βιομάζας — είναι εκ φύσεως συνεχής ή μετρική μεταβλητή: συνίσταται σε ταχύτητα διεργασίας, εάν χρησιμοποιείται ο ρυθμός ανάπτυξης, και στο ολοκλήρωμά της ως προς τον χρόνο, εάν έχει επιλεγεί η βιομάζα. Και τα δύο συσχετίζονται με την αντίστοιχη μέση απόκριση ταυτόσημων καλλιεργειών ελέγχου που δεν έχουν εκτεθεί στην ουσία και παρουσιάζουν μέγιστη απόκριση στις επιβαλλόμενες συνθήκες — κατά τη δοκιμή σε φύκη, το φως και η θερμοκρασία αποτελούν τους πρωταρχικούς καθοριστικούς παράγοντες. Το σύστημα είναι κατανεμημένο ή ομοιογενές και η βιομάζα μπορεί να θεωρηθεί ως ένα συνεχές, χωρίς να λαμβάνονται υπόψη τα επιμέρους κύτταρα. Για το σύστημα αυτό, η κατανομή της διασποράς του τύπου απόκρισης συνδέεται μόνο με τους πειραματικούς παράγοντες (περιγράφεται τυπικά από τη λογαριθμοκανονική ή την κανονική κατανομή του σφάλματος). Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τις τυπικές αποκρίσεις των βιοδοκιμασιών με δεδομένα που δέχονται μόνο δύο τιμές, όπου η ανοχή (με τυπική διωνυμική κατανομή) των επιμέρους οργανισμών υποτίθεται συχνά ότι είναι η κυρίαρχη συνιστώσα της διασποράς. Οι αποκρίσεις του μάρτυρα, εν προκειμένω, είναι μηδέν ή στο επίπεδο υποβάθρου.

Στην απλή περίπτωση, η κανονικοποιημένη ή σχετική απόκριση, r, μειώνεται με μονοτονία από το 1 (μηδενική αναστολή) έως το 0 (100 % αναστολή). Σημειωτέον ότι όλες οι αποκρίσεις ενέχουν σφάλμα και ότι φαινόμενη αρνητική αναστολή είναι δυνατόν να υπολογιστεί μόνο ως επακόλουθο τυχαίου σφάλματος.

Ανάλυση παλινδρόμησης

Μοντέλα

Σκοπός της ανάλυσης παλινδρόμησης είναι να περιγραφεί ποσοτικά η καμπύλη συγκέντρωσης-απόκρισης με τη μορφή μαθηματικής συνάρτησης παλινδρόμησης $Y = f(C)$ ή, συνηθέστερα, $F(Z)$, όπου $Z = \log C$. Η εφαρμογή της αντίστροφης συνάρτησης, $C = f^{-1}(Y)$, επιτρέπει τον υπολογισμό των τιμών της EC_x, όπως των EC_{50}, EC_{10} και EC_{20}, καθώς και των οικείων ορίων εμπιστοσύνης 95 %. Έχει αποδειχθεί ότι οι σχέσεις συγκέντρωσης-απόκρισης που προκύπτουν από τις δοκιμές αναστολής της ανάπτυξης φυκών περιγράφονται επιτυχώς από διάφορες απλές μαθηματικές συναρτήσεις. Στις συναρτήσεις αυτές περιλαμβάνονται, π.χ., η λογιστική εξίσωση, η ασύμμετρη εξίσωση του Weibull και η συνάρτηση της λογαριθμοκανονικής κατανομής — όλες σιγμοειδείς καμπύλες που τείνουν ασυμπτωτικά προς το μηδέν, όταν $C \rightarrow 0$, και προς το ένα, όταν $C \rightarrow$ άπειρο.

Τελευταία, προτείνεται η χρήση μοντέλων συνεχούς συνάρτησης ορίου (π.χ. μοντέλο Kooijman για την αναστολή της ανάπτυξης πληθυσμού, Kooijman et al. 1996) αντί των ασυμπτωτικών μοντέλων. Τα μοντέλα αυτά βασίζονται στην υπόθεση ότι δεν υπάρχουν επιδράσεις σε συγκεντρώσεις κάτω από ένα όριο, EC_0 +, το οποίο υπολογίζεται με προεκβολή της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης μέχρι να τέμνει τον άξονα των συγκεντρώσεων, με την εφαρμογή απλής συνεχούς συνάρτησης που δεν είναι διαφορίσιμη στο αρχικό σημείο.

Σημειωτέον ότι η ανάλυση μπορεί να συνίσταται σε απλή ελαχιστοποίηση των αθροισμάτων των τετραγώνων των καταλοίπων (με την παραδοχή σταθερής διασποράς) ή των σταθμισμένων τετραγώνων, εάν αντισταθμίζεται η ετερογένεια της διασποράς.

Διαδικασία

Η διαδικασία μπορεί να συνοψιστεί ως εξής: Επιλέγεται η κατάλληλη συναρτησιακή εξίσωση, $Y = f(C)$, και προσαρμόζεται στα δεδομένα με μη γραμμική παλινδρόμηση. Χρησιμοποιούνται, κατά προτίμηση, οι μετρήσεις από κάθε επιμέρους φιάλη αντί των μέσων τιμών των επαναλήψεων, ώστε να αντληθούν όσο το δυνατόν περισσότερες πληροφορίες από τα δεδομένα. Από την άλλη πλευρά, σε περίπτωση μεγάλης διασποράς, η πρακτική εμπειρία έχει δείξει ότι οι μέσες

▼M6

τιμές των επαναλήψεων είναι δυνατόν να οδηγήσουν σε ακριβέστερη μαθηματική εκτίμηση, επηρεαζόμενη σε μικρότερο βαθμό από τα συστηματικά σφάλματα των δεδομένων, απ' ό,τι η εκτίμηση με κάθε επιμέρους σημείο δεδομένων που έγινε δεκτό.

Σχεδιάζεται το διάγραμμα της προσαρμοσμένης καμπύλης και των δεδομένων των μετρήσεων και εξετάζεται κατά πόσον η προσαρμογή της καμπύλης είναι η ενδεδειγμένη. Ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο για τον σκοπό αυτό μπορεί να είναι η ανάλυση των καταλοίπων. Εάν η συναρτησιακή σχέση που επιλέχθηκε για την προσαρμογή της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης δεν περιγράφει ικανοποιητικά το σύνολο της εν λόγω καμπύλης ή κάποιο ουσιώδες τμήμα της, όπως την απόκριση σε χαμηλές συγκεντρώσεις, επιλέγεται άλλη δυνατότητα προσαρμογής της καμπύλης — π.χ. ασύμμετρη καμπύλη, όπως η συνάρτηση Weibull, αντί της συμμετρικής. Η αρνητική αναστολή ενδέχεται να αποτελέσει πρόβλημα, π.χ. με τη συνάρτηση της λογαριθμοκανονικής κατανομής, το οποίο απαιτεί ομοίως εναλλακτική συνάρτηση παλινδρόμησης. Δεν συνιστάται να δίνεται στις αρνητικές αυτές τιμές η τιμή μηδέν ή μικρή θετική τιμή, γιατί αυτό στρεβλώνει την κατανομή του σφάλματος. Για τον υπολογισμό των τιμών $EC_{χαμηλόx}$ μπορεί να ενδείκνυνται χωριστές προσαρμογές σε τμήματα της καμπύλης, όπως εκείνο που αντιστοιχεί στο χαμηλό επίπεδο αναστολής. Από την προσαρμοσμένη εξίσωση υπολογίζονται [με «αντίστροφη επίλυση», $C = f^{-1}(Y)$] χαρακτηριστικές σημειακές τιμές της EC_x και αναφέρονται τουλάχιστον η EC_{50} και μία ή δύο εκτιμήσεις $EC_{χαμηλόx}$. Η πρακτική εμπειρία από τη διενέργεια δοκιμών έχει δείξει ότι, κατά κανόνα, η ακρίβεια της μεθόδου δοκιμών σε φύκη επιτρέπει εύλογα ακριβείς εκτιμήσεις στο επίπεδο αναστολής 10 %, εάν επαρκούν τα σημεία δεδομένων — εκτός εάν εμφανιστεί διέγερση στις χαμηλές συγκεντρώσεις ως παράγοντας σύγχυσης. Συχνά, η ακρίβεια εκτίμησης της EC_{20} είναι σημαντικά μεγαλύτερη από εκείνη της EC_{10}, επειδή η EC_{20} βρίσκεται συνήθως στο σχεδόν ευθύγραμμο τμήμα της κεντρικής καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η ερμηνεία της EC_{10} είναι δυνατόν να παρουσιάζει δυσκολίες, λόγω της διέγερσης της ανάπτυξης. Για τον λόγο αυτό, μολονότι η EC_{10} προκύπτει κατά κανόνα με επαρκή ακρίβεια, συνιστάται να αναφέρεται πάντα και η EC_{20}.

Συντελεστές στάθμισης

Επειδή η πειραματική διασπορά δεν είναι γενικά σταθερή και, συνήθως, περιλαμβάνει μια αναλογική συνιστώσα, αποτελεί πλεονέκτημα η συστηματική διενέργεια σταθμισμένης παλινδρόμησης. Κατά κανόνα, για την ανάλυση αυτή υποτίθεται ότι οι συντελεστές στάθμισης είναι αντιστρόφως ανάλογοι της διασποράς:

$$W_i = 1/Var(r_i)$$

Πολλά προγράμματα παλινδρόμησης παρέχουν τη δυνατότητα ανάλυσης της σταθμισμένης παλινδρόμησης, περιλαμβάνοντας πίνακα με τους συντελεστές στάθμισης. Για λόγους διευκόλυνσης, οι συντελεστές στάθμισης θα πρέπει να κανονικοποιούνται πολλαπλασιαζόμενοι επί $n/\Sigma w_i$ (όπου n είναι ο αριθμός των σημείων δεδομένων), ώστε το άθροισμά τους να ισούται με τη μονάδα.

Κανονικοποίηση των αποκρίσεων

Η κανονικοποίηση με βάση τη μέση τιμή απόκρισης των μαρτύρων δημιουργεί ορισμένα προβλήματα αρχής και οδηγεί σε σχετικά περίπλοκη δομή της διασποράς. Η διαίρεση των αποκρίσεων διά του μέσου όρου των αποκρίσεων των μαρτύρων, ώστε να ληφθεί η εκατοστιαία αναστολή, εισάγει ένα πρόσθετο σφάλμα, οφειλόμενο στο σφάλμα του μέσου όρου των μαρτύρων. Εάν το σφάλμα αυτό δεν είναι αμελητέο, οι συντελεστές στάθμισης και τα όρια εμπιστοσύνης της παλινδρόμησης πρέπει να διορθωθούν, ώστε να ληφθεί υπόψη η συνδιασπορά με τον μάρτυρα (Draper και Smith, 1981). Σημειωτέον ότι η μεγάλη ακρίβεια στην εκτίμηση της μέσης τιμής της απόκρισης των μαρτύρων έχει σημασία για την ελαχιστοποίηση της συνολικής διασποράς της σχετικής απόκρισης. Η διασπορά αυτή υπολογίζεται ως εξής:

(Ο δείκτης i αναφέρεται στο επίπεδο συγκέντρωσης i και ο δείκτης 0 στους μάρτυρες.)

$$Yi = \text{σχετική απόκριση} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

▼**M6**

με διασπορά $Var(Y_i) = Var\ (r_i/r_0) \cong (\partial Yi\ /\ \partial\ r_i)^2 \cdot Var(r_i) + ((\partial\ Y_i/\ \partial\ r_0)^2 \cdot Var(r_0)$

και αφού $(\partial\ Y_i/\ \partial\ r_i) = 1/r_0$ και $(\partial\ Y_i/\ \partial\ r_0) = r_i/r_0^2$

με κανονική κατανομή των δεδομένων και με επαναλήψεις m_i και m_0: $Var(r_i) = \sigma^2/m_i$

η συνολική διασπορά της σχετικής απόκρισης Y_i λαμβάνει λοιπόν τη μορφή:

$$Var(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2 \cdot m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4 \cdot m_0$$

Το σφάλμα στον μέσο όρο των μαρτύρων είναι αντιστρόφως ανάλογο προς την τετραγωνική ρίζα του αριθμού των επαναλήψεων μαρτύρων από τον οποίο εξήχθη ο μέσος όρος. Ως εκ τούτου, μερικές φορές δικαιολογείται η προσθήκη ιστορικών δεδομένων, με την οποία περιορίζεται σε μεγάλο βαθμό το σφάλμα. Μια εναλλακτική διαδικασία συνίσταται στη μη κανονικοποίηση των δεδομένων και στην προσαρμογή των απόλυτων τιμών απόκρισης, συμπεριλαμβανομένης της τιμής της απόκρισης του μάρτυρα, η οποία όμως εισάγεται ως πρόσθετη παράμετρος για προσαρμογή με μη γραμμική παλινδρόμηση. Με τη συνήθη διπαραμετρική εξίσωση παλινδρόμησης, η μέθοδος αυτή απαιτεί την προσαρμογή τριών παραμέτρων και, συνεπώς, περισσότερα σημεία δεδομένων από τη μη γραμμική παλινδρόμηση σε δεδομένα που έχουν κανονικοποιηθεί με τη χρήση προκαθορισμένης απόκρισης μάρτυρα.

Αντίστροφα διαστήματα εμπιστοσύνης

Ο υπολογισμός διαστημάτων εμπιστοσύνης στη μη γραμμική παλινδρόμηση με αντίστροφη επίλυση είναι σχετικά πολύπλοκος και δεν διατίθεται ως βασική επιλογή στα συνήθη στατιστικά προγράμματα υπολογιστών. Κατά προσέγγιση όρια εμπιστοσύνης είναι δυνατόν να ληφθούν από τα τυποποιημένα προγράμματα μη γραμμικής παλινδρόμησης με αναπαραμετροποίηση (Bruce και Versteeg, 1992), η οποία περιλαμβάνει νέα γραφή της μαθηματικής εξίσωσης, με τις επιθυμητές εκτιμήσεις σημείων, π.χ. EC_{10} και EC_{50}, ως παραμέτρους προς υπολογισμό. Έστω η εξίσωση I = f (α, β, συγκέντρωση) στην οποία το f (α, β, συγκέντρωση) αντικαθίσταται με την ισοδύναμη συνάρτηση g (EC_{10}, EC_{50}, συγκέντρωση) με χρήση των σχέσεων ορισμού f (α, β, EC_{10}) = 0,1 και f (α, β, EC_{50}) = 0,5.

Πιο άμεσος υπολογισμός (Andersen et al, 1998) εκτελείται με τη διατήρηση της αρχικής εξίσωσης και τη χρήση αναπτύγματος Taylor γύρω από τις μέσες τιμές των r_i και r_0.

Πρόσφατα, άρχισαν να χρησιμοποιούνται ευρέως οι μέθοδοι bootstrap. Στις μεθόδους αυτές χρησιμοποιούνται τα δεδομένα από τις μετρήσεις και η συχνή νέα δειγματοληψία, η οποία κατευθύνεται από γεννήτρια τυχαίων αριθμών, για την εκτίμηση εμπειρικής κατανομής της διασποράς.

ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

Kooijman, S.A.L.M.; Hanstveit, A.O.; Nyholm, N. (1996): No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. *Water Research*, 30, 1625-1632.

Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, Νέα Υόρκη.

Bruce, R..D. and Versteeg,, D.J. (1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1485-1494.

Andersen, J.S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A. & Nyholm, N. (1998). Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics*, 3, 405-420.

▼B

Γ.4. **ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΤΗΣ «ΑΜΕΣΗΣ» ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΙΜΟΤΗΤΑΣ**

ΜΕΡΟΣ 1. **ΓΕΝΙΚΑ ΘΕΜΑΤΑ**

Ι.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Περιγράφονται έξι μέθοδοι δοκιμής χημικών ουσιών ως προς την άμεση βιοαποικοδομησιμότητά τους σε αερόβιο υδατικό μέσο:

(α) Ελάττωση Διαλελυμένου Οργανικού Άνθρακα (DOC) (Μέθοδος Γ.4-Α)

(β) Τροποποιημένη Μέθοδος ΟΟΣΑ — Ελάττωση DOC (Μέθοδος Γ.4-Β)

(γ) Έκλυση διοξειδίου του άνθρακα (C02) (Τροποποιημένη δοκιμή STURM) (Μέθοδος Γ.4-Γ)

(δ) Μανομετρική αναπνευσιομετρία (Μέθοδος Γ.4-Δ)

(ε) Κλειστή φιάλη (Μέθοδος Γ.4-Ε)

(στ) MITI (Ministry of International Trade and Industry — Ιαπωνία) (Μέθοδος Γ.4-Ζ)

Στο Μέρος Ι της μεθόδου περιλαμβάνονται γενικά θέματα όπως επίσης και θέματα κοινά και για τις έξι δοκιμές. Τα Μέρη ΙΙ έως VII αναφέρονται ειδικά σε συγκεκριμένες μεθόδους. Τα Παραρτήματα περιέχουν ορισμούς, τύπους και οδηγίες.

Από διεργαστηριακή συγκριτική δοκιμή που πραγματοποιήθηκε από τον ΟΟΣΑ το 1988, διαπιστώθηκε ότι οι μέθοδοι παρέχουν συναφή αποτελέσματα. Παρ' όλα αυτά, ανάλογα με τα φυσικά χαρακτηριστικά της εξεταζόμενης ουσίας, μπορεί να προτιμηθεί η μια ή η άλλη μέθοδος.

Ι.2. ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΛΗΛΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Προκειμένου να επιλεγεί η καταλληλότερη μέθοδος, ουσιαστικό ρόλο παίζει η ύπαρξη στοιχείων για τη διαλυτότητα, την τάση ατμών Kat τα χαρακτηριστικά προσρόφησης της ουσίας. Για τον υπολογισμό των θεωρητικών τιμών και/ή τον έλεγχο των μετρουμένων τιμών παραμέτρων, π.χ. ThOD, ThC02, DOC, TOC, COD (βλ. Παραρτήματα Ι και ΙΙ), θα πρέπει να είναι γνωστή η χημική δομή ή ο μοριακός τύπος της ουσίας.

Χημικές ουσίες που η διαλυτότητά τους στο νερό είναι τουλάχιστον 100 mg/I μπορούν να αξιολογηθούν με όλες τις μεθόδους, με την προϋπόθεση ότι δεν είναι πτητικές και προσροφητικές. Για τις χημικές ουσίες που είναι ασθενώς διαλυτές στο νερό, πτητικές ή προσροφητικές, κατάλληλες μέθοδοι είναι εκείνες που παρατίθενται στον Πίνακα 1. Ο τρόπος μεταχείρισης των ασθενώς υδατοδιαλυτών χημικών ουσιών και των πτητικών χημικών ουσιών περιγράφεται στο Παράρτημα ΙΙΙ. Οι μετρίως πτητικές χημικές ουσίες μπορούν να υποβάλλονται σε δοκιμή με τη μέθοδο της Ελάττωσης του DOC εφόσον υπάρχει επαρκής χώρος αερίου στα δοχεία δοκιμής (τα οποία πρέπει να είναι κατάλληλα πωματισμένα). Σ' αυτή την περίπτωση πρέπει να γίνεται αβιοτικός έλεγχος προκειμένου να λαμβάνεται υπόψη οποιαδήποτε φυσική απώλεια.

▼B

Πίνακας 1

Δυνατότητα εφαρμογής των μεθόδων δοκιμής

Δοκιμή	Αναλυτική μέθοδος	Καταλληλότητα για ενώοεις οι οποίες είναι		
		ασθενώς διαλυτές	πτητικές	προσροφητικές
Ελάττωση DOC	Διαλελυμένος οργανικός άνθρακας	—	—	+/-
Τροποποιημένη μέθοδος ΟΟΣΑ	Διαλελυμένος οργανικός άνθρακας	—	—	+/-
Έκλυση CO_2,	Αναπνευσιομετρία: έκλυση CO_2,	+	—	+
Μανομετρική αναπνευσιομετρία	Μανομετρική αναπνευσομετρία: κατανάλωση O_2	+	+/-	+
Κλειστή φιάλη	Αναπνευσιομετρία: διαλελυμένο οξυγόνο	+/-	+	+
MITI	Αναπνευσιομετρία: κατανάλωση οξυγόνου	+	+	+

Για την ερμηνεία των λαμβανομένων αποτελεσμάτων, ειδικά όταν αυτά είναι μικρά ή οριακά, απαιτούνται στοιχεία για την καθαρότητα ή τις σχετικές αναλογίες των βασικών συστατικών του υλικού δοκιμής.

Τυχόν πληροφορίες για την τοξικότητα του εξεταζόμενου χημικού προϊόντος απέναντι στα βακτήρια (Παράρτημα IV) μπορεί να είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για την επιλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων για τη δοκιμή ενώ μπορεί να παίζουν βασικό ρόλο στην ερμηνεία χαμηλών τιμών βιοαποικοδόμησης.

I.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Για τον έλεγχο της διαδικασίας, ουσίες αναφοράς που πληρούν τα κριτήρια για την άμεση βιοαποικοδομησιμό-τητα υποβάλλονται σε δοκιμή παρασκευάζοντας το κατάλληλο διάλυμα σε φιάλη που εξετάζεται παράλληλα με την κανονική διαδικασία δοκιμής.

Κατάλληλες χημικές ουσίες είναι η ανιλίνη (πρόσφατα απεσταγμένη), το οξικό νάτριο και το βενζοϊκό νάτριο. Όλες αυτές οι ουσίες αποικοδομούνται με τις μεθόδους αυτές ακόμη κι όταν δεν προστεθεί εμβόλιο για το σκοπό αυτό.

Πρόταθηκε να αναζητηθεί μια ουσία αναφοράς που να είναι ευκόλως βιοαποικοδομήσιμη αλλά που να χρειάζεται την προσθήκη εμβολίου. Έχει προταθεί το όξινο φθαλικό κάλιο, χρειάζονται όμως ακόμη ορισμένα αποδεικτικά στοιχεία με αυτή την ουσία πριν γίνει αποδεκτή σαν ουσία αναφοράς.

Στις αναπνευσιομετρικές δοκιμές, οι ενώσεις που περιέχουν άζωτο μπορεί να επηρεάσουν την ανάλωση οξυγόνου εξαιτίας νιτροποίησης (βλ. Παραρτήματα II και V).

I.4. ΑΡΧΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΔΟΚΙΜΗΣ

Διάλυμα ή εναιώρημα της εξεταζόμενης ουσίας σε ανόργανο μέσον εμβολιάζεται και επωάζεται κάτω από αερόβιες συνθήκες στο σκότος ή σε διάχυτο φως. Η ποσότητα DOC στο διάλυμα αραίωσης λόγω του εμβολίου θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν χαμηλότερη σε σύγκριση με την ποσότητα DOC που οφείλεται στην εξεταζόμενη ουσία. Η ενδογενής δραστικότητα του εμβολίου λαμβάνεται υπόψη εκτελώντας παράλληλα τυφλά πειράματα με εμβόλιο αλλά χωρίς εξεταζόμενη ουσία στο διάλυμα, παρ' όλο ότι η ενδογενής δραστικότητα των κυττάρων με την παρουσία της ουσίας δεν προσομοιάζει ακριβώς με εκείνη του ενδογενή μάρτυρα. Γίνεται παράλληλη δοκιμή μιας ουσίας αναφοράς για τον έλεγχο της εκτέλεσης των διαδικασιών.

▼B

Γενικά, η αποικοδόμηση παρακολουθείται με τον προσδιορισμό παραμέτρων, όπως DOC, παραγωγή CO_2 και εκτελούνται μετρήσεις σε ικανοποιητικά συχνά διαστήματα που επιτρέπουν την αναγνώριση της έναρξης και της περάτωσης της βιοαποικοδόμησης. Με αυτόματα αναπνευσιόμετρα η μέτρηση είναι συνεχής. Ο DOC μετριέται μερικές φορές μαζί με κάποια άλλη παράμετρο αλλά αυτό γίνεται συνήθως μόνο στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής. Μπορεί επίσης να γίνει και ειδική χημική ανάλυση για να εκτιμηθεί η πρωταρχική αποικοδόμηση της εξεταζόμενης ουσίας και να προσδιορισθεί η συγκέντρωση οποιασδήποτε σχηματιζόμενης ενδιάμεσης ουσίας (πράγμα υποχρεωτικό στην περίπτωση της δοκιμής MITI).

Κανονικά, η δοκιμή διαρκεί 28 ημέρες. Παρ' όλα αυτά, οι δοκιμές μπορεί να τερματισθούν και πρίν από τις 28 ημέρες, π.χ. αμέσως όταν η καμπύλη βιοαποικοδόμησης έχει φθάσει σε οριακό επίπεδο για τρεις τουλάχιστον προσδιορισμούς. Οι δοκιμές μπορούν επίσης να παραταθούν και πέραν των 28 ημερών όταν από την καμπύλη φαίνεται ότι άρχισε η βιοαποικοδόμηση αλλά δεν έχει ακόμη φθάσει, την 28η ημέρα, σε οριακό επίπεδο.

I.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

I.5.1. **Αναπαραγωγιμότητα**

Λόγω της φύσης της βιοαποικοδόμησης και των μεικτών βακτηριακών πληθυσμών που χρησιμοποιούνται σαν εμβόλια, οι προσδιορισμοί θα πρέπει να εκτελούνται τουλάχιστον δύο φορές.

Αποτελεί κοινή εμπειρία το ότι όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση των μικροοργανισμών που προστίθενται αρχικά στο μέσον δοκιμής τόσο μικρότερη θα είναι η διακύμανση μεταξύ των επαναληπτικών δοκιμασιών. Από διεργαστηριακές δοκιμές διαπιστώθηκε επίαης ότι μπορεί να υπάρξουν μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ αποτελεσμάτων που λαμβάνονται από διάφορα εργαστήρια, κανονικά όμως επιτυγχάνεται καλή συμφωνία με εύκολα-βιοαποικοδομήσιμες ουσίες.

I.5.2. **Εγκυρότητα της δοκιμής**

Μία δοκιμή θεωρείται έγκυρη αν η διαφορά των ακρότατων επαναληπτικών τιμών απομάκρυνσης της εξεταζόμενης ουσίας στο οριακό επίπεδο, στο τέλος της δοκιμής ή στο τέλος του παραθύρου των 10 ημερών όπως ενδείκνυται, είναι μικρότερη του 20 % και αν η εκατοστιαία αποικοδόμηση της ουσίας αναφοράς έχει φθάσει το επίπεδο της άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας στις 14 ημέρες. Εάν οποιαδήποτε από τις συνθήκες αυτές δεν εκπληρώνεται, η δοκιμή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται. Εξαιτίας της αυστηρότητας των μεθόδων, χαμηλές τιμές δεν σημαίνουν κατ' ανάγκη ότι η εξεταζόμενη ουσία δεν είναι βιοαποικοδομήσιμη κάτω από τις συνθήκες περιβάλλοντος, δείχνουν όμως ότι απαιτείται περισσότερη εργασία για την επίτευξη βιοαποικοδομησιμότητας.

Εάν σε μία δοκιμή τοξικότητας, στην οποία συμπεριλαμβάνεται τόσο η εξεταζόμενη ουσία όσο και κάποια ουσία αναφοράς, επέρχεται σε 7-14 ημέρες μικρότερη από 35 % αποικοδόμηση (με βάση το DOC) ή μικρότερη από 25 % (με βάση το ThOD ή $ThC0_2$), οι εξεταζόμενες χημικές ουσίες μπορούν να θεωρούνται σαν ανασταλτικές (βλ. επίσης Παράρτημα IV). Η σειρά των δοκιμών θα πρέπει να επαναλαμβάνεται, αν είναι δυνατόν χρησιμοποιώντας μικρότερη συγκέντρωση εξεταζόμενης ουσίας και/ή μεγαλύτερη συγκέντρωση εμβολίου, όχι όμως μεγαλύτερη από 30 mg στερεών/λίτρο.

I.6. ΓΕΝΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΕΣ

Οι γενικοί όροι που ισχύουν για τις δοκιμές συνοψίζονται στον Πίνακα 2. Ο εξοπλισμός και οι άλλες πειραματικές συνθήκες που αφορούν ειδικά μία συγκεκριμένη δοκιμή, περιγράφονται αργότερα στο κείμενο που αναφέρεται στη δοκιμή αυτή.

▼B

Πίνακας 2

Συνθήκες δοκιμών

Δοκιμή	Ελάττωση DOC	Έκλυση CO_2	Μανομετρική αναπνευσιομετρία	Τροποποιημένη δοκιμή ΟΟΣΑ	Κλειστή φιάλη	MITI(I)
Συγκέντρωση εξεταζόμενης ουσίας						
σαν mg/l			100		2-10	100
mg DOC/1	10-40	10-20		10-40		
mg ThOD/1			50-100		5-10	
Συγκέντρωση εμβολίου (σε κύτταρα/1 κατά προσέγγιση)	≤ 30 mg/l SS ή ≤ 100 ml λυμάτων/l (10^7-10^8)			0,5 ml από δευτερογενή λύματα/l (10^5)	≤ 5 ml δευτερογενή λύματα/l (10^4-10^6)	30 mg/l SS (10^7-10^8)
Συγκέντρωση στοιχείων στο ανόργανο μέσον (σε mg/l):						
P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	122				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05-0,1				0,05-0,1	0,15
pH	7,4 = 0,2					Κατά προτίμηση 7,0
Θερμοκρασία	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C

DOC = Διαλελυμένος οργανικός άνθρακας ThoD .= Θεωρητικώς απαιτούμενο οξυγόνο SS = Εναιωρούμενα στερεά

I.6.1 **Νερό για αραίωση**

Το νερό που προορίζεται να χρησιμοποιηθεί γενικά σαν διαλύτης πρέπει να είναι απιονισμένο ή απεσταγμένο, απαλλαγμένο από ανασταλτικές συγκεντρώσεις τοξικών ουσιών (π.χ. ιόντα Cu^{++}). Το νερό δεν πρέπει να περιέχει περισσότερο από 10 % της ποσότητας του οργανικού άνθρακα που εισάγεται από το εξεταζόμενο υλικό. Το νερό της δοκιμής είναι ανάγκη να είναι υψηλής καθαρότητας ώστε να αποφεύγονται υψηλές τιμές στα τυφλά πειράματα. Η μόλυνση μπορεί να προκύφει από εγγενείς προσμίξεις όπως επίσης και από τις ιοντοανταλλακτι-κές ρητίνες και από ουσίες που παράγονται απο την λύση βακτηρίων και αλγών. Για κάθε σειρά δοκιμών, χρησιμοποιείται μόνον μία παρτίδα νερού, ελεγμένη προηγουμένως με ανάλυση DOC. Μια τέτοια δοκιμή δεν είναι απαραίτητη για τη δοκιμή κλειστής φιάλης, αλλά η κατανάλωση οξυγόνου από το νερό πρέπει να είναι χαμηλή.

▼B

I.6.2. **Αρχικά διαλύματα ανόργανων συστατικών**

Για την παρασκευή των διαλυμάτων δοκιμής, παρασκευάζονται αρχικά διαλύματα με την κατάλληλη συγκέντρωση ανόργανων συστατικών. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα αρχικά διαλύματα που παρατίθενται παρακάτω (με διαφορετικούς συντελεστές αραίωσης) για τις μεθόδους Ελάττωσης DOC, Τροποποιημένη Δοκιμή ΟΟΣΑ, Έκλυση $C0_2$, Μανομετρική Αναπνευσιομετρία και Δοκιμή Κλειστής Φιάλης.

Οι συντελεστές αραίωσης και, για τη δοκιμή MITI, η ειδική παρασκευή του ανόργανου μέσου, αναφέρονται στα αντίστοιχα κείμενα των συγκεκριμένων δοκιμών.

Αρχικά διαλύματα:

Παρασκευάζονται τα ακόλουθα αρχικά διαλύματα, χρησιμοποιώντας αντιδραστήρια αναλυτικής καθαρότητας.

(α)	Δισόξινο φωσφορικό κάλιο, KH_2PO_4	8,50 g
	Μονόξινο φωσφορικό κάλιο, K_2HPO_4	21,75 g
	Δίυδρο μονόξινο φωσφορικό νάτριο, $Na_2HPO_4.2H_2O$	33,40 g
	Χλωριούχο αμμώνιο, NH_4Cl	0,50 g
	Διάλυση σε νερό και συμπλήρωση μέχρι 1 λίτρο Το pH του διαλύματος θα πρέπει να είναι 7,4	
(β)	Χλωριούχο ασβέστιο, άνυδρο, $CaCl_2$	27,50 g
	ή δίυδρο χλωριούχο ασβέστιο, $CaCl_2.2\ H_2O$	36,40 g
	Διάλυση σε νερό και συμπλήρωση μέχρι 1 λίτρο	
(γ)	Επτάυδρο θεϊκό μαγνήσιο, $MgSO_4.\ 7H_2O$	22,50 g
	Διάλυση σε νερό και συμπλήρωση μέχρι 1 λίτρο	
(δ)	Εξάυδρος χλωριούχος σίδηρος (III), $FeCl_3.6H_2O$	0,25 g
	Διάλυση σε νερό και συμπλήρωση μέχρι 1 λίτρο.	

Σημείωση: για να αποφεύγεται να παρασκευάζεται το διάλυμα αυτό αμέσως πριν από τη χρήση, προστίθεται μία σταγόνα πυκνού HCl ή 0,4 g δινατρίου άλατος του αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA) ανά λίτρο.

1.6.3. **Αρχικά διαλύματα χημικών ουσιών**

Για παράδειγμα, όταν η διαλυτότητα είναι μεγαλύτερη από το 1 g/l, διαλύονται 1-10 g, ανάλογα, εξεταζόμενης ουσίας ή ουσίας αναφοράς σε απιονισμένο νερό και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι 1 λίτρο. Διαφορετικά, παρασκευάζονται αρχικά διαλύματα στο ανόργανο μέσον ή η ουσία προστίθεται απ' ευθείας στο ανόργανο μέσον. Για το χειρισμό λιγότερο ευδιάλυτων χημικών ουσιών, βλ. Παράρτημα ΙΙΙ. Πάντως, στη δοκιμή MITI (Μέθοδος Γ.4-Ε), δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ούτε διαλύτες ούτε γαλακτωματοποιητές.

▼B

I.6.4. **Εμβόλια**

Το εμβόλιο μπορεί να προέρχεται από διάφορες πηγές: ενεργοποιημένη λάσπη, αστικά λύματα (μη χλωριομένα), επιφανειακά νερά και χώματα ή από μείγμα αυτών. Στις δοκιμές της Ελάττωσης DOC, της Έκλυσης CO_2 και της Μανομετρικής Αναπνευσιομετρίας, αν χρησιμοποιείται ενεργοποιημένη λάσπη, αυτή θα πρέπει να λαμβάνεται από εγκατάσταση κατεργασίας ή μονάδα εργαστηριακής κλίμακας που δέχεται κατά κύριο λόγο οικιακά λύματα. Εμβόλια που προέρχονται από άλλες πηγές διαπιστώθηκε ότι δίνουν μεγαλύτερη διασπορά αποτελεσμάτων. Για την Τροποποιημένη Δοκιμή ΟΟΣΑ και τη Δοκιμή Κλειστής Φιάλης απαιτείται ένα πιο αραιό εμβόλιο χωρίς κροκιδώματα ή συσσωματώματα λάσπης και η πηγή που προτιμάται είναι τα δευτερογενή λύματα από εγκαταστάσεις κατεργασίας ή μονάδα εργαστηριακής κλίμακας οικιακών αποβλήτων. Στη δοκιμή MITI, το εμβόλιο προέρχεται από μίγμα πηγών και περιγράφεται στο κείμενο της συγκεκριμένης αυτής δοκιμής.

1.6.4.1. *Εμβόλιο από ενεργοποιημένες λάσπες*

Δείγμα ενεργοποιημένης λάσπης συλλέγεται από τη δεξαμενή αερισμού μιας εγκατάστασης κατεργασίας λυμάτων ή μονάδας εργαστηριακής κλίμακας στην οποία κατεργάζονται κατά κύριο λόγο οικιακά λύματα. Εάν είναι αναγκαίο, τα χονδρά σωματίδια απομακρύνονται με διήθηση μέσα από λεπτό κόσκινο και η λάσπη φυλλάσσεται σε αερόβιες συνθήκες.

Εναλλακτικά, μετά την απομάκρυνση των χονδρών σωματιδίων, η λάσπη αφήνεται να κατακαθίσει ή φυγοκε-ντρείται (π.χ. σε 1 100 g επί 10 λεπτά). Το υπερκείμενο υγρό απορρίπτεται και η συμπυκνωμένη λάσπη πλένεται με το ανόργανο διάλυμα. Η συμπικνωμένη λάσπη αιωρείται σε ανόργανο μέσον μέχρι συγκέντρωσης 3-5 g εναιωρούμενων στερεών/1 και αερίζεται όσο απαιτείται.

Η λάσπη πρέπει να λαμβάνεται από συμβατική εγκατάσταση που λειτουργεί κανονικά. Αν η λάσπη λαμβάνεται από εγκαταστάσεις κατεργασίας υψηλής ταχύτητας ή πιστεύεται ότι περιέχει αναστολείς, θα πρέπει να πλένεται. Η επαναφερθείσα σε μορφή εναιωρήματος λάσπη μετά από επισταμένη ανάμειξη, αφήνεται να κατακαθίσει ή φυγοκεντρείται, το υπερκείμενο υγρό απορρίπτεται και η πλυμένη λάσπη επαναφέρεται σε μορφή εναιωρήματος σε πρόσθετο όγκο ανόργανου μέσου. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρι να κριθεί ότι η λάσπη είναι απαλλαγμένη από υπερβολικό υπόστρωμα ή αναστολέα.

Αφού επιτευχθεί η πλήρης επαναιώρηση, ή στη μη κατεργασμένη λάσπη, λαμβάνεται δείγμα ακριβώς πριν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους των αιωρουμένων στερεών.

Μια άλλη εναλλακτική λύση, είναι η ομοιογενοποίηση της ενεργοποιημένης λάσπης (3-5 g αιωρούμενων στερεών/l). Η λάσπη υποβάλλεται σε κατεργασία σε μηχανικό αναμεικτη για δύο λεπτά με μεσαία ταχύτητα. Η αναμεμειγμένη λάσπη αφήνεται να κατακαθίσει για χρονικό διάστημα 30 λεπτών ή και περισσότερο εάν αυτό απαιτείται και το υγρό μεταγγίζεται για να χρησιμοποιηθεί σαν εμβόλιο σε αναλογία 10 ml/l ανόργανου μέσου.

1.6.4.2. *Άλλες πηγές εμβολίου*

Το εμβόλιο μπορεί να προέρχεται από τα δευτερογενή απόβλητα εγκαταστάσεων κατεργασίας ή μονάδας εργαστηριακής κλίμακας για οικιακά, κατά κύριο λόγο, λύματα. Συλλέγεται πρόσφατο δείγμα και διατηρείται σε αερόβιες συνθήκες κατά τη διάρκεια της μεταφοράς. Αφήνεται να κατακαθίσει για 1 ώρα ή διηθείται διαμέσου χονδρού διηθητικού χαρτιού και τα μεταγγισθέντα απόβλητα ή το διήθημα διατηρούνται σε αερόβιες συνθήκες για όσο χρόνο απαιτείται. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν μέχρι 100 ml αυτού του τύπου εμβολίου ανά λίτρο μέσου.

▼B

Μία περαιτέρω πηγή για το εμβόλιο είναι τα επιφανειακά νερά. Στην περίπτωση αυτή, συλλέγεται δείγμα από κατάλληλα επιφανειακά νερά, π.χ. ποταμούς, λίμνες και διατηρείται σε αερόβιες συνθήκες όσο απαιτείται. Εφόσον χρειάζεται, το εμβόλιο συμπυκνώνεται με διήθηση ή φυγοκέντρηση.

I.6.5. **Προεγκλιματισμός εμβολίων**

Τα εμβόλια μπορούν να προεγκλιματίζονται στις πειραματικές συνθήκες, δεν μπορούν όμως να προσαρμόζονται εκ των προτέρων στην εξεταζόμενη ουσία. Ο προεγκλιματισμός συνίσταται στον αερισμό της ενεργοποιημένης λάσπης σε ανόργανο μέσον ή δευτερογενή απόβλητα επί 5-7 ημέρες σε θερμοκρασία δοκιμής. Ο προεγκλιματι-σμός βελτιώνει μερικές φορές την ακρίβεια των μεθόδων δοκιμής μειώνοντας τις τιμές του τυφλού. Δεν θεωρείται αναγκαίο να προεγκλιματίζεται το εμβόλιο M1T1.

I.6.6. **Αβιοτικοί έλεγχοι**

Όταν απαιτείται, η ενδεχόμενη αβιοτική αποικοδόμηση της εξεταζόμενης ουσίας ελέγχεται προσδιορίζοντας την απομάκρυνση του DOC, την ανάλωση οξυγόνου ή την έκλυση διοξειδίου του άνθρακα σε αποστειρωμένους ελέγχους που δεν περιέχουν εμβόλιο. Η αποστείρωση διενεργείται με διήθηση δια μέσου μεμβράνης (0,2-0,45 μικρόμετρα) ή με προσθήκη μιάς κατάλληλης τοξικής ουσίας σε κατάλληλη συγκέντρωση. Αν χρησιμοποιείται μεμβράνη διήθησης, τα δείγματα λαμβάνονται άσηπτα ώστε να διατηρηθούν αποστειρωμένα. Στις δοκιμές που μετρούν βιοαποικοδόμηση σαν απομάκρυνση του DOC, ειδικότερα με εμβόλιο ενεργοποιημένης λάσπης, πρέπει να περιλαμβάνεται και αβιοτικός έλεγχος που είναι εμβολιασμένος και δηλητηριασμένος, εκτός αν η προσρόφηση της εξεταζόμενης χημικής ουσίας έχει αποκλεισθεί εκ των προτέρων.

I.6.7. **Αριθμός φιαλών**

Ο αριθμός των φιαλών σε μια τυπική διαδικασία δοκιμής περιγράφεται κάτω από τους τίτλους κάθε δοκιμής.

Πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον οι ακόλουθοι τύποι φιαλών:

— Για εναιώρημα δοκιμής: περιέχονται εξεταζόμενη ουσία και εμβόλιο

— Για τυφλό εμβολίου: περιέχεται μόνον εμβόλιο

— Για έλεγχο διαδικασίας: περιέχονται ουσία αναφοράς και εμβόλιο

— Για αβιοτικό στείρο έλεγχο: στείρο, περιέχεται εξεταζόμενη ουσία (βλέπε 1.6.6)

— Για έλεγχο προσρόφησης: περιέχονται εξεταζόμενη ουσία, εμβόλιο και φορέας αποστείρωσης

— Για έλεγχο τοξικότητας: περιέχονται εξεταζόμενη ουσία, ουσία αναφοράς και εμβόλιο

Ο προσδιορισμός στο εναιώρημα δοκιμής και το τυφλό εμβόλιο θα πρέπει να υποχρεωτικά να γίνεται παράλληλα. Θεωρείται σκόπιμο να γίνονται παράλληλα επίσης οι προσδιορισμοί στην άλλη φιάλη.

Αυτό μπορεί, παρ' όλα αυτά, να μην είναι πάντοτε δυνατόν. Πρέπει να εξασφαλίζεται το ότι λαμβάνονται επαρκή δείγματα ή αναγνώσεις ώστε να μπορεί να εκτιμάται το ποσοστό απομάκρυνσης στο 10 ήμερο παράθυρο.

▼B

I.7. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Στον υπολογισμό της D_t, δηλ. του ποσοστού αποικοδόμησης επί τοις εκατό, χρησιμοποιούνται οι μέσες τιμές της διπλής μέτρησης της παραμέτρου τόσο στις φιάλες δοκιμής όσο και στο τυφλό εμβολίου. Οι τύποι παρατίθενται στα κεφάλαια παρακάτω για τις συγκεκριμένες δοκιμές. Η πορεία αποικοδόμησης απεικονίζεται γραφικά και εμφανίζεται το 10 ήμερο παράθυρο. Υπολογίζεται και αναφέρεται η επί τοις εκατό απομάκρυνση που επιτυγχάνεται στο τέλος του 10 ημέρου παραθύρου και η τιμή στο οριζόντιο τμήμα της καμπύλης ή στο τέλος της δοκιμής, ανάλογα με το τι είναι προτιμότερο.

Στις αναπνευσιομετρικές δοκιμές, οι ενώσεις που περιέχουν άζωτο μπορεί να επηρεάσουν την ανάλωση οξυγόνου εξαιτίας νιτροποίησης (βλ. Παραρτήματα II και V).

I.7.1. **Αποικοδόμηση μετρούμενη μέσω προσδιορισμού του DOC**

Η εκατοστιαία αποικοδόμηση (D_t) για κάθε λαμβανόμενο δείγμα πρέπει να υπολογίζεται χωριστά για τις φιάλες που περιέχουν την εξεταζόμενη ουσία χρησιμοποιώντας την μέση τιμή διπλών μετρήσεων DOC ώστε να εκτιμηθεί η εγκυρότητα της δοκιμής (βλέπε I.5.2). Ο υπολογισμός γίνεται με βάση την ακόλουθη εξίσωση:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100$$

όπου:

D_t = % αποικοδόμηση τη χρονική στιγμή t,

C_o = μέση αρχική συγκέντρωση DOC στο εμβολιασμένο μέσον καλλιέργειας που περιέχει την εξεταζόμενη ουσία (mg DOC/l),

C_t = μέση συγκέντρωση DOC στο εμβολιασμένο μέσον καλλιέργειας που περιέχει εξεταζόμενη ουσία τη χρονική στιγμή t (mg DOC/l),

C_{bo} = μέση αρχική συγκέντρωση DOC στο τυφλό του εμβολιασμένου ανόργανου μέσου (mg DOC/l),

C_{bt} = μέση συγκέντρωση DOC του τυφλού κατά τη χρονική στιγμή t (mg DOC/l).

Όλες οι συγκεντρώσεις μετρούνται πειραματικά.

I.7.2. **Αποικοδόμηση μετρούμενη μέσω ειδικής ανάλυσης**

Όταν υπάρχουν διαθέσιμα ειδικά αναλυτικά δεδομένα, η βιοαποικοδόμηση υπολογίζεται πρωταρχικά από τον τύπο:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

όπου:

D_t = % αποικοδόμηση τη χρονική στιγμή t, κανονικά 28 ημέρες,

S_a = εναπομένουσα ποσότητα εξεταζόμενης ουσίας στο εμβολιασμένο μέσον στο τέλος της δοκιμής (mg),

S_b = εναπομένουσα ποσότητα εξεταζόμενης ουσίας στο τυφλό με νερό/μέσον στο οποίο προστέθηκε μόνον η εξεταζόμενη ουσία (mg).

▼B

I.7.3. **Αβιοτική αποικοδόμηση**

Όταν χρησιμοποιείται ένας στείρος αβιοτικός έλεγχος, στον υπολογισμό της εκατοστιαίας αβιοτικής αποικοδόμηαης χρησιμοποιείται

$$\% \text{ αβιοτική αποικοδόμηση} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

άπου:

$C_{s(o)}$ = DOC Συγκέντρωση στο στείρο έλεγχο την ημέρα 0

$C_{s(t)}$ = DOC Συγκέντρωση στο στείρο έλεγχο την ημέρα t

I.8. ΕΚΘΕΣΗ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει, αν είναι δυνατόν, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— εξεταζόμενες και ουσίες αναφοράς όπως και την καθαρότητα τους·

— συνθήκες δοκιμής·

— εμβόλιο: φύση και τόπο (τόπους) δειγματοληψίας, συγκέντρωση και οποιαδήποτε κατεργασία προεγκλιμα-τισμού·

— αναλογία και φύση βιομηχανικών αποβλήτων στα λύματα, αν είναι γνωστές·

— διάρκεια και θερμοκρασία δοκιμής·

— σε περίπτωση ασθενώς διαλυτών εξεταζόμενων ουσιών, πραγματοποιηθείσα κατεργασία·

— εφαρμοσθείσα μέθοδο δοκιμής. Για οποιαδήποτε αλλαγή διαδικασίας θα πρέπει να παρέχονται οι επιστημονικοί λόγοι και επεξήγηση·

— δελτίο δεδομένων·

— οποιοδήποτε φαινόμενο αναστολής που παρατηρήθηκε·

— οποιαδήποτε παρατηρηθείσα αβιοτική αποικοδόμηση·

— συγκεκριμένα χημικά αναλυτικά δεδομένα, εφόσον υπάρχουν·

— αναλυτικά δεδομένα για τα ενδιάμεσα προϊόντα, εφόσον υπάρχουν.

— η γραφική παράσταση της επί τοις εκατό αποικοδόμησης σαν συνάρτηση του χρόνου για την εξεταζόμενη ουσία και τις ουσίες αναφοράς θα πρέπει να εμφαίνονται σαφώς η φάση υστέρησης, η φάση αποικοδόμησης, το 10 ήμερο παράθυρο και η κλίση (Παράρτημα 1). Για την γραφική παράσταση, εφόσον η δοκιμή είναι σύμφωνη με τα κριτήρια εγκυρότητας, χρησιμοποιείται ο μέσος όρος της εκατοστιαίας αποικοδόμησης στις φιάλες που περιέχουν την εξεταζόμενη ουσία·

— η επί τοις εκατό απομάκρυνση μετά το 10 ήμερο παράθυρο, στο οριζόντιο τμήμα ή στο τέλος της δοκιμής.

ΜΕΡΟΣ ΙΙ. **ΔΟΚΙΜΗ ΕΛΑΤΤΩΣΗΣ DOC** (Μέθοδος Γ.4-Α)

ΙΙ.1. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Μετρημένος όγκος εμβολιασμένου ανόργανου μέσου που περιέχει γνωστή συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας (10-40 mg DOC/l) σαν αποκλειστική πηγή οργανικού άνθρακα αερίζεται στο σκοτάδι ή σε διάχυτο φως στους 22 ± 2 °C.

▼B

Η αποικοδόμηση παρακολουθείται με ανάλυση DOC σε τακτά χρονικά διαστήματα για μία περίοδο 28 ημερών. Ο βαθμός βιοαποικοδόμησης υπολογίζεται εκφράζοντας τη συγκέντρωση του απομακρυνθέντος DOC (διορθωμένη με βάση το τυφλό) σαν το εκατοστιαίο ποσοστό της υπάρχουσας αρχικά συγκέντρωσης. Ο βαθμός πρωταρχικής βιοαποικοδόμησης μπορεί να υπολογισθεί επίσης με συμπληρωματική χημική ανάλυση που πραγματοποιείται στην αρχή και στο τέλος της επώασης.

II.2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

II.2.1. **Εξοπλισμός**

(α) Κωνικές φιάλες, π.χ. 250 mg έως 2 l, ανάλογα με τον όγκο που απαιτείται για την ανάλυση DOC

(β) Συσκευή ανατάραξης που δέχεται τις κωνικές φιάλες, είτε με αυτόματο έλεγχο θερμοκρασίας ή που χρησιμοποιείται σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας, ικανής ισχύος ώστε να διατηρεί αερόβιες συνθήκες σε όλες τις φιάλες·

(γ) Συσκευή διήθησης, με κατάλληλες μεμβράνες·

(δ) Αναλυτής DOC

(ε) Συσκευή προσδιορισμού διαλελυμένου οξυγόνου·

(στ) Φυγόκεντρος.

II.2.2. **Προετοιμασία ανόργανου μέσου**

Για την παρασκευή του αρχικού διαλύματος, βλ. I.6.2.

Αναμειγνύονται 10 ml διαλύματος (α) με 800 ml νερού αραίωσης, προστίθεται 1 ml από τα διαλύματα (β) έως (δ) και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι 1 λίτρο με νερό αραίωσης.

II.2.3. **Παρασκευή και προεγκλιματισμός εμβολίου**

Το εμβόλιο μπορεί να παράγεται από μια ποικιλία πηγών: ενεργοποιημένη λάσπη λύματα αποχετεύσεων επιφανειακά νερά' χώματα ή ένα μείγμα αυτών.

Βλ. I.6.4. I.6.4.1. I.6.4.2. και I.6.5.

II.2.4. **Προετοιμασία των φιαλών**

Για παράδειγμα, σε δίλιτρες κωνικές φιάλες φέρονται ποσότητες ανόργανου μέσου όγκου 800 ml και προστίθενται επαρκείς όγκοι αρχικών διαλυμάτων της εξεταζόμενης ουσίας και των ουσιών αναφοράς σε ξεχωριστές φιάλες ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση χημικής ουσίας ισοδύναμη με 10-40 ml DOC/1. Ελέγχεται το pH· και ρυθμίζεται αν είναι ανάγκη στο 7,4. Οι φιάλες εμβολιάζονται με ενεργοποιημένη λάσπη ή άλλη πηγή εμβολίων (βλ. I.6.4.), έτσι ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση όχι μεγαλύτερη από 30 mg αιωρούμενων στερεών/1. Παρασκευάζονται επίσης με το εμβόλιο τυφλά στο ανόργανο μέσον χωρίς όμως εξεταζόμενη ή ουσία αναφοράς.

Εάν χρειάζεται, μία φιάλη χρησιμοποιείται για να ελεγχθεί η πιθανή ανασταλτική επίδραση της εξεταζόμενης ουσίας, εμβολιάζοντας διάλυμα που περιέχει, στο ανόργανο μέσον, συγκρίσιμες συγκεντρώσεις της εξεταζόμενης και μιας ουσίας αναφοράς.

Επίσης, εφόσον απαιτείται, ετοιμάζεται μία ακόμη, αποστειρωμένη φιάλη για να ελεγχθεί αν η εξεταζόμενη ουσία αποικοδομείται αβιοτικώς χρησιμοποιώντας μη εμβολιασμένο διάλυμα της ουσίας (βλ. 1.6,6.).

▼B

Επιπλέον, αν υπάρχουν υποψίες ότι η εξεταζόμενη χημική ουσία προσροφάται σε σημαντικό βαθμό στο γυαλί, στη λάσπη, κ.λπ., γίνεται μία προκαταρκτική εκτίμηση για να προσδιορισθεί η πιθανή έκταση της προσρόφησης και με τον τρόπο αυτό η καταλληλότητα της δοκιμής για τη χημική ουσία (βλ. Πίνακα 1).Τοποθετείται μιά φιάλη που περιέχει την εξεταζόμενη ουσία, το εμβόλιο και τόν φορέα αποστείρωσης.

Τα διαλύματα, σε όλες τις φιάλες, συμπληρώνονται μέχρις όγκου 1 λίτρου με ανόργανο μέσον και, αφού ανακατευτούν, λαμβάνεται από κάθε φιάλη ένα δείγμα για να προσδιορισθεί η αρχική συγκέντρωση DOC (βλ. Παράρτημα II.4). Τα στόμια των φιαλών καλύπτονται, π.χ. με φύλλο αλουμινίου, έτσι ώστε να μπορεί να γίνεται ελεύθερη αναλλαγή αέρα μεταξύ φιάλης και της ατμόσφαιρας που περιβάλλει τη φιάλη. Κατόπιν, οι φιάλες εισάγονται στη συσκευή ανατάραξης για να αρχίσει η δοκιμή.

II.2.5. **Αριθμός φιαλών σε μια τυπική διαδικασία δοκιμής**

Φιάλες 1 και 2: εναιώρημα εξεταζόμενης ουσίας

Φιάλες 3 και 4: τυφλό εμβολίου

Φιάλη 5: έλεγχος διαδικασίας

κατά προτίμηση και όταν είναι απαραίτητο

Φιάλη 6: στείρος αβιοτικός έλεγχος

Φιάλη 7: έλεγχος προσρόφησης

Φιάλη 8: έλεγχος τοξικότητας

Βλέπε επίσης I.6.7.

II.2.6. **Εκτέλεση της δοκιμής**

Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις DOC σε κάθε φιάλη δύο φορές σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα αρκετά κοντινά ώστε να μπορεί να προσδιορισθεί η έναρξη του 10 ήμερου παραθύρου και η επί τοις εκατό απομάκρυνση στο τέλος του 10 ήμερου παραθύρου. Για κάθε προσδιορισμό λαμβάνεται μόνον ο ελάχιστος απαιτούμενος όγκος του εναιωρήματος δοκιμής.

Πριν από τη δειγματοληψία, οι απώλειες από τις φιάλες εξαιτίας εξάτμισης αναπληρώνονται προσθέτοντας νερό αραίωσης (I.6.1) στην απαιτούμενη ποσότητα εφόσον χρειάζεται. Πριν από τη λήψη ενός δείγματος, το μέσον καλλιέργειας αναμειγνύεται καλά και εξασφαλίζεται ότι τυχόν υλικό προσκολλημένο στα τοιχώματα των δοχείων διαλύεται ή εναιωρείται πριν από τη δειγματοληψία. Αμέσως μετά τη λήψη δείγματος πρέπει να γίνει διήθηση με μεμβράνη ή φυγοκέντρηση (βλ. Παράρτημα II.4). Τα διηθημένα ή φυγοκεντρημένα δείγματα αναλύονται την ίδια ημέρα, διαφορετικά φυλάσσονται στους 2-4 ^{o}C για 48 ώρες το ανώτερο, ή κάτω από τους - 18 ^{o}C για μεγαλύτερο διάστημα.

II.3. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΗ

II.3.1. **Επεξεργασία των αποτελεσμάτων**

Υπολογίζεται η επί τοις εκατό αποικοδόμηση τη χρονική στιγμή t όπως αναφέρεται στο I.7.1. (προσδιορισμός DOC) και, προαιρετικά, στο I.7.2. (ειδική ανάλυση).

Όλα τα αποτελέσματα καταγράφονται στα φύλλα δεδομένων.

▼B

II.3.2. **Εγκυρότητα των αποτελεσμάτων**

Βλ. I.5.2.

II.3.3. **Έκθεση**

Βλ. I.8.

II.4. ΦΥΛΛΟ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Ένα παράδειγμα φύλλου δεδομένων δίνεται παρακάτω.

ΔΟΚΙΜΗ ΕΛΑΤΤΩΣΗΣ DOC

1. **ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ**

2. **ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΝΑΡΞΗΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ**

3. **ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ**

Όνομα:

Συγκέντρωση αρχικού διαλύματος: ... mg/l, σαν ουσία

Αρχική συγκέντρωση στο μέσον αραίωσης, t_0: ... mg/l, σαν ουσία

4. **ΕΜΒΟΛΙΟ**

Πηγή: ...

Πραγματοποιηθείσα κατεργασία: ...

Προεγκλιματισμός, εφόσον υπήρξε: ...

Συγκέντρωση αιωρούμενων στερεών στο αντιδρόν μείγμα: ... mg/l

5. **ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ ΑΝΘΡΑΚΑ**

Αναλύτης άνθρακα: ...

	Φιάλη αρ.		DOC μετά η ημέρες (mg/I)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Εξεταζόμενη ουσία μαζί με εμβόλιο	1	a_1					
		a_2					
		a, μέσο $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, μέσο $C_{b(t)}$					

▼B

	Φιάλη αρ.		DOC μετά η ημέρες (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Τυφλό εμβολίου χωρίς εξεταζόμενη ουσία	3	C_1					
		C_2					
		c, μέσο $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, μέσο $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΝΑΠΕΞΕΡΓΑΣΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ**

Φιάλη αρ.		% αποικοδόμηση μετά από η ημέρες				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Μέση (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Το D_1 και D_2 δεν πρέπει να παράγουν μέσο όρο αν υπάρχει ανάμεσά τους σοβαρή διαφορά.

Σημείωση: παρόμοιοι τύποι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ουσία αναφοράς και για τους ελέγχους τοξικότητας.

7. **ΑΒΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ** (προαιρετικός)

	Χρόνος (ημέρες)	
	0	t
DOC συγκέντρωση (mg/l) σε στείρο έλεγχο	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ αβιοτική απακοδόμηση} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **ΕΙΔΙΚΗ ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ** (προαιρετική)

	εναπομείνουσα ποσότητα της χημικής ουσίας στο τέλος της δοκιμής	% πρωταρχική βιοαποικοδόμηση
Στείρος έλεγχος	S_b	

▼B

	εναπομείνουσα ποσότητα της χημικής ουσίας στο τέλος της δοκιμής	% πρωταρχική βιοαποικοδόμηση
Εμβολιασμένο μέσο δοκιμής	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

ΜΕΡΟΣ III. **ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΔΟΚΙΜΗ ΟΟΣΑ** (Μέθοδος Γ.4-Β)

III.1. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Καθορισμένος όγκος ανόργανου μέσου που περιέχει γνωστή συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας (10-40 mg DOC/1) σαν μοναδική πηγή οργανικού άνθρακα εμβολιάζεται με 0,5 ml λυμάτων ανά λίτρο μέσου. Το μείγμα αερίζεται στο σκοτάδι ή σε διάχυτο φως στους 22 ± 2 °C.

Η αποικοδόμηση παρακολουθείται με αναλύσεις DOC κατά τακτά χρονικά διαστήματα για μία περίοδο 28 ημερών. Ο βαθμός βιοαποικοδόμησης υπολογίζεται εκφράζοντας τη συγκέντρωση του απομακρυνθέντος DOC (διορθωμένη με βάση το αποτέλεσμα του τυφλού) σαν το εκατοστιαίο ποσοστό της υπάρχουσας αρχικής συγκέντρωσης. Ο βαθμός πρωταρχικής βιοαποικοδόμησης μπορεί επίσης να υπολογισθεί με πρόσθετη χημική ανάλυση που πραγματοποιείται στην αρχή και στο τέλος της επώασης.

III.2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

III.2.1. **Εξοπλισμός**

(α) Κωνικές φιάλες, π.χ. 250 ml μέχρι 2 l, ανάλογα με τον όγκο που απαιτείται για την ανάλυση DOC

(β) Συσκευή ανατάραξης που δέχεται τις κωνικές φιάλες, είτε με αυτόματο έλεγχο θερμοκρασίας ή που χρησιμοποιείται σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας, και ικανής ισχύος ώστε να διατηρεί αερόβιες συνθήκες σε όλες τις φιάλες·

(γ) Συσκευή διήθησης, με κατάλληλες μεμβράνες·

(δ) Αναλύτης DOC·

(ε) Συσκευή προσδιορισμού διαλελυμένου οξυγόνου·

(στ) Φυγόκεντρος.

III.2.2. **Προετοιμασία ανόργανου μέσου**

Για την παρασκευή του αρχικού διαλύματος, βλ. Ι.6.2.

Αναμειγνύονται 10 ml διαλύματος (α) με 800 ml νερού αραίωσης, προστίθεται 1 ml από τα διαλύματα (β) έως (δ) και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι 1 λίτρο με νερό αραίωσης.

Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται μόνον 0,5 ml λυμάτων/λίτρο σαν εμβόλιο και κατά συνέπεια μπορεί το ανόργανο μέσο να χρειάζεται να ενισχυθεί με ιχνοστοιχεία και παράγοντες ανάπτυξης. Αυτό επιτυγχάνεται προσθέτοντας 1 ml από καθένα από τα ακόλουθα διαλύματα ανά λίτρο τελικού μέσου:

▼B

Διάλυμα ιχνοστοιχείων:

Τετράυδρο θειικό μαγγάνιο, $MnSO_4 . 4H_2O$	39,9 mg
Βορικό οξύ, H_3BO_3	57,2 mg
Επτάυδρος θειικός ψευδάργυρος, $ZnSO_4 . 7H_2O$	42,8 mg
Επταμολυβδαινικό αμμώνιο $(NH_4)_6 Mo_7O_{24}$	34,7 mg
Χηλική ένωση Fe ($FeCl_3$-αιθυλενοδιαμινο-τετραοξικό οξύ)	100,0 mg

Τα ανωτέρω διαλύονται και συμπληρώνονται μέχρι όγκου 1 000 ml με νερό αραίωσης.

Διάλυμα βιταμινών:

Εκχύλισμα ζύμης	15,0 mg

Το εκχύλισμα ζύμης διαλύεται σε 100 ml νερό. Αποστειρώνεται περνώντας το διαμέσου μεμβράνης 0,2 μικρών ή παρασκευάζεται πρόσφατα.

III.2.3. **Παρασκευή και προεγκλιματισμός εμβολίου**

Το εμβόλιο παράγεται από δευτερογενή λύματα εγκατάστασης κατεργασίας ή εργαστηριακής μονάδας που δέχεται κύρια οικιακά απόβλητα. Βλ. I.6.4.2. και I.6.5.

Χρησιμοποιούνται 0,5 ml ανά λίτρο ανόργανου μέσου.

III.2.4. **Προετοιμασία των φιαλών**

Για παράδειγμα, σε δίλιτρες κωνικές φιάλες φέρονται ποσότητες ανόργανου μέσου όγκου 800 ml και προστίθενται επαρκείς ποσότητες αρχικών διαλυμάτων της εξεταζόμενης και της ουσίας αναφοράς σε ξεχωριστές φιάλες ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση χημικής ουσίας ισοδύναμη με 10-40 mg DOC/1. Ελέγχεται η τιμή του pH και ρυθμίζεται, αν είναι ανάγκη, στο 7,4. Οι φιάλες εμβολιάζονται με λύματα αποχετεύσεων σε ποσοστό 0,5 ml/λίτρο (βλ. I.6.4.2.). Παρασκευάζονται επίσης μάρτυρες εμβολίου στο ανόργανο μέσον αλλά χωρίς εξεταζόμενη ουσία ή ουσία αναφοράς.

Αν χρειάζεται, χρησιμοποιείται μία φιάλη για να ελέγχεται· η πιθανή ανασταλτική επίδραση της εξεταζόμενης ουσίας, εμβολιάζοντας ένα διάλυμα περιέχον, στο ανόργανο μέσον, συγκρίσιμες συγκεντρώσεις της εξεταζόμενης ουσίας και μιας ουσίας αναφοράς.

Επίσης, αν απαιτείται, ετοιμάζεται μία ακόμη, αποστειρωμένη φιάλη για να ελεγχθεί αν η εξεταζόμενη ουσία αποικοδομείται αβιοτικά χρησιμοποιώντας μη εμβολιασμένο διάλυμα της ουσίας (βλ. 1.6.6.).

Επιπλέον, αν υπάρχουν υποψίες ότι η εξεταζόμενη χημική ουσία προσροφάται σε σημαντικό βαθμό στο γυαλί, στη λάσπη, κ.λπ., γίνεται μία προκαταρκτική εκτίμηση για να προσδιορισθεί η πιθανή έκταση της προσρόφησης και με τον τρόπο αυτό η καταλληλότητα της δοκιμής για την χημική ουσία (βλ. Πίνακα 1). Τοποθετείται μια φιάλη που περιέχει την εξεταζόμενη ουσία, το εμβόλιο και τον φορέα αποστείρωσης.

Τα διαλύματα σε όλες τις φιάλες συμπληρώνονται μέχρις όγκου 1 λίτρου με ανόργανο μέσο και, αφού ανακατευτούν, λαμβάνεται από κάθε φιάλη ένα δείγμα για να προσδιορισθεί η αρχική συγκέντρωση DOC (βλ. Παράρτημα H.4). Τα στόμια των φιαλών καλύπτονται, π.χ. με φύλλο αλουμινίου, έτσι ώστε να μπορεί να γίνεται ελεύθερα ανταλλαγή του αέρα μεταξύ φιάλης και ατμόσφαιρας. Κατόπιν, οι φιάλες εισάγονται στη συσκευή αναταραξης για να αρχίσει η δοκιμή.

▼B

III.2.5. **Αριθμός φιαλών σε μια τυπική διαδικασία δοκιμής**

Φιάλες 1 και 2: εναιώρημα εξεταζόμενης ουσίας

Φιάλες 3 και 4: τυφλό εμβολίου

Φιάλη 5: έλεγχος διαδικασίας

και κατά προτίμηση όταν είναι απαραίτητο

Φιάλη 6: στείρος αβιοτικός έλεγχος

Φιάλη 7: έλεγχος προσρόφησης

Φιάλη 8: έλεγχος τοξικότητας

Βλέπε επίσης I.6.7.

III.2.6. **Εκτέλεση της δοκιμής**

Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις DOC σε κάθε φιάλη δύο φορές σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα αρκετά κοντινά ώστε να μπορεί να προσδιορισθεί η έναρξη του 10 ήμερου παραθύρου και η επί τοις εκατό απομάκρυνση στο τέλος του 10 ήμερου παραθύρου. Για κάθε προσδιορισμό λαμβάνεται μόνον ο ελάχιστος απαιτούμενος όγκος του εναιωρήματος δοκιμής.

Πριν από τη δειγματοληφία, οι απώλειες από τις φιάλες εξαιτίας εξάτμισης αναπληρώνονται προσθέτοντας νερό αραίωσης (I.6.1.) στην απαιτούμενη ποσότητα εφόσον χρειάζεται. Πριν από τη λήψη ενός δείγματος, το μέσον καλλιέργειας αναμειγνύεται καλά και διασφαλίζεται ότι τυχόν υλικό προσκολλημένο στα τοιχώματα των φιαλών διαλύεται ή επαναφέρεται σε εναιώρηση πριν από τη δειγματοληψία. Αμέσως μετά τη λήψη δείγματος πρέπει να γίνει διήθηση από μεμβράνη ή φυγοκέντρηση {βλ. Παράρτημα II.4). Τα διηθημένα ή φυγοκεντρημένα δείγματα αναλύονται την ίδια ημέρα, διαφορετικά φυλάσσονται στους 2-4 ^{o}C για 48 το πολύ ώρες, ή κάτω από τούς - 18 ^{o}C για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

III.3. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

III.3.1. **Επεξεργασία των αποτελεσμάτων**

Υπολογίζεται η επί τοις εκατό αποικοδόμηση τη χρονική στιγμή t όπως αναφέρεται στο I.7.1. (προσδιορισμός DOC) και, προαιρετικά, στο I.7.2. (ειδική ανάλυση).

Όλα τα αποτελέσματα καταγράφονται στα φύλλα δεδομένων.

III.3.2. **Εγκυρότητα των αποτελεσμάτων**

Βλ. I.5.2.

III.3.3. **Έκθεση**

Βλ. I.8.

III.4. ΦΥΛΛΟ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Ένα παράδειγμα φύλλου δεδομένων δίνεται παρακάτω.

ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΔΟΚΙΜΗ ΟΟΣΑ

1. **ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ**

2. **ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΝΑΡΞΗΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ**

▼B

3. **ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ**

Όνομα:

Συγκέντρωση αρχικού διαλύματος: ... mg/l σαν ουσία

Αρχική συγκέντρωση στο μέσον αραίωσης, t_0: ... mg/l σαν ουσία

4. **ΕΜΒΟΛΙΟ**

Πηγή: ...

Πραγματοποιηθείσα κατεργασία: ...

Προεγκλιματισμός, εφόσον υπήρξε: ...

Συγκέντρωση αιωρουμένων στερεών στο αντιδρόν μείγμα: ... mg/l

5. **ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ ΑΝΘΡΑΚΑ**

Αναλυτής άνθρακα: ...

	Φιάλη αρ.		DOC μετά n ημέρες (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Εξεταζόμενη ουσία μαζί με εμβόλιο	1	a_1					
		a_2					
		a, μέσο $^{C}a(t)$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, μέσο $^{C}b(t)$					
Τυφλο εμβολίου χωρίς εξεταζόμενη ουσία	3	c_1					
		c_2					
		c, μέσο $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, μέσο $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΝΑΠΕΞΕΡΓΑΣΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ**

Φιάλη αρ.		% αποικοδόμηση μετά από n ημέρες				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				

▼B

Φιάλη αρ.		% αποικοδόμηση μετά από n ημέρες				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Μέση (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Το D_1 και D_2 δεν πρέπει να παράγουν μέσο όρο αν υπάρχει ανάμεσά τους σοβαρή διαφορά.

Σημείωση: παρόμοιοι τύποι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ουσία αναφοράς και για τους ελέγχους τοξικότητας.

7. **ΑΒΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ** (προαιρετικός)

	Χρόνος (ημέρες)	
	0	τ
DOC συγκέντρωση (mg/l) σε στείρο έλεγχο	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ αβιοτική αποικοδόμηση} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **ΕΙΔΙΚΗ ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ** (προαιρετική)

	εναπομείνασα ποσότητα της χημικής ουσίας στο τέλος της δοκιμής	% πρωταρχική αποικοδόμηση
Στείρος έλεγχος	S_b	
Εμβολιασμένο μέσο δοκιμής	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

ΜΕΡΟΣ IV. ΔΟΚΙΜΗ ΕΚΑΥΣΗΣ CO_2 (Μέθοδος Γ.4-Γ)

IV.1. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Καθορισμένος όγκος εμβολιασμένου ανόργανου μέσου με γνωστή συγκέντρωση εξεταζόμενης ουσίας (10-20 mg DOC ή TOC/l) σαν η αποκλειστική πηγή οργανικού άνθρακα αερίζεται διοχετεύοντας με ελεγχόμενη ταχύτητα αέρα απαλλαγμένο από διοξείδιο του άνθρακα στο σκοτάδι ή στο διάχυτο φώς. Η αποικοδόμηση παρακολουθείται για μία περίοδο 28 ημερών προσδιορίζοντας το παραγόμενο διοξείδιο του άνθρακα, το οποίο παγιδεύεται σε υδροξείδιο του βαρίου ή νατρίου και το οποίο μετριέται με ογκομέτρηση του εναπομείνοντος υδροξειδίου ή σαν ανόργανος άνθρακας. Η ποσότητα διοξειδίου του άνθρακα που παράγεται από την εξεταζόμενη χημική ουσία (διορθωμένη με βάση το αποτέλεσμα του τυφλού) εκφράζεται σαν το εκατοστιαίο ποσοστό του $ThCO_2$. Ο βαθμός βιοαποικοδόμησης μπορεί επίσης να υπολογισθεί με πρόσθετη ανάλυση DOC που πραγματοποιείται στην αρχή και στο τέλος της επώασης.

▼B

IV.2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

IV.2.1. **Εξοπλισμός**

(α) Φιάλες, 2-5 λίτρων, με σωλήνα προσαγωγής αέρα που σχεδόν αγγίζει τον πυθμένα και αντίστοιχη έξοδο·

(β) Μαγνητικοί αναδευτήρες, όταν αξιολογούνται ασθενώς διαλυτικές χημικές ουσίες·

(γ) Φιάλες απορρόφησης αερίου·

(δ) Διάταξη ελέγχου μέτρησης της ροής του αέρα.

(ε) Συσκευή δέσμευσης διοξειδίου του άνθρακα, γτα την παραγωγή αέρα που να είναι πλήρως απαλλαγμένος από διοξείδιο του άνθρακα εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μείγμα οξυγόνου απαλλαγμένο από CO_2 και αζώτου απαλλαγμένο από CO_2, προερχόμενα από κυλίνδρους αερίων, στις σωστές αναλογίες (20 % O_2: 80 % N_2)·

(στ) Διάταξη προσδιορισμού διοξειδίου του άνθρακα, είτε ογκομετρικά είτε με κάποια μορφή αναλυτού ανόργανου άνθρακα

(ζ) Διάταξη διήθησης με μεμβράνη (προαιρετική)'

(η) Αναλυτής DOC (προαιρετικός).

IV.2.2. **Προετοιμασία ανόργανου μέσου**

Για την ετοιμασία των αρχικών διαλυμάτων, βλ. I.6.2.

Αναμειγνύονται 10 ml διαλύματος (α) με 800 ml νερό αραίωσης, προστίθεται 1 ml από τα διαλύματα (β) έως (δ) και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι 1 λίτρο με νερό αραίωσης.

IV.2.3. **Ετοιμασία και προεγκλιματισμός εμβολίου**

Το εμβόλιο παράγεται από ποικιλία πηγών: ενεργοποιημένη λάσπη λύματα αποχετεύσεων επιφανειακά νερά χώματα ή από μείγματα αυτών.

Βλέπε I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. και I.6.5.

IV.2.4. **Προετοιμασία των φιαλών**

Σαν παράδειγμα, οι τιμές όγκου και βάρους που αναφέρονται πιο κάτω, αντιστοιχούν σε πεντάλιτρες φιάλες που περιέχουν 3 λίτρα εναιωρήματος. Αν χρησιμοποιηθούν μικρότεροι όγκοι οι τιμές τροποποιούνται ανάλογα, πρέπει όμως να εξασφαλίζεται ότι το σχηματιζόμενο διοξείδιο του άνθρακα θα μπορεί να μετρηθεί σωστά.

Σε κάθε πεντάλιτρη φιάλη προστίθενται 2 400 ml ανόργανου μέσου. Προστίθεται ο κατάλληλος όγκος από την παρασκευασθείσα ενεργοποιημένη λάσπη (βλ. I.6.4.1. και I.6.5.) ώστε να ληφθεί συγκέντρωση εναιωρούμενων στερεών όχι μεγαλύτερη από 30 mg/1 στον τελικό όγκο των 3 λίτρων του εμβολιασμένου μείγματος. Εναλλακτικά, πρώτα αραιωνεται η παρασκευασμένη λάσπη ώστε να ληφθεί εναιώρημα 500-1 000 mg/1 στο ανόργανο μέσον προτού προστεθεί η κατάλληλη ποσότητα στο περιεχόμενο της πεντάλιτρης φιάλης έτσι ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 30 mg/l με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται μεγαλύτερη ακρίβεια. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες πηγές εμβολίου (βλ. I.6.4.2.).

Στα εμβολιασμένα αυτά μείγματα εμφυσάται όλη τη νύκτα αέρας απαλλαγμένος από $C0_2$ ώστε να καθαρισθεί το σύστημα από CO_2.

▼B

Προστίθεται η εξεταζόμενη ουσία και η ουσία αναφοράς, ξεχωριστά, σαν γνωστοί όγκοι αρχικών διαλυμάτων, σε αντίστοιχες φιάλες ώστε να επιτευχθούν συγκεντρώσεις, μαζί με τις προστεθείσες ουσίες, από 10 έως 20 mg DOC ή TOC/l σε ορισμένες φιάλες δεν προστίθεται ουσία ώστε να χρησιμεύσουν σαν εμβολιασμένοι μάρτυρες. Οι ασθενώς διαλυτές εξεταζόμενες ουσίες προστίθενται απ' ευθείας στις φιάλες με βάση τον όγκο ή το βάρος ή ακολουθείται η διαδικασία του Παραρτήματος ΙΙΙ.

Εφόσον απαιτείται, μία φιάλη χρησιμοποιείται για να ελεγχθεί πιθανή ανασταλτική επίδραση της εξεταζόμενης ουσίας, προσθέτοντας και τις εξεταζόμενες και τις ουσίες αναφοράς στην ίδια συγκέντρωση με εκείνη των άλλων φιαλών.

Επίσης, εφόσον απαιτείται, χρησιμοποιείται μία στείρα φιάλη για να ελεγχθεί μήπως η εξεταζόμενη ουσία αποικοδομείται αβιοτικά χρησιμοποιώντας μη εμβολιασμένο διάλυμα της ουσίας (βλ. 1.6.6). Αποστειρώνεται με προσθήκη μιας τοξικής ουσίας στην κατάλληλη συγκέντρωση.

Ο όγκος των εναιωρημάτων σε όλες τις φιάλες συμπληρώνεται μέχρι τα 3 λίτρα προσθέτοντας ανόργανο μέσον στο οποίο έχει εμφυσηθεί προηγουμένως αέρας απαλλαγμένος από CO_2. Προαιρετικά, μπορούν να ληφθούν δείγματα για ανάλυση DOC (βλ. Παράρτημα ΙΙ.4.) και/ή ειδική ανάλυση. Οι φιάλες προσρόφησης συνδέονται με τις εξόδους αέρα των φιαλών.

Αν χρησιμοποιηθεί υδροξείδιο του βαρίου, σε κάθε πεντάλιτρη φιάλη συνδέονται εν σειρά τρεις φιάλες προσρόφησης που κάθε μία περιέχει 100 ml διαλύματος υδροξειδίου του βαρίου 0,0125 Μ. Το διάλυμα δεν πρέπει να περιέχει ίζημα θειικών και ανθρακικών ενώ η ισχύς του πρέπει να προσδιορίζεται αμέσως πριν από τη χρήση του. Αν χρησιμοποιηθεί υδροξείδιο του νατρίου, συνδέονται δύο παγίδες από τις οποίες η δεύτερη προορίζεται για να ελέγχεται αν έχει δεσμευθεί όλο το διοξείδιο του άνθρακα στην πρώτη. Ιδιαίτερα κατάλληλες είναι οι φιάλες προσρόφησης που είναι εφοδιασμένες με πώματα φιαλών ορού. Σε κάθε φιάλη προστίθενται 200 ml υδροξειδίου του νατρίου 0,05 Μ, ποσότητα που αρκεί για την προσρόφηση όλης της ποσότητας διοξειδίου του άνθρακα που εκλύεται όταν αποικοδομηθεί πλήρως η εξεταζόμενη ουσία. Το διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου, ακόμη κι όταν είναι πρόσφατα παρασκευασμένο, περιέχει ίχνη ανθρακικών. Αυτό διορθώνεται αφαιρώντας τα ανθρακικά του τυφλού.

IV.2.5. **Αριθμός φιαλών σε μία τυπική διαδικασία δοκιμής**

Φιάλες 1 και 2: εναιώρημα εξεταζόμενης ουσίας

Φιάλες 3 και 4: τυφλό εμβολίου

Φιάλη 5: έλεγχος διαδικασίας

και κατά προτίμηση όταν είναι απαραίτητο

Φιάλη 6: στείρος αβιοτικός έλεγχος

Φιάλη 7: έλεγχος προσρόφησης

Φιάλη 8: έλεγχος τοξικότητας

Βλέπε επίσης 1.6.7.

IV.2.6. **Εκτέλεση της δοκιμής**

Η δοκιμή αρχίζει διοχετεύοντας αέρα απαλλαγμένο από $C0_2$ διαμέσου των εναιωρημάτων με ρυθμό παροχής 30-100 ml/min. Για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε CO_2 λαμβάνονται περιοδικά δείγματα προσροφημένου διοξειδίου του άνθρακα. Τις πρώτες δέκα ημέρες συνιστάται οι αναλύσεις να πραγματοποιούνται κάθε δεύτερη ή τρίτη ημέρα και κατόπιν κάθε πέμπτη ημέρα μέχρι την 28η ημέρα έτσι ώστε να μπορεί να πιστοποιηθεί η περίοδος του 10 ήμερου παραθύρου.

▼B

Την 28η ημέρα, λαμβάνονται δείγματα (προαιρετικά! για ανάλυση DOC και/ή ειδική ανάλυση, μετριέται το pH των εναιωρημάτων και προστίθεται 1 ml πυκνού υδροχλωρικού οξέος σε κάθε φιάλη. Στις φιάλες διοχετεύεται όλη τη νύκτα αέρας για να απομακρυνθεί το διοξείδιο του άνθρακα που υπάρχει στα εξεταζόμενα εναιωρήματα. Την 29η ημέρα, πραγματοποιείται η τελευταία ανάλυση του εκλυόμενου διοξειδίου του άνθρακα.

Τις ημέρες που πραγματοποιείται η μέτρηση του CO_2, η πλησιέστερη στη φιάλη παγίδα υδροξειδίου του βαρίου αποσυνδέεται και το διάλυμα του υδροξειδίου τιτλοδοτείται με HCl 0,05 M χρησιμοποιώντας σαν δείκτη φαινολοφθαλίνη. Οι εναπομένουσες φιάλες προσρόφησης μετακινούνται μία θέση πλησιέστερα στη φιάλη και στο απώτερο άκρο της σειράς τοποθετείται μιά νέα παγίδα περιέχουσα 100 ml πρόσφατα παρασκευασθέντος υδροξειδίου του βαρίου 0,0125 M. Οι τιτλοδοτήσεις γίνονται ανάλογα με το πότε κρίνεται απαραίτητο, π.χ., όταν εμφανίζεται σημαντική ποσότητα ιζήματος στην πρώτη παγίδα και προτού εμφανισθεί ίζημα στη δεύτερη, ή τουλάχιστον μιά φορά την εβδομάδα. Εναλλακτικά, όταν χρησιμοποιείται σαν μέσον προσρόφησης το NaOH, λαμβάνεται με σύριγγα μικρό δείγμα (ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του χρησιμοποιούμενου αναλυτή άνθρακα) του διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου από τη φιάλη προσρόφησης που είναι πλησιέστερα στη φιάλη δοκιμής. Το δείγμα εισάγεται στο τμήμα IC του αναλυτή άνθρακα για τον απευθείας προσδιορισμό του εκλυθέντος διοξειδίου του άνθρακα.

Το περιεχόμενο της δεύτερης παγίδας υποβάλλεται σε ανάλυση στο τέλος μόνον της δοκιμής ώστε να γίνουν τυχόν διορθώσεις εφόσον έχει διαφύγει στη δεύτερη παγίδα ποσότητα διοξειδίου του άνθρακα.

IV.3. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

IV.3.1. **Επεξεργασία των αποτελεσμάτων**

Η ποσότητα του CO_2 που δεσμεύεται σε φιάλη προσρόφησης μπορεί να υπολογισθεί, μετά την τιτλοδότηση, με τον ακόλουθο τύπο:

$$\text{mg } CO_2 = (100 \times C_B - 0{,}5 \times V \times C_A) \times 44$$

όπου:

V = όγκος HCl που απαιτήθηκε για την ογκομέτρηση των 100 ml στη φιάλη προσρόφησης (ml),

C_B = συγκέντρωση του διαλύματος υδροξειδίου του βαρίου (M),

C_A = συγκέντρωση του διαλύματος υδροχλωρικού οξέος (M),

εάν η C_B είναι 0,0125 M και C_A είναι 0,05 M, η τιτλοδότηση των 100 ml υδροξειδίου του βαρίου απαιτεί 50 ml και το βάρος του CO_2 δίνεται από τον τύπο:

$$\frac{0{,}05}{2} \times 44 \times \text{ml HCI titrated} = 1{,}1 \times \text{ml HCI}$$

Έτσι, στην περίπτωση αυτή, για την μετατροπή του όγκου του απαιτηθέντος HC1 σε mg παραχθέντος CO_2 ο συντελεστής είναι 1,1.

Υπολογίζεται το βάρος του CO_2 που παρήχθη μόνο από το εμβόλιο και από το εμβόλιο μαζί με την εξεταζόμενη χημική ουσία χρησιμοποιώντας τις αντίστοιχες τιμές τιτλοδότησης και η διαφορά είναι το βάρος του CO_2 που παρήχθη από τη χημική ουσία μόνη της.

Για παράδειγμα, άν το εμβόλιο μόνο του παρέχει όγκο τιτλοδότησης 48 ml και το εμβόλιο μαζί με τη χημική ουσία παρέχει 45 ml, τότε

$$CO_2 \text{ από εμβόλιο} = 1{,}1 \times (50\text{-}48) = 2{,}2 \text{ mg}$$

▼B

CO_2 από το εμβόλιο μαζί με χημική ουσία = 1,1 × (50-45) = 5,5 mg

και έτσι το βάρος του CO_2 που παράγεται από την εξεταζόμενη ουσία είναι 3,3 mg.

Η βιοαποικοδόμηση επί τοις εκατό υπολογίζεται με τον τύπο:

$$\%\text{degradation} = \frac{\text{mg } CO_2 \text{ produced} \times 100}{ThCO_2 \times \text{mg test chemical added}}$$

η,

$$\%\text{degradation} = \frac{\text{mg } CO_2 \text{ produced} \times 100}{\text{mg TO added in test} \times 3{,}67}$$

όπου το 3,67 είναι ο συντελεστής; μετατροπής (44/12; του άνθρακα σε διοξείδιο του άνθρακα.

Η επί τοις εκατό αποικοδόμηση μετά από ένα ορισμένο χρονικό διάστημα υπολογίζεται προαθέτοντας το ποσοστό των τιμών $ThCO_2$ που υπολογίζονται για κάθε μια από τις ημέρες, μέχρι τη χρονική στιγμή, κατά την οποία έγινε η μέτρηση.

Στην περίπτωση φιαλών προσρόφησης με υδροξείδιο του νατρίου, η ποσότητα του παραγομένου διοξειδίου του άνθρακα υπολογίζεται, εκφρασμένη σε IC (mg), πολλαπλασιάζοντας τη συγκέντρωση του IC στο μέσον προσρόφησης επί τον όγκο του μέσου προσρόφησης.

Η επί τοις εκατό αποικοδόμηση υπολογίζεται με τον τύπο:

$$\%\text{ of } ThCO_2 = \frac{\text{mg IC flask} - \text{mg IC blank}}{\text{MG TOC added as test chemical}} \times 100$$

Οι τιμές του απομακρυνθέντος DOC (προαιρετικά) υπολογίζονται όπως περιγράφεται στο 1.7. Οι τιμές αυτές καθώς και όλα τα άλλα αποτελέσματα καταγράφονται στα φύλλα δεδομένων.

IV.3.2. **Εγκυρότητα των αποτελεσμάτων**

Η περιεκτικότητα σε IC του εναιωρήματος της εξεταζόμενης χημικής ουσίας στο ανόργανο μέσον στην αρχή της δοκιμής πρέπει να είναι μικρότερη του 5 % του TC και η ολική έκλυση CO_2 στο τυφλό στο τέλος της δοκιμής δεν θα πρέπει κανονικά να υπερβαίνει τα 40 mg/l μέσου. Εάν ληφθούν τιμές μεγαλύτερες από 70 mg CO_2/l, θα πρέπει να γίνει επανεξέταση των δεδομένων και της πειραματικής τεχνικής.

Βλ. επίσης I.5.2.

IV.3.3. **Έκθεση**

Βλ. I.8.

IV.4. ΦΥΛΛΟ ΔΕΛΟΜΕΝΩΝ

Ένα παράδειγμα φύλλου δεδομένων δίνεται παρακάτω.

KOHLENDIOXIDENTWICKLUNGSTEST

1. **ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ**

2. **ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΝΑΡΞΗΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ**

3. **ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ**

Όνομα:

Συγκέντρωση αρχικού διαλύματος: ... mg/l σαν ουσία

▼B

Αρχική

συγκέντρωση στο ανόργανο μέσον: ... mg/l σαν ουσία

Συνολική

ποσότητα C προστειθέμενη στη φιάλη: ... mg C

$ThCO_2$: ... mg CO_2

4. **ΕΜΒΟΛΙΟ**

Πηγή: ...

Πραγματοποιηθείσα κατεργασία: ...

Προεγκλιματισμός, εφόσον υπήρξε: ...

Συγκέντρωση αιωρούμενων στερεών στο αντιδρόν μείγμα: ... mg/l

5. **ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΔΙΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ ΚΑΙ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΙΜΟΤΗΤΑ**

Μέθοδος: $Ba(OH)_2$/NaOH/άλλα ...

Χρόνος (ημέρα)	Σχηματισθέν CO_2 Δοκιμή (mg)		Σχηματισθέν CO_2 Τυφλό (mg)		Σχηματισθέν CO_2 αθροιστικό (mg) (δοκιμή μείον τυφλό μέσον)		% $ThCO_2$ αθροιστικό $\frac{CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	1 / 2	μέση	3 / 4	μέση	1	2	1	2	μέσο
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Σημείωση: για την ουσία αναφοράς και για τους ελέγχους τοξικότητας μπορούν να χρησιμοποιηθούν παρόμοιες διατάξεις.

6. **ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΝΘΡΑΚΑ** (προαιρετική)

Αναλυτής άνθρακα: ...

Χρόνος(ημέρα)	Τυφλό mg/l	Εξεταζόμενη ουσία mg/l
0	$C_{b(o)}$	C_o
28 (*)	$C_{b(t)}$	C_t

(*) ή στο τέλος της επώασης.

▼B

$$\% \text{ DOC απομακαρυνθείς} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_o - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **ΑΒΙΟΤΙΚΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ** (προαιριτική)

$$\% \text{ αβιοτική αποικοδόμηση} = \frac{CO_2 \text{ Σχηματισθέν στείρα φιάλη μετά 28 ημέρες (mg)}}{ThCO_2 \text{ (mg)}} \times 100$$

ΜΕΡΟΣ V. **ΔΟΚΙΜΗ ΜΑΝΟΜΕΤΡΙΚΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΙΟΜΕΤΡΙΑΣ** (Μέθοδος Γ.4-Δ)

V.1. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Μετρημένος όγκος εμβολιασμένου ανόργανου μέσου με γνωστή συγκέντρωση εξεταζόμενης ουσίας (100 mg/l εξεταζόμενη ουσία ώστε να λαμβάνονται τουλάχιστον 50-100 mg ThOD/l) σαν η μόνη και αποκλειστική πηγή οργανικού άνθρακα, αναδεύεται σε κλειστή φιάλη σε σταθερή θερμοκρασία (± 1 °C ή και λιγότερο) για χρονικό διάστημα μέχρι 28 ημέρες. Η κατανάλωση οξυγόνου προσδιορίζεται είτε μετρώντας την ποσότητα οξυγόνου (που παράγεται ηλεκτρολυτικά) που απαιτείται για να διατηρηθεί σταθερός ο όγκος των αερίων στην αναπνευσιομε-τρική φιάλη είτε από την αλλαγή του όγκου ή της πίεσης (ή και συνδυασμού των δύο) στη συσκευή. Το εκλυόμενο διοξείδιο του άνθρακα προσροφάται σε διάλυμα υδροξειδίου του καλίου ή σε άλλο κατάλληλο προσροφητικό μέσο. Η ποσότητα οξυγόνου που αναλώνεται από την εξεταζόμενη ουσία (διορθωμένη σε σχέση με την ανάλωση στο τυφλό, το οποίο διεξάγεται παράλληλα) εκφράζεται σαν το εκατοστιαίο ποσοστό του ThOD ή COD. Προαιρετικά, πρωτογενής βιοαποικοδόμηση μπορεί επίσης να υπολογισθεί με συμπληρωματική ειδική ανάλυση DOC πραγματοποιούμενη στην αρχή και στο τέλος της επώασης και στη φάση της τελικής βιοαποικοδόμησης.

V.2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

V.2.1. **Εξοπλισμός**

(α) κατάλληλο αναπνευσιόμετρο·

(β) διάταξη ελέγχου θερμοκρασίας, με ανοχή ± 1 °C ή λιγότερο·

(γ) διάταξη διήθησης με μεμβράνη (προαιρετική)·

(δ) αναλυτής άνθρακα (προαιρετικός).

V.2.2. **Προετοιμασία του ανόργανου μέσου**

Για την ετοιμασία των αρχικών διαλυμάτων, βλ. I.6.2.

Αναμειγνύονται 10 ml διαλύματος (α) με 800 ml νερό αραίωσης, προστίθεται 1 ml από τα διαλύματα (β) έως (δ) και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι το 1 λίτρο με νερό αραίωσης.

V.2.3. **Παρασκευή και προεγκλιματισμός εμβολίου**

Το εμβόλιο παράγεται από ποικιλία πηγών: ενεργοποιημένη λάσπη·λύματα αποχετεύσεων·επιφανειακά νερά·χώματα ή από μείγματα αυτών.

Βλέπε I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. και I.6.5.

V.2.4. **Προετοιμασία των φιαλών**

Παρασκευάζονται διαλύματα της εξεταζόμενης ουσίας και της ουσίας αναφοράς, ξεχωριστά, σε ανόργανο μέσον που να αντιστοιχούν σε συγκέντρωση, κανονικά, 100 mg ουσίας/l (που αντιστοιχεί σε 50-100 mg ThOD/l τουλάχιστον), χρησιμοποιώντας αρχικά διαλύματα.

▼B

Υπολογίζεται το ThOD βάσει του σχηματισμού αμμωνιακών αλάτων εκτός κι αν αναμένεται νιτροποίηση, οπότε ο υπολογισμός θα πρέπει να βασίζεται στο σχηματισμό νιτρικών (βλ. Παράρτημα II.2.)

Προσδιορίζονται οι τιμές pH και, εφόσον χρειάζεται, ρυθμίζονται στο 7,4 ± 0,2.

Ασθενώς διαλυτές ουσίες θα πρέπει να προστίθενται σε ένα μεταγενέστερο στάδιο (βλ. παρακάτω).

Εάν πρέπει να προσδιορισθεί η τοξικότητα της εξεταζόμενης ουσίας, παρασκευάζεται ένα ακόμη διάλυμα σε ανόργανο μέσον που περιέχει τόσο την εξεταζόμενη ουσία όσο και την ουσία αναφοράς με τις ίδιες συγκεντρώσεις όπως και στα ατομικά διαλύματα.

Εάν απαιτείται να μετρηθεί η φυσικοχημική ανάλωση οξυγόνου, παρασκευάζεται διάλυμα της εξεταζόμενης ουσίας που αντιστοιχεί, κανονικά, σε 100 mg ThOD/l και το οποίο αποστειρώνεται με την προσθήκη κατάλληλης τοξικής ουσίας. (βλ. I.6.6.).

Σε διπλές τουλάχιστον φιάλες, φέρεται ο αναγκαίος όγκος διαλυμάτων εξεταζόμενης ουσίας και της ουσίας αναφοράς. Σε άλλες φιάλες φέρεται μόνον ανόργανο μέσον (σαν μάρτυρας εμβολίου) και, εφόσον απαιτείται, το μεικτό διάλυμα εξεταζόμενης/ουσίας αναφοράς και το στείρο διάλυμα.

Εάν η εξεταζόμενη ουσία είναι ασθενώς διαλυτή, η ουσία προστίθεται απ ευθείας στο στάδιο αυτό με βάση το βάρος ή τον όγκο ή ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφεται στο Παράρτημα III. Προστίθεται υδροξείδιο του καλίου, σφαιρίδια νατρασβέστου ή άλλο προσροφητικό μέσον στις φιάλες προσρόφησης του CO_2.

V.2.5. **Αριθμός φιαλών σε μία τυπική διαδικασία δοκιμής**

Φιάλες 1 και 2: εναιώρημα εξεταζόμενης ουσίας

Φιάλες 3 και 4: τυφλό εμβολίου

Φιάλη 5: έλεγχος διαδικασίας

και κατά προτίμηση όταν είναι απαραίτητο

Φιάλη 6: στείρος αβιοτικός έλεγχος

Φιάλη 7: έλεγχος τοξικότητας

Βλέπε επίσης 1.6.7.

V.2.6. **Εκτέλεση της δοκιμής**

Οι φιάλες αφήνονται να φθάσουν στην επιθυμητή θερμοκρασία και αυτές που πρέπει εμβολιάζονται με παρασκευασθείσα ενεργοποιημένη λάσπη ή άλλη πηγή εμβολίου έτσι ώστε να ληφθεί συγκέντρωση αιωρουμένων στερεών που να μην είναι μεγαλύτερη από 30 mg/l. Η όλη διάταξη συναρμολογείται, τίθεται σε λειτουργία ο αναδευτήρας και ελέγχεται η στεγανότητα και αρχίζει η μέτρηση της ανάλωσης οξυγόνου. Συνήθως δεν χρειάζεται καμία άλλη ιδιαίτερη πρόνοια εκτός από το να λαμβάνονται οι αναγκαίες μετρήσεις και να γίνονται καθημερινοί έλεγχοι για να διαπιστώνεται αν διατηρούνται η σωστή θερμοκρασία και η κατάλληλη ανάδευση.

Η ανάλωση του οξυγόνου υπολογίζεται από τις μετρήσεις που γίνονται σε τακτά χρονικά διαστήματα, χρησιμοποιώντας τις μευΟυΟυς που αναφέρει ο κατασκευαστής του εξοπλισμού. Στο τέλος της επώασης, που είναι κανονικά 28 ημέρες, μετριέται το pH του περιεχομένου των φιαλών, ιδιαίτερα αν οι αναλώσεις οξυγόνου είναι μικρότερες ή μεγαλύτερες από την $ThOD_{NH4}$ (για ενώσεις που περιέχουν άζωτο).

▼B

Εφόσον απαιτείται, στην αρχή και στο τέλος, λαμβάνονται από τις αναπνευσιομετρικές φιάλες δείγματα, για ανάλυση DOC ή ειδικής χημικής ουσίας (βλ. Παράρτημα II.4). Στην αρχική δειγματολειφία, εξασφαλίζεται ότι ο όγκος του εξεταζόμενου εναιωρήματος που παραμένει στη φιάλη είναι γνωστός. Όταν το οξυγόνο καταναλώνεται από εξεταζόμενη ουσία που περιέχει N, προσδιορίζεται η αύξηση στη συγκέντρωση νιτρωδών και νιτρικών σε διάστημα 28 ημερών και υπολογίζεται η διόρθωση για το οξυγόνο που καταναλώνεται με τη νιτροποίηση (Παράρτημα V).

V.3. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

V.3.1. **Επεξεργασία των αποτελεσμάτων**

= mg O_2 ανά mg εξεταζόμενης ουσίας.

$$\mathrm{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ uptake by test chemical} - \text{mg } O_2 \text{ uptake by blank})}{(\text{mg test chemical in flask})}$$

Η επί τοις εκατό βιοαποικοδόμηση υπολογίζεται είτε από:

ή από:

$$\%\ \text{biodegradation} = \%\ \mathrm{ThOD} = \frac{\mathrm{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg chemical})}{\mathrm{ThOD}(\text{mg } O_2 \text{ chemical})} \times 100$$

Η ανάλωση οξυγόνου (mg) της εξεταζόμενης ουσίας μετά από δεδομένο χρονικό διάστημα (διορθωμένη σε σχέση με την ανάλωση του τυφλού για το ίδιο χρονικό διάστημα) διαιρείται με το βάρος της χρησιμοποιούμενης εξεταζόμενης χημικής ουσίας. Το λαμβανόμενο αποτέλεσμα παρέχει το BOD εκφρασμένο σαν mg οξυγόνου/mg εξεταζόμενης ουσίας, δηλ.:

$$\%\ \mathrm{COD} = \frac{\mathrm{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg chemical})}{\mathrm{COD}(\text{mg } O_2 \text{ chemical})} \times 100$$

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι δύο αυτές μέθοδοι δεν δίνουν κατ' ανάγκη την ίδια τιμή· προτιμότερο είναι να χρησιμοποιείται η πρώτη μέθοδος.

Για τις εξερταζόμενες ουσίες που περιέχουν άζωτο, χρησιμοποιείται η κατάλληλη παράμετρος ThOD σύμφωνα με το τι είναι γνωστό ή τι αναμένεται όσον αφορά τη μεσολάβηση νιτροποίησης (Παράρτημα II.2). Εάν παρ' όλα αυτά, επέρχεται νιτροποίηση που δεν είναι όμως πλήρης, υπολογίζεται μία διορθωτική τιμή για το οξυγόνο που καταναλίσκεται για νιτροποίηση από τις αλλαγές στη συγκέντρωση των νιτρωδών και νιτρικών (Παράρτημα V).

Όταν εκτελούνται προαιρετικοί προσδιορισμοί οργανικού άνθρακα και/ή ειδικής χημικής ουσίας, η επί τοις εκατό αποικοδόμηση υπολογίζεται όπως περιγράφεται στο 1.7.

Όλα τα αποτελέσματα καταγράφονται στα φύλλα δεδομένων.

V.3.2. **Εγκυρότητα των αποτελεσμάτων**

Η κατανάλωση οξυγόνου από το τυφλό του εμβολίου είναι κανονικά 20-30 mg O_2/l και δεν θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 60 mg/l σε 28 ημέρες. Τιμές μεγαλύτερες από 60 mg/l απαιτούν επισταμένη εξέταση των δεδομένων και των πειραματικών τεχνικών. Εάν η τιμή του pH είναι έξω από τα όρια του 6-8,5 και η κατανάλωση οξυγόνου από την εξεταζόμενη ουσία είναι μικρότερη του 60 %, η δοκιμή θα πρέπει να επαναληφθεί με μικρότερη συγκέντρωση εξεταζόμενης ουσίας.

Βλ. επίσης 1.5.2.

▼B

V.3.3. **Έκθεση**

Βλ. 1.8

V.4. **ΦΥΛΛΟ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ**

Ένα παράδειγμα φύλλου δεδομένων δίνεται παρακάτω.

ΔΟΚΙΜΗ ΜΑΝΟΜΕΤΡΙΚΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΙΟΜΕΤΡΙΑΣ

1. **ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ**

2. **ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΝΑΡΞΗΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ**

3. **ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ**

Όνομα:

Συγκέντρωση αρχικού διαλύματος: ... mg/l σαν ουσία

Αρχική συγκέντρωση στο ανόργανο μέσον, C_0: ... mg/l σαν ουσία

Όγκος στη φιάλη δοκιμής (V): ...

ThOD ή COD: ... mg O_2/mg ουσίας εξεταζόμενης (NH_4, $N0_3$)

4. **ΕΜΒΟΛΙΟ**

Πηγή: ...

Πραγματοποιηθείσα κατεργασία: ...

Προεγκλιματισμός, εφόσον υπήρξε: ...

Συγκέντρωση αιωρουμένων στερεών στο αντιδρόν μείγμα: ... mg/l

5. **ΡΑΝΑΛΩΣΗ ΟΞΥΓΟΝΟΥ: ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΙΜΟΤΗΤΑ**

		Χρόνος (ημέρες)											
		0		7		14			21			28	
O_2 αναλώμενο (mg) εξεταζόμενη ουσία	1												
	2												
	3, μέση												
O_2 αναλώμενο (mg) τυφλό	3												
	4												
	B, μέση												
Διορθωμένο BOD (mg)	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
BOD ανά mg εξεταζόμενης ουσίας	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												

▼B

		Χρόνος (ημέρες)											
		0		7		14			21			28	
% αποικοδόμηση $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$	D_1 (a_1)												
	D_2 (a_2)												
	Μέση (*)												

V = όγκος μέσου στη φιάλη δοκιμής.
(*) Δεν πρέπει να εξάγεται μέσος όρος για το D_1 και D_2 αν υπάρχει αναμεσά τους σοβαρή διαφορά.

Σημείωση: παρόμοιες διατάξεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την ουσία αναφοράς και για τους ελέγχους τοξικότητας.

6. **ΔΙΟΡΘΩΣΗ ΓΙΑ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗ** (Βλέπε Παράρτημα V)

Ημέρα		0	28	Διαφορά
(i)	Συγκέντρωση νιτρικών (mg N/l)			(N)
(ii)	Ισοδύναμο οξυγόνο (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
(iii)	Ισοδύναμο νιτρωδών (mg N/l)			(N)
(iv)	Ισοδύναμο οξυγόνο (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
(ii + iv)	Ολικό ισοδύναμο οξυγόνο	—	—	

7. **ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΝΘΡΑΚΑ** (προαιρετική)

Αναλυτής άνθρακα: ...

Χρόνος (ημέρα)	Τυφλό mg/l	Εξεταζόμενη ουσία mg/l
0	(C_{blo})	(C_o)
28 (*)	(C_{blt})	(C_t)

(*) ή στο τέλος της επώασης.

$$\% \text{ DOC} - \text{απομακαρυνθείς} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **ΕΙΔΙΚΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ** (προαιρετική)

S_b = συγκέντρωση σε φυσικοχημικό (στείρο) μάρτυρα στις 28 ημέρες.

S_a = συγκέντρωση σε εμβολιασμένη φιάλη στις 28 ημέρες

$$\% \text{ βιοαποικοδόμηση} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **ΑΒΙΟΤΙΚΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ** (προαιρετική)

α = κατανάλωση οξυγόνου σε στείρες φιάλες μετά από 28 ημέρες (mg)

$$\text{χατανάλωση οξυγόνου ανά mg εξεταζόμενης ουσίας} = \frac{a \times 100}{C_o V}$$

▼B

(βλέπε τμήματα 1 και 3)

$$\% \text{ αβιοτική αποιχοδόμηση} = \frac{a \times 100}{C_o V \times ThOD}$$

ΜΕΡΟΣ VI. **ΔΟΚΙΜΗ ΚΛΕΙΣΤΗΣ ΦΙΑΛΗΣ** (Μέθοδος Γ. 4-Ε)

VI.1. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Το διάλυμα της εξεταζόμενης ουσίας σε ανόργανο μέσο, συνήθως 2-5 mg/l, εμβολιάζεται με σχετικά μικρό αριθμό μικροοργανισμών από μεικτό πληθυσμό και φυλάσσεται σε πλήρως γεμισμένες, κλειστές φιάλες στο σκοτάδι σε σταθερή θερμοκρασία. Η αποικοδόμηση παρακολουθείται με ανάλυση του διαλελυμένου οξυγόνου για χρονικό διάστημα 28 ημερών. Η ποσότητα του οξυγόνου που καταναλίσκεται από την εξεταζόμενη ουσία, διορθωμένη κατά την ανάλωση του τυφλού που διενεργείται παράλληλα, εκφράζεται σαν το εκατοστιαίο ποσοστό του ThOD ή COD.

VI.2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

VI.2.1. **Εξοπλισμός**

α) Φιάλες BOD, με γυάλινα πώματα, π.χ. 250-300 ml.

β) Υδρόλουτρο ή επωαστικός θάλαμος, για να διατηρούνται οι φιάλες σε σταθερή θερμοκρασία (± 1 °C ή και λιγότερο) μακρυά από το φως·

γ) Μεγάλες γυάλινες φιάλες (2-5 λίτρων) για την ετοιμασία των ανόργανων μέσων και για το γέμισμα των φιαλών BOD·

δ) Ηλεκτρόδιο και μετρητής οξυγόνου, ή όργανα και αντιδραστήρια για τιτλοδότηση Winkler.

VI.2.2. **Προετοιμασία του ανόργανου μέσου**

Για την ετοιμασία του αρχικού διαλύματος, βλ. 1.6.2.

Αναμειγνύεται 1 ml διαλύματος (α) έως (δ) και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι το ένα λίτρο με νερό αραίωσης.

VI.2.3. **Ετοιμασία του εμβολίου**

Το εμβόλιο κανονικά παράγεται από δευτερογενή λύματα μονάδας κατεργασίας ή εργαστηριακής μονάδας που δέχεται κυρίως οικιακά λύματα. Εναλλακτική πηγή εμβολίου είναι τα επιφανειακά νερά. Χρησιμοποιούνται κανονικά μιά σταγόνα (0,05 ml) έως 5 ml διηθήματος ανά λίτρο μέσου. Πιθανόν να χρειασθούν δοκιμές για τον καθορισμό του καταλλήλου όγκου για δεδομένα λύματα, (βλέπε 1.6.4.2. και 1.6.5.)

VI.2.4. **Προετοιμασία των φιαλών**

Στο ανόργανο μέσο διαβιβάζεται για τουλάχιστον 20 λεπτά, ισχυρό ρεύμα αέρα. Κάθε σειρά δοκιμών πραγματοποιείται με ανόργανο μέσο που προέρχεται από την ίδια παρτίδα. Γενικά, το μέσο είναι έτοιμο να χρησιμοποιηθεί αφού παραμείνει επί 20 ώρες στη θερμοκρασία δοκιμής. Προσδιορίζεται η συγκέντρωση του διαλελυμένου οξυγόνου για να χρησιμεύσει σαν μάρτυρας. Η τιμή θα πρέπει να είναι περίπου 9 mg/l στους 20 °C. Όλες οι εργασίες μεταφοράς και γεμίσματος του κορεσμένου σε αέρα μέσου διεξάγονται χωρίς να υπάρχουν φυσαλλίδες, π· χ., χρησιμοποιώντας σιφώνια.

▼B

Ετοιμάζονται παράλληλες ομάδες φιαλών BOD για τον προσδιορισμό της εξεταζόμενης ουσίας και της ουσίας αναφοράς σε ταυτόχρονες πειραματικές σειρές. Επαρκής αριθμός φιαλών BOD, συμπεριλαμβανομένων και φιαλών τυφλού, συνδυάζονται έτσι ώστε να μπορούν να γίνουν διπλές τουλάχιστον μετρήσεις κατανάλωσης οξυγόνου στις επιθυμητές χρονικές στιγμές, π.χ., μετά 0, 7, 14, 21 και 28 ημέρες. Για να εξασφαλισθεί η δυνατότητα αναγνώρισης του 10 ήμερου παραθύρου, μπορεί να απαιτηθούν περισσότερες φιάλες.

Ανόργανο μέσο που έχει υποστεί πλήρη αερισμό, φέρεται σε μεγάλες φιάλες έτσι ώστε αυτές να είναι γεμάτες περίπου κατά το ένα τρίτο. Προστίθεται κατόπιν επαρκής ποσότητα των αρχικών διαλυμάτων της εξεταζόμενης ουσίας και της ουσίας αναφοράς σε ξεχωριστές μεγάλες φιάλες έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση των ουσιών να μην είναι κανονικά μεγαλύτερη από 10 mg/l. Στο μέσο που θα παίξει ρόλο τυφλού και περιέχεται σε μία άλλη μεγάλη φιάλη, δεν προστίθεται καμία από τις ουσίες.

Προκειμένου να εξασφαλισθεί ο μη περιορισμός της δραστικότητας του εμβολίου, η συγκέντρωση του διαλελυμένου οξυγόνου δεν πρέπει να πέφτει κάτω από τα 0,5 mg/l στις φιάλες BOD. Αυτό περιορίζει τη συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας σε 2 mg/l περίπου. Παρ' όλα αυτά, για ασθενώς αποικοδομήσιμες ενώσεις και για ενώσεις με χαμηλό ThOD, μπορούν να χρησιμοποιηθούν 5-10 mg/l. Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να είναι επιθυμητό να ετοιμασθούν παράλληλες σειρές εξεταζόμενης ουσίας με δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις, για παράδειγμα, 2 και 5 mg/l. Κανονικά, το ThOD υπολογίζεται με βάση τον σχηματισμό αμμωνιακών αλάτων αλλά, αν αναμένεται ή είναι γνωστό ότι επήλθε νιτροποίηση, υπολογίζεται με βάση τον σχηματισμό νιτρικών ($ThOD_{N03}$: βλέπε Παράρτημα II.2). Παρ' όλα αυτά, αν επέρχεται νιτροποίηση χωρίς να είναι πλήρης, γίνονται διορθώσεις με βάση τις αλλαγές στη συγκέντρωση νιτρωδών και νιτρικών, που προσδιορίζεται με ανάλυση (βλέπε Παράρτημα V).

Εάν πρέπει να διερευνηθεί η τοξικότητα της εξεταζόμενης ουσίας (στην περίπτωση, για παράδειγμα, που έχει βρεθεί προηγούμενα χαμηλή τιμή βιοαποικοδομησιμότητας), χρειάζεται μία άλλη σειρά φιαλών.

Ετοιμάζεται μια άλλη μεγάλη φιάλη που περιέχει ανόργανο μέσον που έχει υποβληθεί σε εμφύσηση αέρα (στο ένα τρίτο περίπου του όγκου της) μαζί με εξεταζόμενη ουσία και ουσία αναφοράς. Οι τελικές συγκεντρώσεις είναι κανονικά οι ίδιες με τις συγκεντρώσεις στις άλλες μεγάλες φιάλες.

Τα διαλύματα στις μεγάλες φιάλες εμβολιάζονται με δευτερογενή λύματα (μία σταγόνα ή περίπου 0,05 ml, έως 5 ml/l) ή με μία άλλη πηγή όπως ποταμίσιο νερό (βλ. 1.6.4.2.). Τελικά, τα διαλύματα συμπληρώνονται μέχρι τον όγκο της φιάλης με ανόργανο μέσον που υποβλήθηκε σε εμφύσηση αέρα, χρησιμοποιώντας ένα σωλήνα που φθάνει μέχρι τον πυθμένα της φιάλης για να επιτυγχάνεται η κατάλληλη ανάμειξη.

VI.2.5. **Αριθμός φιαλών σε μία τυπική διαδικασία δοκιμής**

Σε μία τυπική διαδικασία, χρησιμοποιούνται οι ακόλουθες φιάλες:

— τουλάχιστον 10 που περιέχουν εξεταζόμενη ουσία και εμβόλιο (εναιώρημα ουσίας δοκιμής),

— τουλάχιστον 10 που περιέχουν μόνον εμβόλιο (τυφλό εμβολίου),

— τουλάχιστον 10 που περιέχουν ουσία αναφοράς και εμβόλιο (έλεγχος διαδικασίας),

▼B

— και, όταν χρειάζεται, 6 φιάλες που περιέχουν εξεταζόμενη ουσία, ουσία αναφοράς και εμβόλιο (έλεγχος τοξικότητας). Παρ' όλα αυτά, για να εξασφαλισθεί η δυνατότητα αναγνώρισης του 10 ήμερου παραθύρου, μπορεί να χρειασθούν οι διπλάσιες από αυτές φιάλες.

VI.2.6. Εκτέλεση της δοκιμής

Κάθε διάλυμα που παρασκευάζεται φέρεται αμέσως στην αντίστοιχη ομάδα φιαλών BOD με σωλήνα που ξεκινά από το κατώτερο τέταρτο (όχι από τον πυθμένα) της κατάλληλης μεγάλης φιάλης, έτσι ώστε να γεμισθούν τελείως όλες οι φιάλες BOD. Οι φιάλες κτυπιώνται ελαφρά ώστε να απομακρυνθεί οποιαδήποτε φυσαλλίδα αέρα. Οι φιάλες που αντιστοιχούν στο χρόνο μηδέν υποβάλλονται σε ανάλυση αμέσως για τον προσδιορισμό διαλελυμένου οξυγόνου με την μέθοδο Winkler ή τη μέθοδο των ηλεκτροδίων. Το περιεχόμενο των φιαλών μπορεί να διατηρηθεί για μετέπειτα ανάλυση με τη μέθοδο Winkler προσθέτοντας θειικό μαγγάνιο (II) και υδροξείδιο του νατρίου (το πρώτο αντιδραστήριο του Winkler). Οι πωματισμένες με προσοχή φιάλες που περιέχουν το οξυγόνο που έχει δεσμευθεί με την μορφή καφέ ένυδρου οξειδίου του μαγγανίου (III), φυλάσσονται στο σκοτάδι στους 10-20 ^{o}C για 24 το πολύ ώρες πριν υποβληθούν στα επόμενα στάδια της μεθόδου Winkler. Οι παραμένουσες ίδιες φιάλες πωματίζονται ώστε να εξασφαλισθεί ότι δεν θα εμπερικλείονται φυσσαλίδες αέρα και επωάζονται στους 20 ^{o}C στο σκοτάδι. Κάθε σειρά πρέπει να συνοδεύεται από μία πλήρη παράλληλη σειρά για τον προσδιορισμό του εμβολιασμένου τυφλού. Κατά την διάρκεια των 28 ημερών επώασης, λαμβάνονται τουλάχιστον διπλές φιάλες από όλες τις σειρές για ανάλυση διαλελυμένου οξυγόνου σε ορισμένα χρονικά διαστήματα (τουλάχιστον μιά φορά την εβδομάδα).

Με τα εβδομαδιαία δείγματα θα πρέπει να μπορεί να γίνεται εκτίμηση της επί τοις εκατό απομάκρυνσης σε 14ήμερο παράθυρο, ενώ με τη δειγματοληψία κάθε 3-4 ημέρες θα πρέπει να μπορεί να αναγνωρίζεται το 10 ήμερο παράθυρο, πράγμα που απαιτεί τις διπλάσιες περίπου φιάλες.

Σε εξεταζόμενες ουσίες που περιέχουν άζωτο, θα πρέπει να γίνονται διορθώσεις για να λαμβάνεται υπόφη η ανάλωση οξυγόνου από τυχόν επερχόμενη νιτροποίηση. Για να γίνει αυτό, χρησιμοποιείται η μέθοδος του ηλεκτροδίου οξυγόνου για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του διαλελυμένου οξυγόνου και κατόπιν λαμβάνεται δείγμα από τη φιάλη BOD για ανάλυση των νιτρωδών και νιτρικών. Από την αύξηση της συγκέντρωσης νιτρωδών και νιτρικών, υπολογίζεται το χρησιμοποιηθέν οξυγόνο (βλ. Παράρτημα V).

VI.3. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

VI.3.1. **Επεξεργασία των αποτελεσμάτων**

Υπολογίζεται πρώτα το BOD για κάθε χρονική περίοδο αφαιρώντας την ελάττωση του οξυγόνου (mg O_2/l) του τυφλού από αυτή που εμφανίζει η εξεταζόμενη ουσία. Η διορθωμένη αυτή ελάττωση διαιρείται με τη συγκέντρωση (mg/l) της εξεταζόμενης ουσίας για να ληφθεί το ειδικό BOD σαν mg οξυγόνου ανά mg εξεταζόμενης ουσίας. Η επί τοις εκατό βιοαποικοδομησιμότητα υπολογίζεται διαιρώντας το ειδικό BOD με το ειδικό ThOD (που υπολογίζεται σύμφωνα με το Παράρτημα II.2) ή COD (που προσδιορίζεται με ανάλυση, βλέπε Παράρτημα 11.3), κατά συνέπεια:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ αναλωμένου απο την εξεταζόμενη ουσία} - \text{mg } O_2 \text{ αναλωμένου από τυφλό})}{(\text{mg εξεταζόμενης ουσίας στη φιάλη})}$$

▼B

= mg O_2 ανά mg εξεταζόμενης ουσίας

$$\% \text{ αποιχοδόμηση} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg εξεταζόμενης ουσίας)}}{\text{ThOD(mg } O_2/\text{mg εξεταζόμενης ουσίας)}} \times 100$$

ή

$$\% \text{ αποιχοδόμηση} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg εξεταζόμενης ουσίας)}}{\text{COD(mg } O_2/\text{mg εξεταζόμενης ουσίας)}} \times 100$$

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι δύο αυτές μέθοδοι δεν δίνουν κατ9 ανάγκη την ίδια τιμή. Προτιμότερο είναι να χρησιμοποιείται η πρώτη μέθοδος.

Στην περίπτωση ουσιών που περιέχουν άζωτο, χρησιμοποείται η κατάλληλη παράμετρος ThOD (NH_4 ή $N0_3$) ανάλογα με το αν αναμένεται ή είναι γνωστό ότι συμβαίνει νιτροποίηση (Παράρτημα Π.2), Εάν συμβαίνει νιτροποίηση χωρίζ όμως να είναι πλήρης, υπολογίζεται μία διόρθωση για το οξυγόνο που καταναλίσκεται εξαιτίας της νατροποίησης λαμβάνοντας υπόψη τις αλλαγές στη συγκέντρωση των νιτρωδών και νιτρικών (Παράρτημα V).

VI.3.2. **Εγκυρότητα των αποτελεσμάτων**

Η ελάττωση οξυγόνου στο τυφλό δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 1,5 mg διαλελυμένου οξυγόνου/1 μετά από 28 ημέρες. Σε περίπτωση τιμών που είναι μεγαλύτερες από αυτή, απαιτείται η διερεύνηση των πειραματικών τεχνικών. Η εναπομένουσα συγκέντρωση οξυγόνου στις φιάλες της δοκιμής δεν πρέπει να πέφτει κάτω από τα 0,5 mg/l σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή. Τέτοια χαμηλά επίπεδα οξυγόνου είναι έγκυρα μόνον αν η μέθοδος προσδιορισμού διαλελυμένου οξυγόνου η οποία χρησιμοποιείται, είναι δυνατό να μετρήσει με ορθότητα τέτοια επίπεδα.

Βλέπε επίσης 1.5.2.

VI.3.3. **Έκθεση**

Βλ. 1.8.

VI.4. ΦΥΛΛΟ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Ένα παράδειγμα φύλλου δεδομένων δίνεται παρακάτω.

1. **ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ**

2. **ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΝΑΡΞΗΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ**

3. **ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ**

Όνομα:

Συγκέντρωση αρχικού διαλύματος: ... mg/l

Αρχική συγκέντρωση στη φιάλη: ... mg/l

ΤηΟΔ ή COD: ... mg O_2/mg εξεταζόμενης ουσίας

4. **ΕΜΒΟΛΙΟ**

Πηγή. ...

Πραγματοποιηθείσα κατεργασία:…

▼B

Προεγκλιματισμός, εφόσον υπήρξε:…

Συγκέντρωση στο αντιδρόν μείγμα: ... ml/l

5. **ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ DO**

Μέθοδος: Winkler/*ηλεκτρόδιο*

Αναλύσεις φιαλών

Χρόνος Επώασης (d)			DO (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Τυφλό (χωρις χημική ουσία)	1	C_1				
	2	C_2				
Μέσο	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Εξεταζόμενη ουσία	1	a_1				
	2	a_2				
Μέσο	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Σημείωση: Ίδιος τύπος δεδομένων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ουσία αναφαράς και τον έλεγχο τοξικοτητας.

6. **ΔΙΟΡΘΩΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗ** (Βλέπε Παράρτημα V)

Χρόνος επώασης (d)		0	n_1	n_2	n_3
(i)	Συγκέντρωση νιτρικών (mg N/l)				
(ii)	Αλλαγή στη συγκέντρωση νιτρικών (mg N/l)	—			
(iii)	Ισοδύναμο οξυγόνου (mg/l)	—			
(iv)	Συγκέντρωση νιτρωδών (mg N/l)				
(v)	Αλλαγή στη συγκέντρωση νιτρωδών (mg N/l)	—			
(vi)	Ισοδύναμο οξυγόνου (mg/l)	—			
(iii + vi)	Ολικό ισοδύναμο οξυγόνου (mg/l)	—			

7. **ΕΛΑΤΤΩΣΗ DO: % ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ**

	Ελάτωση μετά από η ημέρες (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
ΦΙΑΛΗ 1: $(m_{to} - m_{tx}) - m_{bo} - m_{bx})$				
ΦΙΑΛΗ 2: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				

▼B

	Ελάτωση μετά από η ημέρες (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
ΦΙΑΛΗ 1: $\% D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{συφκεν. δοκιμής} \times \text{ThOD ουσίας}}$				
ΦΙΑΛΗ 2: $\% D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{συφκεν. δοκιμης} \times \text{ThOD ουσίας}}$				
$\% D \text{ μέσο } (*) = \frac{D_1 + D_2}{2}$				

(*) Δεν πρέπει να εξάγεται μέσος όρος αν υπάρχουν σοβαρές διαφορές οτις επαναλήψεις.

m_{t0} = τιμή στη φιάλη δοκιμής στο χρόνο 0

m_{tx} = τιμή στη φιάλη δοκιμής στο χρόνο x

m_{bo} = μέση τιμή τυφλού σε χρόνο 0

m_{bx} = μέση τιμή τυφλού σε χρόνο x

Η διόρθωση για τη νιτροποίηση από iii + vi εφαρμόζεται επίσης και στο τμήμα 6.

8. **ΕΛΑΤΤΩΣΕΙΣ DO ΣΤΟ ΤΥΦΛΟ**

Κατανάλωση οξυγόνου στο τυφλό: (m_{bo} - m_{b28}) mg/l. Η κατανάλωση αυτή είναι σημαντική για την εγκυρότητα της δοκιμής. Θα πρέπει να είναι μικρότερη από 1,5 mg/l.

ΜΕΡΟΣ VII. **ΔΟΚΙΜΗ M.I.T.I** (Μέθοδος Γ.4-Ζ)

VII.1. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Σε σκοτεινό, κλεισμένο αναπνευσιόμετρο και σε θερμοκρασία 25 ± 1 °C, μετριέται αυτόματα για μία περίοδο 28 ημερών η ανάλωση οξυγόνου από αναδευόμενο διάλυμα, ή εναιώρημα, της εξεταζόμενης ουσίας σε ανόργανο μέσο, εμβολιασμένο με ειδικά ανεπτυγμένους, μη προσαρμοσμένους μικροοργανισμούς. Το εκλυόμενο διοξείδιο του άνθρακα προσροφάται σε νατράσβεστο. Η βιοαποικοδομησιμότητα εκφράζεται σαν η επί τοις εκατό ανάλωση οξυγόνου (διορθωμένη κατά την ανάλωση του τυφλού) της θεωρητικής ανάλωσης (ThOD). Το εκατοστιαίο ποσοστό πρωταρχικής βιοαποικοδομησιμότητας υπολογίζεται επίσης με συμπληρωματική ειδική χημική ανάλυση που γίνεται στην αρχή και στο τέλος της επώασης και, ενδεχομένως, με ανάλυση DOC.

VII.2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

VII.2.1. **Εξοπλισμός**

α) Αυτόματος ηλεκτρολυτικός μετρητής BOD ή αναπνευσιόμετρο που φέρει κανονικά 6 φιάλες, των 300 ml η καθεμία, και δοχεία που περιέχουν υλικό προσρόφησης CO_2·

▼B

β) Σταθερή θερμοκρασία δωματίου και/ή υδρόλουτρο στους 25 ± 1 °C ή και καλύτερο·

γ) Διάταξη διήθησης με μεμβράνη (προαιρετική)·

δ) Αναλυτής άνθρακα (προαιρετικός).

VII.2.2. **Προετοιμασία του ανόργανου μέσου**

Παρασκευάζονται τα ακόλουθα αρχικά διαλύματα, χρησιμοποιώντας αντιδραστήρια αναλυτικής καθαρότητας και νερό (I.6.1):

(α)	Δισόξινο φωσφορικό κάλιο, KH_2P0_4	8,50 g
	Μονόξινο φωσφορικό κάλιο, K_2HPO_4	21,75 g
	Δωδεκάυδρο μονόξινο φωσφορικό νάτριο, Na_2HPO_4 . 12 H_2O.	44,60 g
	Χλωριούχο αμμώνιο, NH_4Cl	1,70 g
	Διαλύεται σε νερό και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι 1 λίτρο.	
	Το pH του διαλύματος πρέπει να είναι 7,2	
(β)	Επτάυδρο θειικό μαγνήσιο, $MgS0_4.7\ H_20$	22,50 g
	Διαλύεται σε νερό και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι 1 λίτρο	
(γ)	νυδρο χλωριούχο ασβέστιο, $CaCl_2$	27,50 g
	Διαλύεται σε νερό και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι 1 λίτρο	
(δ)	Εξάνυδρος τριχλωριούχος σίδηρος, $FeCl_3.6\ H_2O$	0,25 g
	Διαλύεται σε νερό και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι 1 λίτρο.	

Λαμβάνονται 3 ml από κάθε διάλυμα (α), (β), (γ) και (δ) και συμπληρώνονται μέχρι 1 λίτρο.

VII.2.3. **Παρασκευή του εμβολίου**

Συλλέγονται πρόσφατα δείγματα από δέκα τουλάχιστον σημεία, κυρίως από περιοχές όπου χρησιμοποιούνται και απορρίπτονται πολλών ειδών χημικά. Από σημεία όπως εγκαταστάσεις κατεργασίας λυμάτων αποχετεύσεων, κατεργασίας βιομηχανικών αποβλήτων, ποταμούς, λίμνες, θάλασσες, λαμβάνονται δείγματα λάσπης, επιφανειακού εδάφους, νερού, κ.λπ., όγκου 1 λίτρου, και αναμειγνύονται καλά. Αφού απομακρυνθεί το υλικό που επιπλέει και το υπόλοιπο αφεθεί να κατακαθίσει, ρυθμίζεται το pH του υπερκείμενου υγρού στο 7 ± 1 με υδροξείδιο του νατρίου ή φωσφορικό οξύ.

Λαμβάνεται κατάλληλος όγκος διηθημένου υπερκείμενου υγρού και χρησιμοποιείται για την πλήρωση δοχείου ενεργοποιημένης λάσπης. Στο υγρό εμφυσάται αέρας για χρονικό διάστημα περίπου 23,5 ωρών. Τριάντα λεπτά αφού σταματήσει η εμφύσηση αέρα, το ένα τρίτο περίπου του ολικού όγκου του υπερκειμένου απορρίπτεται και προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος (pH 7) που περιέχει γλυκόζη, πεπτόνη και δισόξινο φωσφορικό κάλιο σε ποσοστό 0,1 % το καθένα, στο υλικό που έχει παραμείνει και ξαναρχίζει η διαβίβαση αέρα. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μία φορά την ημέρα. Η μονάδα πρέπει να λειτουργεί σύμφωνα με τους κανόνες ορθής πρακτικής: τα λύματα πρέπει να είναι διαυγή, η θερμοκρασία να κρατείται στούς 25 ± 2 °C, το pH 7 ± 1, να γίνεται καλή κατακάθιση της λάσπης, επαρκής αερισμός ώστε να διατηρείται το μείγμα συνεχώς αερόβιο, να υπάρχουν πρωτόζωα και να εξετάζεται η δραστικότητα της λάσπης με βάση την ουσία αναφοράς κάθε τρεις τουλάχιστον μήνες. Λάσπη δεν πρέπει να χρησιμοποιείται σαν εμβόλιο παρά μόνο μετά από ένα τουλάχιστον μήνα διεργασία, όχι όμως αργότερα από τέσσερις μήνες. Συνεπώς, η δειγματοληψία πρέπει να γίνεται από 10 τουλάχιστον σημεία σε τακτά χρονικά διαστήματα, μία φορά κάθε τρεις μήνες.

▼B

Για να διατηρείται η πρόσφατη και η παλιά λάσπη στην ίδια δραστικότητα, το διηθημένο υπερκείμενο υγρό χρησιμοποιούμενης ενεργοποιημένης λάσπης αναμειγνύεται με ίσο όγκο του διηθημένου υπερκείμενου υγρού πρόσφατα συλλεγέντος μείγματος από δέκα πηγές και το υγρό που προκύπτει από τη συνένωση καλλιεργείται όπως πιο πάνω. Μπορεί να παραληφθεί λάσπη για να χρησιμοποιηθεί σαν εμβόλιο, 18-24 ώρες μετά την τροφοδοσία της μονάδας.

VII.2.4. **Προετοιμασία των φιαλών**

Ετοιμάζονται οι ακόλουθες έξι φιάλες:

No. 1: εξεταζόμενη ουσία σε νερό αραίωσης με συγκέντρωση 100 mg/l.

No. 2, 3 και 4: εξεταζόμενη ουσία σε ανόργανο μέσο με συγκέντρωση 100 mg/l.

No. 5: ουσία αναφοράς (π.χ. ανιλίνη) σε ανόργανο μέσο με συγκέντρωση 100 mg/l.

No. 6: μόνον ανόργανο μέσο.

Οι ασθενώς διαλυτές εξεταζόμενες ουσίες προστίθενται απ' ευθείας με βάση το βάρος ή τον όγκο ή ακολουθείται η διαδικασία του Παραρτήματος III, εκτός από το ότι δεν πρέπει να χρησιμοποιηθεί ούτε διαλύτης ούτε γαλακτωματοποιητής. Το υλικό προσρόφησης του CO, προστίθεται σε όλες τις φιάλες στα ειδικά διατιθέμενα δοχεία. Το pH στις φιάλες 2, 3 και 4 ρυθμίζεται στο 7,0.

VII.2.5. **Εκτέλεση της δοκιμής**

Οι φιάλες 2, 3 και 4 (εναιωρήματα εξεταζόμενης ουσίας), 5 (έλεγχος δραστικότητας) και 6 (τυφλό) εμβολιάζονται με μικρή ποσότητα εμβολίου ώστε να ληφθεί συγκέντρωση 30 mg/l εναιωρούμενων στερεών. Στη φιάλη 1 που χρησιμεύει για τον αβιοτικό έλεγχο δεν προστίθεται καθόλου εμβόλιο. Η διάταξη συναρμολογείται, ελέγχεται σε σχέση με το αν είναι αεροστεγής, τίθενται σε λειτουργία οι αναδευτήρες και αρχίζει η μέτρηση της ανάλωσης οξυγόνου σε συνθήκες σκότους. Ελέγχεται καθημερινά η θερμοκρασία, ο αναδευτήρας και ο κουλομετρικός καταγραφέας ανάλωσης οξυγόνου, σημειώνεται δε κάθε αλλαγή στο χρώμα του περιεχομένου των φιαλών. Οι αναλώσεις οξυγόνου από τις έξι φιάλες διαβάζονται απευθείας με μιά κατάλληλη μέθοδο, για παράδειγμα, από το διάγραμμα καταγραφέα εξαπλής καταγραφής, ο οποίος παρέχει την καμπύλη BOD. Στο τέλος της επώασης, 28 ημέρες κανονικά, μετριέται το pH του περιεχομένου των φιαλών και προσδιορίζεται η συγκέντρωση της εναπομείνασας εξεταζόμενης ουσίας και κάθε ενδιάμεσου προϊόντος και, στην περίπτωση υδαταδιαλυτής ουσίας, η συγκέντρωση DOC (Παράρτημα II.4). Ιδιαίτερη μέριμνα λαμβάνεται στην περίπτωση πτητικών ουσιών. Εάν προβλέπεται νιτροποίηση, προσδιορίζεται αν είναι δυνατό, η συγκέντρωση νιτρικών και νιτρωδών.

VII.3. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

VII.3.1. **Επεξεργασία των αποτελεσμάτων**

Η ανάλωση οξυγόνου (mg) μετά από ορισμένο χρόνο, διορθωμένη κατά την ανάλωση του τυφλού για τον ίδιο χρόνο, διαιρείται με το χρησιμοποιούμενο βάρος της εξεταζόμενης ουσίας. Έτσι λαμβάνεται το BOD εκφρασμένο ως mg οξυγόνου/mg εξεταζόμενης ουσίας, δηλαδή:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ αναλισχόμενα από εξεταζόμ.} - \text{mg } O_2 \text{ ουσία})}{(\text{mg εξεταζόμενης ουσίας στη φιάλη})}$$

= mg O_2 εξεταζόμενης ουσίας

▼B

Η επί της εκατό βιοαποικοδόμηση λαμβάνεται από τον τύπο:

$$\% \text{ βιοαποιχοδόμηση} = \% \text{ ThOD} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg ουσίας)}}{\text{ThOD (mg } O_2/\text{mg ουσίας)}} \times 100$$

Στην περίπτωση μειγμάτων, το ThOD υπολογίζεται από τη στοιχειακή ανάλυση, όπως για μία απλή ένωση. Ανάλογα με το αν δεν επέρχεται ή επέρχεται πλήρης νιτροποίηση (Παράρτημα II.2), χρησιμοποιείται η κατάλληλη παράμετρος ThOD ($ThOD_{NH4}$ ή $ThOD_{N03}$). Εάν παρ' όλα αυτά επέρχεται νιτροποίηση χωρίς όμως να είναι πλήρης, γίνεται μία διόρθωση για το οξυγόνο που καταναλίσκεται με τη νιτροποίηση που υπολογίζεται από τις αλλαγές στη συγκέντρωση νιτρωδών και νιτρικών (Παράρτημα V).

Η επί της εκατό πρωταρχική βιοαποικοδόμηση υπολογίζεται από την απώλεια ειδικής (μητρικής) ουσίας (βλ. 1.7.2.).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100\ \%$$

Εάν υπάρχει απώλεια εξεταζόμενης ουσίας στη φιάλη 1 όπου μετριέται η φυσικοχημική απομάκρυνση, αυτό αναφέρεται στην έκθεση και η συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας (S_b) μετά από 28 ημέρες στη φιάλη αυτή, χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της επί της εκατό βιοαποικοδόμησης.

Όταν εκτελούνται προσδιορισμοί DOC (προαιρετικό), η επί τοις εκατό τελική βιοαποικοδόμηση υπολογίζεται με τον τύπο:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100\ \%$$

όπως περιγράφεται στο 1.7.1. Εάν υπάρχει απώλεια DOC στη φιάλη 1, στην οποία μετριέται η φυσικοχημική απομάκρυνση, η συγκέντρωση DOC στη φιάλη αυτή χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της επί τοις εκατό βιοαποικοδόμησης.

Όλα τα αποτελέσματα καταγράφονται στα φύλλα δεδομένων.

VII.3.2. **Εγκυρότητα των αποτελεσμάτων**

Η ανάλωση οξυγόνου από το τυφλό είναι κανονικά 20-30 mg O_2/l και δεν θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 60 mg/l σε 28 ημέρες. Στην περίπτωση τιμών μεγαλύτερων από 60 mg/l, απαιτείται να πραγματοποιηθεί κριτική εξέταση των δεδομένων και των πειραματικών τεχνικών. Εάν το pH είναι έξω από τα όρια 6-8,5 και η κατανάλωση οξυγόνου από την εξεταζόμενη ουσία είναι μικρότερη από το 60 %, η δοκιμή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται με μικρότερη συγκέντρωση εξεταζόμενης ουσίας.

Βλέπε επίσης 1.5.2.

Εάν η επί τοις εκατόν αποικοδόμηση της ανιλίνης υπολογιζόμενη από την κατανάλωση οξυγόνου δεν υπερβαίνει το 40 % μετά από 7 ημέρες και το 65 % μετά από 14 ημέρες, η δοκιμή θεωρείται σαν μη έγκυρη.

VII.3.3. **Έκθεση**

Βλ. 1.8.

VII.4. ΦΥΛΛΟ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Ένα παράδειγμα φύλλου δεδομένων δίνεται παρακάτω.

ΔΟΚΙΜΗ ΜΙΤΙ (Ι)

1. **ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ**

2. **ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΝΑΡΞΗΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ**

▼B

3. **ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ**

Όνομα:

Συγκέντρωση αρχικού διαλύματος: ... mg/l σαν ουσία

Αρχική συγκέντρωση στο μέσον, C_0: ... mg/l σαν ουσία

Όγκος του μείγματος αντίδρασης, V: ... ml

ThOD: ... mg O_2/l

4. **ΕΜΒΟΛΙΟ**

Σημεία δειγματοληψίας λάσπης:

1) …
2) …
3) …
4) …
5) …
6) …
7) …
8) …
9) …
10) …

Συγκέντρωση εναιωρούμενων στερεών σε ενεργοποιημένη λάσπη μετά από εγκλιματισμό με συνθετικά λύματα = ... mg/l

Όγκος ενεργοποιημένης λάσπης ανά λίτρο τελικού μέσου = ...ml

Συγκέντρωση λάσπης στο τελικό μέσο = ...mg/l

5. **ΑΝΑΛΩΣΗ ΟΞΥΓΟΝΟΥ: ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΙΜΟΤΗΤΑ**

Τύπος χρησιμοποιημένου αναπνευσιομέτρου: ....

			Χρόνος (ημέρες)				
			0	7	14	21	28
Αναλώμενο O_2 (mg) εξεταζόμενη ουσία	a_1						
	a_2						
	a_3						
Αναλώμενο O_2 (mg) τυφλό	b						
Διορθωμένο αναλώμενο O_2 (mg)	$(a_1 - b)$ $(a_2 - b)$ $(a_3 - b)$						
BOD ανά εξεταζόμενης ουσίας	$\frac{(a-b)}{C_o V}$	Φιάλη 1					
		Φιάλη 2					
		Φιάλη 3					
% αποικοδόμηση $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1					
		2					
		3					
		μέσο (*)					

(*) Δεν πρέπει να εξάγεται μέσος όρος αν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των επαναλήψεων.

▼B

Σημείωση: παρόμοιος τύπος δεδομένων μπορεί να χρηαιμοποιηθεί για την ουσία αναφοράς.

6. **ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΝΘΡΑΚΑ** (προαιρετική)

Αναλυτής άνθρακα: ...

Φιάλη	DOC				% DOC απομακρυνθείς	Μέσο
	Μετρούμενο		Διορθωμένο			
Νερό + εξεταζόμενη ουσία	a				—	—
Λάσπη + εξεταζόμενη ουσία	b_1		b_1 - c			
Λάσπη + εξεταζόμενη ουσία	b_2		b_2 - c			
Λάσπη + εξεταζόμενη ουσία	b_3		b_3 - c			
Μάρτυρας τυφλού	c		—		—	—

$$\% \text{ DOC} - \text{απομακαρυνθείς} : \frac{a_1 - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **ΕΙΔΙΚΑ ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

	Εναπομένουσα ποσότητα εξεταζόμενης ουσίας στο τέλος της δοκιμής	% αποικοδόμηση
τυφλό δοκιμής με νερό	Sb	
εμβολιασμένο μέσον	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\% \text{ απακοδόμηση} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Υπολογίζεται η % αποικοδόμηση για τις φιάλες a_1 a_2 και a_3 αντίστοιχα.

8. **ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ**

Πρέπει να επισυνάπτεται, αν υπάρχει, καμπύλη BOD σαν συνάρτηση του χρόνου.

▼B

Παραρτημα I

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΟΡΙΣΜΟΙ

DO: Διαλελυμένο οξυγόνο (mg/l) είναι η συγκέντρωση του διαλελυμένου οξυγόνου σε ένα υδατικό δείγμα.

BOD: Βιοχημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (g) είναι η ποσότητα του οξυγόνου που καταναλώνεται από μικροοργανισμούς κατά το μεταβολισμό μιας εξεταζόμενης ουσίας· εκφράζεται επίσης και σαν g ανάλωσης οξυγόνου ανά g εξεταζόμενης ουσίας, (βλέπε μέθοδο Γ.5.)

COD: Χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (g) είναι η ποσότητα του οξυγόνου που καταναλώνεται κατά την οξείδωση μιας εξεταζόμενης ουσίας εν θερμώ με όξινο διχρωμικό άλας· αποτελεί μέτρο της ποσότητας του υπάρχοντος οξειδώσιμου υλικού εκφράζεται επίσης και σαν g οξυγόνου καταναλισκόμενα ανά g εξεταζόμενης ένωσης, (βλέπε μέθοδο Γ.6.)

DOC: Διαλελυμένος οργανικός άνθρακας είναι ο οργανικός άνθρακας που υπάρχει σε διάλυμα ή ο άνθρακας που διέρχεται διαμέσου φίλτρου 0,45 μικρομέτρων ή ο άνθρακας που παραμένει στο υπερκείμενο υγρό μετά από φυγοκέντρηση με 40 000 $m.s^{-2}$ (± 4 000 g) επί 15 λεπτά.

ThOD: Θεωρητικώς απαιτούμενο οξυγόνο (mg) είναι η ολική ποσότητα οξυγόνου που απαιτείται για να οξειδωθεί πλήρως μία χημική ουσία· υπολογίζεται από τον μοριακό τύπο (βλέπε Παράρτημα II.2) και εκφράζεται επίσης σαν mg οξυγόνου απαιτούμενου ανά mg εξεταζόμενης ένωσης.

$ThCO_2$: Θεωρητικό διοξείδιο του άνθρακα (mg) είναι η ποσότητα διοξειδίου του άνθρακα που υπολογίζεται ότι παράγεται από τη γνωστή ή μετρούμενη ποσότητα άνθρακα της εξεταζόμενης ουσίας όταν μετατρέπεται πλήρως σε ανόργανη μορφή· εκφράζεται επίσης σαν mg διοξειδίου του άνθρακα που εκλύονται ανά mg εξεταζόμενης ουσίας.

TOC: Ολικός οργανικός άνθρακας ενός δείγματος είναι το άθροισμα του ευρισκόμενου υπό μορφή διαλύματος και εναιωρήματος οργανικού άνθρακα.

IC: Ανόργανος άνθρακας.

TC: Ολικός άνθρακας είναι το άθροισμα του οργανικού και ανόργανου άνθρακα που υπάρχει σε ένα δείγμα.

Πρωταρχική αποικοδόμηση:

είναι η μεταβολή στη χημική δομή μιας ουσίας που προέρχεται από βιολογική δράση και έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια χαρακτηριστικών ιδιοτήτων της ουσίας αυτής.

Τελική βιοαποικοδόμηση (αερόβια):

είναι ο βαθμός αποικοδόμησης που επιτυγχάνεται όταν η εξεταζόμενη ένωση καταναλίσκεται καθ· ολοκληρία από μικροοργανισμούς καταλήγοντας στην παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα, νερού, ανόργανων αλάτων και νέων μικροβιακών κυτταρικών συστατικών (βιομάζα).

Ευκόλως βιοαποικοδομήσιμη:

αυθαίρετη κατάταξη χημικών ουσιών που έχουν περάσει ορισμένες συγκεκριμένες επιλεκτικές δοκιμές τελικής βιοαποικοδομησιμότητας· οι δοκιμές αυτές είναι τόσο περιοριστικές που να εκτιμάται ότι οι ενώσεις αυτές βιοαποικοδομούνται ταχέως και πλήρως σε υδατικό περιβάλλον κάτω από αερόβιες συνθήκες.

▼B

Εγγενώς βιοαποικοδομήσιμη:

κατάταξη χημικών ουσιών για τις οποίες υπάρχουν αναμφίβολες αποδείξεις βιοαποικοδόμησης (πρωταρχική ή τελική) σε οποιαδήποτε αναγνωρισμένη δοκιμή βιοαποικοδόμησης.

Κατεργασιμότητα:

ο όρος χαρακτηρίζει την ευκολία με την οποία μια ένωση μπορεί να απομακρυνθεί κατά την βιολογική κατεργασία λυμάτων χωρίς να επηρεασθεί δυσμενώς η κανονική λειτουργία των μεθόδων κατεργασίας. Γενικά, οι ευκόλως βιοαποικοδομήσιμες ενώσεις είναι κατεργάσιμες όχι όμως και όλες οι εγγενώς βιοαποικοδομήσιμες ενώσεις. Μπορεί επίσης να λάβουν χώρα και αβιοτικές διεργασίες.

Χρόνος υστέρησης

είναι ο χρόνος που μεσολαβεί από τον εμβολιασμό, σε μια δοκιμή ελάττωσης, μέχρι τη χρονική στιγμή που το ποσοστό αποικοδόμησης αυξάνεται στο 10 % τουλάχιστον. Ο χρόνος υστέρησης παρουσιάζει συχνά μεγάλες διακυμάνσεις και μικρή αναπαραγωγιμότητα.

Χρόνος αποικοδόμησης

είναι ο χρόνος που μεσολαβεί από τη λήξη του χρόνου υστέρησης μέχρι τη χρονική στηγμή κατά την οποία επιτυγχάνεται το 90 % του μέγιστου βαθμού αποικοδόμησης.

10 ήμερο παράθυρο

είναι οι δέκα ημέρες που ακολουθούν αμέσως μετά την επίτευξη αποικοδόμησης 10 %.

▼B

Παραρτημα II

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΤΑΛΛΗΛΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ

Ανάλογα με την επιλεγόμενη μέθοδο απαιτούνται και ορισμένες μοριακές παράμετροι. Στα επόμενα περιγράφεται η εξαγωγή των τιμών αυτών. Η χρήση των παραμέτρων αυτών περιγράφεται στις συγκεκριμένες μεθόδους.

1. **Περιεκτικότητα σε άνθρακα**

Η περιεκτικότητα σε άνθρακα υπολογίζεται από τη γνωστή στοιχειακή σύσταση ή προσδιορίζεται με στοιχειακή ανάλυση της εξεταζόμενης ουσίας.

2. **Θεωρητικώς απαιτούμενο οξυγόνο (ThOD)**

Το θεωρητικώς απαιτούμενο οξυγόνο (ThOD) μπορεί να υπολογισθεί αν η στοιχειακή σύσταση είναι γνωστή ή προσδιορισθεί με στοιχειακή ανάλυση. Για την ένωση:

$C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}0_0P_pS_s$

χωρίς νιτροποίηση,

$$ThOD_{NH4} = \frac{16\ [2\ c + 1/2\ (h - cl - 3\ n) + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

ή με νιτροποίηση,

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\ [2\ c + 1/2\ (h - cl) + 5/2\ n + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

3. **Χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (COD)**

Το χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (COD) προσδιορίζεται με τη μέθοδο Γ.6.

4. **Διαλελυμένος οργανικός άνθρακας (DOC)**

Διαλελυμένος οργανικός άνθρακας (DOC) είναι εξ ορισμού ο οργανικός άνθρακας κάθε χημικής ουσίας ή μείγματος σε νερό που διέρχεται διαμέσου φίλτρου 0,45 μικρομέτρων.

Λαμβάνονται δείγματα από τις δοκιμαστικές φιάλες και διηθούνται αμέσως στη διηθητική συσκευή χρησιμοποιώντας την κατάλληλη διηθητική μεμβράνη. Τα πρώτα 20 ml (η ποσότητα αυτή μπορεί να ελαττωθεί όταν χρησιμοποιούνται μικρά φίλτρα) του διηθήματος απορρίπτονται. Για την ανάλυση του άνθρακα χρησιμοποιούνται όγκοι 10-20 ml ή και μικρότεροι για περίπτωση ένεσης (ο όγκος εξαρτάται από την ποσότητα που απαιτείται για τον αναλυτή άνθρακα). Η συγκέντρωση του DOC προσδιορίζεται με αναλυτή οργανικού άνθρακα, που μπορεί να κάνει ακριβείς μετρήσεις για συγκεντρώσεις άνθρακα ίσες ή και μικρότερες του 10 % της αρχικής συγκέντρωσης DOC που χρησιμοποιείται στη δοκιμή.

Τα διηθημένα δείγματα που δεν μπορούν να αναλυθούν την ίδια ημέρα μπορούν να φυλάσσονται σε ψυγείο σε θερμοκρασία 2-4 °C επί 48 ώρες ή σε θερμοκρασία - 18 °C για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα.

Παρατηρήσεις:

Οι διηθητικές μεμβράνες διαποτίζονται συχνά με τασιενεργά για υδροφιλίωση. Έτσι το φίλτρο μπορεί να περιέχει ορισμένα mg διαλυτού οργανικού άνθρακα που μπορούν να παρεμβληθούν στους προσδιορισμούς βιοαποικοδο-μησημότητα. Τα τασιενεργά και οι άλλες διαλυτές οργανικές ενώσεις απομακρύνονται από τα φίλτρα βάζοντας τα σε απιονισμένο νερό τρεις φορές για μία ώρα. Τα φίλτρα μπορούν κατόπιν να φυλάσσονται σε νερό για μία εβδομάδα. Εάν χρησιμοποιούνται φίλτρα μιας χρήσης κάθε παρτίδα πρέπει να ελέγχεται ότι δεν ελευθερώνει διαλυτό οργανικό άνθρακα.

▼B

Ανάλογα με τον τύπο της διηθητικής μεμβράνης η εξεταζόμενη χημική ουσία μπορεί να κατακρατείται με προσρόφηση. Κατά συνέπεια, ενδέχεται να απαιτείται να ελεγχθεί μήπως η εξεταζόμενη χημική ουσία κατακρατείται από το φίλτρο.

Φυγοκέντρηση με 40 000 $m.sec^{-2}$ (4 000 g) επί 15 λεπτά για τη διαφοροποίηση του TOC από τον DOC, μπορεί να χρησιμοποιηθεί αντί διήθησης. Η μέθοδος δεν είναι αξιόπιστη για αρχική συγκέντρωση < 10 mg DOC/l αφού είτε δεν απομακρύνονται όλα τα βακτήρια είτε ο άνθρακας σαν μέρος του βακτηριακού πλάσματος επαναδιαλύεται.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

— Standard Methods for the Examination of Water and Waste water, 12th, Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, P 65.

— Wagner, R., Von Wasser, 1976, vol 46, 139.

— DIN-Entwurf 38 409 Teil 41 — Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

— Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol 13 (1), 169.

▼B

Παραρτημα III

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΑΣΘΕΝΩΣ ΔΙΑΛΥΤΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Σε δοκιμές βιοδιασπασιμότητας με ασθενώς διαλυτές ουσίες ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίδεται στις ακόλουθες πλευρές του θέματος.

Ενώ τα ομοιογενή υγρά σπανίως παρουσιάζουν προβλήματα δειγματοληψίας, συνιστάται όπως τα στερεά υλικά ομοιογενοποιούνται με κατάλληλα μέσα για να αποφεύγονται λάθη που οφείλονται στη μη ομοιογένεια τους. Ιδιαίτερη πρόνοια πρέπει να λαμβάνεται όταν απαιτούνται αντιπροσωπευτικά δείγματα λίγων χιλιοστογράμμων από μείγματα χημικών προϊόντων ή ουσιών με μεγάλες ποσότητες προσμείξεων.

Κατά τη διάρκεια των δοκιμών μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες μορφές ανάδευσης. Θα πρέπει να δίδεται προσοχή ώστε η ανάδευση να είναι τόση όση απαιτείται ώστε να διατηρείται απλά και μόνο σε διασπορά το χημικό προϊόν και να αποφεύγεται η υπερθέρμανση, ο υπερβολικός αφρισμός και οι υπερβολικές δυνάμεις διάτμησης.

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάποιος γαλακτωματοποιητής που να επιτυγχάνει σταθερή διασπορά του χημικού προϊόντος. Ο γαλακτωματοποιητής δεν θα πρέπει να είναι τοξικός για τα βακτήρια και δεν πρέπει να βιοαποικοδομείται ή να προκαλεί αφρισμό στις συνθήκες της δοκιμής.

Για τους διαλύτες ισχύουν τα ίδια κριτήρια όπως και για τους γαλακτωματοποιητές.

Οι στερεοί φορείς δεν συνιστάται να χρησιμοποιούνται για στερεές εξεταζόμενες ουσίες, μπορεί όμως να είναι κατάλληλοι για ελαιώδεις ουσίες.

Όταν χρησιμοποιούνται βοηθητικές ουσίες όπως γαλακτωματοποιητές, διαλύτες και φορείς, θα πρέπει να εκτελείται τυφλή δοκιμή με την βοηθητική ουσία.

Για τη μελέτη της βιοαποικοδομησιμότητας ασθενώς διαλυτών ενώσεων μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε από τις τρεις αναπνευσιομετρικές δοκιμές CO_2, BOD και MITI.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

— de Morsier, A. et al. Biodegradation tests for poorly-soluble compounds. Chemosphere, 1987, vol 16, 833.

— Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol 13, 169.

▼B

Παραρτημα IV

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ

Όταν ένα χημικό προϊόν υποβάλλεται σε δοκιμασία άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας και φαίνεται να είναι μη βιοαποικοδομήσιμο, συνιστάται η ακόλουθη διαδικασία εφόσον επιθυμείται να γίνει διάκριση μεταξύ αναστολής και αδρανείας {Reynolds et al., 1987).

Για την τοξικότητα και τις δοκιμές βιοαποικοδόμησης θα πρέπει να χρησιμοποιούνται παρόμοια ή ταυτόσημα εμβόλια.

Η εκτίμηση της τοξικότητας της εξεταζόμενης ουσίας σε δοκιμές άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας, μπορεί να επιτευχθεί με την εφαρμογή μιας ή ενός συνδυασμού από τις μεθόδους της αναστολής ρυθμού αναπνοής λάσπης (δοκιμή αναστολής αναπνοής ενεργοποιημένης λάσπης-οδηγία 88/302/ΕΟΚ), BOD και/ή Αναστολής Ανάπτυξης.

Εάν πρέπει να αποφευχθεί η αναστολή εξαιτίας τοξικότητας, συνιστάται οι συγκεντρώσεις της εξεταζόμενης ουσίας, που χρησιμοποιούνται στις δοκιμές άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας να είναι μικρότερες του 1/10 των τιμών EC_{50} (ή μικρότερες των τιμών EC_{20}) που λαμβάνονται από τη δοκιμή τοξικότητας. Ενώσεις με τιμή EC_{50} μεγαλύτερη από 300 mg/l δεν μπορούν, κατά πάσα πιθανότητα, να εμφανίσουν τοξική δράση κατά τις δοκιμές άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας.

Τιμές EC_{50} μεγαλύτερες από 20 mg/l είναι πιθανόν να δημιουργήσουν σοβαρά προβλήματα στη μετέπειτα δοκιμή. Θα πρέπει στη δοκιμή να χρησιμοποιούνται χαμηλές συγκεντρώσεις πράγμα που έχει σαν αποτέλεσμα την ανάγκη χρήσης της αυστηρής και ευαίσθητης δοκιμής της κλειστής φιάλης ή χρήσης υλικού ιχνηθετημένου με ^{14}C. Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν υψηλότερες συγκεντρώσεις εξεταζόμενης ουσίας εφόσον χρησιμοποιηθεί εγκλιματισμένο εμβόλιο. Παρ' όλα αυτά, στην τελευταία αυτή περίπτωση χάνεται το ειδικό κριτήριο της δοκιμής άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Reynolds, L. et al. Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, vol 16, 2259.

▼B

Παραρτημα V

ΔΙΟΡΘΩΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΛΩΣΗΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΓΙΑ ΝΑ ΛΗΦΘΕΙ ΥΠΟΨΗ Η ΠΑΡΕΜΒΟΛΗ ΤΗΣ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗΣ

Τα σφάλματα που οφείλονται στο μη υπολογισμό της νιτροποίησης κατά την εκτίμηση, μέσω της ανάλωσης οξυγόνου, της βιοαποικοδόμησης ουσιών που δεν περιέχουν N είναι μικρά (όχι μεγαλύτερα από 5 %), ακόμη κι αν η οξείδωση του αμμωνιακού N στο μέσον της αντίδρασης συμβαίνει ακανόνιστα όπως μεταξύ δοχείων δοκιμής και τυφλού. Παρ' όλα αυτά, στην περίπτωση εξέτασης ουσιών που περιέχουν N, μπορούν να προκύψουν σοβαρά σφάλματα.

Εάν επέλθει νιτροποίηση, όχι όμως πλήρης, η παρατηρούμενη ανάλωση οξυγόνου από το μείγμα που αντιδρά μπορεί να διορθωθεί σε σχέση με την ποσότητα οξυγόνου που χρησιμοποιείται για την οξείδωση της αμμωνίας σε νιτρώδη και νιτρικά, εάν προσδιορισθούν οι αλλαγές στη συγκέντρωση κατά την επώαση νιτρωδών και νιτρικών με τη χρησιμοποίηση των ακόλουθων εξισώσεων:

$$2\ NH_4Cl + 3\ O_2 = 2\ HNO_2 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

Συνολική:

$$2\ NH_4Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (3)$$

Από την εξίσωση (1), η ανάλωση οξυγόνου από 28 g αζώτου περιεχόμενα σε χλωριούχο αμμώνιο (NH_4Cl) κατά την οξείδωση προς νιτρώδη είναι 96 g, δηλ. ένας συντελεστής 3,43 (96/28). Με τον ίδιο τρόπο, από την εξίσωση (3), η ανάλωση οξυγόνου από 28 g αζώτου κατά την οξείδωση προς νιτρικά είναι 128 g, δηλαδή ένας συντελεστής 4,57 (128/28).

Αφού οι αντιδράσεις είναι αλληλοδιάδοχες, πραγματοποιούμενες από διάκριτα και διάφορα είδη βακτηρίων, είναι δυνατόν η συγκέντρωση των νιτρωδών να αυξηθεί ή να μειωθεί. Στην τελευταία περίπτωση, μπορεί να σχηματισθούν νιτρικά σε ισοδύναμη συγκέντρωση. Έτσι, το οξυγόνο που καταναλίσκεται κατά την παραγωγή νιτρικών είναι 4,57 πολλαπλασιασμένο με την αύξηση της συγκέντρωσης των νιτρικών, ενώ το οξυγόνο που σχετίζεται με το σχηματισμό νιτρωδών είναι 3,43 πολλαπλασιασμένο με την αύξηση στη συγκέντρωση νιτρωδών ή ενώ κατά τη μείωση της συγκέντρωσης τους η απώλεια οξυγόνου είναι - 3,43 πολλαπλασιασμένο με τη μείωση στη συγκέντρωση.

Δηλαδή:

O_2 αναλώμενο στο σχηματισμό νιτρικών = 4,57 x αύξηση συγκέντρωσης νιτρικών-N (4)

και

O_2 αναλώμενο στο σχηματισμό νιτρωδών = 3,43 x αύξηση συγκέντρωσης νιτρωδών-N (5)

και

O_2-απωλεσθέν από εξαφάνιση νιτρωδών = μείωση συγκ. νιτρωδών-N × - 3,43 (6)

Έτσι ώστε

O_2-λόγω νιτροποίησης = ± 3,43 × αλλαγή συγκ. νιτρωδών-N + 4,57 × αύξ. συγκ. νιτρικών-N (7)

και έτσι

O_2-Ανάλωση O_2 λόγω οξείδωσης C = ολική παρατηρηθ. ανάλωση-ανάλωση λόγω νιτροποίησης (8)

Εναλλακτικά, εάν προσδιορισθεί μόνο ολικό οξειδωμένο N, η ανάλωση οξυγόνου λόγω νιτροποίησης μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι, σύμφωνα με μία πρώτη προσέγγιση, 4,57 × αύξηση στο οξειδωμένο N.

Η διορθωμένη τιμή για την κατανάλωση οξυγόνου λόγω οξείδωσης του C συγκρίνεται κατόπιν με την ThOD NH_3, όπως υπολογίζεται στο Παράρτημα II.

▼B

Γ.5. ΔΙΑΣΠΑΣΙΜΟΤΗΤΑ — ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΣ ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΟ ΟΞΥΓΟΝΟ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο σκοπός της μεθόδου είναι η μέτρηση του βιοχημικώς απαιτούμενου οξυγόνου (BOD) στερεών ή υγρών οργανικών ουσιών.

Δεδομένα που λαμβάνονται με τη μέθοδο αυτή αναφέρονται σε υδατοδιαλυτές ενώσεις· πάντως, πτητικές ενώσεις καθώς και εκείνες με χαμηλή υδατοδιαλυτότητα μπορούν επίσης, τουλάχιστον κατ' αρχήν, να ελεγχθούν.

Η μέθοδος εφαρμόζεται μόνον σ' εκείνα τα οργανικά ελεγχόμενα υλικά που δεν παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των βακτηρίων στη συγκέντρωση που χρησιμοποιείται στον έλεγχο. Αν το ελεγχόμενο υλικό δεν είναι διαλυτό στη συγκέντρωση του ελέγχου, μπορεί να χρειασθεί να χρησιμοποιηθούν ειδικές τεχνικές, τέτοιες όπως η χρήση υπέρηχων, για να επιτευχθεί καλή διασπορά της ελεγχόμενης ουσίας.

Πληροφορίες για την τοξικότητα της χημικής ουσίας μπορεί να είναι χρήσιμες για την ερμηνεία χαμηλών αποτελεσμάτων και για την επιλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων ελέγχου.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Σαν BOD ορίζεται η μάζα του διαλελυμένου οξυγόνου που απαιτείται από ορισμένο όγκο διαλύματος της ουσίας για τη διαδικασία της βιοχημικής οξείδωσης υπό καθορισμένες συνθήκες.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε γραμμάρια BOD ανά γραμμάρια ελεγχόμενης ουσίας.

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Είναι επιθυμητή η χρήση κατάλληλης ουσίας αναφοράς για τον έλεγχο της δραστικότητας του εμβολίου.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Γνωστή ποσότητα της ουσίας, διαλελυμένη ή σε διασπορά, σε καλά αεριζόμενο κατάλληλο μέσο, εμβολιάζεται με μικροοργανισμούς και επωάζεται σε σταθερή καθορισμένη θερμοκρασία περιβάλλοντος στο σκοτάδι.

Το BOD προσδιορίζεται από τη διαφορά στη συγκέντρωση του διαλελυμένου οξυγόνου στην αρχή και στο τέλος του ελέγχου. Η διάρκεια του ελέγχου πρέπει να είναι το λιγότερο πέντε και όχι περισσότερο από 28 ημέρες.

Πρέπει να γίνει ένας τυφλός προσδιορισμός σε παράλληλη δοκιμασία που δεν περιέχει ελεγχόμενη ουσία.

1.5. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Ο προσδιορισμός του BOD δεν μπορεί να θεωρηθεί σαν έγκυρος προσδιορισμός της βιοδιασπασιμότητας μιας ουσίας. Ο έλεγχος αυτός μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο σαν βασικός έλεγχος.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Παρασκευάζεται προκαταρκτικό διάλυμα ή διασπορά της ουσίας με συγκέντρωση BOD κατάλληλη για τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο. Προσδιορίζεται κατόπιν το BOD ακολουθώντας οποιαδήποτε κατάλληλη εθνική ή διεθνή τυποποιημένη μέθοδο.

▼B

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗ**

Υπολογίζεται το BOD που περιέχεται στο προκαταρκτικό διάλυμα σύμφωνα με την προτότυπη μέθοδο που έχει επιλεγεί και μετατρέπεται σε γραμμάρια BOD ανά γραμμάρια ελεγχόμενης ουσίας.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

Πρέπει να δηλώνεται η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε.

Το βιοχημικώς απαιτούμενο οξυγόνο πρέπει να είναι ο μέσος όρος τριών τουλάχιστον έγκυρων μετρήσεων.

Πρέπει να αναφέρονται όλες οι πληροφορίες και παρατηρήσεις για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, ειδικά σε σχέση με τις ξένες προσμείξεις, φυσική κατάσταση, τοξικές επιδράσεις και σχετική σύνθεση της ουσίας που μπορεί να επηρεάζει τα αποτελέσματα.

Πρέπει να αναφέρεται η χρήση προσθετικών για την παρεμπόδιση της βιολογικής διατροφής.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Κατάλογος των προτύπων μεθόδων, π.χ.:

NF T 90-103: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 3235 5.4.: Bepaling van het biochemish zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

▼B

Γ.6. **ΔΙΑΣΠΑΣΙΜΟΤΗΤΑ — ΧΗΜΙΚΩΣ ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΟ ΟΞΥΓΟΝΟ**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σκοπός της μεθόδου είναι η μέτρηση του χημικώς απαιτούμενου οξυγόνου (COD) στερεών ή υγρών οργανικών ουσιών με ένα πρότυπο αυθαίρετο τρόπο, υπό καθορισμένες εργαστηριακές συνθήκες.

Πληροφορίες για τον τύπο της ουσίας θα είναι χρήσιμες κατά την εκτέλεση του ελέγχου και την ερμηνεία του λαμβανόμενου αποτελέσματος (π.χ. αλογονούχα άλατα, σιδηρούχα άλατα οργανικών ενώσεων, οργανοχλωριούχες ενώσεις).

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Το χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο είναι μέτρο της επιδεκτικότητας προς οξείδωση μιας ουσίας και εκφράζεται σαν το ισοδύναμο ποσό σε οξυγόνο ενός οξειδωτικού παράγοντα, που καταναλώνεται από την ουσία, υπό καθορισμένες εργαστηριακές συνθήκες.

Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε γραμμάρια COD ανά γραμμάρια ελεγχόμενης ουσίας.

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Ουσίες αναφοράς δεν είναι απαραίτητο να χρησιμοποιούνται σε όλες τις περιπτώσεις που εξετάζεται μια νέα ουσία. Αυτό θα χρησίμευε, κατ' αρχή, για τη βαθμονόμηση της μεθόδου, από καιρό σε καιρό, και για να προσφέρει τη δυνατότητα σύγκρισης των αποτελεσμάτων σε περιπτώσεις που εφαρμόζεται άλλη μέθοδος.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Γνωστή ποσότητα της ουσίας διαλύεται ή διασπείρεται σε νερό, οξειδώνεται με διχρωμικό κάλιο σε ισχυρά όξινο με θειικό οξύ περιβάλλον, με θειικό άργυρο σαν καταλύτη, επί δύο ώρες υπό επαναρροή. Το υπόλοιπο διχρωμικό προσδιορίζεται με τιτλοδότηση με πρότυπο διάλυμα εναμμώνιου θειικού σιδήρου.

Στην περίπτωση ουσιών που περιέχουν χλώριο, προστίθεται θειικός υδράργυρος για την ελάττωση της παρεμπόδισης από τα χλωριόντα ([1]).

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Εξ' αιτίας του αυθαίρετου τρόπου προσδιορισμού, το COD είναι ένας «δείκτης οξειδωσιμότητας» και συνεπώς χρησιμοποιείται σαν μία πρακτική μέθοδος προσδιορισμού της οργανικής ύλης.

Τα χλωριόντα μπορεί να παρεμβαίνουν στη δοκιμή αυτή· στον προσδιορισμό του COD μπορεί επίσης να παρεμβαίνουν και ανόργανοι αναγωγικοί ή οξειδωτικοί παράγοντες.

Ορισμένες κυκλικές ενώσεις και πολλές πτητικές ουσίες (π.χ. κατώτερα λιπαρά οξέα) δεν οξειδώνονται πλήρως στη δοκιμή αυτή.

Μετά από τη χρησιμοποίηση τους, τα διαλύματα που περιέχουν άλατα υδραργύρου θα πρέπει να υποβάλλονται σε κατεργασία για να αποφεύγεται η διασπορά υδραργύρου στο περιβάλλον.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Παρασκευάζεται προκαταρκτικό διάλυμα ή διασπορά της ουσίας με το COD μεταξύ 250 και 600 mg/l.

([1]) Μετά από τη χρησιμοποίηση τους, τα διαλύματα που περιέχουν άλατα υδραργύρου θα πρέπει να υποβάλλονται σε κατεργασία για να αποφεύγεται η διασπορά υδραργύρου στο περιβάλλον.

▼B

Παρατήρηση:

Στην περίπτωση ουσιών με χαμηλή διαλυτότητα όταν δεν μπορούν να σχηματίσουν διασπορά, ζυγίζεται ποσότητα λεπτής σκόνης της ουσίας, ή υγρής ουσίας, αντίστοιχη με 5 mg COD και φέρεται στην πειραματική συσκευή με νερό.

Το χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (COD) συχνά και ιδιαίτερα στην περίπτωση ουσιών με χαμηλή διαλυτότητα, προσδιορίζεται καλύτερα με μία παραλλαγή της μεθόδου, δηλ. σε κλειστό σύστημα με εξισωτή πίεσης (H. Kelkenberg, 1975). Με την τροποποίηση αυτή, ενώσεις που μόνο με δυσκολία προσδιορίζονται με τη συμβατική μέθοδο. π.χ. οξεικό οξύ — μπορούν συχνά να προσδιορίζονται ποσοτικά με επιτυχία. Εντούτοις, η μέθοδος δεν έχει και πάλι εφαρμογή στην περίπτωση πυριδίνης. Αν η συγκέντρωση του διχρωμικού καλίου, όπως αυτή προδιαγράφεται στην παραπομπή (1), αυξηθεί σε 0,25 N (0,0416 M), η άμεση αποτίμηση 5-10 mg ουσίας, διευκολύνεται γεγονός που είναι βασικό για τον προσδιορισμό του COD ασθενώς υδατοδιαλυτών ουσιών (παραπομπή 2).

Διαφορετικά, το COD προσδιορίζεται τότε ακολουθώντας οποιαδήποτε εθνική ή διεθνή τυποποιημένη μέθοδο.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ**

Υπολογίζεται το COD που περιέχεται στην πειραματική φιάλη, σύμφωνα με την πρότυπη μέθοδο που έχει επιλεγεί και μετατρέπεται σε γραμμάρια COD ανά γραμμάρια ελεγχόμενης ουσίας.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

Πρέπει να δηλώνεται η μέθοδος που χρμσιμοποιήθηκε.

Το χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο πρέπει να είναι ο μέσος όρος τριών τουλάχιστον μετρήσεων. Πρέπει να αναφέρονται όλες οι πληροφορίες και παρατηρήσεις για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, ειδικά σε σχέση με τις ξένες προσμείξεις, τη φυσική κατάσταση και τις σχετικές ιδιότητες της ουσίας (εάν είναι γνωστές) που μπορεί να επηρεάζουν τα αποτελέσματα.

Πρέπει να αναφέρεται η χρήση θειικού υδραργύρου που μειώνει την παρεμπόδιση των χλωριόντων.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) Kelkenberg, H. Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.

(2) Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

Κατάλογος προτύπων μεθόδων, π.χ.:

NBN T 91-201 Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN 0 11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NF T 90-101 Determination of the chemical oxygen demand.

DS 217 — water Determination of the chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41 Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

▼B

Γ.7. ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ — ΑΒΙΟΤΙΚΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ: ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΩΣ ΣΥΝΑΡΤΗΣΗ ΤΟΥ pH

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή TG 111 (2004) του ΟΟΣΑ.

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι χημικές ουσίες μπορούν να εισέλθουν στα επιφανειακά ύδατα με τρόπους όπως η άμεση τοποθέτηση, η μετατόπιση αερολυμάτων, η απορροή, η αποστράγγιση, η απόρριψη (διάθεση) αποβλήτων, τα βιομηχανικά, οικιακά ή γεωργικά λύματα και οι ατμοσφαιρικές εναποθέσεις, ενώ μπορούν να μετατραπούν στα εν λόγω ύδατα με χημικές (π.χ. υδρόλυση, οξείδωση), φωτοχημικές και/ή μικροβιακές διεργασίες. Στις παρούσες κατευθυντήριες γραμμές, που βασίζονται σε υφιστάμενες κατευθυντήριες γραμμές (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7), περιγράφεται μία εργαστηριακή μέθοδος δοκιμών για την εκτίμηση των αβιοτικών υδρολυτικών μετατροπών χημικών ουσιών σε υδάτινα συστήματα, σε τιμές pH που απαντούν υπό κανονικές συνθήκες στο περιβάλλον (pH 4-9).

Τα πειράματα εκτελούνται με σκοπό να προσδιοριστούν (i) η ταχύτητα υδρόλυσης της ελεγχόμενης ουσίας ως συνάρτηση του pH και (ii) η ταυτότητα ή η φύση και οι ταχύτητες σχηματισμού και αποικοδόμησης των προϊόντων υδρόλυσης στα οποία είναι δυνατή η έκθεση οργανισμών. Οι μελέτες αυτές ενδέχεται να απαιτούνται για τις χημικές ουσίες που φέρονται απευθείας στα ύδατα ή που ενδέχεται να φθάσουν στο περιβάλλον με τους άλλους, προαναφερθέντες τρόπους.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Βλ. παράρτημα 2.

1.3. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέθοδος εφαρμόζεται εν γένει στις χημικές ουσίες (ραδιοσημασμένες και μη) για τις οποίες υπάρχει αναλυτική μέθοδος επαρκούς ακρίβειας και ευαισθησίας. Εφαρμόζεται σε ελαφρώς πτητικές και μη πτητικές ενώσεις επαρκούς υδατοδιαλυτότητας. Η δοκιμή δεν πρέπει να εφαρμόζεται σε χημικές ουσίες που είναι πολύ πτητικές από το νερό (π.χ. μέσα υποκαπνισμού, οργανικοί διαλύτες) και, ως εκ τούτου, δεν μπορούν να διατηρηθούν διαλελυμένες υπό τις πειραματικές συνθήκες της συγκεκριμένης δοκιμής. Η διεξαγωγή της δοκιμής ενδέχεται να είναι δύσκολη με ουσίες ελάχιστης υδατοδιαλυτότητας (8).

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Η ελεγχόμενη ουσία φέρεται σε στείρα υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα διαφόρων τιμών pH (pH 4, 7 και 9) και το σύνολο επωάζεται στο σκοτάδι υπό ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες (σε σταθερές θερμοκρασίες). Ανά κατάλληλα τακτά χρονικά διαστήματα, τα ρυθμιστικά διαλύματα υποβάλλονται σε ανάλυση για την ελεγχόμενη ουσία και τα προϊόντα υδρόλυσης. Με ραδιοσημασμένη ελεγχόμενη ουσία (π.χ. ^{14}C), διευκολύνεται ο προσδιορισμός του ισοζυγίου μάζας.

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών έχει σχεδιαστεί με βαθμιδωτή προσέγγιση, η οποία παρατίθεται και εξηγείται στο παράρτημα 1. Η εκκίνηση κάθε βαθμίδας εξαρτάται από τα αποτελέσματα της προηγούμενης βαθμίδας.

▼B

1.5. ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ

Για τη μέτρηση της ταχύτητας υδρόλυσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν ραδιοσημασμένες και μη ραδιοσημασμένες ελεγχόμενες ουσίες. Το ραδιοσημασμένο υλικό προτιμάται, γενικά, για τη μελέτη της πορείας της υδρόλυσης, καθώς και για τον προσδιορισμό του ισοζυγίου μάζας· ωστόσο, σε ειδικές περιπτώσεις, η ραδιοσήμανση ενδέχεται να μην είναι απολύτως αναγκαία. Συνιστάται η ραδιοσήμανση με ^{14}C, πλην όμως η χρήση άλλων ισοτόπων, όπως των ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ενδέχεται να είναι επίσης χρήσιμη. Στο μέτρο του δυνατού, το ισότοπο πρέπει να τοποθετείται στο(στα) σταθερότερο(α) μέρος(η) του μορίου. Παραδείγματος χάριν, εάν η ελεγχόμενη ουσία περιέχει έναν δακτύλιο, είναι απαραίτητη η ραδιοσήμανση στον δακτύλιο αυτό· σε περίπτωση κατά την οποία η ελεγχόμενη ουσία περιέχει δύο ή περισσότερους δακτυλίους, ενδέχεται να είναι αναγκαία η διεξαγωγή χωριστών μελετών, ώστε να εξετάζεται η πορεία κάθε ραδιοσημασμένου δακτυλίου και να λαμβάνονται κατάλληλες πληροφορίες για τον σχηματισμό προϊόντων υδρόλυσης. Η καθαρότητα της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να είναι τουλάχιστον 95 %.

Πριν από τη διεξαγωγή δοκιμής υδρόλυσης, πρέπει να υπάρχουν οι ακόλουθες πληροφορίες σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία:

(α) υδατοδιαλυτότητα [μέθοδος δοκιμών Α.6],

(β) διαλυτότητα σε οργανικούς διαλύτες,

(γ) τάση ατμών [μέθοδος δοκιμών Α.4] και/ή σταθερά του Νόμου του Henry,

(δ) συντελεστής κατανομής σε μίγμα n-οκτανόλης/νερού [μέθοδος δοκιμών Α.8],

(ε) σταθερά διαστάσεως (pK_a) [κατευθυντήρια γραμμή 112 του ΟΟΣΑ] (9),

(στ) ταχύτητα άμεσης και έμμεσης φωτομετατροπής στο νερό, κατά περίπτωση.

Πρέπει να υπάρχουν αναλυτικές μέθοδοι για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ελεγχόμενης ουσίας και, όπου είναι σκόπιμο, για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων υδρόλυσης σε υδατικά διαλύματα (βλ. επίσης σημείο 1.7.2).

1.6. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Όποτε αυτό είναι δυνατό, πρέπει να χρησιμοποιούνται ουσίες αναφοράς για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων υδρόλυσης με φασματοσκοπικές και χρωματογραφικές μεθόδους ή άλλες, κατάλληλες ευαίσθητες μεθόδους.

1.7. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

1.7.1. **Ανάκτηση**

Η ανάλυση τουλάχιστον διπλού δείγματος των ρυθμιστικών διαλυμάτων ή των εκχυλισμάτων τους αμέσως μετά την προσθήκη της ελεγχόμενης ουσίας παρέχει μια πρώτη ένδειξη της επαναληπτικότητας της αναλυτικής μεθόδου και της ομοιομορφίας της διαδικασίας προσθήκης ως προς την ελεγχόμενη ουσία. Η ανάκτηση για τα μεταγενέστερα στάδια των πειραμάτων δίδεται από τα αντίστοιχα ισοζύγια μάζας (όταν χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένο υλικό). Η ανάκτηση πρέπει να κυμαίνεται από 90 % έως 110 % για τις ραδιοσημασμένες και μη ραδιοσημασμένες χημικές ουσίες (7). Σε περίπτωση που είναι τεχνικά δύσκολο να επιτευχθεί το εν λόγω εύρος τιμών, γίνεται δεκτή ανάκτηση της τάξεως του 70 % για τις μη ραδιοσημασμένες χημικές ουσίες, συνοδευόμενη όμως από σχετική αιτιολόγηση.

▼B

1.7.2. **Ενδοεργαστηριακή επαναληπτικότητα και ευαισθησία της αναλυτικής μεθόδου**

Η ενδοεργαστηριακή επαναληπτικότητα της(των) αναλυτικής(ών) μεθόδου(ων) που χρησιμοποιείται(ούνται) για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ελεγχόμενης ουσίας και των προϊόντων υδρόλυσης σε μεταγενέστερα στάδια μπορεί να ελεγχθεί με διπλή ανάλυση δείγματος των ίδιων ρυθμιστικών διαλυμάτων (ή των εκχυλισμάτων τους), αφού σχηματιστούν επαρκείς για τον ποσοτικό προσδιορισμό ποσότητες προϊόντων υδρόλυσης.

Η αναλυτική μέθοδος πρέπει να είναι αρκούντως ευαίσθητη για τον προσδιορισμό συγκεντρώσεων της ελεγχόμενης ουσίας μέχρι ποσοστού 10 % ή λιγότερο της αρχικής συγκέντρωσης. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι αναλυτικές μέθοδοι πρέπει επίσης να είναι αρκούντως ευαίσθητες ώστε να επιτρέπουν τον ποσοτικό προσδιορισμό προϊόντων υδρόλυσης που αντιστοιχούν στο 10 % ή περισσότερο της χρησιμοποιούμενης δόσης (σε οποιαδήποτε φάση της μελέτης) μέχρι ποσοστού 25 % ή λιγότερο της κορυφαίας συγκέντρωσής τους.

1.7.3. **Διαστήματα εμπιστοσύνης για τα κινητικά δεδομένα της υδρόλυσης**

Πρέπει να υπολογίζονται με ηλεκτρονικό υπολογιστή και να παρουσιάζονται διαστήματα εμπιστοσύνης για όλους τους συντελεστές παλινδρόμησης, τις σταθερές ταχύτητας, τους χρόνους ημίσειας ζωής, καθώς και για κάθε άλλη κινητική παράμετρο (π.χ. DT50).

1.8. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

1.8.1. **Εργαστηριακά σκεύη και όργανα**

Η μελέτη πρέπει να διεξάγεται σε γυάλινους περιέκτες (π.χ. δοκιμαστικούς σωλήνες, μικρές φιάλες) στο σκοτάδι και υπό στείρες συνθήκες, εφόσον αυτό είναι αναγκαίο, εκτός εάν προηγούμενες πληροφορίες (όπως, λόγου χάριν, ο συντελεστής κατανομής σε μίγμα n-οκτανόλης/νερού) υποδηλώνουν ότι η ελεγχόμενη ουσία ενδέχεται να προσκολλάται στο γυαλί. Στις περιπτώσεις αυτές, πρέπει να εξετάζεται η χρήση εναλλακτικών υλικών (όπως του Teflon). Είναι δυνατή επίσης η άμβλυνση του προβλήματος προσκόλλησης στο γυαλί με τη χρήση μίας ή περισσότερων από τις ακόλουθες μεθόδους:

— προσδιορισμός της μάζας της ελεγχόμενης ουσίας και των προϊόντων υδρόλυσης που υφίστανται ρόφηση στο δοχείο της δοκιμής,

— χρήση λουτρού υπερήχων,

— έκπλυση όλων των γυάλινων σκευών με διαλύτη σε κάθε δειγματοληπτικό διάστημα,

— χρήση μορφοποιημένων προϊόντων,

— χρήση αυξημένης ποσότητας συνδιαλύτη για την προσθήκη της ελεγχόμενης ουσίας στο σύστημα· σε περίπτωση χρήσης συνδιαλύτη, ο τελευταίος δεν πρέπει να υδρολύει την ελεγχόμενη ουσία.

Κατά κανόνα απαιτούνται θερμοστατούμενα, ανακινούμενα υδατόλουτρα ή θερμοστατικά ελεγχόμενοι επωαστές για την επώαση των διαφόρων διαλυμάτων δοκιμής.

Απαιτείται συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός ο οποίος περιλαμβάνει, ειδικότερα:

— πεχάμετρο·

▼B

— αναλυτικά όργανα, όπως συσκευές αέριας χρωματογραφίας (GC), υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC), συμπεριλαμβανομένων κατάλληλων συστημάτων ανίχνευσης για την ανάλυση ραδιοσημασμένων και μη ραδιοσημασμένων ουσιών ή για τη μέθοδο αντίστροφης αραίωσης ισοτόπων

— όργανα ταυτοποίησης (π.χ. φασματομετρίας μάζας (MS), αέριας χρωματογραφίας — φασματομετρίας μάζας (GC-MS), υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης — φασματομετρίας μάζας (HPLC-MS), φασματομετρίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), κλπ.)·

— απαριθμητή υγρού σπινθηρισμού·

— διαχωριστικές χοάνες για εκχύλιση υγρού — υγρού·

— συσκευές για τη συμπύκνωση διαλυμάτων και εκχυλισμάτων (π.χ. περιστρεφόμενος εξατμιστήρας)·

— συσκευή ελέγχου της θερμοκρασίας (π.χ. υδατόλουτρο).

Τα χημικά αντιδραστήρια περιλαμβάνουν, π.χ.:

— οργανικούς διαλύτες αναλυτικής καθαρότητας, όπως εξάνιο, διχλωρομεθάνιο, κλπ.,

— υγρό σπινθηρισμού,

— ρυθμιστικά διαλύματα (για λεπτομέρειες, βλ. σημείο 1.8.3).

Όλα τα γυάλινα σκεύη, το νερό καθαρότητας αντιδραστηρίου και τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται στις δοκιμές υδρόλυσης, πρέπει να αποστειρώνονται.

1.8.2. **Προσθήκη της ελεγχόμενης ουσίας**

Η ελεγχόμενη ουσία πρέπει να προστίθεται ως υδατικό διάλυμα στα διάφορα ρυθμιστικά διαλύματα (βλ. παράρτημα 3). Εάν είναι αναγκαίο για την επαρκή διάλυση, η χρήση μικρών ποσοτήτων διαλυτών που αναμειγνύονται με το νερό (όπως το ακετονιτρίλιο, η ακετόνη, η αιθανόλη) επιτρέπεται για την προσθήκη και κατανομή της ελεγχόμενης ουσίας, πλην όμως δεν πρέπει, κατά κανόνα, να υπερβαίνει το 1 % v/v. Εάν εξετάζεται το ενδεχόμενο να χρησιμοποιηθεί υψηλότερη συγκέντρωση διαλυτών (π.χ. στην περίπτωση δυσδιάλυτων ελεγχόμενων ουσιών), αυτό επιτρέπεται μόνο όταν είναι δυνατόν να καταδειχθεί ότι ο διαλύτης δεν επηρεάζει την υδρόλυση των ελεγχόμενων ουσιών.

Η χρήση μορφοποιημένων προϊόντων ως συνήθης πρακτική δεν συνιστάται, δεδομένου ότι δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο να επηρεαστεί η διαδικασία υδρόλυσης από τα συστατικά του μορφοποιημένου προϊόντος. Ωστόσο, για δυσδιάλυτες στο νερό ελεγχόμενες ουσίες ή ουσίες που προσκολλώνται στο γυαλί (βλ. σημείο 1.8.1), η χρήση μορφοποιημένων υλικών ενδέχεται να αποτελεί κατάλληλη εναλλακτική λύση.

Πρέπει να χρησιμοποιείται μία και μόνη συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας· αυτή δεν πρέπει να υπερβαίνει το 0,01 M ή το ήμισυ της συγκέντρωσης κορεσμού (βλ. παράρτημα 1).

▼B

1.8.3. **Ρυθμιστικά διαλύματα**

Η δοκιμή υδρόλυσης πρέπει να διεξάγεται σε τιμές pH 4, 7 και 9. Για το σκοπό αυτό, πρέπει να παρασκευάζονται ρυθμιστικά διαλύματα με την χρήση χημικών ουσιών και νερού καθαρότητας αντιδραστηρίου. Ορισμένα χρήσιμα ρυθμιστικά συστήματα περιγράφονται στο παράρτημα 3. Σημειωτέον ότι το χρησιμοποιούμενο ρυθμιστικό σύστημα μπορεί να επηρεάσει την ταχύτητα της υδρόλυσης και, όταν αυτό παρατηρείται, πρέπει να χρησιμοποιείται εναλλακτικό ρυθμιστικό σύστημα ([1]).

Το pH κάθε ρυθμιστικού διαλύματος πρέπει να ελέγχεται με βαθμονομημένο πεχάμετρο, με ακρίβεια τουλάχιστον 0,1, στην απαιτούμενη θερμοκρασία.

1.8.4. **Συνθήκες δοκιμής**

1.8.4.1. *Θερμοκρασία δοκιμής*

Τα πειράματα υδρόλυσης πρέπει να εκτελούνται σε σταθερές θερμοκρασίες. Για λόγους παρέκτασης, είναι σημαντικό να επιτυγχάνεται σταθερότητα θερμοκρασίας τουλάχιστον ± 0,5°C.

Στην περίπτωση που η υδρολυτική συμπεριφορά της ελεγχόμενης ουσίας δεν είναι γνωστή, πρέπει να διεξάγεται προκαταρκτική δοκιμή (βαθμίδα 1) σε θερμοκρασία 50 °C. Οι κινητικές δοκιμές ανώτερων βαθμίδων πρέπει να εκτελούνται σε τρεις τουλάχιστον θερμοκρασίες (συμπεριλαμβανομένης δοκιμής στους 50 °C), εκτός εάν η ελεγχόμενη ουσία είναι σταθερή στην υδρόλυση, όπως προκύπτει από τη δοκιμή της βαθμίδας 1. Ένα συνιστώμενο πεδίο τιμών θερμοκρασίας είναι 10-70 °C (κατά προτίμηση με τη χρήση μίας τουλάχιστον θερμοκρασίας κάτω των 25 °C), το οποίο περικλείει τη θερμοκρασία αναφοράς 25 °C και τις περισσότερες από τις θερμοκρασίες που συναντώνται στο ύπαιθρο.

1.8.4.2. *Φως και οξυγόνο*

Όλες οι υδρολυτικές δοκιμές πρέπει να διεξάγονται με τη χρήση κατάλληλων μεθόδων, ώστε να αποφεύγονται τα φωτολυτικά φαινόμενα. Πρέπει να λαμβάνεται κάθε κατάλληλο μέτρο ώστε να αποφεύγεται το οξυγόνο (π.χ. με τη διοχέτευση φυσαλίδων ηλίου, αζώτου ή αργού για διάστημα 5 λεπτών πριν από την παρασκευή του διαλύματος).

1.8.4.3. *Διάρκεια της δοκιμής*

Η προκαταρκτική δοκιμή πρέπει να διεξάγεται επί πενθήμερο, ενώ οι δοκιμές ανώτερων βαθμίδων πρέπει να διενεργούνται μέχρι να υδρολυθεί το 90 % της ελεγχόμενης ουσίας ή επί 30 ημέρες, ανάλογα με το ποιο από τα δύο χρονικά διαστήματα είναι μικρότερο.

1.8.5. **Εκτέλεση της δοκιμής**

1.8.5.1. *Προκαταρκτική δοκιμή (βαθμίδα 1)*

Η προκαταρκτική δοκιμή εκτελείται σε θερμοκρασία 50 ± 0,5°C και pH 4,0, 7,0 και 9,0. Εάν μετά από 5 ημέρες παρατηρείται υδρόλυση μικρότερη του 10 τοις εκατό ($t0.5_{25\ °C} > 1$ έτος), η ελεγχόμενη ουσία θεωρείται υδρολυτικώς σταθερή και, κατά κανόνα, δεν απαιτούνται περαιτέρω δοκιμές. Εάν είναι γνωστό ότι η ουσία είναι ασταθής σε περιβαλλοντικώς σημαντικές θερμοκρασίες ([2]), δεν απαιτείται προκαταρκτική δοκιμή. Η αναλυτική μέθοδος πρέπει να είναι αρκούντως ακριβής και ευαίσθητη ώστε να ανιχνεύει μία κατά 10 τοις εκατό μείωση της αρχικής συγκέντρωσης.

([1]) Οι Mabey και Mill συνιστούν τη χρήση βορικών ή οξικών ρυθμιστικών διαλυμάτων, αντί των φωσφορικών (11).

([2]) Οι σχετικές πληροφορίες ενδέχεται να προέρχονται από άλλες πηγές, όπως τα βιβλιογραφικά δεδομένα για την υδρόλυση ενώσεων ανάλογης δομής, ή από άλλες, προκαταρτικές ημι-ποσοτικές δοκιμές υδρόλυσης με την ελεγχόμενη ουσία, σε προγενέστερο στάδιο ανάπτυξης.

▼B

1.8.5.2. *Υδρόλυση ασταθών ουσιών (βαθμίδα 2)*

Η δοκιμή της ανώτερης βαθμίδας (προηγμένη) πρέπει να εκτελείται στις τιμές pH στις οποίες η ελεγχόμενη ουσία διαπιστώθηκε ότι είναι ασταθής, βάσει της προαναφερθείσας προκαταρκτικής δοκιμής. Τα ρυθμιστικά διαλύματα της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να διατηρούνται στις επιλεγμένες θερμοκρασίες. Προκειμένου να ελεγχθεί η συμπεριφορά πρώτης τάξεως, κάθε διάλυμα αντίδρασης πρέπει να αναλύεται ανά χρονικά διαστήματα που εξασφαλίζουν τουλάχιστον έξι σημεία διατεταγμένα μεταξύ επιπέδων υδρόλυσης της ελεγχόμενης ουσίας 10 % και 90 %. Πρέπει να λαμβάνονται επιμέρους δείγματα πολλαπλού προσδιορισμού (τουλάχιστον δύο σε χωριστές φιάλες) και να αναλύεται το περιεχόμενό τους τουλάχιστον σε έξι χρόνους δειγματοληψίας (ώστε να προκύπτουν τουλάχιστον δώδεκα σημεία δεδομένων). Η χρήση ενός και μόνου δείγματος χύδην, από το οποίο λαμβάνονται επιμέρους κατάλληλες ποσότητες του ελεγχόμενου διαλύματος σε κάθε δειγματοληπτικό μεσοδιάστημα θεωρείται ανεπαρκής, επειδή δεν επιτρέπει την ανάλυση της μεταβλητότητας (διακύμανσης) των δεδομένων και ενδέχεται να προκαλέσει προβλήματα μόλυνσης του διαλύματος της δοκιμής. Στο τέλος της δοκιμής της ανώτερης βαθμίδας (δηλ. όταν έχει επιτευχθεί υδρόλυση 90 % ή έχουν παρέλθει 30 ημέρες) πρέπει να διενεργούνται έλεγχοι για τη επιβεβαίωση της στειρότητας. Ωστόσο, εάν δεν παρατηρηθεί αποικοδόμηση (δηλαδή μετατροπή), οι έλεγχοι στειρότητας δεν θεωρούνται αναγκαίοι.

1.8.5.3. *Ποιοτικός προσδιορισμός των προϊόντων υδρόλυσης (βαθμίδα 3)*

Κάθε σημαντικό προϊόν υδρόλυσης, τουλάχιστον δε αυτά που αντιπροσωπεύουν ποσοστό > 10 % της χρησιμοποιούμενης δόσης, πρέπει να ταυτοποιείται με κατάλληλες αναλυτικές μεθόδους.

1.8.5.4. *Προαιρετικές δοκιμές*

Για υδρολυτικώς ασταθείς ελεγχόμενες ουσίες ενδέχεται να απαιτούνται πρόσθετες δοκιμές σε τιμές pH εκτός των τιμών 4, 7 και 9. Λόγου χάριν, για λόγους φυσιολογίας, ενδέχεται να απαιτείται δοκιμή υπό περισσότερο όξινες συνθήκες (π.χ. pH 1,2), με τη χρήση μιας και μόνης φυσιολογικώς κατάλληλης θερμοκρασίας (37 ^{o}C).

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Οι ποσότητες των ελεγχόμενων ουσιών και, εάν έχουν σημασία, των προϊόντων υδρόλυσης πρέπει να εκφράζονται σε % της χρησιμοποιηθείσας αρχικής συγκέντρωσης και, ενδεχομένως, σε mg/l για κάθε διάστημα δειγματοληψίας και για κάθε pH και θερμοκρασία δοκιμής. Επιπλέον, όταν έχει χρησιμοποιηθεί ραδιοσημασμένη ελεγχόμενη ουσία, πρέπει να παρέχεται το ισοζύγιο μάζας σε επί τοις εκατό ποσοστό της χρησιμοποιηθείσας αρχικής συγκέντρωσης.

Πρέπει να παρέχεται γραφική παράσταση του λογάριθμου των συγκεντρώσεων της ελεγχόμενης ουσίας σε συνάρτηση με τον χρόνο. Πρέπει να ταυτοποιούνται τα κύρια προϊόντα υδρόλυσης, τουλάχιστον δε αυτά που αντιπροσωπεύουν ποσοστό ≥ 10 % της χρησιμοποιηθείσας δόσης και να χαράσσεται η καμπύλη του λογάριθμου των συγκεντρώσεών τους, όπως για τη μητρική ουσία, ώστε να εμφαίνονται οι αντίστοιχες ταχύτητες σχηματισμού και αποικοδόμησης.

▼B

2.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Οι χρόνοι ημίσειας ζωής ή οι τιμές DT50 πρέπει να προσδιορίζονται ακριβέστερα με κατάλληλους υπολογισμούς κινητικού μοντέλου. Οι χρόνοι ημίσειας ζωής και/ή τιμές DT_{50} (συμπεριλαμβανομένων των ορίων εμπιστοσύνης) πρέπει να αναφέρονται για κάθε pH και θερμοκρασία, συνοδευόμενοι από περιγραφή του χρησιμοποιηθέντος μοντέλου, της τάξεως της κινητικής και του συντελεστή προσδιορισμού (r^2). Όπου ενδείκνυται, οι υπολογισμοί πρέπει να εφαρμόζονται και στα προϊόντα υδρόλυσης.

Σε περίπτωση μελετών ταχύτητας που διεξάγονται σε διαφορετικές θερμοκρασίες, πρέπει να δίδονται οι σταθερές ταχύτητας υδρόλυσης ψευδο-πρώτης τάξεως (k_{obs}) συναρτήσει της θερμοκρασίας. Ο υπολογισμός πρέπει να στηρίζεται στον διαχωρισμό των k_{obs} σε σταθερές ταχύτητας για την υδρόλυση σε όξινο, ουδέτερο και αλκαλικό περιβάλλον (k_H, $k_{neutral}$, και k_{OH} αντιστοίχως), καθώς και στην εξίσωση του Arrhenius:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{neutral} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i = H,neutral,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

όπου A_i και B_i είναι σταθερές παλινδρόμησης από το σημείο τομής και την κλίση, αντιστοίχως, των καμπυλών που διέρχονται από τα περισσότερα σημεία μετά από γραμμική παλινδρόμηση του ln k_i έναντι του αντιστρόφου της απόλυτης θερμοκρασίας σε βαθμούς Kelvin (T). Με τη βοήθεια των εξισώσεων του Arrhenius για την υδρόλυση σε όξινο, ουδέτερο και αλκαλικό περιβάλλον, μπορούν να υπολογιστούν οι σταθερές ταχύτητας ψευδο-πρώτης τάξεως και, συνεπώς, οι χρόνοι ημίσειας ζωής για άλλες θερμοκρασίες, για τις οποίες δεν είναι πρακτικά δυνατός ο άμεσος πειραματικός προσδιορισμός σταθεράς της ταχύτητας (10).

2.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Οι περισσότερες υδρολυτικές αντιδράσεις έχουν φαινόμενες ταχύτητες αντίδρασης πρώτης τάξεως και, ως εκ τούτου, οι χρόνοι ημίσειας ζωής είναι ανεξάρτητοι από τη συγκέντρωση (βλ. εξίσωση 4 στο παράρτημα 2). Το γεγονός αυτό επιτρέπει, κατά κανόνα, την εφαρμογή των εργαστηριακών αποτελεσμάτων που προσδιορίζονται σε συγκεντρώσεις 10^{-2} έως 10^{-3} M στις περιβαλλοντικές συνθήκες (< 10^{-6} M) (10). Από τους Mabey και Mill (11) έχουν αναφερθεί αρκετά παραδείγματα ικανοποιητικής συμφωνίας μεταξύ των ταχυτήτων υδρόλυσης που μετρήθηκαν τόσο σε καθαρά, όσο και σε φυσικά ύδατα για ποικιλία χημικών ενώσεων, υπό τον όρο ότι είχαν μετρηθεί τόσο το pH, όσο και η θερμοκρασία.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση για τη δοκιμή πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη ουσία:

— κοινή ονομασία, χημική ονομασία, αριθ. CAS, συντακτικός τύπος (όπου εμφαίνεται η θέση του ιχνηθέτη/ισοτόπου, όταν χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένο υλικό) και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες (βλ. τμήμα 1.5),

— καθαρότητα (προσμείξεις) της ελεγχόμενης ουσίας,

— καθαρότητα ισοτόπου για τη ραδιοσημασμένη χημική ουσία και μοριακή δραστικότητα (κατά περίπτωση).

▼B

— Ρυθμιστικά διαλύματα:

— ημερομηνίες και λεπτομέρειες παρασκευής,

— χρησιμοποιηθέντα ρυθμιστικά διαλύματα και ύδατα,

— μοριακότητα και pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων.

Συνθήκες δοκιμής:

— ημερομηνίες διεξαγωγής των μελετών,

— ποσότητα της χρησιμοποιηθείσας ελεγχόμενης ουσίας,

— μέθοδος και διαλύτες (τύπος και ποσότητα) που χρησιμοποιήθηκαν για την προσθήκη της ελεγχόμενης ουσίας,

— όγκος επωασθέντων με την ελεγχόμενη ουσία ρυθμιστικών διαλυμάτων,

— περιγραφή του χρησιμοποιηθέντος συστήματος επώασης,

— pH και θερμοκρασία κατά τη μελέτη,

— χρόνοι δειγματοληψίας,

— μέθοδος(οι) εκχύλισης,

— μέθοδοι ποσοτικού και ποιοτικού προσδιορισμού της ελεγχόμενης ουσίας και των οικείων προϊόντων υδρόλυσης στα ρυθμιστικά διαλύματα,

— αριθμός πολλαπλών προσδιορισμών.

Αποτελέσματα:

— ενδοεργαστηριακή επαναληπτικότητα και ευαισθησία των αναλυτικών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν,

— ανακτήσεις (οι % τιμές για μία έγκυρη μελέτη παρέχονται στο σημείο 1.7.1),

— δεδομένα πολλαπλού προσδιορισμού και μέσοι όροι σε μορφή πινάκων,

— ισοζύγιο μάζας κατά τη διάρκεια και στο τέλος των μελετών (όταν χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένη ελεγχόμενη ουσία),

— αποτελέσματα προκαταρκτικής δοκιμής,

— συζήτηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων,

— όλα τα αρχικά δεδομένα και αριθμητικά στοιχεία.

Τα ακόλουθα στοιχεία απαιτούνται μόνο όταν έχει προσδιοριστεί η ταχύτητα υδρόλυσης:

— καμπύλες συγκεντρώσεων σε συνάρτηση με τον χρόνο για τις ελεγχόμενες ουσίες και, κατά περίπτωση, για τα προϊόντα υδρόλυσης σε κάθε τιμή pH και θερμοκρασίας,

— πίνακες αποτελεσμάτων της εξίσωσης του Arrhenius για τη θερμοκρασία 20 °C/25 °C, με pH, ωριαίες ή ημερήσιες σταθερές ταχύτητας [ώρα^{-1} ή ημέρα^{-1}], χρόνο ημίσειας ζωής ή DT50, θερμοκρασίες [°C] συμπεριλαμβανομένων των ορίων εμπιστοσύνης και των συντελεστών συσχέτισης (r^2) ή συγκρίσιμα στοιχεία,

— προτεινόμενη πορεία υδρόλυσης

▼B

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) OECD (1981). Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals Nr. 111, adopted 12 May 1981.

(2) US-Environmental Protection Agency (1982). 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 °C. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(3) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(4) Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) (1995). Οδηγία 95/36/ΕΚ της Επιτροπής για τροποποίηση της οδηγίας 91/414/ΕΟΚ του Συμβουλίου σχετικά με τη διάθεση στην αγορά φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Παράρτημα V: Πορεία και συμπεριφορά στο περιβάλλον.

(5) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(6) BBA (1980). Merkblatt Nr. 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (October 1980).

(7) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(8) OECD (2000). Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Nr.23.

(9) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994 — 2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

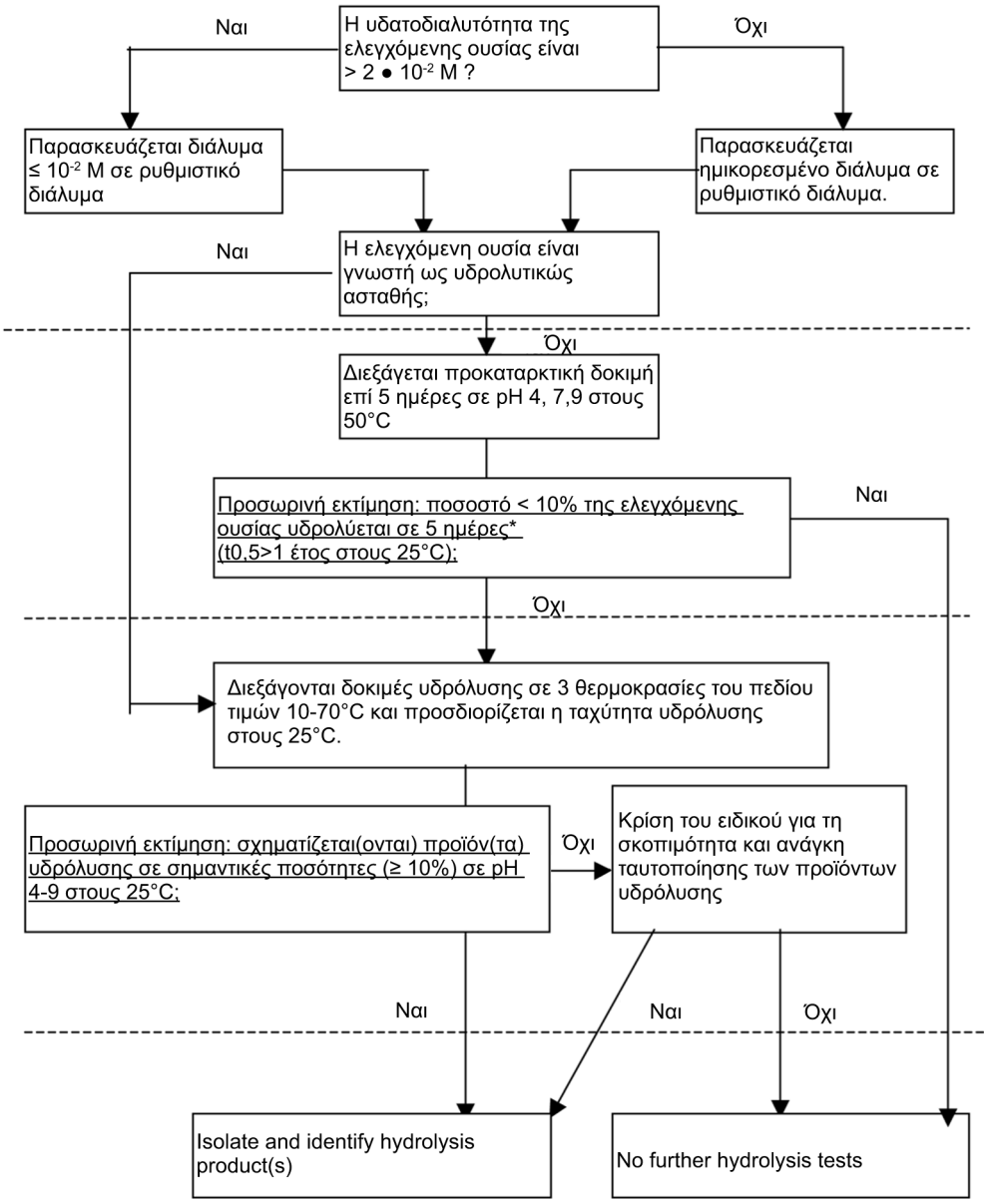
(10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).

(11) Mabey, W. and Mill, T. (1978). Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, 383-415.

▼B

Παραρτημα 1

Βαθμιδωτό σύστημα δοκιμών υδρόλυσης



* A vizsgált anyag 10%-os hidrolízise 50 °C-on kb. 30 nap, 25 °C-on kb. 1 év felezési időnek felel meg.Δεν διεξάγονται περαιτέρω δοκιμές υδρόλυσης.

▼B

Παραρτημα 2

Ορισμοί και μονάδες

Πρέπει οπωσδήποτε να χρησιμοποιούνται οι **μονάδες του Διεθνούς Συστήματος (ΔΣ/SI)**.

Ελεγχόμενη ουσία: κάθε ουσία, είτε πρόκειται για τη μητρική ένωση είτε για σημαντικά προϊόντα μετατροπής.

Προϊόντα μετατροπής: κάθε ουσία που προκύπτει από βιοτικές ή αβιοτικές αντιδράσεις μετατροπής της ελεγχόμενης ουσίας.

Προϊόντα υδρόλυσης: κάθε ουσία που προκύπτει από υδρολυτικές αντιδράσεις μετατροπής της ελεγχόμενης ουσίας.

Ωσ υδρόλυση νοείται η αντίδραση ελεγχόμενης ουσίας RX με νερό, όπου πραγματοποιείται καθαρή ανταλλαγή της ομάδας X με OH στο κέντρο της αντίδρασης:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

Η ταχύτητα με την οποία μειώνεται η συγκέντρωση της RX στην εν λόγω απλουστευμένη διαδικασία δίδεται από τη σχέση

ταχύτητα = $k\ [H_2O]\ [RX]$ αντίδραση δευτέρας τάξεως

ή

ταχύτητα = $k\ [RX]$ αντίδραση πρώτης τάξεως

ανάλογα με το στάδιο που καθορίζει την ταχύτητα. Επειδή το νερό υπάρχει σε μεγάλη περίσσεια σε σύγκριση με την ελεγχόμενη ουσία, ο εν λόγω τύπος αντίδρασης συνήθως περιγράφεται ως αντίδραση ψευδο-πρώτης τάξεως, όπου η παρατηρούμενη σταθερά ταχύτητας παρέχεται από τη σχέση

$$k_{obs} = k\ [H_2O] \qquad [2]$$

και μπορεί να υπολογιστεί από τον τύπο (*)

$$k_{obs} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_o}{C_t} \qquad [3]$$

όπου

t = χρόνος

και C_o, C_t = συγκεντρώσεις της RX στους χρόνους 0 και t.

Οι μονάδες της σταθεράς αυτής έχουν τις διαστάσεις $(\text{χρόνος})^{-1}$ και ο χρόνος ημίσειας ζωής για την αντίδραση (χρόνος αντίδρασης του 50 % της RX) παρέχεται από τον τύπο

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \qquad [4]$$

Χρόνος ημίσειας ζωής: ($t_{0,5}$) είναι ο χρόνος που χρειάζεται προκειμένου να υδρολυθεί το 50 % της ελεγχόμενης ουσίας, όταν η αντίδραση μπορεί να περιγραφεί από κινητική πρώτης τάξεως· είναι ανεξάρτητος από τη συγκέντρωση.

(*) Εάν η καμπύλη του λογάριθμου των δεδομένων έναντι του χρόνου δεν δηλώνει γραμμική συνάρτηση (εξισούμενη με ταχύτητα αντίδρασης πρώτης τάξεως), τότε η χρήση της εξίσωσης [3] δεν ενδείκνυται για τον υπολογισμό της σταθεράς της ταχύτητας υδρόλυσης της ελεγχόμενης ουσίας.

▼B

DT_{50} [Disappearance Time (Χρόνος Εξαφάνισης) 50]: είναι ο χρόνος εντός του οποίου η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας μειώνεται κατά 50 %· διαφέρει από το χρόνο ημίσειας ζωής $t_{0,5}$ όταν η αντίδραση δεν έχει χαρακτηριστικά κινητικής πρώτης τάξεως.

Υπολογισμός της σταθεράς ταχύτητας k σε διαφορετική θερμοκρασία

Όταν οι σταθερές ταχύτητας είναι γνωστές για δύο θερμοκρασίες, οι σταθερές ταχύτητας σε άλλες θερμοκρασίες μπορούν να υπολογιστούν με τη χρήση της εξίσωσης του Arrhenius:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ ή } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

Η καμπύλη ln k έναντι 1/T παρέχει ευθεία γραμμή με κλίση –E/R

όπου:

k = σταθερά ταχύτητας, μετρούμενη σε διαφορετικές θερμοκρασίες

E = ενέργεια ενεργοποίησης [kJ/mol]

T = απόλυτη θερμοκρασία [K]

R = σταθερά των αερίων [8,314 J/mol K]

Η ενέργεια ενεργοποίησης υπολογίστηκε με ανάλυση παλινδρόμησης ή με την ακόλουθη εξίσωση:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

όπου: $T_2 > T_1$.

▼B

Παραρτημα 3

Ρυθμιστικά συστήματα

A. **CLARK ΚΑΙ LUBS:**

Ρυθμιστικά μείγματα των CLARK και LUBS (*)

Σύνθεση	pH
HCl 0,2 N ΚΑΙ KCl 0,2 N ΣΤΟΥΣ 20 °C	
47,5 ml HCl + 25 ml KCl και αραίωση μέχρι 100 ml	1,0
32,25 ml HCl + 25 ml KCl και αραίωση μέχρι 100 ml	1,2
20,75 ml HCl + 25 ml KCl και αραίωση μέχρι 100 ml	1,4
13,15 ml HCl + 25 ml KCl και αραίωση μέχρι 100 ml	1,6
8,3 ml HCl + 25 ml KCl και αραίωση μέχρι 100 ml	1,8
5,3 ml HCl + 25 ml KCl και αραίωση μέχρι 100 ml	2,0
3,35 ml HCl + 25 ml KCl και αραίωση μέχρι 100 ml	2,2
Όξινο φθαλικό κάλιο 0,1 M + HCl 0,1 N στους 20 °C	
46,70 ml HCl 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	2,2
39,60 ml HCl 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	2,4
32,95 ml HCl 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	2,6
26,42 ml HCl 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	2,8
20,32 ml HCl 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	3,0
14,70 ml HCl 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	3,2
9,90 ml HCl 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	3,4
5,97 ml HCl 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	3,6
2,63 ml HCl 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	3,8
Όξινο φθαλικό κάλιο 0,1 M + NaOH 0,1 N στους 20 °C	
0,40 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	4,0
3,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	4,2
7,50 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	4,4
12,15 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	4,6
17,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	4,8

(*) Οι τιμές pH που εμφαίνονται στους πίνακες αυτούς υπολογίστηκαν βάσει των μετρήσεων δυναμικού με τη χρήση των πρότυπων εξισώσεων του Sörensen (1909). Οι αντίστοιχες τιμές pH είναι υψηλότερες κατά 0,04 μονάδες από τις τιμές των πινάκων.

▼B

Σύνθεση	pH
23,85 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	5,0
29,95 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	5,2
35,45 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	5,4
39,85 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	5,6
43,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	5,8
45,45 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	6,0

Ρυθμιστικά μείγματα των CLARK και LUBS (συνέχεια)

Δισόξινο φωσφορικό κάλιο 0,1 M + NaOH 0,1 N στους 20 °C	
5,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φωσφορικού άλατος μέχρι 100 ml	6,0
8,60 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φωσφορικού άλατος μέχρι 100 ml	6,2
12,60 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φωσφορικού άλατος μέχρι 100 ml	6,4
17,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φωσφορικού άλατος μέχρι 100 ml	6,6
23,45 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φωσφορικού άλατος μέχρι 100 ml	6,8
29,63 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φωσφορικού άλατος μέχρι 100 ml	7,0
35,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φωσφορικού άλατος μέχρι 100 ml	7,2
39,50 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φωσφορικού άλατος μέχρι 100 ml	7,4
42,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φωσφορικού άλατος μέχρι 100 ml	7,6
45,20 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φωσφορικού άλατος μέχρι 100 ml	7,8
46,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φωσφορικού άλατος μέχρι 100 ml	8,0
$H_3 B0_3$ 0,1 M σε KCl 0,1 M + NaOH 0,1 N στους 20 °C	
2,61 ml NaOH 0,1 N + 50 ml βορικού οξέος μέχρι 100 ml	7,8
3,97 ml NaOH 0,1 N + 50 ml βορικού οξέος μέχρι 100 ml	8,0
5,90 ml NaOH 0,1 N + 50 ml βορικού οξέος μέχρι 100 ml	8,2
8,50 ml NaOH 0,1 N + 50 ml βορικού οξέος μέχρι 100 ml	8,4
12,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml βορικού οξέος μέχρι 100 ml	8,6
16,30 ml NaOH 0,1 N + 50 ml βορικού οξέος μέχρι 100 ml	8,8
21,30 ml NaOH 0,1 N + 50 ml βορικού οξέος μέχρι 100 ml	9,0
26,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml βορικού οξέος μέχρι 100 ml	9,2

▼B

32,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml βορικού οξέος μέχρι 100 ml	9,4
36,85 ml NaOH 0,1 N + 50 ml βορικού οξέος μέχρι 100 ml	9,6
40,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml βορικού οξέος μέχρι 100 ml	9,8
43,90 ml NaOH 0,1 N + 50 ml βορικού οξέος μέχρι 100 ml	10,0

B. **KOLTHOFF KAI VLEESCHHOUWER:**

Ρυθμιστικά διαλύματα κιτρικού άλατος των KOLTHOFF και VLEESCHHOUWER

Σύνθεση	pH
Δισόξινο κιτρικό κάλιο 0,1 M και HC1 0,1 N στους 18 °C (*)	
49,7 ml HCl 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	2,2
43,4 ml HCl 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	2,4
36,8 ml HCl 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	2,6
30,2 ml HCl 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	2,8
23,6 ml HCl 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	3,0
17,2 ml HCl 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	3,2
10,7 ml HCl 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	3,4
4,2 ml HCl 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	3,6
Δισόξινο κιτρικό κάλιο 0,1 M και NaOH 0,1 N στους 18 °C (*)	
2,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	3,8
9,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	4,0
16,3 ml NaOH 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	4,2
23,7 ml NaOH 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	4,4
31,5 ml NaOH 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	4,6
39,2 ml NaOH 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	4,8
46,7 ml NaOH 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	5,0
54,2 ml NaOH 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	5,2
61,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	5,4
68,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	5,6
74,4 ml NaOH 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	5,8
81,2 ml NaOH 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	6,0

(*) Προστίθεται μικροσκοπικός κρύσταλλος θυμόλης ή ανάλογη ουσία ώστε να αποφευχθεί η ανάπτυξη μυκήτων.

▼B

Γ. **SÖRENSEN:**

Μείγματα βορικού άλατος του SÖRENSEN

Σύνθεση		Sörensen 18 °C	Walbum, pH στους		
ml βόρακα	ml HCl/NaO H		10 °C	40 °C	70 °C
Βόρακας 0,05 M + HCl 0,1 N					
5,25	4,75	7,62	7,64	7,55	7,47
5,50	4,50	7,94	7,98	7,86	7,76
5,75	4,25	8,14	8,17	8,06	7,95
6,00	4,00	8,29	8,32	8,19	8,08
6,50	3,50	8,51	8,54	8,40	8,28
7,00	3,00	8,08	8,72	8,56	8,40
7,50	2,50	8,80	8,84	8,67	8,50
8,00	2,00	8,91	8,96	8,77	8,59
8,50	1,50	9,01	9,06	8,86	8,67
9,00	1,00	9,09	9,14	8,94	8,74
9,50	0,50	9,17	9,22	9,01	8,80
10,00	0,00	9,24	9,30	9,08	8,86
Βόρακας 0,05 M + NaOH 0,1 N					
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12
6,0	4,0	9,97	10,06	9,67	9,28

Μείγματα φωσφορικών αλάτων του SÖRENSEN

Σύνθεση	pH
Δισόξινο φωσφορικό κάλιο 0,0667 M + Όξινο φωσφορικό νάτριο 0,0667 M στους 20 °C	
99,2 ml KH_2PO_4 + 0,8 ml Na_2HPO_4	5,0
98,4 ml KH_2PO_4 + 1,6 ml Na_2HPO_4	5,2
97,3 ml KH_2PO_4 + 2,7 ml Na_2HPO_4	5,4
95,5 ml KH_2PO_4 + 4,5 ml Na_2HPO_4	5,6
92,8 ml KH_2PO_4 + 7,2 ml Na_2HPO_4	5,8
88,9 ml KH_2PO_4 + 11,1 ml Na_2HPO_4	6,0
83,0 ml KH_2PO_4 + 17,0 ml Na_2HPO_4	6,2
75,4 ml, KH_2PO_4 + 24,6 ml Na_2HPO_4	6,4
65,3 ml KH_2PO_4 + 34,7 ml Na_2HPO_4	6,6

▼B

53,4 ml, KH_2PO_4 + 46,6 ml Na_2HPO_4	6,8
41,3 ml KH_2PO_4 + 58,7 ml Na_2HPO_4	7,0
29,6 ml KH_2PO_4 + 70,4 ml Na_2HPO_4	7,2
19,7 ml KH_2PO_4 + 80,3 ml Na_2HPO_4	7,4
12,8 ml KH_2PO_4 + 87,2 ml Na_2HPO_4	7,6
7,4 ml KH_2PO_4 + 92,6 ml Na_2HPO_4	7,8
3,7 ml KH_2PO_4 + 96,3 ml Na_2HPO_4	8,0

▼B

Γ.8 **ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΠΑ ΤΟΥΣ ΓΑΙΟΣΚΩΛΗΚΕΣ:**

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΤΕΧΝΗΤΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην εργαστηριακή αυτή δοκιμασία, η ελεγχόμενη ουσία προστίθεται σε τεχνητό έδαφος στο οποίο τοποθετούνται γαιοσκώληκες για 14 ημέρες. Μετά την περίοδο αυτή (και προαιρετικά μετά από επτά ημέρες) εξετάζεται η θανατηφόρος δράση της ουσίας στους γαιοσκώληκες, Η δοκιμασία παρέχει μέθοδο για τη σχετικά βραχυπρόθεσμη παρακολούθηση της δράσης χημικών ουσιών στους γαιοσκώληκες, με πρόσληψη από το δέρμα ή την τροφική οδό.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΑ

LC_{50}: Η συγκέντρωση μιας ουσίας που υπολογίζεται ότι σκοτώνει το 50 % των πειραματοζώων κατά την περίοδο της δοκιμασίας.

1.3. ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Χρησιμοποιείται περιοδικά μια ουσία αναφοράς για να επιβεβαιώνεται ότι η ευαισθησία του συστήματος ελέγχού δεν έχει μεταβληθεί σημαντικά.

Ως ουσία αναφοράς συνιστάται το χλωροακεταμίδιο αναλυτικής καθαρότητας.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Το έδαφος είναι μεταβλητό μέσο, ώστε στη δοκιμασία αυτή χρησιμοποιείται τεχνητό αργιλώδες έδαφος που έχει καθοριστεί με προσοχή. Ενήλικες γαιοσκώληκες του είδους Eisenia foetida (βλέπε σημείωση στο προσάρτημα) διατηρούνται σε καθορισμένο τεχνητό έδαφος που έχει υποστεί κατεργασία με διαφορετικές συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας. Το περιεχόμενο των δοχείων απλώνεται σε δίσκο 14 ημέρες (και προαιρετικά επτά ημέρες) μετά την έναρξη της δοκιμασίας και μετριούνται οι γαιοσκώληκες που έχουν επιζήσει σε κάθε συγκέντρωση.

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Η δοκιμασία έχει μελετηθεί για να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη δυνατή αναπαραγωγιμότητα σε σχέση με το υπόστρωμα και τον οργανισμό ελέγχου. Η θνησιμότητα των μαρτύρων στο τέλος της δοκιμασίας δεν πρέπει να υπερβαίνει το 10 %, διαφορετικά η δοκιμασία είναι άκυρη.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

1.6.1. *Υλικά*

1.6.1.1. Υπόστρωμα δοκιμασίας

Ως βασικό υπόστρωμα για τη δοκιμασία χρησιμοποιείται καθορισμένο τεχνητό έδαφος,

α) Βασικό υπόστρωμα (τα ποσοστά εκφράζουν ξηρό βάρος)

— 10 % τύρφη σφάγνων (με pH όσο το δυνατό πλησιέστερα στο 5,5-6,0, χωρίς ορατά υπολείμματα φυτού και λεπτά αλεσμένη),

▼B

— 20 % άργιλος καολινίτη, κατά προτίμηση με περισσότερο από 50 % καολινίτη,

— 69 % περίπου βιομηχανική χαλαζιακή άμμος (να υπερισχύει η λεπτή άμμος με ποσοστό περισσότερο από 50 % σε μέγεθος σωματιδίων 0,05 έως 0,2 mm). Αν η ουσία δεν διασπείρεται αρκετά στο νερό, φυλάσσονται 10 g ανά δοχείο δοκιμασίας για να αναμειχθούν αργότερα με τη δοκιμαζόμενη ουσία.

— 1 % περίπου ανθρακικό ασβέστιο ($CaC0_3$), κονιοποιημένο, χημικά καθαρό, που προστίθεται για να ρυθμιστεί το pH στο 6,0 ± 0,5.

β) Υπόστρωμα δοκιμασίας

Το υπόστρωμα δοκιμασίας περιέχει το βασικό υπόστρωμα, την ελεγχόμενη ουσία και απιονισμένο νερό.

Η περιεκτικότητα σε νερό είναι περίπου 25 έως 42 % του ξηρού βάρους του βασικού υποστρώματος και προσδιορίζεται με ξήρανση ενός δείγματος στους 105 °C μέχρι σταθερού βάρους. Το κριτήριο-κλειδί είναι ότι το τεχνητό έδαφος πρέπει να υγρανθεί τόσο ώστε να μην υπάρχει στάσιμο νερό. Η ανάμειξη γίνεται με προσοχή για να ληφθεί ομοιόμορφη κατανομή της δοκιμαζόμενης ουσίας στο υπόστρωμα. Ο τρόπος ενσωμάτωσης της δοκιμαζόμενης ουσίας στο υπόστρωμα πρέπει να αναφέρεται.

γ) Υπόστρωμα-μάρτυρας

Το υπόστρωμα-μάρτυρας περιέχει το βασικό υπόστρωμα και νερό. Αν χρησιμοποιούνται πρόσθετα, παρασκευάζεται συμπληρωματικός μάρτυρας που περιέχει την ίδια ποσότητα προσθέτου.

1.6.1.2. Δοχεία δοκιμασίας

Είναι γυάλινα δοχεία χωρητικότητας ενός λίτρου περίπου (κατάλληλα σκεπασμένα με πλαστικά καλύμματα, πλάκες ή με πλαστική μεμβράνη με οπές αερισμού), γεμάτα με μια ποσότητα υγρού υποστρώματος ελέγχου ή μάρτυρα που ισοδυναμεί με 500 g ξηρού βάρους υποστρώματος.

1.6.2. *Συνθήκες δοκιμασίας*

Τα δοχεία διατηρούνται σε κλιματιζόμενους θαλάμους σε θερμοκρασία 20 ± 2 °C με συνεχές φως. Η ένταση του φωτός θα πρέπει να είναι 400 έως 800 lux.

Η περίοδος δοκιμασίας είναι 14 ημέρες αλλά η θνησιμότητα μπορεί να υπολογιστεί προαιρετικά επτά ημέρες μετά την έναρξη της δοκιμασίας.

1.6.3. *Διαδικασία δοκιμασίας*

Συγκεντρώσεις δοκιμασίας

Οι συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας εκφράζονται ως βάρος της ουσίας ανά ξηρό βάρος του βασικού υποστρώματος (mg/kg).

Δοκιμασία προσδιορισμού σειράς

Η σειρά των συγκεντρώσεων που προξενούν θνησιμότητα από 0 μέχρι 100 % μπορεί να βρεθεί με δοκιμασία προσδιορισμού σειράς ώστε να συγκεντρωθούν πληροφορίες για τη σειρά συγκεντρώσεων που θα χρησιμοποιηθούν στην οριστική δοκιμασία.

▼B

Οι ουσίες ελέγχονται στις εξής συγκεντρώσεις: 1 000, 100, 10, 1 και 0,1 mg ουσίας/kg υποστρώματος ελέγχου (ξηρό βάρος).

Αν πρόκειται να διεξαχθεί πλήρης οριστική δοκιμασία, ένας κύκλος δοκιμασίας ανά συγκέντρωση και ένας για τον μάρτυρα που δεν έχει υποστεί κατεργασία, καθένας με δέκα σκώληκες, επαρκούν για τη δοκιμασία προσδιορισμού σειράς.

Οριστική δοκιμασία

Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας προσδιορισμού σειράς χρησιμοποιούνται για την εκλογή πέντε τουλάχιστον συγκεντρώσεων σε γεωμετρική σειρά που να καλύπτουν ακριβώς την κλίμακα θνησιμότητας 0 έως 100 % και να διαφέρουν κατά σταθερό συντελεστή όχι μεγαλύτερο από 1,8.

Η δοκιμασία που εκτελείται με αυτές τις σειρές συγκεντρώσεων επιτρέπει να προσδιοριστούν με τη μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια η τιμή LC_{50} και τα όρια εμπιστοσύνης γι' αυτήν.

Στην οριστική δοκιμασία διεξάγονται τέσσερις τουλάχιστον κύκλοι ελέγχου ανά συγκέντρωση και τέσσερις για τους μάρτυρες που δεν έχουν υποστεί κατεργασία, καθένας με δέκα σκώληκες. Το αποτέλεσμα αυτών των σειρών δοκιμών εκφράζονται ως μέσος όρος και τυπική απόκλιση.

Όταν δύο διαδοχικές συγκεντρώσεις με λόγο 1,8 προκαλούν θνησιμότητα μόνο 0 % και 100 %, οι δύο αυτές τιμές είναι αρκετές για να δειχθεί η περιοχή τιμών μέσα στην οποία βρίσκεται η τιμή της LC_{50}.

Ανάμειξη του βασικού υποστρώματος δοκιμασίας και της δοκιμαζόμενης ουσίας

Το υπόστρωμα δοκιμασίας θα πρέπει, κατά το δυνατό, να παρασκευάζεται χωρίς άλλα πρόσθετα μέσα εκτός από νερό. Αμέσως πριν από την έναρξη της δοκιμασίας, ένα γαλάκτωμα ή εναιώρημα της ελεγχόμενης ουσίας σε απιονισμένο νερό ή άλλο διαλύτη αναμειγνύεται με το βασικό υπόστρωμα δοκιμασίας ή ψεκάζεται ομοιόμορφα πάνω από αυτό με λεπτό χρωματογραφικό ή παρόμοιο ψεκαστήρα,

Αν η ελεγχόμενη συσία δεν διαλύεται στο νερό, είναι δυνατόν να διαλυθεί σε όσο το δυνατό μικρότερο όγκο κατάλληλου οργανικού διαλύτη (π.χ. εξάνιο, ακετόνη ή χλωροφόρμιο).

Μόνο μέσα που εξαερώνονται εύκολα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διαλυτοποίηση, διασπορά ή γαλακτωματοποίηση της ελεγχόμενης ουσίας. Το υπόστρωμα ελέγχου πρέπει να αερίζεται πριν χρησιμοποιηθεί. Η ποσότητα νερού που εξατμίζεται πρέπει να αναπληρώνεται. Ο μάρτυρας περιέχει την ίδια ποσότητα από οποιαδήποτε πρόσθετο.

Αν η δοκιμαζόμενη ουσία δεν διαλύεται, διασπείρεται ή γαλακτωματοποιείται σε οργανικούς διαλύτες, 10 g ενός μείγματος από λεπτή κονιοποιημένη χαλαζιακή άμμο και την ποσότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας που απαιτείται για την κατεργασία 500 g ξηρού βάρους τεχνητού εδάφους, αναμειγνύονται με 490 g ξηρού βάρους υποστρώματος δοκιμασίας.

Για κάθε κύκλο δοκιμασίας, ποσότητα υγρού υποστρώματος δοκιμασίας που ισοδυναμεί με 500 g ξηρού βάρους τοποθετείται σε κάθε γυάλινο δοχείο. Δέκα γαιοσκώληκες, που έχουν προκαλλιεργηθεί για 24 ώρες σε παρόμοιο υγρό βασικό υπόστρωμα, στη συνέχεια έχουν πλυθεί και η περίσσεια του νερού έχει απορροφηθεί με διηθητικό χαρτί πριν χρησιμοποιηθούν, τοποθετούνται στην επιφάνεια του υποστρώματος δοκιμασίας.

▼B

Τα δοχεία καλύπτονται με διάτρητα πλαστικά καλύμματα, πλάκες ή μεμβράνη για να μην ξηρανθεί το υπόστρωμα και διατηρούνται στις συνθήκες της δοκιμασίας για 14 ημέρες.

Οι εκτιμήσεις γίνονται 14 ημέρες (και προαιρετικά επτά ημέρες) μετά την έναρξη της δοκιμασίας. Το υπόστρωμα απλώνεται σε δίσκο κατασκευασμένο από γυαλί ή ανοξείδωτο χάλυβα, Εξετάζονται οι γαιοσκώληκες και προσδιορίζεται ο αριθμός αυτών που επιζούν. Οι γαιοσκώληκες θεωρούνται νεκροί αν δεν αντιδρούν σε ελαφρό μηχανικό ερεθισμό στο πρόσθιο άκρο τους.

Όταν η εξέταση γίνεται μετά από επτά ημέρες, το δοχείο γεμίζεται πάλι με το υπόστρωμα και οι επιζώντες γαιοσκώληκες επανατοποθετούνται στην επιφάνεια του ίδιου υποστρώματος ελέγχου.

1.6.4. *Οργανισμοί δοκιμασίας*

Οι οργανισμοί δοκιμασίας θα πρέπει να είναι ενήλικες Eisenia foetida (βλέπε σημείωση στο προσάρτημα) (ηλικίας τουλάχιστον δύο μηνών, με δακτυλιοειδή τμήματα) υγρού βάρους 300 έως 600 mg. (Για μέθοδο εκτροφής βλέπε προσάρτημα.)

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Οι συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας αναφέρονται σε συσχετισμό με τα αντίστοιχα ποσοστά νεκρών γαιοσκωλήκων.

Όταν τα δεδομένα είναι *αρκετά,* η τιμή LC_{50} και τα όρια εμπιστοσύνης (p = 0,05) προσδιορίζονται με πρότυπες μεθόδους (Litchfield και Wilcoxon, 1949, ή αντίστοιχη μέθοδο). Η τιμή LC_{50} δίνεται ως mg της ελεγχόμενης ουσίας ανά kg υποστρώματος ελέγχου (ξηρό βάρος).

Σε περίπτωση που η κλίση της καμπύλης συγκεντρώσεων είναι πολύ μεγάλη και δεν επιτρέπει τον υπολογισμό της LC_{50}, αρκεί ο γραφικός υπολογισμός της τιμής αυτής.

Όταν δύο διαδοχικές συγκεντρώσεις με λόγο 1,8 προσκαλούν θνησιμότητα μόνο 0 % και 100 %, οι δύο αυτές τιμές είναι αρκετές για να δειχθεί η περιοχή τιμών μέσα στην οποία βρίσκεται η τιμή της LC_{50}.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Η έκθεση της δοκιμασίας περιλαμβάνει, αν είναι δυνατόν, τις ακόλουθες πληροφορίες:

— δήλωση ότι η δοκιμασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα παραπάνω ποιοτικά κριτήρια,

— τη δοκιμασία που πραγματοποιήθηκε (δοκιμασία προσδιορισμού σειράς ή/και οριστική δοκιμασία),

— ακριβή περιγραφή των συνθηκών της δοκιμασίας ή δήλωση ότι η δοκιμασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο· οποιεσδήποτε παρεκκλίσεις πρέπει να αναφέρονται,

— ακριβή περιγραφή του τρόπου με τον οποίο η δοκιμαζόμενη ουσία αναμείχθηκε με το βασικό υπόστρωμα δοκιμασίας,

— πληροφορίες για τους οργανισμούς δοκιμασίας (είδος, ηλικία, μέσος όρος και κλίμακα βάρους, συνθήκες διατήρησης και αναπαραγωγής, προμηθευτής),

▼B

— τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της LC_{50},

— τα αποτελέσματα της δοκιμασίας, συμπεριλαμβανομένων όλων των δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν,

— περιγραφή συμπτωμάτων ή αλλαγών συμπεριφοράς που παρατηρήθηκαν στους οργανισμούς των μαρτύρων,

— τη θνησιμότητα των μαρτύρων,

— την τιμή LC_{50} ή την υψηλότερη συγκέντρωση ελέγχου που δεν προκάλεσε θνησιμότητα και τη χαμηλότερη συγκέντρωση που προκάλεσε θνησιμότητα 100 %, 14 ημέρες (και προαιρετικά επτά ημέρες) μετά την έναρξη της δοκιμάσιας,

— γραφική παράσταση της καμπύλης συγκέντρωσης/απόκρισης,

— τα αποτελέσματα που έχουν ληφθεί με την ουσία αναφοράς, είτε στα πλαίσια της δοκιμασίας αυτής είτε από προηγούμενα πειράματα ποιοτικού ελέγχου.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

(I) ΟΟΣΑ, Παρίσι, 1981, *Test Guideline 207,* απόφαση του Συμβουλίου C(81) 30 τελικό.

(2) Edwards, C. A. and Lofty, J. R., 1977, *Biology of Earthworms.* Chapman and Hall, London, 331 pp.

(3) Bouche, M. B., 1972, *Lombriciens de France, Ecologie et Systématique,* Institut national dc la recherche agronomique, 671 pp.

(4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method of evaluating dose effect experiments. J. of Pharm. and Exp. Therap., 1, vol. 96, 1949, p. 99.

(5) Επιτροπή των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, *Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms,* έκθεση EUR 8714 EN, 1983,

(6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag «Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden», in: Rudolph/Boje, Ö*kotoxikologie,* ecomed, Landsberg, 1986.

▼B

Προσάρτημα

Αναπαραγωγή και διατήρηση των σκωλήκων πριν από τη δοκιμασία

Για την αναπαραγωγή οργανισμών, 30 έως 50 ενήλικες σκώληκες τοποθετούνται σε δοχείο αναπαραγωγής με φρέσκο υπόστρωμα και μεταφέρονται μετά από 14 ημέρες. Οι οργανισμοί αυτοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν για νέους κύκλους αναπαραγωγής. Οι γαιοσκώληκες που εκκολάπτονται από τους βόμβυκες χρησιμοποιούνται για τη δοκιμασία αφού ωριμάσουν (στις συνθήκες που καθορίζονται, μετά από δύο έως τρεις μήνες).

Συνθήκες διατήρησης και αναπαραγωγής

Κλιματιζόμενος θάλαμος:	θερμοκρασία 20 ± 2 °C, κατά προτίμηση με συνεχές φως (ένταση 400 έως 800 lux).
Δοχεία αναπαραγωγής:	κατάλληλα ρηχά δοχεία με όγκο 10 έως 20 l.
Υπόστρωμα:	Οι οργανισμοί *Eisenia foetida* μπορούν να αναπαραχθούν σε διάφορα ζωικά περιττώμα-τα. Συνιστάται η χρήση ενός μείγματος από 50 % κατ' όγκο τύρφη και 50 % κοπριά αγελάδας ή αλόγου σαν υλικού αναπαραγωγής, Το υλικό θα πρέπει να έχει pH 6 έως 7 περίπου (ρυθμίζεται με ανθρακικό ασβέστιο) και χαμηλή ιονική αγωγιμότητα (λιγότερο από 6 mm hos ή 0,5 % συγκέντρωση αλάτων) Το υπόστρωμα θα πρέπει να είναι υγρό αλλά όχι πολύ βρεγμένο. Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν και άλλες επιτυχείς μέθοδοι.

Σημείωση: Οι γαιοσκώληκες *Eisenia foetida* απαντούν σε δύο οικογένειες, τις οποίες ορισμένοι ειδικοί στην ταξινόμηση έχουν διαχωρίσει σε είδη (Bouche, 1972). Οι δύο οικογένειες είναι παρόμοιες μορφολογικά αλλά η μία, *Eisenia foetida foetida*, παρουσιάζει τυπικές εγκάρσιες ζώνες ή λωρίδες στα μεταμερίδια ενώ η άλλη. *Eisenia foetida* andrei, δεν τις έχει και είναι ποικιλόχρωμη με κοκκινωπή απόχρωση. Αν είναι δυνατόν, θα πρέπει να χρησιμοποιείται ή *Eisenia foetida* andrei. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη αν είναι γνωστή η αναγκαία μεθοδολογία.

▼B

Γ.9 ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ZAHN-WELLENS

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μέθοδος αποβλέπει στην εκτίμηση της δυνητική τελικής βιοαποικοδομητικότητας υδατοδιαλυτών, μη πτητικών οργανικών ουσιών, όταν αυτές εκτίθενται σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις μικροοργανισμών σε στατιστική δοκιμασία.

Στα εν αιωρήσει στερεά, είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί φυσικοχημική προσρόφηση και αυτό πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων (βλέπε σημείο 3.2.).

Οι υπό μελέτη ουσιές χρησιμοποιούνται σε συγκεντρώσεις που αντιστοιζούν σε τιμές DOC μεταξύ 50 και 400 mg/l ή τιμές COD μεταξύ 100 και 1 000 mg/l (DOC = dissolved organic carbon/διαλελυμένος οργανικός άνθρακας· COD = chemical oxygen demand/χημική απαίτηση σε οξυγόνο). Οι σχετικές υψηλές αυτές συγκεντρώσεις παρουσιάζουν το πλεονέκτημα της αναλυτικής αξιοπιστίας. Ενώσεις με τοξικές ιδιότητες μπορούν να επιβραδύνουν ή να αναστείλουν τη διαδικασία αποικοδομήσεως,

Στη μέθοδο αυτή, η μέτρηση της συγκέντρωσης του διαλελυμένου οργανικού άνθρακα ή της χημικής απαίτησης σε οξυγόνο χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της τελικής βιοαποικοδόμηση ς της ουσίας που υποβάλλεται στη δοκιμασία.

Η ταυτόχρονη χρησιμοποίηση μιας ειδικής αναλυτικής μεθόδου μπορεί να επιτρέψει τον προσδιορισμό της πρωτογενούς βιοαποικοδόμησης της ουσίας (εξαφάνιση της αρχικής χημικής δομής).

Η μέθοδος εφαρμόζεται αποκλειστικά στις υπό δοκιμασία οργανικές ουσίες εφόσον, στη συγκέντρωση υπό την οποία χρησιμοποιούνται στη δοκιμασία:

— είναι υδατοδιαλυτές στις συνθήκες υπό τις οποίες διεξάγεται η δοκιμασία,

— η τάση των ατμών τους στις συνθήκες υπό τις οποίες διεξάγεται η δοκιμασία είναι αμελητέα,

— δεν αποτελούν αντιβακτηριακούς παράγοντες,

— η προσρόφησή τους στο σύστημα της δοκιμασίας είναι περιορισμένη,

— δεν χάνονται από το διάλυμα της δοκιμασίας λόγω του σχηματισμού αφρού.

Στοιχεία που αφορούν τη σχετική αναλογία των κυριότερων συστατικών του υπό δοκιμασία υλικού θα είναι χρήσιμα στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων, ιδίως στις περιπτώσεις όπου οι τιμές των αποτελεσμάτων είναι μικρές ή οριακές.

Είναι σκόπιμο να γνωστοποιούνται τα στοιχεία που αφορούν την τοξικότητα της ουσίας σε μικροοργανισμούς προκειμένου να χρησιμοποιούνται στην ερμηνεία των χαμηλών τψών των αποτελεσμάτων και στην επιλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων για τη δοκιμασία.

▼B

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Ο βαθμός αποικοδόμησης που λαμβάνεται στο τέλος της δοκιμασίας αναφέρεται ως «Βισαποικοδομητικότητα στην δοκιμασία Zahn-Wellens»

$$D_T(\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})}\right] \times 100$$

όπου:

D_T = βιοαποικσδόμηση (%) σε χρόνο T,

C_A = τιμές DOC (ή COD) στο μείγμα τις δοκιμασίας, η μέτρηση των οποίων έχει γίνει τρεις ώρες μετά από την έναρξη της δοκιμασίας (mg/l) (DOC = dissolved organic carbon/διαλελυμένος οργανικός άνδρακας· COD = chemical oxygen demand/χημική απαίτηση σε οξυγόνο),

C_T = τιμές DOC ή COD στο μείγμα της δοκιμασίας, τη στιγμή της δειγματοληψίας (mg/l),

C_B = τιμή DOC ή COD της τυφλής δοκιμασίας τη στιγμή της δειγματοληψίας (mg/l),

C_{BA} = τιμή DOC ή COD της τυφλής δοκιμασίας, η μέτρηση της οποίας έχει γίνει τρεις ώρες μετά από την έναρξη

της δοκιμασίας (mg/l).

Ο αριθμός που εκφράζει το ύψος της αποικοδόμησης στρογγυλεύεται στην πλησιέστερη ακέραια εκατοστιαία μονάδα. Η εκατοστιαία αποικοδόμηση εκφράζεται σε επί τους εκατό DOC (ή COD) απώλεια της υπό δοκιμασία ουσίας.

Η διαφορά μεταξύ της τιμής που μετρήθηκε μετά από τρεις ώρες και της αρχικής τιμής που έχει υπολογιστεί —ή καλύτερα μετρηθεί— μπορεί να παράσχει χρήσιμα στοιχεία για την αποικοδόμηση της ουσίας (βλέπε σημείο 3.2 «Ερμηνεία των αποτελεσμάτων»).

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Σε μερικές περιπτώσεις ανάλυσης νέων ουσιών είναι χρήσιμη η παρουσία ουσιών αναφοράς. Ωστόσο δεν είναι ακόμη δυνατόν να διατυπωθούν συστάσεις για συγκεκριμένης ουσίες αναφοράς.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Οι ενεργοποιημένες ιλύες, τα ανόργανα θρεπτικά συστατικά και το υλικό της δοκιμασίας σε υδατικό διάλυμα ως αποκλειστική πηγή άνθρακα τοποθετούνται μαζί σε υάλινο δοχείο χωρητικότητας 1 έως 4 λίτρων, το οποίο φέρει αναδευτήρα και συσκευή για την εισπίεση αέρα. Αναδεύεται το μείγμα και διοχετεύεται αέρας σε 20 έως 25 °C, υπό διάχυτο φωτισμό ή σε σκοτεινό θάλαμο επί 28 ημέρες κατά μέγιστο όριο. Η διαδικασία αποικοδόμησης παρακολουθείται προσδιορίζοντας τις τιμές DOC (ή COD) στο διηθηθέν διάλυμα, καθημερινά ή ανά τακτά διαστήματα. Η αναλογία του αποικοδομούμενου DOC (ή COD), μετά από κάθε ανάπαυλα, προς την τιμή της μέτρησης που διενεργείται τρεις ώρες μετά από την έναρξη εκφράζεται ως ποσοστό βιοαποικοδόμησης και χρησιμεύει ως μέτρο του βαθμού αποικοδομήσεως τη στιγμή εκείνη. Η σημείωση των αποτελεσμάτων αυτών σε σύστημα συντεταγμένων σε συνάρτηση με τον παράγοντα χρόνος παρέχει την καμπύλη βιοαποικοδόμησης.

Όταν χρησιμοποιείται μια ειδική αναλυτική μέθοδος είναι δυνατόν να μετρηθούν οι μεταβολές της συγκέντρωσης της αρχικής ένωσης, οι οποίες οφείλονται στη βιοαποικοδόμηση (πρωτογενής βιοαποικοδόμηση).

▼B

1.5. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Σε ένα ring test αποδείχτηκε η αναπαραγωγιμότητα ικανοποιητική.

Η ευαισθησία της μεθόδου καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από το βαθμό σταθερότητας της τυφλής δοκιμασίας και σε μικρότερο βαθμό από την ακρίβεια του προσδιορισμού του διαλελυμένου οργανικού άνθρακα και το επίπεδο της ενώσεως της δοκιμασίας στο υγρό.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

1.6.1. *Προπαρασκευαστικές εργασίες*

1.6.1.1. Αντιδραστήρια

Νερό που χρησιμοποιείται στη δοκιμασία; πόσιμο νερό με περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα μικρότερη των 5 mg/l. Η συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου και μαγνησίου μαζί δεν πρέπει να υπερβαίνει το επίπεδο των 2,7 mmole/l. Στην περίπτωση που δεν τηρηθεί το όριο αυτό απαιτείται αραίωση με απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό.

Θειικό οξύ αναλυτικού βαθμού καθαρότητας: 50 g/l.

Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας: 40 g/l.

Ανόργανο θρεπτικό διάλυμα: διαλύονται σε ένα λίτρο απιονισμένου νερού:

χλωριούχο αμμώνιο, NH_4CL, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας: 38,5 g,

δισόξινο φωσφορικό νάτριο, $N_4H_2PO_4.2H_2^O$, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας: 33,4 g,

δισόξινο φωσφορικό κάλιο, KH_2PO_4, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας: 8,5 g,

μονόξινο φωσφορικό κάλιο, K_2HPO_4, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας: 21,75 g.

Το μείγμα χρησιμεύει τόσο ως θρεπτικό όσο και ως ρυθμιστικό διάλυμα.

1.6.1.2. Όργανα

Υάλινα δοχεία χωρητικότητας 1 έως 4 λίτρων (π.χ. κυλινδρικά δοχεία).

Αναδευτήρας με υάλινο ή μεταλλικό βραχίονα αναδεύσεως σε κατάλληλο στέλεχος (ο βραχίονας πρέπει να περιστρέφεται σε ύψος 5 έως 10 cm περίπου από τον πυθμένα του δοχείου). Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά μαγνητικός αναδευτήρας μήκους 7 έως 10 cm.

Υάλινος σωλήνας εσωτερικής διαμέτρου 2 έως 4 mm για την εισαγωγή αέρα. Το στόμιο του σωλήνα πρέπει να είναι σε ύψος 1 cm περίπου από τον πυθμένα του δοχείου.

Συσκευή φυγοκεντρήσεως (περίπου 3 550 g). pH-μέτρο.

Μετρητής του διαλελυμένου οξυγόνου.

Χάρτινοι ηθμοί.

▼B

Συσκευή διηθήσεως με μεμβράνη.

Μεμβράνες διηθήσεως, μεγέθους πόρου 0,45 μm. Οι μεμβράνες διηθήσεως είναι κατάλληλες εφόσον αποδεδειγμένα· δεν αποδεσμεύουν άνθρακα ούτε απορροφούν την ουσία κατά το στάδιο της διηθήσεως.

Αναλυτικός εξοπλισμός για τον προσδιορισμό του περιεχόμενου οργανικού άνθρακα και της χημικής απαίτησης σε

οξυγόνο.

1.6.1.3. Παρασκευή του εμβολίου

Η ενεργοποιημένη ιλύς που λαμβάνεται από σταθμό βιολογικής κατεργασίας εκπλύσεται με τη βοήθεια (επανειλημμένων) φυγόκεντρησεων ή καθιζήσεως με νερό κατάλληλο για τη δοκιμασία (ανωτέρω).

Η ενεργοποιημένη ιλύς πρέπει να είναι σε κατάλληλη κατάσταση. Τέτοια ιλύς μπορεί να ληφθεί από ένα σταθμό επεξεργασίας λυμάτων που λειτουργεί κανονικά. Προκειμένου η ποικιλία των βακτηριακών ειδών ή στελεχών να είναι όσο το δυνατό μεγαλύτερη, ίσως είναι προτιμότερο να αναμειγνύονται υλικά ενοφθαλμισμού διαφορετικής προελεύσεως (π.χ. από διαφορετικούς σταθμούς κατεργασίας, δείγματα εδάφους, ποτάμια νερά κλπ.). Το μείγμα υφίσταται επεξεργασία όπως περιγράφεται ανωτέρω.

Για τον έλεγχο της δραστικότητας της ενεργοποιημένης ιλύος βλέπε «Λειτουργικός έλεγχος» παρακάτω.

1.6.1.4. Παρασκευή των διαλυμάτων της δοκιμασίας

Στο δοχείο της δοκιμασίας προστίθενται 500 ml κατάλληλου για τη δοκιμασία νερού, 2,5 ml/1 ανόργανου θρεπτικού διαλύματος και ενεργοποιημένη ιλύς σε τιμή που αντιστοιχεί σε 0,2 έως 1,0 g/l ξηρής ύλης στο τελικό μείγμα. Προστίθεται επαρκώ; ποσότης αποθέματος διαλύματος της υπό δοκιμασία ουσίας μέχρις ότου επιτευχθεί στο τελικό μείγμα συγκέντρωση DOC 50 έωζ 4O0 mg/l. Οι αντίστοιχες τιμές COD είναι 100 έως 1 000 mg/l. Προστίθεται κατάλληλο για τη δοκιμασία νερό μέχρι τελικού συνολικού όγκου 1 έως 4 λίτρων. Ο καθορισμός του τελικού όγκου εξαρτάται από τον αριθμό των δειγμάτων που λαμβάνονται για προσδιορισμό του DOC ή του COD, καθώς και από τους όγκους που είναι αναγκαίοι για τη διεξαγωγή της ανάλυσης. Συνήθως ένας όγκος δύο λίτρων μπορεί να θεωρηθεί ικανοποιητικός.

Σε κάθε σειρά δοκιμασιών ακολουθείται παράλληλη διαδικασία για ένα τουλάχιστον δοχείο-μάρτυρα (τυφλή δοκιμασία). Το δοχείο αυτό περιέχει αποκλειστικά ενεργοποιημένη ιλύ και ανόγρανο θρεπτικό διάλυμα, όπου προστίθεται κατάλληλο για τη δοκιμασία νερό μέχρι συνολικού όγκου ισοδύναμου με αυτόν των δοχείων που χρησιμοποιούνται στη δοκιμασία.

1.6.2. *Διεξαγωγή της δοκιμασίας*

Το περιεχόμενο των δοχείων της δοκιμασίας αναδεύεται με μαγνητικούς αναδευτήρες ή έλικες υπό συνθήκες διάχυτου φωτισμού ή σε σκοτεινό θάλαμο σε θερμοκρασία 20 έως 25 °C. Ο αερισμός εξασφαλίζεται με τη διοχέτευση αέρα υπό πίεση ο οποίος καθαρίζεται με ηθμό από βαμβάκι ή και με φιάλη εκπλύσεως, εφόσον αυτό είναι αναγκαίο. Πρέπει να εξασφαλιστεί ότι η ιλύς δεν θα καθιζάνει και ότι η συγκέντρωση του οξυγόνου δεν θα πέσει σε επίπεδα χαμηλότερα των 2 mg/l.

Η τιμή του pH πρέπει να ελέγχεται τακτικά (π.χ. καθημερινά) και εφόσον αυτό είναι αναγκαίο να διορθώνεται σε pH 7 έως 8.

▼B

Οι απώλειες από την εξάτμηση αναπληρώνονται πριν από κάθε δειγματοληψία με τις απαιτούμενες ποσότητες απιονισμένου ή απεσταγμένου νερού. Μια καλή μέθοδος είναι να σημειώνεται η στάθμη του υγρού στο δοχείο πριν από την έναρξη της δοκιμασίας. Μετά από κάθε δειγματοληψία σημειώνεται η νέα στάθμη (χωρίς αερισμό και ανάδευση), Τα πρώτα δείγματα λαμβάνονται πάντοτε τρεις ώρες μετά την έναρξη της δοκιμασίας προκειμένου να εντοπισθεί η προσρόφηση υλικού της δοκιμασίας από την ενεργοποιημένη ιλύ.

Η εξάλειψη του υλικού της δοκιμασίας απολουθείται από προσδιορισμούς DOC ή COD που διεξάγονται σε καθημερινή ή σε κάποια άλλη τακτική βάση. Τα δείγματα από το δοχείο της δοκιμασίας και από αυτό της τυφλής δοκιμασίας διηθούνται με τη βοήθεια προσεκτικά εκπλυθέντος χάρτινου ηθμού. Τα πρώτα 5 ml του διαλύμα-τος-διηθήματος της δοκιμασίας απομακρύνονται. Οι ιλύες που είναι δύσκολο να διηθηθούν μπορούν να αφαιρεθούν προηγουμένως διά φυγοκεντρήσεως επί 10 λεπτά. Οι προσδιορισμοί DOC και COD πραγματοποιούνται τουλάχιστον εις διπλούν. Η δοκιμασία διεξάγεται επό 28 ημέρες κατά μέγιστο όριο.

Σημείωση: Τα δείγματα που παραμένουν θολά διηθούνται με τη βοήθεια ηθμών από μεμβράνη. Οι ηθμοί από μεμβράνη πρέπει να μην αποδεσμεύουν ή προσροφούν οργανικές ύλες.

Λειτουργικός έλεγχος της ενεργοποιημένης ιλύος

Παράλληλα με κάθε σειρά δοκιμασιών πρέπει να διεξάγεται και μια δοκιμασία με δοχείο που περιέχει γνωστή ουσία, προκειμένου να ελέγχεται η λειτουργική αποδοτικότητα της ενεργοποιημένης ιλύος. Η διαιθυλενογλυκόλη έχει αποδειχθεί πολύ χρήσιμη για το σκοπό αυτό.

Προσαρμογή των μικροοργανισμών

Εφόσον τα χρονικά διαστήματα που μεσολαβούν μεταξύ των αναλύσεων είναι σχετικά μικρά (π.χ, εφόσον διεξάγονται καθημερινά), η προσαρμογή των μικροοργανισμών μπορεί να αναγνωριστεί σαφώς από την καμπύλη αποικοδομήσεως (βλέπε σχήμα 2). Κατά συνέπεια η δοκιμασία δεν πρέπει να αρχίζει αμέσως πριν το Σαββατοκύριακο.

Στην περίπτωση που η προσαρμογή πραγματοποιείται στο τέλος της περιόδου, η δοκιμασία μπορεί να παραταθεί μέχρις ότου περατωθεί η διάσπαση.

Σημείωση: Εφόσον απαιτείται ευρύτερη γνώση της συμπεριφοράς της ιλύος, η ίδια ενεργοποιημένη ιλύς εκτίθεται για άλλη μια φορά στο ίδιο υλικό της δοκιμασίας, σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία:

Σταματάμε τη λειτουργία του αναδευτήρα και της συσκευής για την εισπίεση αέρα και αφήνουμε την ενεργοποιημένη· ιλύ σε ηρεμία ώστε να καθιζάνει. Απομακρύνουμε το επιπλέον υγρό, προσθέτουμε νερό της δοκιμασίας μέχρι τελικού όγκου δύο λίτρων, αναδεύουμε επί 15 λεπτά και αφήνουμε ξανά το σύστημα να ηρεμήσει. Μόλις απομακρυνθεί εκ νέου το επιπλέον υγρό χρησιμοποιείται ή εναπομένουσα ιλύς για να επαναληφθεί η δοκιμασία με το ίδιο υλικό σύμφωνα με τα σημεία 1.6.1.4 και 1.6.2. Η ενεργοποιημένη ιλύς μπορεί επίσης να απομονωθεί με φυγοκέντρηση αντί της καθίζησης.

Η προσαρμοσμένη ιλύς μπορεί να αναμειχθεί με νωπή ιλύ μέχρι 0,2 έως 1 g βάρους ξηράς ουσίας/λίτρο κατά μέγιστο όριο.

▼B

Αναλυτικά μέσα

Κατά κανόνα τα δείγματα διηθούνται με τη βοήθεια προσεκτικά εκπλυθέντος χάρτινου ηθμού (για την έκπλυση χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό).

Τα δείγματα που παραμένουν θολά διηθούνται με τη βοήθεια μεμβρανών διηθήσεως (0,45 μm).

Η συγκέντρωση DOC προσδιορίζεται εις διπλούν στα διηθήματα του δείγματος (τα πρώτα 5 ml απομακρύνονται) με τη βοήθεια οργάνου TOC. Στην περίπτωση που δεν είναι δυνατόν να υποβληθεί αυθημερόν σε ανάλυση το διήθημα, φυλάσσεται στο ψυγείο μέχρι την επομένη ημέρα. Η περαιτέρω φύλαξη δεν συνιστάται.

Η συγκέντρωση COD προσδιορίζεται στα διηθήματα δείγματος με τη βοήθεια των οργάνων μετρήσεως του COD, σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφεται στην παραπομπή (2), κατωτέρω.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ**

Οι συγκεντρώσεις DOC και COD στα δείγματα προσδιορίζονται τουλάχιστον δύο φορές, σύμφωνα με το σημείο 1.6.2 ανωτέρω. Η αποικοδόμηση κατά τον χρόνο T υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο (με τους ορισμούς) που αναφέρεται στο σημείο 1.2 ανωτέρω.

Ο αριθμός που εκφράζει την έκταση της αποικοδόμησης στρογγυλεύεται στην πλησιέστερη ακέραια εκατοστιαία μονάδα. Η αποικοδόμηση που έχει συντελεστεί στο τέλος της δοκιμασίας αποδίδεται ως «Βιοαποικοδομητικότητα στη δοκιμασία Zahn-Wellens».

Σημείωση: Στην περίπτωση που η αποικοδόμηση ολοκληρωθεί πρίν από τη λήξη του χρόνου της δοκιμασίας, και το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιωθεί με δεύτερη ανάλυση που διενεργείται την επομένη, η δοκιμασία μπορεί να περατωθεί.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Η έκθεση της δοκιμασίας πρέπει, εφόσον είναι δυνατόν, να περιλαμβάνει τα ακόλουθα:

— την αρχική συγκέντρωση της ουσίας,

— κάθε άλλη πληροφορία καθώς και τα πειραματικά αποτελέσματα που αφορούν την υπό δοκιμασία ουσία, την ουσία αναφοράς —εφόσον χρησιμοποιείται— και αυτήν της τυφλής δοκιμασίας,

— τη συγκέντρωση μετά από τρεις ώρες,

— την καμπύλη βιοαποικοδόμήσης, με περιγραφή,

— την ημερομηνία και τον τόπο δειγματοληψίας των μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται για τη δοκιμασία, το βαθμό προσαρμογής, τη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση κλπ.,

— τους επιστημονικούς λόγους της τυχόν μεταβολής της διαδικασίας της δοκιμασίας.

3.2. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η βαθμιαία απώλεια του DOC (COD) σε διάστημα ημερών ή εβδομάδων αποτελεί ένδειξη ότι η υπό δοκιμασία ουσία βιοαποικοδομείται.

▼B

Σε ορισμένες περιπτώσεις ωστόσο, η φυσικοχημική προσρόφηση μπορεί να διαδραματίσει κάποιο ρόλο και αυτό φαίνεται όταν σημειώνεται ολική ή επιμέρους απώλεια από την αρχή, εντός των τριών πρώτων ωρών, και η διαφορά μεταξύ επιπλεόντων υγρών μαρτύρων και αυτών της δοκιμασίας κυμαίνεται σε μη αναμενόμενα χαμηλά επίπεδα.

Για να γίνει διάκριση μεταξύ βιοαποικοδόμησης (ή μερικής βιοαποικοδόμησης) και προσρόφησης είναι αναγκαίο να διενεργούνται περαιτέρω δοκιμασίες.

Αυτό μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους, ο εγκυρότερος των οποίων είναι να χρησιμοποιηθεί το επιπλέον υγρό ως υλικό εμβολιασμού σε βασική δοκιμασία (κατά προτίμηση σε δοκιμασία με αναπνοόμετρο).

Υπό δοκιμασία ουσίες με υψηλή απώλεια DOC (COD) που δεν οφείλεται σε προσρόφηση πρέπει να θεωρούνται ως ενδεχομένως βιοαποικοδομήσιμες. Η ύπαρξη μερικής, μη οφειλόμενης σε προσρόφηση απώλειας αποτελεί ένδειξη ότι η χημική ουσία υπόκειται τουλάχιστον σε κάποιας έκτασης βιοαποικοδόμηση. Η ύπαρξη χαμηλής ή μηδενικής απώλειας DOC (COD) μπορεί να οφείλεται σε ανασταλτική δράση της υπό δοκιμασία ουσίας στους μικροοργανισμούς, και αυτό μπορεί επίσης να διαπιστωθεί με τη λύση και την απώλεια ιλύος, γεγονός που οδηγεί σε θολά επιπλέοντα υγρά. Στη περίπτωση αυτή η δοκιμασία πρέπει να επαναληφθεί χρησιμοποιώντας ουσία χαμηλότερης περιεκτικότητας.

Η χρησιμοποίηση μιας ειδικής για τη συγκεκριμένη ένωση αναλυτικής μεθόδου ή σεσημασμένης με ^{14}C ουσίας της δοκιμασίας μπορεί να επιτρέψει την επίτευξη μεγαλύτερης ευαισθησίας. Στην περίπτωση που χρησιμοποιηθεί για τη δοκιμασία ένωση σεσημασμένη με ^{14}C, η ανάκτηση $^{14}CO_2$ θα επιβεβαιώσει ότι συντελέστηκε βιοαποικοδόμηση.

Όταν τα αποτελέσματα εκφράζονται σε πρωτογενή βιοαπσικοδόμηση, πρέπει, εφόσον είναι δυνατόν, να δοθεί κάποια εξήγηση για τη μεταβολή της χημικής δομής που οδηγεί σε έλλειψη ανταποκρίσεως εκ μέρους της αρχικής ουσίας της δοκιμασίας.

Η κατοχύρωση της εγκυρότητας της αναλυτικής μεθόδου πρέπει να γίνεται μαζί με την ανταπόκριση που διαπιστώνεται σε μέσο όπου διεξάγεται τυφλή δοκιμασία.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

(1) ΟΟΣΑ, Παρίσι, 1981, *Test Guideline 302 B,* απόφαση του Συμβουλίου C(81)30 τελικό.

(2) Παράρτημα V C.9 Αποικοδόμηση: Χημική απαίτηση σε οξυγόνο, οδηγία 84/449/ΕΟΚ της Επιτροπής, *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων* αριθ. L 251 της 19.9.1984.

▼B

Προσάρτημα

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΕΚΤΙΜΗΣΕΩΣ

Οργανική Ενωση:	4-Αιθοξυβενζοϊκό οξύ
Θεωρητική συγκέντρωση της δοκιμασίας:	600 mg/l
Θεωρητικός DOC:	390 mg/l
Υλικό εμβολιασμού:	Σταθμός κατεργασίας αποβλήτων . . .
Συγκέντρωση;	1 g ξηράς ουσίας λίτρο
Βαθμός προσαρμογής:	μη προσαρμοσμένη
Ανάλυση:	Προσδιορισμός DOC
Ποσότητα δείγματος:	3 ml
Ουσία-μάρτυρας:	Διαιθυλενογλυκόλη
Τοξικότητα ενώσεως:	Δεν εμφανίζει τοξικότητα κάτω των 1 000 mg/l Χρησιμοποιούμενη δοκιμασία: Δοκιμασία ζυμώσεως σε σωλήνα

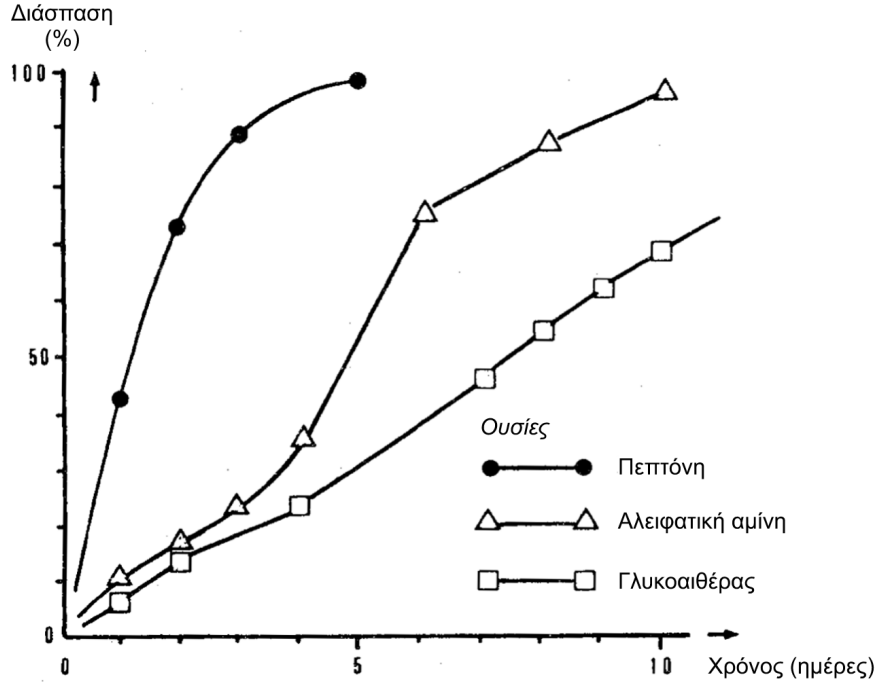
Χρόνος δοκιμασίας	Ουσία μάρτυρας				Ουσία δοκιμασίας		
	Τυφλό DOC (1) mg/l	DOC (1) mg/l	DOC καθαρό mg/l	Διάσπαση %	DOC (1) mg/l	DOC καθαρό mg/l	Διάσπαση %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 ώρες	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 ημέρα	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 ημέρες	3,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 ημέρες	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 ημέρες	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 ημέρες	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 ημέρες	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 ημέρες	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 ημέρες	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

(1) Μέσες τιμές τριπλών προσδιορισμών.

▼B

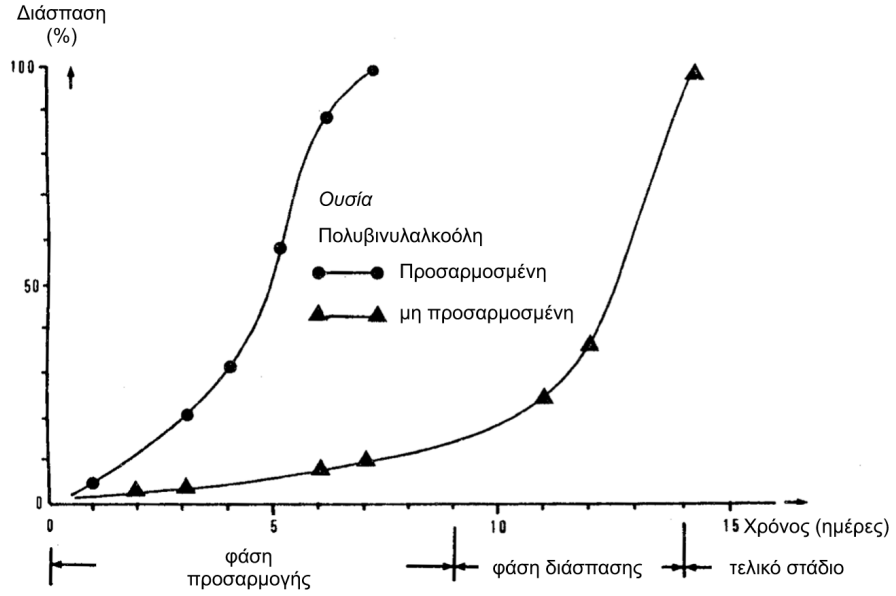
Σχήμα 1

Παραδείγματα καμπυλών βιοαποικοδόμησης



Σχήμα 2

Παραδείγματα προσαρμογής ιλύος



▼M4

Γ.10. **ΔΟΚΙΜΗ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗΣ ΑΕΡΟΒΙΑΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΛΥΜΑΤΩΝ: Γ.10-Α: ΜΟΝΑΔΕΣ ΕΝΕΡΓΟΥ ΙΛΥΟΣ — Γ.10-Β: ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΕΣ**

Γ.10-Α: Μονάδες ενεργού ιλύος

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 303 του ΟΟΣΑ (2001). Τη δεκαετία του ’50 έγινε αντιληπτό ότι οι νεοεισαχθείσες επιφανειοδραστικές ουσίες προκαλούσαν υπερβολικό αφρισμό σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων και ποταμούς. Οι εν λόγω ουσίες δεν απομακρύνονταν πλήρως κατά την αερόβια επεξεργασία και, σε ορισμένες περιπτώσεις, περιόριζαν την απομάκρυνση άλλων οργανικών ουσιών. Αυτό υποκίνησε πολλές έρευνες σχετικά με το πώς θα μπορούσαν να απομακρύνονται οι επιφανειοδραστικές ουσίες από τα λύματα και το κατά πόσον οι νέες χημικές ουσίες που παράγονται από τη βιομηχανία επιδέχονται επεξεργασία λυμάτων. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν μοντέλα μονάδων που αντιπροσωπεύουν τους δυο κύριους τύπους αερόβιας βιολογικής επεξεργασίας λυμάτων (ενεργός ιλύς και διύλιση ή διήθηση με χαλικοδιυλιστήριο). Η διανομή κάθε νέας χημικής ουσίας και η παρακολούθηση εγκαταστάσεων επεξεργασίας μεγάλης κλίμακας θα ήταν πρακτικά ανέφικτες και δαπανηρές, ακόμη και σε τοπικό επίπεδο.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

Μονάδες ενεργού ιλύος

2. Έχουν περιγραφεί μοντέλα μονάδων ενεργού ιλύος των οποίων το μέγεθος κυμαίνεται μεταξύ 300 ml και περίπου 2 000 ml. Ορισμένες μονάδες μιμούνταν σε μεγάλο βαθμό τις εγκαταστάσεις πλήρους κλίμακας, αφού διέθεταν δεξαμενές καθίζησης ιλύος όπου η καθιζάνουσα ιλύς διοχετεύεται εκ νέου στη δεξαμενή αερισμού, ενώ άλλες μονάδες δεν διέθεταν εγκαταστάσεις καθίζησης, π.χ. Swisher (1). Το μέγεθος της συσκευής είναι προϊόν συμβιβασμού. Αφενός, πρέπει να είναι αρκετά μεγάλο για επιτυχή μηχανική λειτουργία και για την παροχή επαρκούς όγκου δειγμάτων δίχως να επηρεάζεται η λειτουργία και, αφετέρου, δεν πρέπει να είναι τόσο μεγάλο ώστε να απαιτεί υπερβολικό χώρο και υλικά.

3. Δύο μορφές συσκευών που έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς και με ικανοποιητικά αποτελέσματα είναι οι μονάδες Husmann (2) και οι μονάδες πορώδους δοχείου (Porous Pot) (3)(4), οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά στη μελέτη των επιφανειοδραστικών ουσιών και περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών. Επίσης, έχουν χρησιμοποιηθεί με ικανοποιητικά αποτελέσματα και άλλες συσκευές, π.χ. Eckenfelder (5). Λόγω του σχετικά υψηλού κόστους και της προσπάθειας που απαιτεί η παρούσα δοκιμή προσομοίωσης, διερευνήθηκαν παράλληλα απλούστερες και λιγότερο δαπανηρές δοκιμές διαλογής, οι οποίες έχουν πλέον ενσωματωθεί στο κεφάλαιο Γ.4, μέθοδοι Γ4-Α έως Γ4-Ζ του παρόντος παραρτήματος (6). Η πείρα από τις δοκιμές με πολλές επιφανειοδραστικές και άλλες χημικές ουσίες έχει καταδείξει ότι αυτές που σημείωσαν επιτυχία στις δοκιμές διαλογής (άμεσα βιοαποικοδομήσιμες) αποικοδομούνταν και στη δοκιμή προσομοίωσης. Ορισμένες από τις ουσίες που απέτυχαν στις δοκιμές διαλογής έχουν επιτύχει στις δοκιμές εγγενούς βιοαποικοδομησιμότητας [κεφάλαια Γ.12 (7) και Γ.19 (8) του παρόντος παραρτήματος], αλλά μόνο ορισμένες από τις τελευταίες αυτές αποικοδομήθηκαν στη δοκιμή προσομοίωσης, ενώ οι χημικές ουσίες που απέτυχαν στις δοκιμές εγγενούς βιοαποικοδομησιμότητας δεν αποικοδομήθηκαν στις δοκιμές προσομοίωσης (9)(10)(11).

4. Για ορισμένους σκοπούς θεωρούνται επαρκείς οι δοκιμές προσομοίωσης που διεξάγονται στο πλαίσιο ενός και μόνο συνόλου συνθηκών λειτουργίας. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστιαία απομάκρυνση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας ή του διαλυμένου οργανικού άνθρακα (DOC). Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών περιγράφεται μια τέτοια δοκιμή. Ωστόσο, σε αντίθεση με την προηγούμενη έκδοση του παρόντος κεφαλαίου, στην οποία περιγραφόταν μόνο ένας τύπος συσκευής επεξεργασίας συνθετικών λυμάτων στη μέθοδο σύζευξης, όπου χρησιμοποιείται μια σχετικά πρόχειρη μέθοδος για την περίσσεια ιλύος, το παρόν κείμενο προσφέρει μια σειρά από παραλλαγές. Περιγράφονται εναλλακτικές λύσεις σχετικά με τον τύπο

▼M4

της συσκευής, τον τρόπο λειτουργίας, τα λύματα και την απόοριψη της περίσσειας ιλύος. Το παρόν κείμενο είναι πιστό σε εκείνο του προτύπου ISO 11733 (12), το οποίο εξετάστηκε διεξοδικά κατά τη σύνταξή του, μολονότι η μέθοδος δεν έχει υποβληθεί σε κυκλική δοκιμή επικύρωσης.

5. Για άλλους σκοπούς απαιτείται να είναι γνωστή με μεγαλύτερη ακρίβεια η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στις εκροές και γι' αυτό χρειάζεται πιο διεξοδική μέθοδος. Για παράδειγμα, η παροχή περίσσειας ιλύος πρέπει να ελέγχεται με μεγαλύτερη ακρίβεια κατά τη διάρκεια κάθε ημέρας και καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής και οι μονάδες πρέπει να λειτουργούν με διάφορες παροχές περίσσειας ιλύος. Για την επίτευξη πλήρους μεθόδου, οι δοκιμές θα πρέπει επίσης να εκτελούνται σε δύο ή τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες: μια τέτοια μέθοδος περιγράφεται από τον Birch (13)(14) και παρουσιάζεται συνοπτικά στο προσάρτημα 6. Ωστόσο, οι έως τώρα γνώσεις δεν αρκούν προκειμένου να αποφασισθεί ποιο από τα κινητικά μοντέλα έχει εφαρμογή στη βιοαποικοδόμηση των χημικών ουσιών κατά την επεξεργασία των λυμάτων και στο υδάτινο περιβάλλον εν γένει. Η εφαρμογή της κινητικής Monod, η οποία παρατίθεται ως παράδειγμα στο προσάρτημα 6, περιορίζεται σε χημικές ουσίες που είναι παρούσες σε συγκέντρωση 1 mg/l και άνω, αλλά κατά τη γνώμη ορισμένων, ακόμη και αυτό χρήζει τεκμηρίωσης. Στο προσάρτημα 7 υποδεικνύονται δοκιμές σε συγκεντρώσεις που αντικατοπτρίζουν ακριβέστερα εκείνες που διαπιστώνονται σε λύματα, αλλά οι δοκιμές αυτές, όπως και εκείνες του προσαρτήματος 6, περιλαμβάνονται σε προσαρτήματα αντί να δημοσιευθούν ως χωριστές μέθοδοι δοκιμών.

Φίλτρα

6. Πολύ λιγότερη προσοχή έχει δοθεί στα μοντέλα φίλτρων διύλισης, ίσως επειδή είναι πιο περίπλοκα και λιγότερο συμπαγή από τα μοντέλα εγκατάστασης ενεργού ιλύος. Οι Gerike et al. ανέπτυξαν μονάδες χαλικοδιυλιστηρίου οι οποίες λειτουργούσαν με τη μέθοδο σύζευξης (15). Τα φίλτρα αυτά ήταν σχετικά μεγάλα (ύψος 2 μ., όγκος 60 L) και το καθένα απαιτούσε 2 l λυμάτων ανά ώρα. Οι Baumann et al. (16) προσομοίωσαν χαλικοδιυλιστήρια εισάγοντας λωρίδες πολυεστερικού «πιλήματος» σε σωλήνες μήκους 1 μέτρου (εσωτερικής διαμέτρου 14 mm), οι οποίες είχαν προηγουμένως εμβαπτιστεί σε συμπυκνωμένη ενεργό ιλύ επί 30 λεπτά. Η ελεγχόμενη χημική ουσία, ως μοναδική πηγή άνθρακα (C) σε ένα διάλυμα ανόργανων αλάτων, τροφοδοτήθηκε στον κατακόρυφο σωλήνα από την κορυφή του και η βιοαποικοδόμηση εκτιμήθηκε βάσει μετρήσεων του DOC στις εκροές και του CO_2 στο εκλυόμενο αέριο.

7. Τα βιόφιλτρα έχουν προσομοιωθεί με άλλο τρόπον (15). Οι εσωτερικές επιφάνειες περιστρεφόμενων σωλήνων, τοποθετημένων υπό μικρή κλίση ως προς το οριζόντιο επίπεδο, τροφοδοτήθηκαν με λύματα (περίπου 250 ml/ώρα), με και χωρίς την ελεγχόμενη χημική ουσία, και οι συλλεγείσες εκροές αναλύθηκαν για την ανίχνευση DOC και/ή της συγκεκριμένης ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

8. Σκοπός της παρούσας μεθόδου είναι ο προσδιορισμός της απομάκρυνσης και της πρωτοβάθμιας και/ή τελικής βιοαποικοδόμησης των υδατοδιαλυτών οργανικών χημικών ουσιών από αερόβιους μικροοργανισμούς σε συνεχούς λειτουργίας σύστημα δοκιμών που προσομοιώνει τη διεργασία ενεργού ιλύος. Ένα εύκολα βιοαποικοδομήσιμο οργανικό μέσο και η οργανική ελεγχόμενη χημική ουσία αποτελούν τις πηγές άνθρακα και ενέργειας για τους μικροοργανισμούς.

9. Δύο συνεχούς λειτουργίας μονάδες δοκιμής (εγκαταστάσεις ενεργού ιλύος ή πορώδη δοχεία) λειτουργούν παράλληλα υπό πανομοιότυπες συνθήκες, οι οποίες επιλέγονται κατά τρόπο ώστε να εξυπηρετούν τον σκοπό της δοκιμής. Κατά κανόνα, ο μέσος υδραυλικός χρόνος παραμονής είναι 6 ώρες και η μέση ηλικία ιλύος (χρόνος παραμονής ιλύος) είναι 6 έως 10 ημέρες. Η περίσσεια ιλύος απορρίπτεται με μία από τις δύο μεθόδους, ενώ η ελεγχόμενη χημική ουσία προστίθεται συνήθως σε συγκέντρωση μεταξύ 10 mg/l και 20 mg/l διαλυμένου οργανικού άνθρακα (DOC) στην εισροή (οργανικό μέσο) μιας μόνο από τις μονάδες. Η δεύτερη μονάδα χρησιμοποιείται ως μονάδα-μάρτυρας για τον προσδιορισμό της βιοαποικοδόμησης του οργανικού μέσου.

▼M4

10. Σε δείγματα που λαμβάνονται κατά συχνά διαστήματα από τις εκροές προσδιορίζονται ο DOC, κατά προτίμηση, ή το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD) και η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας (εφόσον απαιτείται) με ειδική ανάλυση, στην εκροή της μονάδας που δέχεται την ελεγχόμενη χημική ουσία. Η διαφορά μεταξύ των συγκεντρώσεων DOC ή COD στις εκροές των μονάδων δοκιμής και μάρτυρα υποτίθεται ότι οφείλεται στην ελεγχόμενη χημική ουσία ή στους οργανικούς μεταβολίτες της. Η διαφορά αυτή συγκρίνεται με τη συγκέντρωση DOC ή COD στην εισροή, που οφείλεται στην προσθήκη της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, προκειμένου να προσδιοριστεί η απομάκρυνση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

11. Κατά κανόνα, η βιοαποικοδόμηση μπορεί να διακριθεί από τη βιοπροσρόφηση με προσεκτική εξέταση της καμπύλης απομάκρυνσης-χρόνου και, συνήθως, επιβεβαιώνεται με τη διεξαγωγή δοκιμής άμεσης βιοαποικοδόμησης, για την οποία χρησιμοποιείται ένα εγκλιματισμένο εμβόλιο από τη μονάδα που δέχεται την ελεγχόμενη χημική ουσία.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

12. Για να είναι δυνατή η ορθή ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει να είναι γνωστά τα χαρακτηριστικά καθαρότητας, υδατοδιαλυτότητας, πτητικότητας και προσρόφησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Κατά κανόνα, οι πτητικές και οι αδιάλυτες χημικές ουσίες μπορούν να ελεγχθούν μόνο εάν λαμβάνονται ειδικές προφυλάξεις (βλέπε προσάρτημα 5). Θα πρέπει επίσης να είναι γνωστή η χημική δομή ή τουλάχιστον ο εμπειρικός τύπος, ώστε να υπολογίζονται οι θεωρητικές τιμές και/ή να ελέγχονται οι μετρούμενες τιμές των παραμέτρων, π.χ. θεωρητικά απαιτούμενο οξυγόνο (ThOD), διαλυμένος οργανικός άνθρακας (DOC) και χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD).

13. Οι πληροφορίες που αφορούν την τοξικότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας για μικροοργανισμούς (βλέπε προσάρτημα 4) μπορεί να είναι χρήσιμες για την επιλογή κατάλληλων συγκεντρώσεων δοκιμής και να έχουν ουσιαστική σημασία για την ορθή ερμηνεία χαμηλών τιμών βιοαποικοδόμησης.

ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΠΙΤΥΧΙΑΣ

14. Κατά την αρχική εφαρμογή της παρούσας (επιβεβαιωτικής) δοκιμής προσομοίωσης στην πρωτοβάθμια βιοαποικοδόμηση των επιφανειοδραστικών ουσιών, απαιτείται η απομάκρυνση άνω του 80 % της συγκεκριμένης χημικής ουσίας για να επιτραπεί η διάθεση της επιφανειοδραστικής ουσίας στο εμπόριο. Εάν δεν επιτυγχάνεται η τιμή του 80 %, μπορεί να εφαρμοστεί η παρούσα (επιβεβαιωτική) δοκιμή προσομοίωσης και η επιφανειοδραστική ουσία μπορεί να διατεθεί στο εμπόριο μόνον εάν απομακρύνεται περισσότερο από το 90 % της συγκεκριμένης χημικής ουσίας. Δεν τίθεται ζήτημα επιτυχίας/αποτυχίας για τις χημικές ουσίες εν γένει και η τιμή ποσοστιαίας απομάκρυνσης που προκύπτει μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε προσεγγιστικούς υπολογισμούς της πιθανής περιβαλλοντικής συγκέντρωσης που πρέπει να χρησιμοποιείται στις εκτιμήσεις των κινδύνων από τις χημικές ουσίες. Τα αποτελέσματα τείνουν να είναι απόλυτα (όλα ή τίποτα). Σε μια σειρά μελετών με καθαρές χημικές ουσίες, διαπιστώθηκε ποσοστιαία απομάκρυνση DOC > 90 % σε περισσότερο από τα τρία τέταρτα και > 80 % σε πάνω από το 90 % των χημικών ουσιών που παρουσίασαν σημαντικό βαθμό βιοαποικοδομησιμότητας.

15. Σχετικά λίγες χημικές ουσίες (π.χ. επιφανειοδραστικές ουσίες) περιέχονται σε λύματα στις συγκεντρώσεις (περίπου 10 mg C/l) που χρησιμοποιούνται στην παρούσα δοκιμή. Ορισμένες χημικές ουσίες μπορεί να είναι ανασταλτικές σε αυτές τις συγκεντρώσεις, ενώ η κινητική της απομάκρυνσης άλλων μπορεί να διαφέρει σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Ακριβέστερη εκτίμηση της αποικοδόμησης θα μπορούσε να επιτευχθεί με τη χρήση τροποποιημένων μεθόδων, με ρεαλιστικά χαμηλές συγκεντρώσεις των ελεγχόμενων χημικών ουσιών, και τα συλλεγόμενα δεδομένα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό των κινητικών σταθερών. Ωστόσο, δεν έχουν ακόμη επικυρωθεί πλήρως οι απαραίτητες πειραματικές τεχνικές, ούτε έχουν εδραιωθεί τα κινητικά μοντέλα που περιγράφουν τις αντιδράσεις βιοαποικοδόμησης (βλέπε προσάρτημα 7).

▼M4

ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

16. Για να διασφαλιστεί η ορθή διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας, είναι χρήσιμη η κατά καιρούς δοκιμή χημικών ουσιών γνωστής συμπεριφοράς ταυτόχρονα με τη διερεύνηση των εελγχόμενων χημικών ουσιών. Στις χημικές ουσίες αυτού του είδους συγκαταλέγονται το αδιπικό οξύ, η 2-φαινυλο φαινόλη, η 1-ναφθόλη, το διφαινικό οξύ, το 1-ναφθοϊκό οξύ κ.λπ. (9)(10)(11).

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

17. Οι εκθέσεις μελετών με αντικείμενο τις δοκιμές προσομοίωσης είναι πολύ λιγότερες σε σχέση με τις δοκιμές άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας. Η αναπαραγωγιμότητα μεταξύ των (ταυτόχρονων) πολλαπλών προσδιορισμών (replicates) είναι ικανοποιητική (10-15 %) για τις ελεγχόμενες χημικές ουσίες που αποικοδομούνται σε ποσοστό 80 % ή περισσότερο, αλλά η μεταβλητότητα είναι μεγαλύτερη για χημικές ουσίες με λιγότερο ικανοποιητικό βαθμό αποικοδόμησης. Επίσης, με ορισμένες οριακές χημικές ουσίες έχουν καταγραφεί αποτελέσματα με μεγάλες αποκλίσεις (π.χ. 10 %, 90 %) σε διάφορες περιπτώσεις εντός των 9 εβδομάδων που προβλέπονται στη δοκιμή.

18. Μολονότι έχουν διαπιστωθεί ελάχιστες διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με τους δύο τύπους συσκευών, η αποικοδόμηση ορισμένων χημικών ουσιών είναι υψηλότερου βαθμού και σταθερότερη με οικιακά λύματα απ' ό,τι με τα συνθετικά λύματα του ΟΟΣΑ.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Εξοπλισμός

Σύστημα δοκιμής

19. Το σύστημα δοκιμής για μία ελεγχόμενη χημική ουσία αποτελείται από μια μονάδα δοκιμής και μια μονάδα-μάρτυρα. Σε περίπτωση όμως που εκτελούνται μόνο ειδικές αναλύσεις (πρωτοβάθμια βιοαποικοδόμηση), απαιτείται μόνο μια μονάδα δοκιμής. Μία μονάδα-μάρτυρας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πολλές μονάδες δοκιμής που δέχονται είτε την ίδια είτε διαφορετικές ελεγχόμενες χημικές ουσίες. Στην περίπτωση της σύζευξης (προσάρτημα 3), κάθε μονάδα δοκιμής πρέπει να συνοδεύεται από τη δική της μονάδα-μάρτυρα. Το σύστημα δοκιμής μπορεί να είναι είτε μοντέλο εγκατάστασης ενεργού ιλύος, μονάδα Husmann (προσάρτημα 1, σχήμα 1), ή πορώδες δοχείο (προσάρτημα 1, σχήμα 2). Και στις δύο περιπτώσεις απαιτούνται δοχεία αποθήκευσης επαρκούς μεγέθους για τις εισροές και τις εκροές, καθώς και αντλίες για την τροφοδοσία της εισροής, είτε σε μείγμα με διάλυμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας είτε χωριστά.

20. Κάθε μονάδα εγκατάστασης ενεργού ιλύος αποτελείται από ένα δοχείο αερισμού με γνωστή χωρητικότητα, περίπου 3 λίτρων ενεργού ιλύος, και έναν διαχωριστήρα (δευτεροβάθμιος διαυγαστήρας), χωρητικότητας περίπου 1,5 λίτρων. Οι χωρητικότητες μπορούν, ως έναν βαθμό, να μεταβάλλονται με ρύθμιση του ύψους του διαχωριστήρα. Είναι αποδεκτά δοχεία διαφόρων μεγεθών, εφόσον λειτουργούν με συγκρίσιμα υδραυλικά φορτία. Εάν δεν είναι δυνατόν να διατηρηθεί η θερμοκρασία της αίθουσας δοκιμών στο επιθυμητό εύρος, συνιστάται η χρήση δοχείων με υδροχιτώνιο με νερό ελεγχόμενης θερμοκρασίας. Χρησιμοποιείται αεροκίνητη ή δοσομετρική αντλία για την ανακύκλωση της ενεργού ιλύος από τον διαχωριστήρα στο δοχείο αερισμού, είτε συνεχώς είτε ανά τακτά χρονικά διαστήματα.

21. Το σύστημα πορώδους δοχείου αποτελείται από έναν εσωτερικό, πορώδη κύλινδρο με κωνικό πυθμένα, τοποθετημένος μέσα σε ένα ελαφρώς μεγαλύτερο δοχείο ίδιου σχήματος, το οποίο όμως είναι κατασκευασμένο από αδιαπέραστο πλαστικό υλικό. Κατάλληλο υλικό για το πορώδες δοχείο είναι το πορώδες πολυαιθυλένιο με πόρους μέγιστου μεγέθους 90 μm και πάχος 2 mm. Ο διαχωρισμός της ιλύος από το επεξεργασμένο οργανικό μέσο επιτυγχάνεται με διαφορική διέλευση μέσω του πορώδους τοιχώματος. Οι εκροές συλλέγονται στον δακτυλιοειδή χώρο, απ' όπου υπερχειλίζουν μέσα στο δοχείο συλλογής. Δεν γίνεται καθίζηση και, επομένως, δεν υπάρχει επιστροφή ιλύος. Ολόκληρο το σύστημα μπορεί να τοποθετηθεί σε θερμοστατούμενο υδατόλουτρο. Τα πορώδη δοχεία αποφράσσονται και ενδέχεται

▼M4

να υπερχειλίσουν στα αρχικά στάδια. Σε μια τέτοια περίπτωση, αντικαθίσταται η πορώδης επένδυση με καθαρή, με σιφωνισμό της ιλύος από το δοχείο σε έναν καθαρό κάδο και αφαίρεση της αποφραγμένης επένδυσης. Αφού σφογγιστεί ο αδιαπέραστος εξωτερικός κύλινδρος, εισάγεται μια καθαρή επένδυση και επαναφέρεται η ιλύς στο δοχείο. Επίσης, αποξέεται με προσοχή και μεταφέρεται τυχόν ιλύς που έχει προσκολληθεί στα τοιχώματα της αποφραγμένης επένδυσης. Τα αποφραγμένα δοχεία καθαρίζονται με εκτόξευση λεπτής δέσμης νερού για την απομάκρυνση της εναπομένουσας ιλύος και με εμβάπτιση, πρώτα σε αραιό διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου και, στη συνέχεια, σε νερό, την οποία ακολουθεί επιμελής έκπλυση με νερό.

22. Για τον αερισμό της ιλύος στα δοχεία αερισμού και των δύο συστημάτων απαιτούνται κατάλληλες τεχνικές, όπως πορώδεις κύβοι (διαχυτήρες) και πεπιεσμένος αέρας. Εάν είναι αναγκαίο, ο αέρας καθαρίζεται διερχόμενος μέσω κατάλληλου φίλτρου και εκπλύνεται. Για να διατηρούνται οι αερόβιες συνθήκες και να παραμένουν οι κροκίδες ιλύος σε εναιώρημα καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής, πρέπει να διέρχεται επαρκής αέρας από το σύστημα.

Συσκευή διήθησης ή φυγόκεντρος

23. Συσκευή για τη διήθηση των δειγμάτων με διηθητικές μεμβράνης κατάλληλου πορώδους (ονομαστική διάμετρος οπών 0,45 μm), οι οποίες προσροφούν διαλυτές οργανικές χημικές ουσίες και ελευθερώνουν οργανικό άνθρακα σε ελάχιστο βαθμό. Εάν χρησιμοποιούνται ηθμοί που ελευθερώνουν οργανικό άνθρακα, εκπλύνονται επιμελώς με θερμό νερό για την απομάκρυνση του στραγγίσιμου οργανικού άνθρακα. Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί φυγόκεντρος ικανή να λειτουργεί σε 40 000 m/s^2.

Αναλυτικός εξοπλισμός

24. Συσκευή που απαιτείται για να προσδιοριστούν τα εξής:

— DOC (διαλυμένος οργανικός άνθρακας) και TOC (ολικός οργανικός άνθρακας) ή COD (χημικά απαιτούμενο οξυγόνο),

— συγκεκριμένες χημικές ουσίες, εάν απαιτείται,

— αιωρούμενα στερεά, pH, συγκέντρωση οξυγόνου στο νερό,

— θερμοκρασία, οξύτητα και αλκαλικότητα,

— αμμώνιο και νιτρώδη και νιτρικά ιόντα, εάν η δοκιμή εκτελείται σε συνθήκες νιτροποίησης.

Νερό

25. Νερό βρύσης, που περιέχει λιγότερο από 3 mg/l DOC. Προσδιορίζεται η αλκαλικότητα εάν δεν είναι ήδη γνωστή.

26. Απιονισμένο νερό που περιέχει λιγότερο από 2 mg/l DOC.

Οργανικό μέσο

27. Ως οργανικό μέσο είναι αποδεκτά συνθετικά λύματα, οικιακά λύματα ή μείγμα των δύο. Έχει αποδειχθεί (11)(14) ότι η χρήση μόνο οικιακών λυμάτων έχει συχνά ως αποτέλεσμα αυξημένη ποσοστιαία απομάκρυνση DOC και επιτρέπει ακόμη και την απομάκρυνση και βιοαποικοδόμηση ορισμένων χημικών ουσιών που δεν βιοαποικοδομούνται όταν χρησιμοποιούνται συνθετικά λύματα του ΟΟΣΑ. Επίσης, η συνεχής ή διαλείπουσα προσθήκη οικιακών λυμάτων σταθεροποιεί συχνά την ενεργό ιλύ, καθώς και την κρίσιμης σημασίας ικανότητα καλής καθίζησης. Επομένως, συνιστάται η χρήση οικιακών λυμάτων. Μετράται η συγκέντρωση DOC ή COD σε κάθε νέα παρτίδα οργανικού μέσου. Η οξύτητα ή αλκαλικότητα του οργανικού μέσου θα πρέπει να είναι γνωστή. Εάν το οργανικό μέσο έχει χαμηλή οξύτητα ή αλκαλικότητα, μπορεί να απαιτείται η προσθήκη κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος (όξινο ανθρακικό νάτριο ή δισόξινο φωσφορικό κάλιο) για τη διατήρηση του pH στην τιμή 7,5 ± 0,5 στο δοχείο αερισμού κατά τη δοκιμή. Η ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος που θα προστεθεί και ο χρόνος της προσθήκης του πρέπει να αποφασίζονται κατά περίπτωση. Όταν χρησιμοποιούνται μείγματα είτε συνεχώς είτε διακεκομμένα, ο DOC (ή το COD) του μείγματος πρέπει να διατηρείται σε μια κατά προσέγγιση σταθερή τιμή, π.χ. μέσω αραίωσης με νερό.

▼M4

Συνθετικά λύματα

28. Διαλύονται σε ένα λίτρο νερού βρύσης: πεπτόνη, 160 mg· εκχύλισμα κρέατος, 110 mg· ουρία, 30 mg, άνυδρο όξινο φωσφορικό κάλιο (K_2HPO_4), 28 mg· χλωριούχο νάτριο (NaCl), 7 mg· διένυδρο χλωριούχο ασβέστιο ($CaCl_2$. $2H_2O$), 4 mg· επταένυδρο θειικό μαγνήσιο ($Mg_2SO_4.7H_20$), 2 mg. Τα συγκεκριμένα συνθετικά λύματα του ΟΟΣΑ αποτελούν παράδειγμα και παρέχουν μέση συγκέντρωση DOC στην εισροή της τάξης των 100 mg/l. Εναλλακτικά, χρησιμοποιούνται άλλες συνθέσεις, με την ίδια περίπου συγκέντρωση DOC, οι οποίες προσεγγίζουν περισσότερο τα πραγματικά λύματα. Εάν απαιτείται λιγότερο πυκνή εισροή, τα συνθετικά λύματα αραιώνονται με νερό βρύσης, για παράδειγμα σε αναλογία 1:1, ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση περίπου 50 mg/l. Μια τέτοια ασθενέστερη εισροή θα επιτρέψει την καλύτερη ανάπτυξη των νιτροποιητικών οργανισμών και η τροποποίηση αυτή θα πρέπει να χρησιμοποιείται εάν πρόκειται να διερευνηθεί η προσομοίωση εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων με νιτροποίηση. Αυτά τα συνθετικά λύματα μπορούν να παρασκευάζονται με αποσταγμένο νερό σε συμπυκνωμένη μορφή και να φυλάσσονται σε θερμοκρασία περίπου 1 °C για μέγιστο διάστημα μιας εβδομάδας. Όταν χρειάζονται, αραιώνονται με νερό βρύσης. (Το μέσο αυτό δεν είναι ικανοποιητικό, π.χ. η συγκέντρωση αζώτου είναι πολύ υψηλή, η περιεκτικότητα σε άνθρακα σχετικά χαμηλή, αλλά δεν έχει προταθεί καλύτερη εναλλακτική λύση, εκτός από την προσθήκη περισσότερου φωσφορικού άλατος ως ρυθμιστικού διαλύματος και επιπλέον πεπτόνης).

Οικιακά λύματα

29. Χρησιμοποιούνται πρόσφατα, καθιζημένα λύματα που συλλέγονται καθημερινά από εγκαταστάσεις επεξεργασίας οι οποίες δέχονται κατά κύριο λόγο οικιακά λύματα. Θα πρέπει να συλλέγονται, πριν από την πρωτοβάθμια καθίζηση, από την τάφρο υπερχείλισης της δεξαμενής πρωτοβάθμιας καθίζησης ή από την τροφοδοσία της εγκατάστασης ενεργού ιλύος, και να είναι σε μεγάλο βαθμό απαλλαγμένα από χονδρόκοκκα σωματίδια. Τα λύματα μπορούν να χρησιμοποιούνται αφού αποθηκευθούν για αρκετές ημέρες (γενικά όμως, όχι περισσότερο από επτά ημέρες) στους 4 °C περίπου, εάν αποδεικνύεται ότι ο DOC (ή το COD) δεν μειώνεται σημαντικά (δηλαδή κατά λιγότερο από 20 %) κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Προκειμένου να περιοριστούν οι διαταραχές στο σύστημα, ο DOC (ή το COD) κάθε νέας παρτίδας θα πρέπει να ρυθμίζεται πριν από τη χρήση σε κατάλληλη σταθερή τιμή, π.χ. μέσω αραίωσης με νερό βρύσης.

Ενεργός ιλύς

30. Συλλέγεται ενεργός ιλύς για εμβολιασμό από τη δεξαμενή αερισμού μιας εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων που λειτουργεί αποτελεσματικά ή από εργαστηριακή μονάδα ενεργού ιλύος, η οποία επεξεργάζεται κατά κύριο λόγο οικιακά λύματα.

Διαλύματα παρακαταθήκης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας

31. Για χημικές ουσίες επαρκούς διαλυτότητας, παρασκευάζονται διαλύματα παρακαταθήκης κατάλληλων συγκεντρώσεων (π.χ. 1 έως 5 g/l) σε απιονισμένο νερό ή στο ανόργανο τμήμα των συνθετικών λυμάτων (για αδιάλυτες και πτητικές ουσίες, βλέπε προσάρτημα 5). Προσδιορίζεται ο DOC και ο ολικός οργανικός άνθρακας (TOC) του διαλύματος παρακαταθήκης και επαναλαμβάνονται οι μετρήσεις για κάθε νέα παρτίδα. Εάν η διαφορά μεταξύ του DOC και του TOC είναι μεγαλύτερη από 20 %, ελέγχεται η υδατοδιαλυτότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Συγκρίνεται ο DOC ή η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που έχει μετρηθεί με ειδική ανάλυση του διαλύματος παρακαταθήκης με την ονομαστική τιμή, προκειμένου να εξακριβωθεί αν η ανάκτηση είναι αρκετά ικανοποιητική (συνήθως αναμένεται > 90 %). Εξακριβώνεται, ειδικά για τις διασπορές, κατά πόσον ο DOC μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αναλυτική παράμετρος ή αν μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο μια ειδική για την ελεγχόμενη χημική ουσία αναλυτική τεχνική. Για τις διασπορές απαιτείται φυγοκέντρηση των δειγμάτων. Για κάθε νέα παρτίδα μετράται ο DOC, ο COD ή η ελεγχόμενη χημική ουσία με ειδική ανάλυση.

▼M4

32. Προσδιορίζεται το pH του διαλύματος παρακαταθήκης. Τυχόν ακραίες τιμές υποδηλώνουν ότι η προσθήκη της χημικής ουσίας μπορεί να επιδρά στο pH της ενεργού ιλύος στο σύστημα δοκιμής. Στην περίπτωση αυτή, εξουδετερώνεται το διάλυμα παρακαταθήκης, ώστε να επιτευχθεί pH 7 ± 0,5, με μικρές ποσότητες ανόργανου οξέος ή βάσης, αλλά πρέπει να αποφεύγεται η καθίζηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

33. Η διαδικασία περιγράφεται για τις μονάδες εγκατάστασης ενεργού ιλύος και θα πρέπει να προσαρμόζεται ελαφρά για το σύστημα πορώδους δοχείου.

Παρασκευή του εμβολίου

34. Κατά την έναρξη της δοκιμής, εμβολιάζεται το σύστημα δοκιμής είτε με ενεργό ιλύ είτε με εμβόλιο που περιέχει μικροοργανισμούς σε χαμηλή συγκέντρωση. Το εμβόλιο διατηρείται αεριζόμενο σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι τη χρήση του και χρησιμοποιείται εντός 24 ωρών. Στην πρώτη περίπτωση, λαμβάνεται δείγμα ενεργού ιλύος από τη δεξαμενή αερισμού μιας εγκατάστασης βιολογικής επεξεργασίας λυμάτων που λειτουργεί αποτελεσματικά ή μιας εργαστηριακής εγκατάστασης επεξεργασίας, που δέχεται κυρίως οικιακά λύματα. Εάν πρόκειται να προσομοιωθούν οι συνθήκες νιτροποίησης, λαμβάνεται ιλύς από εγκατάσταση νιτροποιητικής επεξεργασίας λυμάτων. Προσδιορίζεται η συγκέντρωση των αιωρούμενων στερεών και, εάν είναι απαραίτητο, συμπυκνώνεται η ιλύς με καθίζηση, ώστε να είναι ελάχιστος ο όγκος που θα προστεθεί στο σύστημα δοκιμής. Εξακριβώνεται ότι η αρχική συγκέντρωση ξηράς ουσίας είναι περίπου 2,5 g/l.

35. Στη δεύτερη περίπτωση, χρησιμοποιούνται ως εμβόλιο 2 ml/l έως 10 ml/l εκροής από εγκατάσταση βιολογικής επεξεργασίας οικιακών λυμάτων. Για να υπάρξουν όσο το δυνατόν περισσότερα διαφορετικά είδη βακτηρίων, μπορεί να είναι χρήσιμο να προστεθούν εμβόλια από διάφορες άλλες πηγές, π.χ. από επιφανειακά ύδατα. Στην περίπτωση αυτή, η ενεργός ιλύς θα αναπτυχθεί και θα αυξηθεί στο σύστημα δοκιμής.

Τροφοδοσία του οργανικού μέσου

36. Εξακριβώνεται ότι τα δοχεία των εισροών και των εκροών, καθώς και οι σωληνώσεις από τα δοχεία εισροών προς τα δοχεία εκροών έχουν καθαριστεί επιμελώς προκειμένου να αφαιρεθεί η μικροβιακή χλωρίδα, τόσο στην αρχή όσο και σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Συναρμολογούνται τα συστήματα δοκιμής σε αίθουσα ελεγχόμενης θερμοκρασίας (κανονικό εύρος 20-25 °C) ή χρησιμοποιούνται μονάδες δοκιμής με υδροχιτώνιο. Παρασκευάζεται επαρκής όγκος του απαιτούμενου οργανικού μέσου (παράγραφοι 27-29). Αρχικά, το δοχείο αερισμού και ο διαχωριστήρας πληρούνται με το οργανικό μέσο και προστίθεται το εμβόλιο (παράγραφοι 34, 35). Αρχίζει ο αερισμός, ώστε η ιλύς να διατηρείται σε εναιώρημα και αερόβια κατάσταση, και έπειτα η τροφοδοσία της εισροής και η ανακύκλωση της καθιζάνουσας ιλύος. Μεταφέρεται οργανικό μέσο από τα αποθηκευτικά δοχεία στα δοχεία αερισμού (παράγραφοι 20, 21) των μονάδων δοκιμής και μάρτυρα και συλλέγονται οι αντίστοιχες εκροές σε παρόμοια αποθηκευτικά δοχεία. Για να επιτευχθεί ο κανονικός υδραυλικός χρόνος παραμονής των 6 ωρών, το οργανικό μέσο αντλείται με παροχή 0,5 l/ώρα. Για να επιβεβαιωθεί η παροχή αυτή, μετράται η ημερήσια ποσότητα τροφοδοσίας οργανικού μέσου, με καταγραφή της μείωσης του όγκου του μέσου στα δοχεία αποθήκευσης. Για τον προσδιορισμό των επιδράσεων της διαλείπουσας ελευθέρωσης και της αιφνίδιας φόρτισης (σοκ) χημικών ουσιών απαιτούνται άλλοι τρόποι τροφοδοσίας.

37. Εάν το οργανικό μέσο παρασκευάζεται για να χρησιμοποιηθεί πέραν της 1 ημέρας αργότερα, απαιτείται ψύξη στους 4 °C περίπου, ή άλλη κατάλληλη μέθοδος διατήρησης για να αποφευχθούν η ανάπτυξη μικροβίων και η βιοαποικοδόμηση εκτός των μονάδων δοκιμής (παράγραφος 29). Εάν χρησιμοποιούνται συνθετικά λύματα, είναι δυνατόν να παρασκευαστεί και να αποθηκευτεί στους 4 °C περίπου ένα πυκνό διάλυμα παρακαταθήκης (π.χ. με συγκέντρωση 10πλάσια της κανονικής, παράγραφος 28). Το εν λόγω διάλυμα παρακαταθήκης μπορεί να αναμειχθεί καλά με τον κατάλληλο όγκο νερού βρύσης πριν από τη χρήση. Εναλλακτικά, μπορεί να αντληθεί απευθείας, ενώ η κατάλληλη ποσότητα νερού βρύσης αντλείται χωριστά.

▼M4

Τροφοδοσία της ελεγχόμενης χημικής ουσίας

38. Κατάλληλος όγκος διαλύματος παρακαταθήκης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας (παράγραφος 31) προστίθεται στο δοχείο αποθήκευσης της εισροής ή εισάγεται απευθείας, με χωριστή αντλία, στο δοχείο αερισμού. Η κανονική μέση συγκέντρωση δοκιμής στην εισροή πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 10 mg/l και 20 mg/l DOC, ενώ η ανώτερη συγκέντρωση δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 50 mg/l. Εάν η υδατοδιαλυτότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας είναι χαμηλή ή είναι πιθανό να σημειωθούν τοξικές επιδράσεις, μειώνεται η συγκέντρωση DOC σε 5 mg/l ή σε ακόμη χαμηλότερο επίπεδο, μόνο όμως εάν διατίθεται και εφαρμόζεται κατάλληλη ειδική αναλυτική μέθοδος (ελεγχόμενες χημικές ουσίες σε μορφή διασποράς, που είναι δυσδιάλυτες στο νερό, μπορούν να προστεθούν με τη χρήση ειδικών δοσομετρικών τεχνικών, βλέπε προσάρτημα 5).

39. Αρχίζει η προσθήκη της ελεγχόμενης χημικής ουσίας μετά από μια περίοδο κατά την οποία το σύστημα έχει σταθεροποιηθεί και απομακρύνει αποτελεσματικά (περίπου κατά 80 %) τον DOC του οργανικού μέσου. Είναι σημαντικό να εξακριβώνεται ότι όλες οι μονάδες λειτουργούν εξίσου αποτελεσματικά, πριν από την προσθήκη της χημικής ουσίας. Σε αντίθετη περίπτωση, είναι συνήθως χρήσιμο να αναμειγνύονται οι επιμέρους ιλύες και να αναδιανέμονται ίσοι όγκοι στις επιμέρους μονάδες. Όταν χρησιμοποιείται εμβόλιο με (περίπου) 2,5 g/l (ξηρό βάρος) ενεργού ιλύος, η ελεγχόμενη χημική ουσία μπορεί να προστίθεται από την αρχή της δοκιμής, δεδομένου ότι η απευθείας προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων από την αρχή έχει το πλεονέκτημα ότι η ενεργός ιλύς μπορεί να προσαρμόζεται καλύτερα στην ελεγχόμενη χημική ουσία. Ανεξαρτήτως του τρόπου με τον οποίο προστίθεται η ελεγχόμενη χημική ουσία, συνιστάται η μέτρηση της σχετικής ταχύτητας ροής και/ή των όγκων στα δοχεία αποθήκευσης ανά τακτά διαστήματα.

Χειρισμός της ενεργού ιλύος

40. Κατά κανόνα, η συγκέντρωση των στερεών της ενεργού ιλύος σταθεροποιείται κατά τη δοκιμή, ανεξάρτητα από το χρησιμοποιούμενο εμβόλιο, εντός ορίων της τάξης του 1 έως 3 g/l (ξηρό βάρος), ανάλογα με την ποιότητα και τη συγκέντρωση του οργανικού μέσου, τις συνθήκες λειτουργίας, το είδος των παρόντων μικροοργανισμών και την επίδραση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

41. Προσδιορίζονται τα αιωρούμενα στερεά στα δοχεία αερισμού τουλάχιστον εβδομαδιαίως και απορρίπτεται η πλεονάζουσα ιλύς ώστε να διατηρείται η συγκέντρωση εντός των ορίων 1 g/l έως 3 g/l (ξηρό βάρος) ή ελέγχεται η μέση ηλικία ιλύος ώστε να διατηρείται σε σταθερή τιμή, συνήθως μεταξύ 6 και 10 ημερών. Εάν, για παράδειγμα, επιλεγεί χρόνος παραμονής ιλύος 8 ημερών, αφαιρείται καθημερινά το 1/8 του όγκου της ενεργού ιλύος στο δοχείο αερισμού και απορρίπτεται. Ακολουθείται η ίδια διαδικασία σε καθημερινή βάση ή, κατά προτίμηση, με αυτόματη αντλία διαλείπουσας λειτουργίας. Η διατήρηση της συγκέντρωσης των αιωρούμενων στερεών σε σταθερό επίπεδο ή εντός στενών ορίων δεν συνεπάγεται τη διατήρηση σταθερού χρόνου παραμονής της ιλύος (SRT), ο οποίος αποτελεί τη μεταβλητή λειτουργίας που καθορίζει την τιμή της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στις εκροές.

42. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, αφαιρείται, τουλάχιστον ημερησίως, τυχόν ιλύς που έχει προσκολληθεί στα τοιχώματα του δοχείου αερισμού και του διαχωριστήρα, ούτως ώστε να επαναιωρείται. Ελέγχονται και καθαρίζονται τακτικά όλοι οι σωλήνες και τις σωληνώσεις για την πρόληψη της ανάπτυξης βιομεμβράνης. Ανακυκλώνεται η καθιζημένη ιλύς από τον διαχωριστήρα στο δοχείο αερισμού, κατά προτίμηση με διαλείπουσα άντληση. Στο σύστημα πορώδους δοχείου δεν γίνεται ανακύκλωση, αλλά πρέπει να εξασφαλίζεται η εισαγωγή καθαρών εσωτερικών δοχείων προτού αυξηθεί σημαντικά ο όγκος στο δοχείο (παράγραφος 21).

43. Στις μονάδες εγκατάστασης Husmann ενδέχεται να σημειωθεί ανεπαρκής καθίζηση και απώλεια ιλύος, που μπορούν να διορθωθούν με μία ή περισσότερες από τις ακόλουθες ενέργειες που παρατίθενται, στις μονάδες δοκιμής και μάρτυρα παράλληλα:

— προσθήκη πρόσφατης ιλύος ή κροκιδωτή (για παράδειγμα, 2 ml/δοχείο διαλύματος $FeCl_3$ 50 g/l) ανά τακτά διαστήματα, π.χ. εβδομαδιαίως, αλλά πρέπει να εξακριβώνεται ότι η ελεγχόμενη χημική ουσία δεν αντιδρά ούτε καταβυθίζεται με $FeCl_3$,

▼M4

— αντικατάσταση της αεροκίνητης αντλίας από περισταλτική, ώστε να καθίσταται δυνατή μια ροή ανακυκλοφορίας ιλύος η οποία σχεδόν ισούται προς την παροχή εισροής που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί, καθώς και η ανάπτυξη αναερόβιας ζώνης στην καθιζημένη ιλύ (τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της αεροκίνητης αντλίας περιορίζουν την ελάχιστη ταχύτητα ροής της ιλύος που επιστρέφει στο12πλάσιο της παροχής εισροής),

— διαλείπουσα άντληση της ιλύος από τον διαχωριστήρα προς το δοχείο αερισμού (π.χ. 5 λεπτά ανά 2,5 ώρες για την ανακύκλωση 1 l/ώρα έως 1,5 l/ώρα,

— χρήση μη τοξικού αντιαφριστικού μέσου σε ελάχιστη συγκέντρωση για την πρόληψη της απώλειας μέσω αφρισμού (π.χ. έλαιο σιλικόνης),

— διαβίβαση αέρα μέσω της ιλύος στον διαχωριστήρα με σύντομες, ισχυρές ριπές (π.χ. 10 δευτερόλεπτα ανά ώρα),

— τροφοδοσία του οργανικού μέσου κατά διαστήματα στο δοχείο αερισμού (π.χ. 3 έως 10 λεπτά ανά ώρα).

Δειγματοληψία και ανάλυση

44. Σε τακτά χρονικά διαστήματα μετράται η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου, η θερμοκρασία και το pH της ενεργού ιλύος στα δοχεία αερισμού. Εξακριβώνεται ότι είναι πάντα διαθέσιμο επαρκές οξυγόνο (> 2 mg/l) και ότι η θερμοκρασία διατηρείται στις απαιτούμενες τιμές (κατά κανόνα μεταξύ 20 °C και 25 °C). Διατηρείται το pH στην τιμή 7,5 ± 0,5 με την προσθήκη μικρών ποσοτήτων ανόργανης βάσης ή ανόργανου οξέος στο δοχείο αερισμού ή στην εισροή ή με αύξηση της ρυθμιστικής ικανότητας του οργανικού μέσου (βλέπε παράγραφο 27). Σε περίπτωση νιτροποίησης παράγεται οξύ, καθώς η οξείδωση 1 mg N παράγει το ισοδύναμο περίπου 7 mg CO_3^-. Η συχνότητα των μετρήσεων εξαρτάται από την παράμετρο που πρόκειται να μετρηθεί και τη σταθερότητα του συστήματος και μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ ημερήσιων και εβδομαδιαίων μετρήσεων.

45. Μετράται ο DOC ή το COD στις εισροές των δοχείων δοκιμής και μάρτυρα. Μετράται η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην εισροή της μονάδας δοκιμής με ειδική ανάλυση ή υπολογίζεται με βάση τη συγκέντρωση στο διάλυμα παρακαταθήκης (παράγραφος 31), τον όγκο που χρησιμοποιήθηκε και την ποσότητα της τροφοδοσίας λυμάτων στη μονάδα δοκιμής. Συνιστάται ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, ώστε να μειώνεται η μεταβλητότητα των δεδομένων συγκέντρωσης.

46. Λαμβάνονται κατάλληλα δείγματα από τη συλλεγόμενη εκροή (π.χ. σύνθετα 24ώρου) και διηθούνται μέσω μεμβράνης με πόρους μεγέθους 0,45 μm ή φυγοκεντρούνται σε περίπου 40 000 m/s^2 για περίπου 15 λεπτά. Η φυγοκέντρηση θα πρέπει να χρησιμοποιείται εάν δεν είναι εύκολη η διήθηση. Προσδιορίζεται ο DOC ή το COD τουλάχιστον εις διπλούν για τη μέτρηση της τελικής βιοαποικοδόμησης και, εφόσον απαιτείται, της πρωτοβάθμιας βιοαποικοδόμησης, με ειδική για την ελεγχόμενη χημική ουσία ανάλυση.

47. Η χρήση του COD μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα ανάλυσης σε χαμηλές συγκεντρώσεις και, συνεπώς, συνιστάται μόνο εάν χρησιμοποιείται αρκετά υψηλή συγκέντρωση δοκιμής (περίπου 30 mg/l). Επίσης, για ισχυρά προσροφώμενες χημικές ουσίες, συνιστάται η μέτρηση της ποσότητας της προσροφημένης χημικής ουσίας στην ιλύ με ειδική για την ελεγχόμενη χημική ουσία αναλυτική τεχνική.

48. Η συχνότητα δειγματοληψίας εξαρτάται από την αναμενόμενη διάρκεια της δοκιμής. Μια συνιστώμενη συχνότητα είναι τρεις φορές την εβδομάδα. Όταν οι μονάδες αρχίσουν να λειτουργούν αποδοτικά, παρέχεται ένα χρονικό περιθώριο 1 έως 6 το πολύ εβδομάδων μετά την εισαγωγή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, ώστε η προσαρμογή να φτάσει σε σταθερή κατάσταση. Για την αξιολόγηση του αποτελέσματος της δοκιμής, λαμβάνονται κατά προτίμηση τουλάχιστον 15 έγκυρες τιμές στη φάση οριζοντίωσης (παράγραφος 59), η οποία συνήθως διαρκεί 3 εβδομάδες. Η δοκιμή μπορεί να ολοκληρωθεί, εάν έχει επιτευχθεί επαρκής βαθμός απομάκρυνσης (π.χ. > 90 %) και είναι διαθέσιμες οι εν λόγω 15 τιμές, οι οποίες αντιπροσωπεύουν τις αναλύσεις κάθε εργάσιμης ημέρας για πάνω από 3 εβδομάδες. Κατά κανόνα, η διάρκεια δοκιμής δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 12 εβδομάδες μετά την προσθήκη της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

▼M4

49. Εάν η ιλύς νιτροποιείται και πρόκειται να μελετηθούν οι επιδράσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στη νιτροποίηση, δείγματα από τις εκροές των μονάδων δοκιμής και μάρτυρα υποβάλλονται σε ανάλυση, τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα, για αμμώνιο και/ή για νιτρώδη και νιτρικά ιόντα.

50. Όλες οι αναλύσεις θα πρέπει να εκτελούνται το συντομότερο δυνατόν, ιδίως οι προσδιορισμοί του αζώτου. Εάν χρειάζεται να αναβληθούν οι αναλύσεις, τα δείγματα φυλάσσονται στους 4 °C περίπου, στο σκοτάδι, μέσα σε πλήρεις, ερμητικά σφραγισμένες φιάλες. Εάν τα δείγματα πρέπει να φυλαχθούν για περισσότερο από 48 ώρες, διατηρούνται με κατάψυξη, οξίνιση (π.χ. 10 ml/l διαλύματος θειικού οξέος 400 g/l) ή με την προσθήκη κατάλληλης τοξικής χημικής ουσίας (π.χ. 20 ml/l διαλύματος χλωριούχου υδραργύρου (II) 10 g/l). Εξακριβώνεται ότι η τεχνική διατήρησης δεν επηρεάζει τα αποτελέσματα της ανάλυσης.

Σύζευξη των μονάδων ελέγχου

51. Εάν πρόκειται να εφαρμοστεί σύζευξη (προσάρτημα 3), ανταλλάσσεται καθημερινά η ίδια ποσότητα ενεργού ιλύος (150 ml έως 1 500 ml για τα δοχεία αερισμού που περιέχουν 3 λίτρα υγρού) μεταξύ των δοχείων αερισμού της μονάδας δοκιμής και της οικείας μονάδας-μάρτυρα. Εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία προσροφάται ισχυρά στην ιλύ, αλλάζεται μόνο το υπερκείμενο υγρό των διαχωριστήρων. Και στις δύο περιπτώσεις χρησιμοποιείται διορθωτικός συντελεστής για τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων της δοκιμής (παράγραφος 55).

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

52. Υπολογίζεται το ποσοστό απομάκρυνσης του DOC ή του COD της ελεγχόμενης χημικής ουσίας για κάθε χρόνο εκτίμησης, με τη βοήθεια της εξίσωσης:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

όπου

D_t = % απομάκρυνση του DOC ή COD σε χρόνο t

C_s = DOC ή COD στην εισροή λόγω της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, υπολογιζόμενο κατά προτίμηση από το διάλυμα παρακαταθήκης (mg/l)

E = μετρούμενη τιμή DOC ή COD στην εκροή της μονάδας δοκιμής σε χρόνο t (mg/l)

E_o = μετρούμενη τιμή DOC ή COD στην εκροή της μονάδας-μάρτυρα σε χρόνο t (mg/l)

53. Ο βαθμός απομάκρυνσης του DOC ή COD του οργανικού μέσου στη μονάδα-μάρτυρα αποτελεί χρήσιμο στοιχείο για την εκτίμηση της βιοαποικοδομητικής δραστικότητας της ενεργού ιλύος κατά τη δοκιμής. Υπολογίζεται η ποσοστιαία απομάκρυνση από την εξίσωση:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

όπου

D_B = % απομάκρυνση του DOC ή COD του οργανικού μέσου στη μονάδα-μάρτυρα σε χρόνο t

C_M = DOC ή COD του οργανικού μέσου στην εισροή της μονάδας-μάρτυρα (mg/l)

▼M4

Προαιρετικά, υπολογίζεται το ποσοστό απομάκρυνσης του DOC ή COD λόγω του οργανικού μέσου με την ελεγχόμενη χημική ουσία στη μονάδα δοκιμής από την εξίσωση:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

όπου

D_T = % απομάκρυνση του DOC ή COD από τη συνολική εισροή της μονάδας δοκιμής

C_T = DOC ή COD της συνολικής εισροής της μονάδας δοκιμής ή υπολογιζόμενα από τα διαλύματα παρακαταθήκης (mg/l)

54. Υπολογίζεται η απομάκρυνση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε κάθε χρόνο εκτίμησης, εάν έχει μετρηθεί με ειδική μέθοδο ανάλυσης, από την εξίσωση:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

όπου

D_{ST} = % πρωτοβάθμια απομάκρυνση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε χρόνο t

S_i = μετρούμενη ή εκτιμώμενη συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην εισροή της μονάδας δοκιμής (mg/l)

S_e = μετρούμενη συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην εκροή της μονάδας δοκιμής σε χρόνο t (mg/l)

55. Εάν έχει χρησιμοποιηθεί η μέθοδος σύζευξης, αντισταθμίζεται η αραίωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο δοχείο αερισμού λόγω της ανταλλαγής ιλύος με την εφαρμογή διορθωτικού συντελεστή (βλέπε προσάρτημα 3). Σε περίπτωση που έχουν εφαρμοστεί μέσος υδραυλικός χρόνος παραμονής 6 ωρών και ανταλλαγή του μισού όγκου της ενεργού ιλύος στο δοχείο αερισμού, οι προσδιορισθείσες ημερήσιες τιμές απομάκρυνσης (D_t, παράγραφος 52) πρέπει να διορθωθούν, για να προκύψει ο πραγματικός βαθμός απομάκρυνσης, D_{tc}, της ελεγχόμενης χημικής ουσίας από την εξίσωση:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

Έκφραση των αποτελεσμάτων της δοκιμής

56. Σχεδιάζεται γραφική παράσταση του ποσοστού απομάκρυνσης D_t (ή D_{tc}) και D_{st}, εάν είναι διαθέσιμο, συναρτήσει του χρόνου (βλέπε προσάρτημα 2). Από το σχήμα της καμπύλης απομάκρυνσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας (αυτής καθαυτής ή ως DOC) μπορούν να συναχθούν ορισμένα συμπεράσματα σχετικά με τη διεργασία απομάκρυνσης.

Προσρόφηση

57. Εάν παρατηρηθεί υψηλός βαθμός απομάκρυνσης του DOC της ελεγχόμενης χημικής ουσίας από την αρχή της δοκιμής, η ελεγχόμενη χημική ουσία πιθανώς απομακρύνεται με προσρόφηση στα στερεά της ενεργού ιλύος. Η απόδειξη αυτού είναι δυνατή με τον προσδιορισμό της προσροφημένης ελεγχόμενης χημικής ουσίας με ειδική ανάλυση. Δεν είθισται να παραμένει υψηλή η απομάκρυνση του DOC των προσροφήσιμων χημικών ουσιών καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Κατά κανόνα, ο βαθμός απομάκρυνσης είναι αρχικά υψηλός και, στη συνέχεια, μειώνεται σταδιακά σε μια τιμή ισορροπίας. Εάν, ωστόσο, η προσροφήσιμη ελεγχόμενη χημική ουσία ήταν ικανή να προκαλέσει με οποιονδήποτε τρόπο εγκλιματισμό του μικροβιακού πληθυσμού, η απομάκρυνση του DOC της ελεγχόμενης χημικής ουσίας θα αυξανόταν στη συνέχεια φθάνοντας σε υψηλή τιμή ορίζοντίωσης της καμπύλης.

▼M4

Λανθάνουσα φάση

58. Όπως και στις στατικές δοκιμές διαλογής, για πολλές ελεγχόμενες χημικές ουσίες απαιτείται μια λανθάνουσα φάση πριν από την πλήρη βιοαποικοδόμηση. Κατά τη λανθάνουσα φάση, συντελείται εγκλιματισμός ή προσαρμογή των βακτηριδίων αποικοδόμησης, με σχεδόν μηδενική απομάκρυνση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Στη συνέχεια, αρχίζουν να αναπτύσσονται τα βακτηρίδια αυτά. Η συγκεκριμένη φάση ολοκληρώνεται και η φάση αποικοδόμησης θεωρείται ότι αρχίζει όταν έχει απομακρυνθεί περίπου το 10 % της αρχικής ποσότητας της ελεγχόμενης χημικής ουσίας (λαμβανομένης υπόψη της προσρόφησης, εάν υπάρξει). Η λανθάνουσα φάση παρουσιάζει συχνά μεγάλη μεταβλητότητα και μικρή αναπαραγωγιμότητα.

Φάση σταθερής οριζοντίωσης

59. Η φάση οριζοντίωσης της καμπύλης απομάκρυνσης σε μια συνεχή δοκιμή ορίζεται ως η φάση κατά την οποία σημειώνεται η μέγιστη αποικοδόμηση. Η φάση οριζοντίωσης θα πρέπει να διαρκεί τουλάχιστον 3 εβδομάδες και να εμφανίζει περίπου 15 έγκυρες μετρηθείσες τιμές.

Μέσος βαθμός απομάκρυνσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας

60. Υπολογίζεται η μέση τιμή από τις τιμές απομάκρυνσης (D_t) της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στη φάση οριζοντίωσης. Η τιμή αυτή, αφού στρογγυλοποιηθεί στον πλησιέστερο ακέραιο αριθμό (1 %), είναι ο βαθμός απομάκρυνσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Συνιστάται επίσης ο υπολογισμός του διαστήματος εμπιστοσύνης 95 % της μέσης τιμής.

Απομάκρυνση του οργανικού μέσου

61. Σχεδιάζεται γραφική παράσταση του ποσοστού της απομάκρυνσης του DOC ή COD του οργανικού μέσου στη μονάδα-μάρτυρα (D_B) συναρτήσει του χρόνου. Αναφέρεται ο μέσος βαθμός απομάκρυνσης με τον ίδιο τρόπο όπως και για την ελεγχόμενη χημική ουσία (παράγραφος 60).

Ένδειξη βιοαποικοδόμησης

62. Εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία δεν προσροφάται σημαντικά στην ενεργό ιλύ και η καμπύλη απομάκρυνσης έχει το τυπικό σχήμα μιας καμπύλης βιοαποικοδόμησης, με λανθάνουσα φάση, φάση αποικοδόμησης και φάση οριζοντίωσης (παράγραφοι 58, 59), η μετρούμενη απομάκρυνση μπορεί με ασφάλεια να αποδοθεί σε βιοαποικοδόμηση. Εάν έχει σημειωθεί υψηλός βαθμός αρχικής απομάκρυνσης, η δοκιμή προσομοίωσης δεν μπορεί να κάνει διάκριση μεταξύ βιολογικών και αβιοτικών διεργασιών απομάκρυνσης. Σε τέτοιες περιπτώσεις, καθώς και σε άλλες όπου υπάρχει αμφιβολία σχετικά με τη βιοαποικοδόμηση (π.χ. αφαίρεση), εκτελείται ανάλυση των προσροφημένων ελεγχόμενων χημικών ουσιών ή διεξάγονται πρόσθετες στατικές δοκιμές βιοαποικοδόμησης με βάση τις παραμέτρους που αποτελούν σαφείς ενδείξεις βιολογικών διεργασιών. Οι δοκιμές αυτές είναι οι μέθοδοι πρόσληψης οξυγόνου [κεφάλαιο Γ.4, μέθοδοι Δ, Ε και Ζ του παρόντος παραρτήματος (6)] ή η δοκιμή με μέτρηση της παραγωγής διοξειδίου του άνθρακα [κεφάλαιο Γ.4, μέθοδος Γ του παρόντος παραρτήματος (6)] ή η μέθοδος υπερκείμενης φάσης του ISO (18), στις οποίες χρησιμοποιείται προεκτεθειμένο εμβόλιο από τη δοκιμή προσομοίωσης. Εάν έχουν μετρηθεί τόσο η απομάκρυνση DOC, όσο και η απομάκρυνση συγκεκριμένων χημικών ουσιών, σημαντικές διαφορές μεταξύ των ποσοστών που απομακρύνονται (το πρώτο να είναι χαμηλότερο από το δεύτερο) υποδηλώνουν την παρουσία ενδιάμεσων οργανικών προϊόντων στις εκροές, τα οποία μπορεί να είναι πιο δύσκολο να αποικοδομηθούν σε σύγκριση με τη μητρική χημική ουσία.

Εγκυρότητα των αποτελεσμάτων της δοκιμής

63. Λαμβάνονται πληροφορίες σχετικά με την κανονική συμπεριφορά βιοαποικοδόμησης του εμβολίου, εάν προσδιορίζεται ο βαθμός απομάκρυνσης του οργανικού μέσου (παράγραφος 53) στη μονάδα-μάρτυρα. Η δοκιμή θεωρείται έγκυρη εάν ο βαθμός απομάκρυνσης DOC ή COD στις μονάδες-μάρτυρες είναι > 80 % μετά από δύο εβδομάδες και δεν έχουν καταγραφεί ασυνήθιστες παρατηρήσεις.

▼M4

64. Εάν έχει χρησιμοποιηθεί ευκόλως βιοαποικοδομήσιμη χημική ουσία (αναφοράς), ο βαθμός βιοαποικοδόμησης (D_t, παράγραφος 52), πρέπει να είναι > 90 %.

65. Εάν η δοκιμή διεξάγεται υπό συνθήκες νιτροποίησης, η μέση συγκέντρωση στις εκροές πρέπει να είναι<1 mg/l αμμωνιακού N και<2 mg/l N νιτρωδών ιόντων.

66. Εάν δεν πληρούνται τα ανωτέρω κριτήρια (παράγραφοι 63-65), επαναλαμβάνεται η δοκιμή με εμβόλιο από διαφορετική πηγή, υποβάλλεται σε δοκιμή μια χημική ουσία αναφοράς και επανεξετάζονται όλες οι πειραματικές διαδικασίες.

Έκθεση δοκιμής

67. Η έκθεση της δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Ελεγχόμενη χημική ουσία:

— δεδομένα ταυτοποίησης,

— φυσική μορφή και, όπου απαιτείται, φυσικοχημικές ιδιότητες.

Συνθήκες δοκιμής:

— τύπος του συστήματος δοκιμής και τυχόν τροποποιήσεις για τη δοκιμή αδιάλυτων και πτητικών χημικών ουσιών,

— τύπος οργανικού μέσου,

— αναλογία και είδος των βιομηχανικών αποβλήτων στα λύματα, εφόσον είναι γνωστά,

— εμβόλιο, είδος και σημεία δειγματοληψίας, συγκέντρωση και τυχόν προεπεξεργασία,

— διάλυμα παρακαταθήκης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας: περιεκτικότητα σε DOC και TOC, τρόπος παρασκευής, εναιώρημα ή όχι, συγκέντρωση δοκιμής που χρησιμοποιήθηκε, λόγοι για τους οποίους ο DOC δεν κυμαινόταν μεταξύ 10 και 20 mg/l, μέθοδος προσθήκης, ημερομηνία πρώτης προσθήκης, τυχόν αλλαγές,

— μέση ηλικία ιλύος και μέσος υδραυλικός χρόνος παραμονής, μέθοδος απόρριψης της περίσσειας ιλύος, μέθοδοι για την αντιμετώπιση της διόγκωσης, της απώλειας ιλύος κ.λπ.,

— αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν,

— θερμοκρασία δοκιμής,

— ιδιότητες της διόγκωσης ιλύος, δείκτης όγκου ιλύος (ΔΟΠ), αιωρούμενα στερεά ανάμικτου υγρού (MLSS),

— τυχόν αποκλίσεις από τις τυποποιημένες διαδικασίες και περιστάσεις που ενδέχεται να έχουν επηρεάσει τα αποτελέσματα.

Αποτελέσματα της δοκιμής:

— όλα τα μετρηθέντα δεδομένα (DOC, COD, ειδικές αναλύσεις, pH, θερμοκρασία, συγκέντρωση οξυγόνου, αιωρούμενα στερεά, αζωτούχες χημικές ουσίες, εάν έχουν σημασία,

— όλες οι υπολογισθείσες τιμές D_t (ή D_{tc}), D_B, D_{St} σε μορφή πίνακα και οι καμπύλες απομάκρυνσης,

— πληροφορίες σχετικά με τη λανθάνουσα φάση και τη φάση οριζοντίωσης, τη διάρκεια της δοκιμής, τον βαθμό απομάκρυνσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και τον βαθμό απομάκρυνσης του οργανικού μέσου στη μονάδα-μάρτυρα, συνοδευόμενες από στατιστικά στοιχεία και δηλώσεις για τη βιοαποικοδομησιμότητα και την εγκυρότητα της δοκιμής,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων.

▼**M4**

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) Swisher R.D. (1987), «Surfactant Biodegradation», 2nd Edn. Marcel Dekker Inc. New York, 1085 pp.

(2) German Government (1962), Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents, *Bundesgesetzblatt*, Pt.1 No.49: 698-706.

(3) Painter H.A. και King E.F. (1978a), WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No.70, Water Research Centre, Medmenham, UK.

(4) Painter H.A. και King E.F. (1978b), The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants, *Wat. Res.* 12: 909-915.

(5) Eckenfelder, W.W (19) US EPA.

(6) Κεφάλαιο Γ.4 του παρόντος παραρτήματος: Προσδιορισμός «άμεσης» βιοαποικοδομησιμότητας.

(7) Κεφάλαιο Γ.12 του παρόντος παραρτήματος: Βιοαποικοδόμηση — τροποποιημένη δοκιμασία SCAS.

(8) Κεφάλαιο Γ.19 του παρόντος παραρτήματος: Υπολογισμός του συντελεστή προσρόφησης (K_{OC}) του εδάφους και της λάσπης των υπονόμων χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).

(9) Gerike P. και Fischer W.K. (1979), A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests, *Ecotox. Env. Saf.* 3:157-173.

(10) Gerike P. και Fischer W.K. (1981), as (9), II Additional results and conclusions, *Ecotox. Env. Saf.* 5: 45-55.

(11) Painter H.A. και Bealing D. (1989), Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. pp 113-138, In: Laboratory tests for simulation of water treatment processes, CEC Water Pollution Report 18, Eds. Jacobsen B.N., Muntau H., Angeletti G.

(12) ISO 11733 (1995; revised 2004), Evaluation of the elimination and biodegradability of organic substances in an aqueous medium - activated sludge simulation test.

(13) Birch R.R. (1982), The biodegradability of alcohol ethoxylates, *XIII Jornado Com. Espanol. Deterg.*: 33-48.

(14) Birch R.R. (1984), Biodegradation of noniomic surfactants, *J.A.O.C.S.* 61 (2): 340-343.

(15) Gerike P., Fischer W.K. και Holtmann W. (1980), Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test, *Wat. Res.* 14: 753-758.

(16) Baumann U., Kuhn G. και Benz M. (1998), Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, *UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox.* 10: 214-220.

(17) Her Majesty's Stationery Office (1982), Assessment of biodegradability, Methods for the examination of waters and associated materials, pp. 91-98 ISBN 011 751661 9.

(18) ISO 14593 (1998), Water Quality - Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic compounds, Method by the analysis of inorganic carbon in sealed vessels.

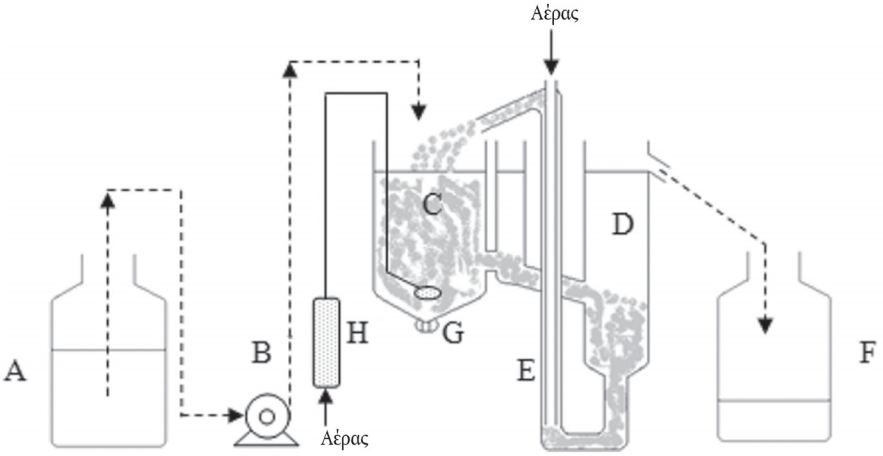
▼**M4**

Προσάρτημα 1

Σχήμα 1

Εξοπλισμός που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της βιοαποικοδομησιμότητας

Μονάδα Husmann



A. Δοχείο αποθήκευσης

B. Δοσομετρική αντλία

C. Θάλαμος αερισμού (χωρητικότητας 3L)

D. Δοχείο καθίζησης

E. Αεροκίνητη αντλία

F. Δοχείο συλλογής

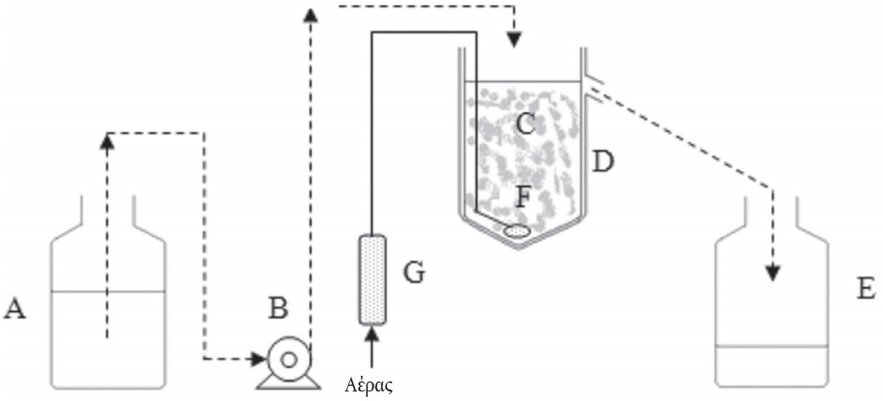
G. Αεριστήρας

H. Μετρητής ροής αέρα

Σχήμα 2

Εξοπλισμός που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της βιοαποικοδομησιμότητας

Πορώδες δοχείο



A. Δοχείο αποθήκευσης

B. Δοσομετρική αντλία

C. Πορώδες δοχείο αερισμού

D. Εξωτερικό αδιαπέραστο δοχείο

E. Δοχείο συλλογής

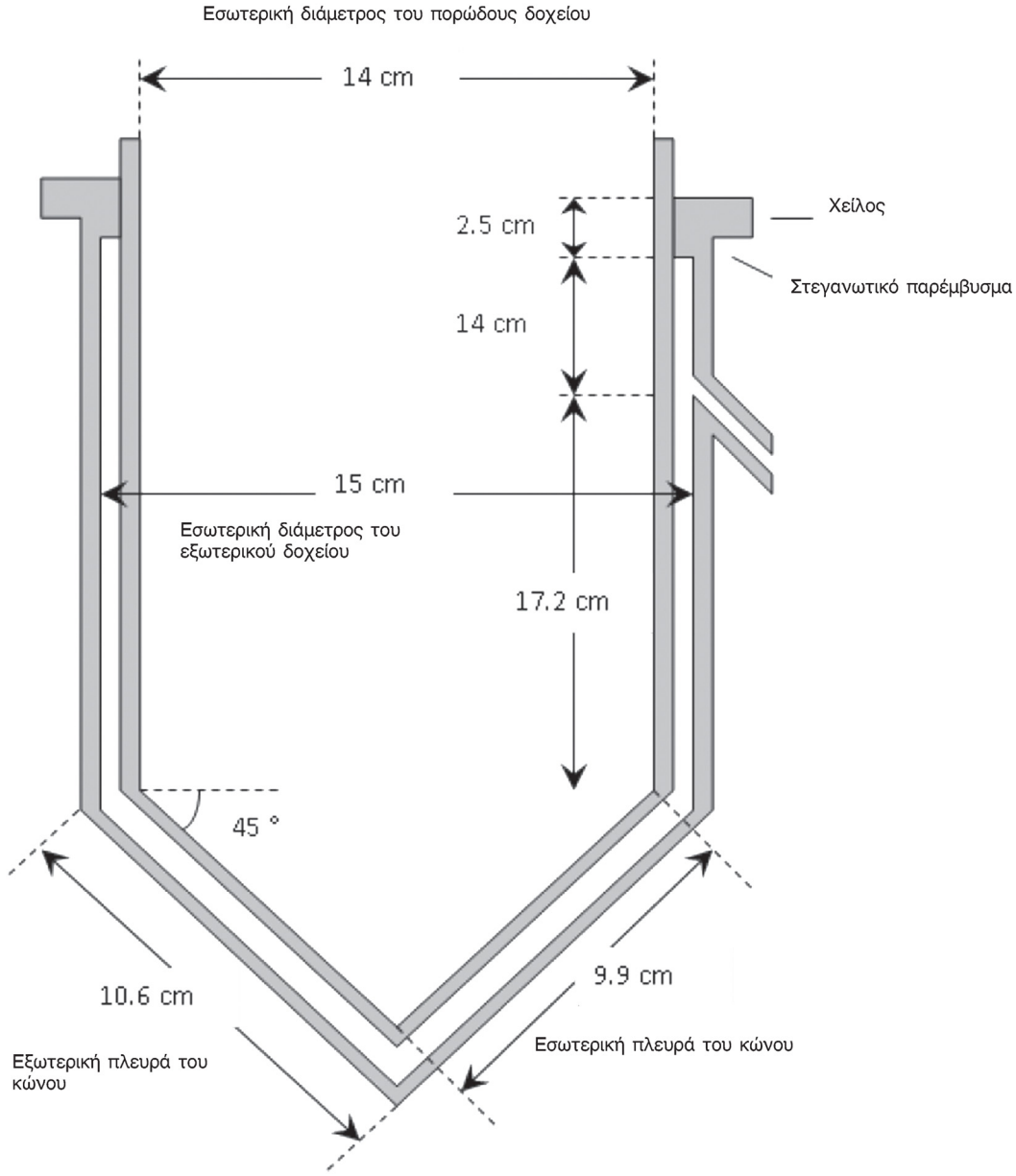
F. Διαχυτήρας

G. Μετρητής ροής αέρα

▼**M4**

Σχήμα 3

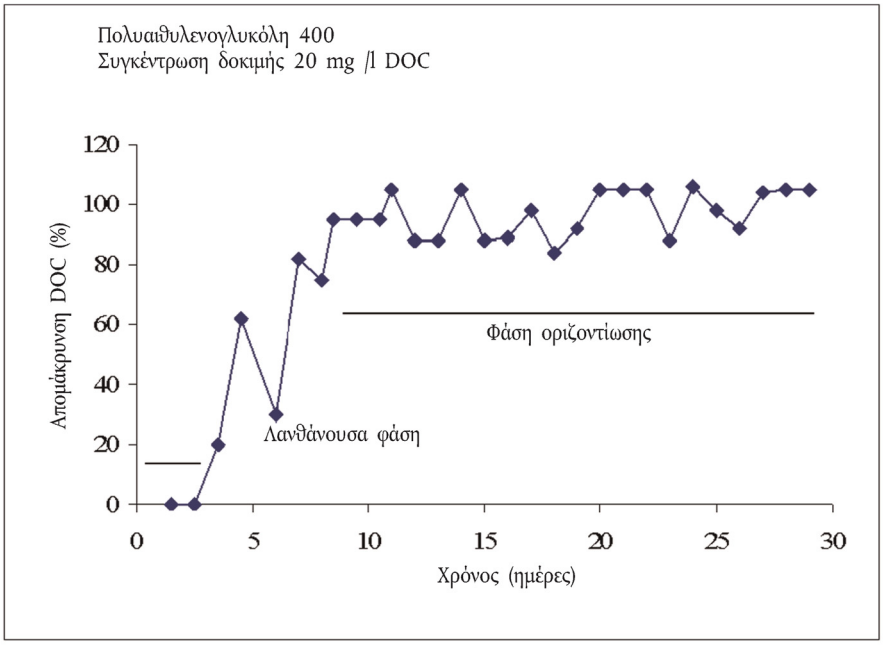
Στοιχεία πορώδους δοχείου αερισμού χωρητικότητας 3 λίτρων



▼**M4**

Προσάρτημα 2

Παράδειγμα καμπύλης απομάκρυνσης



▼**M4**

Προσάρτημα 3

[ΕΝΗΜΕΡΩΤΙΚΟ]

ΣΥΖΕΥΞΗ ΤΩΝ ΜΟΝΑΔΩΝ ΔΟΚΙΜΗΣ

Σε μια προσπάθεια εξίσωσης των μικροβιακών πληθυσμών στις ιλύες της μονάδας δοκιμής, που δέχεται λύματα και την ελεγχόμενη χημική ουσία, και της μονάδας-μάρτυρα, που δέχεται μόνο λύματα, εισήχθη η καθημερινή ανταλλαγή ιλύος (1). Η διαδικασία αυτή ονομάστηκε σύζευξη και η μέθοδος είναι γνωστή ως συζευγμένες μονάδες. Η σύζευξη πραγματοποιούνταν αρχικά με μονάδες ενεργού ιλύος Husmann, αλλά έχει πραγματοποιηθεί και με μονάδες πορώδους δοχείου (2)(3). Δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές ως προς τα αποτελέσματα μεταξύ των μη συζευγμένων και των συζευγμένων μονάδων, είτε πρόκειται για μονάδες Husmann είτε για πορώδη δοχεία, και επομένως, η δαπάνη χρόνου και ενέργειας που απαιτείται για τη σύζευξη των μονάδων δεν προσφέρει κανένα πλεονέκτημα.

Οι ανταλλαγές ιλύος μπορεί να δίνουν την εντύπωση μιας σημαντικής απομάκρυνσης, δεδομένου ότι μέρος της ελεγχόμενης χημικής ουσίας μεταφέρεται και οι συγκεντρώσεις της στις εκροές των μονάδων δοκιμής και μάρτυρα εξισώνονται περισσότερο. Συνεπώς, πρέπει να χρησιμοποιούνται διορθωτικοί συντελεστές, οι οποίοι εξαρτώνται από το ανταλλασσόμενο κλάσμα και τον μέσο υδραυλικό χρόνο παραμονής. Έχουν δημοσιευθεί περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με τον υπολογισμό (1).

Υπολογίζεται ο διορθωμένος βαθμός απομάκρυνσης του DOC ή COD με τη βοήθεια του γενικού τύπου:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12)\ \%$$

όπου

D_{tc} = διορθωμένη % απομάκρυνση DOC ή COD

D_t = προσδιορισθείσα % απομάκρυνση DOC ή COD

a = ανταλλασσόμενο κλάσμα του όγκου των μονάδων ενεργού ιλύος

r = μέσος υδραυλικός χρόνος παραμονής (ώρες)

Εάν, για παράδειγμα, ανταλλάσσεται ο μισός όγκο της δεξαμενής αερισμού (a = 0,5) και ο μέσος υδραυλικός χρόνος παραμονής είναι 6 ώρες, ο τύπος για τη διόρθωση είναι:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) Fischer W., Gerike P., Holtmann W. (1975), Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test, *Wat. Res.* 9: 1131-1135.

(2) Painter H.A., Bealing D.J. (1989), Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. pp. 113-138, στο: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18, Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

(3) Painter H.A., King E.F. (1978), Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability, Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, UK.

▼M4

Προσάρτημα 4

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΥ ΙΛΥΟΣ

Διεργασία από ελεγχόμενες χημικές ουσίες

1. Μια χημική ουσία (ή λύμα) μπορεί να μην αποικοδομηθεί ή απομακρυνθεί στη δοκιμή προσομοίωσης ή ακόμη και να έχει ανασταλτική επίδραση στους μικροοργανισμούς της ιλύος. Άλλες χημικές ουσίες βιοαποικοδομούνται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, αλλά είναι ανασταλτικές σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (όρμηση). Οι ανασταλτικές επιδράσεις ενδέχεται να έχουν αποκαλυφθεί σε προγενέστερο στάδιο ή μπορούν να προσδιοριστούν με τη διεξαγωγή δοκιμής τοξικότητας, κατά την οποία χρησιμοποιείται ένα εμβόλιο παρόμοιο ή πανομοιότυπο με το χρησιμοποιούμενο στη δοκιμή προσομοίωσης (1). Τέτοιες μέθοδοι είναι η αναστολή της πρόσληψης οξυγόνου [κεφάλαιο Γ.11 του παρόντος παραρτήματος (2) και πρότυπο ISO 8192(3)] και η αναστολή της ανάπτυξης οργανισμών της ιλύος [ISO 15522 (4)].

2. Στη δοκιμή προσομοίωσης, η αναστολή εκδηλώνεται, όταν η διαφορά ως προς τον διαλυμένο οργανικό άνθρακα (DOC) ή το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο COD μεταξύ της εκροής από το δοχείο δοκιμής και της εκροής από το δοχείο-μάρτυρα είναι μεγαλύτερη από τον DOC που προστίθεται ως ελεγχόμενη χημική ουσία. Με άλλα λόγια, η ποσοστιαία απομάκρυνση DOC (και βιοχημικά απαιτούμενου οξυγόνου BOD, χημικά απαιτούμενου οξυγόνου COD και/ή NH^{+}_{4}) του υπό επεξεργασία οργανικού μέσου θα μειώνεται λόγω της παρουσίας της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Στην περίπτωση αυτή, η δοκιμή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται, με μείωση της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας μέχρι το επίπεδο στο οποίο δεν παρατηρείται αναστολή και, ίσως, με περαιτέρω μείωση της συγκέντρωσης έως ότου βιοαποικοδομηθεί η ελεγχόμενη χημική ουσία. Ωστόσο, εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία (ή το λύμα) έχει δυσμενείς επιδράσεις στη διεργασία σε όλες τις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν, αυτό αποτελεί ένδειξη του ότι η βιολογική επεξεργασία της χημικής ουσίας είναι δύσκολη, αν όχι αδύνατη, αλλά ίσως είναι σκόπιμο να επαναληφθεί η δοκιμή με ενεργό ιλύ από διαφορετική πηγή και/ή να υποβληθεί η ιλύς σε σταδιακότερο εγκλιματισμό.

3. Αντιστρόφως, εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία απομακρυνθεί βιολογικά με την πρώτη προσπάθεια στη δοκιμή προσομοίωσης, η συγκέντρωσή της θα πρέπει να αυξηθεί, εάν απαιτείται να είναι γνωστή η πιθανή ανασταλτική ικανότητα της χημικής ουσίας.

4. Κατά την προσπάθεια προσδιορισμού βαθμών αναστολής δεν θα πρέπει να παραβλέπεται ότι ο πληθυσμός της ενεργού ιλύος μπορεί να μεταβληθεί, με αποτέλεσμα να αναπτύσσουν ενδεχομένως οι μικροοργανισμοί, με την πάροδο του χρόνου, ανοχή προς μια ανασταλτική χημική ουσία.

5. Υπολογισμός του βαθμού αναστολής:

   Το συνολικό ποσοστό απομάκρυνσης, R_o, των BOD, DOC, COD κ.λπ. μπορεί να υπολογιστεί για τις μονάδες δοκιμής και μάρτυρα από τον τύπο:

$$R_o = 100\ (I - E)/I\%$$

   όπου:

   I = συγκέντρωση BOD, DOC, COD κ.λπ., στην εισροή, για δοχεία δοκιμής ή μάρτυρα (mg/l)

   E = αντίστοιχες συγκεντρώσεις στις εκροές (mg/l).

   Οι τιμές I και E πρέπει να διορθώνονται για να λαμβάνεται υπόψη ο DOC που οφείλεται στην ελεγχόμενη χημική ουσία στις μονάδες δοκιμής, γιατί διαφορετικά οι υπολογισμοί του ποσοστού αναστολής θα είναι εσφαλμένοι.

▼**M4**

Ο βαθμός αναστολής που προκαλείται από την παρουσία της ελεγχόμενης χημικής ουσίας μπορεί να υπολογιστεί από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = 100\ (R_c - R_t)/R_c$$

όπου:

R_c = ποσοστό απομάκρυνσης στα δοχεία-μάρτυρες

R_t = ποσοστό απομάκρυνσης στα δοχεία δοκιμής

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) Reynolds L. et al. (1987), Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability, *Chemosphere* 16: 2259.

(2) Κεφάλαιο Γ.11 του παρόντος παραρτήματος: Βιοαποικοδόμηση — Ενεργός ιλύς: έλεγχος αναστολής της αναπνοής.

(3) ISO 8192 (2007) Water quality — Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation.

(4) ISO 15522 (1999) Water Quality — Determination of the inhibitory effect of water constituents on activated sludge microorganisms.

▼M4

Προσάρτημα 5

Δυσδιάλυτες στο νερό ελεγχόμενες χημικές ουσίες — πτητικές χημιές ουσίες

Δυσδιάλυτες στο νερό χημικές ουσίες

Λίγες είναι οι εκθέσεις που έχουν δημοσιευθεί σχετικά με την υποβολή δυσδιάλυτων και αδιάλυτων στο νερό χημικών ουσιών σε δοκιμές προσομοίωσης της επεξεργασίας λυμάτων (1)(2)(3).

Δεν υπάρχει ενιαία μέθοδος διασποράς της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που να εφαρμόζεται σε όλες τις αδιάλυτες χημικές ουσίες. Δύο από τους τέσσερις τύπους μεθόδου που περιγράφονται στο πρότυπο ISO 10634 (4) φαίνονται κατάλληλοι για την προσπάθεια διασποράς ελεγχόμενων χημικών ουσιών για δοκιμές προσομοίωσης: πρόκειται για τη χρήση γαλακτωματοποιητών και/ή υπερηχητικής ενέργειας. Θα πρέπει να αποδεικνύεται η σταθερότητα της προκύπτουσας διασποράς τουλάχιστον για 24 ώρες. Στη συνέχεια, κατάλληλα σταθεροποιημένες διασπορές, που περιέχονται σε συνεχώς αναδευόμενο δοχείο (παράγραφος 38) τροφοδοτούνται στη δεξαμενή αερισμού χωριστά από τα οικιακά (ή συνθετικά) λύματα.

Εάν οι διασπορές είναι σταθερές, διερευνάται ο τρόπος με τον οποίο μπορεί να προσδιοριστεί η ελεγχόμενη χημική ουσία σε μορφή διεσποράς. Οι πιθανότητες να είναι κατάλληλος ο DOC είναι λίγες και, επομένως, θα πρέπει να καθορίζεται ειδική αναλυτική μέθοδος για την ελεγχόμενη χημική ουσία, με δυνατότητα εφαρμογής στις εκροές, στα στερεά εκροών και στην ενεργό ιλύ. Στη συνέχεια προσδιορίζεται η πορεία της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην προσομοίωση της διεργασίας ενεργού ιλύος, σε υγρή και στερεή φάση. Ως εκ τούτου, μπορεί να καθοριστεί ένα «ισοζύγιο μάζας» για να κριθεί αν η ελεγχόμενη χημική ουσία βιοαποικοδομήθηκε. Ωστόσο, αυτό θα υποδήλωνε μόνο πρωτοβάθμια βιοαποικοδόμηση. Η απόδειξη της τελικής βιοαποικοδόμησης πρέπει να επιχειρείται με τη διεξαγωγή μιας αναπνευσιομετρικής δοκιμής άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας [κεφάλαιο Γ.4 του παρόντος παραρτήματος (5), μέθοδοι Γ, Ζ, Δ], με τη χρήση ιλύος που έχει εκτεθεί στην ελεγχόμενη χημική ουσία κατά τη δοκιμή προσομοίωσης ως εμβολίου.

Πτητικές χημικές ουσίες

Η εφαρμογή των προσομοιώσεων επεξεργασίας λυμάτων σε πτητικές χημικές ουσίες είναι τόσο αμφισβητήσιμη, όσο και προβληματική. Όπως και με τις δυσδιάλυτες στο νερό ελεγχόμενες χημικές ουσίες, έχουν δημοσιευθεί ελάχιστες εκθέσεις που περιγράφουν δοκιμές προσομοίωσης με πτητικές χημικές ουσίες. Ένας συμβατικός τύπος συσκευής πλήρους ανάμειξης προσαρμόζεται με τη σφράγιση των δεξαμενών αερισμού και καθίζησης, τη μέτρηση και τον έλεγχο της ροής του αέρα με μετρητές ροής και με τη διοχέτευση του αερίου εξόδου μέσω παγίδων για τη συλλογή των πτητικών οργανικών ουσιών. Σε ορισμένες περιπτώσεις, χρησιμοποιείται αντλία κενού για να διαβιβάσει το αέριο εξόδου μέσω κρυοπαγίδας ή παγίδας εκδίωξης-παγίδευσης που περιέχει Tenax και πυριτική πηκτή, για αεριοχρωματογραφικές αναλύσεις. Η ελεγχόμενη χημική ουσία που υπάρχει στην παγίδα μπορεί να προσδιοριστεί με ανάλυση.

Η δοκιμή διεξάγεται σε δύο μέρη. Οι μονάδες λειτουργούν πρώτα χωρίς ιλύ, αλλά με άντληση των συνθετικών λυμάτων συν την ελεγχόμενη χημική ουσία στη δεξαμενή αερισμού. Για μερικές ημέρες συλλέγονται δείγματα εισροών, εκροών και αερίων εξόδου και αναλύονται για την ανίχνευση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Από τα συλλεγόμενα δεδομένα μπορεί να υπολογιστεί το ποσοστό (R_{vs}) της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που αφαιρείται από το σύστημα.

Στη συνέχεια, εκτελείται η κανονική βιολογική δοκιμή (με ιλύ) υπό συνθήκες λειτουργίας πανομοιότυπες με εκείνες της μελέτης αφαίρεσης. Εκτελούνται επίσης μετρήσεις DOC ή COD προκειμένου να εξακριβώνεται η αποτελεσματική λειτουργία των μονάδων. Διενεργούνται περιστασιακές αναλύσεις για τον προσδιορισμό της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην εισροή, στην εκροή και στο αέριο εξόδου κατά το πρώτο μέρος της δοκιμής, ενώ μετά τον εγκλιματισμό οι αναλύσεις είναι συχνότερες. Από τα δεδομένα σε σταθερή κατάσταση μπορεί και πάλι να υπολογιστεί το ποσοστό απομάκρυνσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας (R_T) από την υγρή φάση με όλες τις διεργασίες (φυσικές και βιολογικές), καθώς και το ποσοστό (R_V) που αφαιρείται από το σύστημα.

▼**M4**

Υπολογισμός:

α) Στη μη βιολογική δοκιμή, το ποσοστό (R_{VP}) του υπό δοκιμή υλικού που αφαιρείται από το σύστημα μπορεί να υπολογιστεί από την εξίσωση:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

όπου

R_{VP} = απομάκρυνση της χημικής ουσίας με εξάτμιση (%),

S_{VP} = ελεγχόμενη χημική ουσία που έχει συλλεγεί σε παγίδα, εκφρασμένη ως ισοδύναμη συγκέντρωση σε υγρή φάση (mg/l),

S_{IP} = συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην εισροή (mg/l).

β) Στη βιολογική δοκιμή, το ποσοστό (R_V) του υπό δοκιμή υλικού που αφαιρείται από το σύστημα μπορεί να υπολογιστεί από την εξίσωση:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

όπου

R_V = απομάκρυνση της χημικής ουσίας με εξάτμιση κατά τη βιολογική δοκιμή (%),

S_V = ελεγχόμενη χημική ουσία που έχει συλλεγεί σε παγίδα κατά τη βιολογική δοκιμή, εκφρασμένη ως ισοδύναμη συγκέντρωση σε υγρή εισροή (mg/l),

S_I = συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην εισροή (mg/l).

γ) Στη βιολογική δοκιμή, το ποσοστό (R_T) της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που απομακρύνεται με όλες τις διεργασίες δίδεται από τον τύπο:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

όπου

S_E = συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην (υγρή) εκροή (mg/l).

δ) Επομένως, το ποσοστό (R_{BA}) που απομακρύνεται αθροιστικά με βιοαποικοδόμηση και προσρόφηση μπορεί να υπολογιστεί από την εξίσωση:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Θα πρέπει να διεξάγονται χωριστές δοκιμές για να διαπιστώνεται κατά πόσον η ελεγχόμενη χημική ουσία προσροφάται. Εάν η απάντηση είναι καταφατική, μπορεί να γίνει περαιτέρω διόρθωση.

ε) Η σύγκριση μεταξύ των ποσοστών της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που αφαιρούνται από τα συστήματα βιολογικής (R_v) και μη βιολογικής δοκιμής (R_{vp}) υποδηλώνει το συνολικό αποτέλεσμα της βιολογικής επεξεργασίας όσον αφορά τις ατμοσφαιρικές εκπομπές της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

Παράδειγμα: Βενζόλιο

Χρόνος παραμονής ιλύος = 4 ημέρες

Συνθετικά λύματα, χρόνος παραμονής = 8 ώρες

$S_{IP} = S_I = 150$ mg/l

$S_{VP} = 150$ mg/l ($S_{EP} = 0$)

$S_V = 22{,}5$ mg/l

$S_E = 50$ μg/l

▼**M4**

Άρα,

R_{VP} = 100 %, R_V = 15 %

R_T = 100 % και R_{BA} = 85 %.

Θεωρείται ότι το βενζόλιο δεν προσροφήθηκε στην ιλύ.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) Horn J.A., Moyer J.E., Hale J.H. (1970), Biological degradation of tertiary butyl alcohol, Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939-854.

(2) Pitter P., Chudoba J. (1990), Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.

(3) Stover E.L., Kincannon D.F. (1983), Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.

(4) ISO 10634 (1995) Water Quality - Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

(5) Κεφάλαιο Γ.4 του παρόντος παραρτήματος: Προσδιορισμός «άμεσης» βιοαποικοδομησιμότητας.

▼M4

Προσάρτημα 6

Επίδραση του χρόνου παραμονής ιλύος (SRT) στην επεξεργασιμότητα χημικών ουσιών

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η μέθοδος που περιγράφεται στο κυρίως κείμενο προορίζεται για την εξακρίβωση του κατά πόσον οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες (συνήθως αυτές που είναι γνωστό ότι είναι εγγενώς, αλλά όχι ευκόλως, βιοαποικοδομήσιμες) μπορούν να βιοαποικοδομηθούν εντός των ορίων που επιβάλλουν οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστιαία απομάκρυνση και ποσοστιαία βιοαποικοδόμηση. Οι συνθήκες λειτουργίας των μονάδων ενεργού ιλύος και η επιλογή εισροής καθιστούν δυνατές σχετικά μεγάλες διακυμάνσεις της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίες στις εκροές. Οι δοκιμές διεξάγονται μόνο σε μία ονομαστική συγκέντρωση στερεών ιλύος ή σε έναν ονομαστικό χρόνο παραμονής της ιλύος (SRT) και τα περιγραφόμενα συστήματα περίσσειας ιλύος μπορούν να οδηγήσουν στη σημαντική διακύμανση της τιμής του SRT κατά τη δοκιμή, τόσο από ημέρα σε ημέρα όσο και κατά τη διάρκεια της ίδιας ημέρας.

2. Στην παρούσα παραλλαγή (1)(2) ο SRT ελέγχεται εντός πολύ στενότερων ορίων ανά 24ωρο (όπως ακριβώς συμβαίνει σε μεγάλη κλίμακα), γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα σταθερότερη συγκέντρωση στις εκροές. Συνιστώνται τα οικιακά λύματα, διότι εξασφαλίζουν συνεπέστερα και υψηλότερα ποσοστά απομάκρυνσης. Διερευνώνται επίσης οι επιδράσεις μιας σειράς τιμών SRT, ενώ σε μια πιο διεξοδική μελέτη μπορούν να προσδιοριστούν οι επιδράσεις ενός εύρους θερμοκρασιών στη συγκέντρωση στις εκροές.

3. Δεν έχει υπάρξει ακόμη γενική συμφωνία ως προς τα κινητικά μοντέλα που λειτουργούν όταν χημικές ουσίες βιοαποικοδομούνται υπό συνθήκες επεξεργασίας λυμάτων. Επιλέχθηκε το μοντέλο Monod της βακτηριακής ανάπτυξης και της χρησιμοποίησης υποστρώματος (1)(2) για εφαρμογή στα συλλεγόμενα δεδομένα, καθώς η μέθοδος προορίζεται για εφαρμογή μόνο σε χημικές ουσίες που παράγονται σε μεγάλες ποσότητες, με αποτέλεσμα οι συγκεντρώσεις τους στα λύματα να υπερβαίνουν το 1 mg/l. Η εγκυρότητα του απλοποιημένου μοντέλου και οι παραδοχές που έγιναν αποδείχθηκαν με τη χρήση μιας σειράς αιθοξυλεστέρων αλκοόλης με διάφορους βαθμούς πρωτοβάθμιας βιοαποικοδόμησης (2)(3).

Σημείωση: Η παρούσα παραλλαγή ακολουθεί πιστά μεγάλο μέρος του κειμένου της παρούσας μεθόδου δοκιμών Γ.10-Α και κατωτέρω παρατίθενται μόνο οι λεπτομέρειες που διαφέρουν.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

4. Μονάδες πορώδους δοχείου ενεργού ιλύος, σχεδιασμένες με σκοπό να διευκολύνουν τη (σχεδόν) συνεχή απόρριψη ανάμεικτου υγρού που επιτρέπει τον ακριβέστατο έλεγχο του χρόνου παραμονής της ιλύος (SRT ή θ_s), λειτουργούν χωρίς σύζευξη σε ένα εύρος χρόνων παραμονής ιλύος (SRT) και, προαιρετικά, σε ένα εύρος θερμοκρασιών. Ο χρόνος παραμονής κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 2 και 10 ημερών και η θερμοκρασία μεταξύ 5 και 20 °C. Τα λύματα, κατά προτίμηση οικιακά, και ένα διάλυμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας τροφοδοτούνται χωριστά στις μονάδες με ρυθμό που επιτρέπει να επιτευχθούν ο απαιτούμενος χρόνος παραμονής λυμάτων (3 έως 6 ώρες) και η απαιτούμενη συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην εισροή. Για λόγους σύγκρισης, λειτουργούν παράλληλα μονάδες-μάρτυρες που δεν δέχονται την ελεγχόμενη χημική ουσία.

5. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι τύποι συσκευών, αλλά πρέπει να δίδεται μεγάλη προσοχή στην επίτευξη ικανοποιητικού ελέγχου του SRT. Για παράδειγμα, όταν χρησιμοποιούνται εγκαταστάσεις που περιλαμβάνουν δεξαμενή καθίζησης, ενδέχεται να είναι απαραίτητο ένα περιθώριο για απώλειες στερεών μέσω των εκροών της εγκατάστασης. Περαιτέρω, πρέπει να λαμβάνονται ειδικές προφυλάξεις ώστε να αποφεύγονται σφάλματα που οφείλονται στη μεταβλητότητα της ποσότητας ιλύος στη δεξαμενή καθίζησης.

▼M4

6. Οι μονάδες λειτουργούν σε κάθε επιλεγμένο σύνολο συνθηκών και, αφού επιτευχθεί ισορροπία, λαμβάνονται για περίοδο περίπου τριών εβδομάδων οι μέσες συγκεντρώσεις σταθερής κατάστασης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στις εκροές και, προαιρετικά, του DOC. Εκτός από την εκτίμηση της ποσοστιαίας απομάκρυνσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και, προαιρετικά, του DOC, εκφράζεται με γραφική παράσταση η σχέση μεταξύ των συνθηκών λειτουργίας της εγκατάστασης και της συγκέντρωσης στην εκροή. Από τη σχέση αυτή είναι δυνατόν να υπολογιστούν προσωρινές κινητικές σταθερές και να προβλεφθούν οι συνθήκες υπό τις οποίες η ελεγχόμενη χημική ουσία μπορεί να υποστεί επεξεργασία.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

7. Εφαρμόζονται οι παράγραφοι 12 και 13 του κεφαλαίου Γ.10-Α.

ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΠΙΤΥΧΙΑΣ

8. Εφαρμόζονται οι παράγραφοι 14 και 15 του κεφαλαίου Γ.10-Α.

ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

9. Εφαρμόζεται η παράγραφος 16 του κεφαλαίου Γ.10-Α.

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

10. Εφαρμόζονται οι παράγραφοι 17 και 18 του κεφαλαίου Γ.10-Α.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Εξοπλισμός

11. Κατάλληλη μονάδα είναι το τροποποιημένο σύστημα πορώδους δοχείου (προσάρτημα 6.1). Αποτελείται από ένα εσωτερικό δοχείο (ή επένδυση) που είναι κατασκευασμένο από πορώδες πολυπροπυλένιο πάχους 3,2 mm, με πόρους μεγέθους περίπου 90 μm, του οποίου η συναρμογή έχει συγκολληθεί μετωπικά. (Πρόκειται για πιο ανθεκτική μονάδα από αυτή που περιγράφεται στην παράγραφο 21 του παρόντος κεφαλαίου Γ.10-Α). Η επένδυση τοποθετείται σε ένα εξωτερικό αδιαπέραστο δοχείο από πολυαιθυλένιο, το οποίο αποτελείται από δύο μέρη: μια κυκλική βάση, με οπές για δύο γραμμές αέρα και μια γραμμή περίσσειας ιλύος, και έναν άνω κύλινδρο, ο οποίος βιδώνεται στη βάση και φέρει στόμιο τοποθετημένο κατά τρόπο ώστε το πορώδες δοχείο να έχει γνωστό όγκο (3 L). Μία από τις γραμμές αέρα είναι εφοδιασμένη με διαχυτήρα, ενώ η δεύτερη είναι ανοικτού τύπου και σχηματίζει ορθή γωνία με τον διαχυτήρα του δοχείου. Το σύστημα αυτό δημιουργεί τον αναγκαίο στροβιλισμό ώστε να εξασφαλίζεται η πλήρης ανάμειξη του περιεχομένου του δοχείου, παράλληλα με την επίτευξη συγκεντρώσεων διαλυμένου οξυγόνου άνω των 2 mg/l.

12. Ο κατάλληλος αριθμός μονάδων διατηρείται σε ελεγχόμενες θερμοκρασίες μεταξύ 5 και 20 °C (± 1 °C), είτε σε υδατόλουτρα είτε σε αίθουσες σταθερής θερμοκρασίας. Απαιτούνται αντλίες για την τροφοδοσία των δοχείων αερισμού με το διάλυμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και τα καθιζημένα λύματα με τις απαιτούμενες παροχές (0-1,0 ml/λεπτό και 0-25 ml/λεπτό, αντίστοιχα), καθώς και μια τρίτη αντλία για την αφαίρεση της περίσσειας ιλύος από τα δοχεία αερισμού. Η απαραίτητη πολύ χαμηλή παροχή περίσσειας ιλύος επιτυγχάνεται με τη χρήση αντλίας ρυθμισμένης σε υψηλότερη παροχή, η οποία λειτουργεί διακεκομμένα με τη βοήθεια χρονοδιακόπτη, π.χ. λειτουργία επί 10 δευτερόλεπτα ανά λεπτό, παροχή αντλίας 3 ml/λεπτό, παροχή περίσσειας ιλύος 0,5 ml/λεπτό.

Συσκευή διήθησης ή φυγόκεντρος

13. Εφαρμόζεται η παράγραφος 23 του κεφαλαίου Γ.10-Α

Αναλυτικός εξοπλισμός

14. Εφαρμόζεται η παράγραφος 24 του κεφαλαίου Γ.10-Α.

Νερό

▼**M4**

15. Εφαρμόζονται οι παράγραφοι 25 και 26 του κεφαλαίου Γ.10-Α.

Οργανικό μέσο

16. Εφαρμόζεται η παράγραφος 27 του κεφαλαίου Γ.10-Α.

Συνθετικά λύματα

17. Εφαρμόζεται η παράγραφος 28 του κεφαλαίου Γ.10-Α.

Οικιακά λύματα

18. Εφαρμόζεται η παράγραφος 29 του κεφαλαίου Γ.10-Α.

Ενεργός ιλύς

19. Εφαρμόζεται η παράγραφος 30 του κεφαλαίου Γ.10-Α.

Διαλύματα παρακαταθήκης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας

20. Εφαρμόζονται οι παράγραφοι 31 και 32 του κεφαλαίου Γ.10-Α.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Παρασκευή του εμβολίου

21. Εφαρμόζεται μόνο η παράγραφος 34 του κεφαλαίου Γ.10-Α — χρήση ενεργού ιλύος (περίπου 2,5 g/l).

Αριθμός μονάδων δοκιμής

22. Για μια απλή δοκιμή, δηλαδή για τη μέτρηση της ποσοστιαίας απομάκρυνσης, απαιτείται μόνο μία τιμή SRT, αλλά προκειμένου να αποκτηθούν απαραίτητα δεδομένα για τον υπολογισμό προσωρινών κινητικών σταθερών απαιτούνται 4 ή 5 τιμές SRT. Συνήθως, επιλέγονται τιμές μεταξύ 2 και 10 ημερών. Στην πράξη, εξυπηρετεί η διεξαγωγή μιας δοκιμής με 4 ή 5 χρόνους SRT ταυτοχρόνως σε μία θερμοκρασία. Σε εκτεταμένες μελέτες χρησιμοποιούνται οι ίδιες τιμές SRT, ή ενδεχομένως ένα διαφορετικό εύρος τιμών σε άλλες θερμοκρασίες που κυμαίνονται μεταξύ 5 και 20 °C. Για την πρωτοβάθμια βιοαποικοδόμηση (η κύρια χρήση) απαιτείται κατά κανόνα μόνο μία μονάδα ανά σύνολο συνθηκών. Ωστόσο, για την τελική βιοαποικοδομησιμότητα απαιτείται μια μονάδα-μάρτυρας για κάθε σύνολο συνθηκών, η οποία δέχεται λύματα, αλλά όχι την ελεγχόμενη χημική ουσία. Εάν θεωρείται ότι η ελεγχόμενη χημική ουσία είναι παρούσα στα χρησιμοποιούμενα λύματα, θα είναι αναγκαίο να χρησιμοποιηθούν μονάδες-μάρτυρες κατά την εκτίμηση της πρωτοβάομιας βιοαποικοδόμησης και την απαραίτητη διόρθωση στους υπολογισμούς.

Τροφοδοσία του οργανικού μέσου και της ελεγχόμενης χημικής ουσίας

23. Εφαρμόζονται οι παράγραφοι 36 έως 39 του κεφαλαίου Γ.10-Α, αλλά πρέπει να σημειωθεί ότι το διάλυμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας προστίθεται χωριστά και χρησιμοποιούνται διάφορες παροχές περίσσειας ιλύος. Παρακολουθούνται επίσης συχνά και, εφόσον είναι αναγκαίο, ρυθμίζονται σε ± 10 %, οι παροχές εισροής, εκροής και περίσσειας ιλύος, π.χ. δύο φορές ημερησίως. Εάν, κατά τη χρήση οικιακών λυμάτων, ανακύψουν δυσκολίες στις αναλυτικές μεθόδους, η δοκιμή διεξάγεται με συνθετικά λύματα, αλλά πρέπει να εξακριβώνεται ότι προκύπτουν συγκρίσιμα δεδομένα κινητικής από τα διαφορετικά μέσα.

Χειρισμός των μονάδων ενεργού ιλύος

24. Εφαρμόζονται οι παράγραφοι 40 έως 43 του κεφαλαίου Γ.10-Α, αλλά ο χρόνος παραμονής ιλύος ελέγχεται μόνο με «σταθερή» περίσσεια ιλύος.

Δειγματοληψία και ανάλυση

25. Εφαρμόζονται οι παράγραφοι 44 έως 50 του κεφαλαίου Γ.10-Α, με τη διαφορά ότι πρέπει να προσδιορίζεται η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και, προαιρετικά, του DOC, ενώ δεν πρέπει να χρησιμοποιείται το COD.

▼M4

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

26. Εφαρμόζονται οι παράγραφοι 52 και 54 του κεφαλαίου Γ.10-Α.

Έκφραση των αποτελεσμάτων της δοκιμής

27. Εφαρμόζονται οι παράγραφοι 56 έως 62 του κεφαλαίου Γ.10-Α.

Υπολογισμός των κινητικών σταθερών

28. Η παράθεση της μέσης συγκέντρωσης σε σταθερή κατάσταση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην εκροή και η εξήγηση της μεταβολής της ανάλογα με τις συνθήκες λειτουργίας της εγκατάστασης είναι ρεαλιστικότερη από την παράθεση της ποσοστιαίας πρωτοβάθμιας βιοαποικοδόμησης. Αυτό μπορεί να γίνει με βάση την εξίσωση [6] του προσαρτήματος 6.2, η οποία μπορεί να αποδώσει τιμές K_S, μ_m και θ_{SC}, τον κρίσιμο χρόνο παραμονής της ιλύος.

(Εναλλακτικά, είναι δυνατόν να ληφθούν κατά προσέγγιση τιμές K_S και μm με τη χρήση ενός απλού υπολογιστικού προγράμματος για την προσαρμογή της θεωρητικής καμπύλης που υπολογίζεται από την εξίσωση 2 (προσάρτημα 6.2) στις πειραματικές τιμές. Παρά το γεγονός ότι κανένα δεδομένο διάλυμα δεν είναι μοναδικό, μπορεί να ληφθεί μια εύλογη προσέγγιση των K_S και μ_m.)

Μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων

29. Αποτελεί κοινή εμπειρία ότι λαμβάνονται μεταβλητές τιμές των κινητικών παραμέτρων για τις επιμέρους χημικές ουσίες. Πιστεύεται ότι οι συνθήκες υπό τις οποίες έχει αναπτυχθεί η ιλύς, καθώς και οι συνθήκες που επικρατούν κατά τη διεξαγόμενη δοκιμή (όπως στην παράγραφο 5 και σε άλλες δοκιμές), επηρεάζουν σημαντικά τις τιμές που προκύπτουν. Μια πτυχή αυτής της μεταβλητότητας έχει συζητηθεί από τους Grady et al. (4), οι οποίοι έχουν προτείνει τους όρους «υφιστάμενη» και «εγγενής» για τις δύο ακραίες συνθήκες που αντιπροσωπεύουν τα όρια της φυσιολογικής κατάστασης στα οποία μπορεί να φθάσει μια καλλιέργεια κατά τη διάρκεια ενός πειράματος κινητικής. Εάν δεν ελιναι δυνατή η μεταβολή της κατάστασης κατά τη διάρκεια της δοκιμής, οι τιμές των κινητικών παραμέτρων εκφράζουν τις συνθήκες του περιβάλλοντος από το οποίο ελήφθησαν οι μικροοργανισμοί. Οι τιμές αυτές ονομάζονται «υφιστάμενες» ή τρέχουσες. Στον αντίποδα, εάν οι συνθήκες κατά τη διάρκεια της δοκιμής επιτρέπουν την πλήρη ανάπτυξη του πρωτεϊνοσυνθετικού συστήματος που καθιστά δυνατό τον μέγιστο δυνατό ρυθμό ανάπτυξης, οι προκύπτουσες κινητικές παράμετροι καλούνται «εγγενείς» και εξαρτώνται μόνο από το είδος του υποστρώματος και τους τύπους των βακτηρίων της καλλιέργειας. Ενδεικτικά, υφιστάμενες τιμές θα λαμβάνονται με τη διατήρηση του λόγου της συγκέντρωσης του υποστρώματος προς τους σχετικούς μικροοργανισμούς (S_o/X_o) σε χαμηλά επίπεδα, π.χ. 0,025, ενώ εγγενείς τιμές προκύπτουν όταν ο λόγος αυτός είναι υψηλός, π.χ. τουλάχιστον 20. Και στις δύο περιπτώσεις, η τιμή S_o θα πρέπει να είναι ίση ή να υπερβαίνει τη σχετική τιμή Ks, της σταθεράς ημικορεσμού.

30. Η μεταβλητότητα και άλλες πτυχές της κινητικής της βιοαποικοδόμησης συζητήθηκαν σε πρόσφατη ημερίδα της SETAC (5). Από τις σχετικές μελέτες, δημοσιευμένες και υπό δημοσίευση, αναμένεται σύντομα να διαμορφωθεί σαφέστερη εικόνα της κινητικής στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, ώστε να καταστεί δυνατή η καλύτερη ερμηνεία των υπαρχόντων δεδομένων και να προταθούν καταλληλότερα σχέδια για μελλοντικές μεθόδους δοκιμών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) Birch R.R. (1982), The biodegradability of alcohol ethoxylates, *XIII Jornado Com. Espanol Deterg.*: 33-48.

(2) Birch R.R. (1984), Biodegradation of nonionic surfactants, *J.A.O.C.S.* 61(2): 340-343.

(3) Birch R.R. (1991), Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 50: 411-422.

▼**M4**

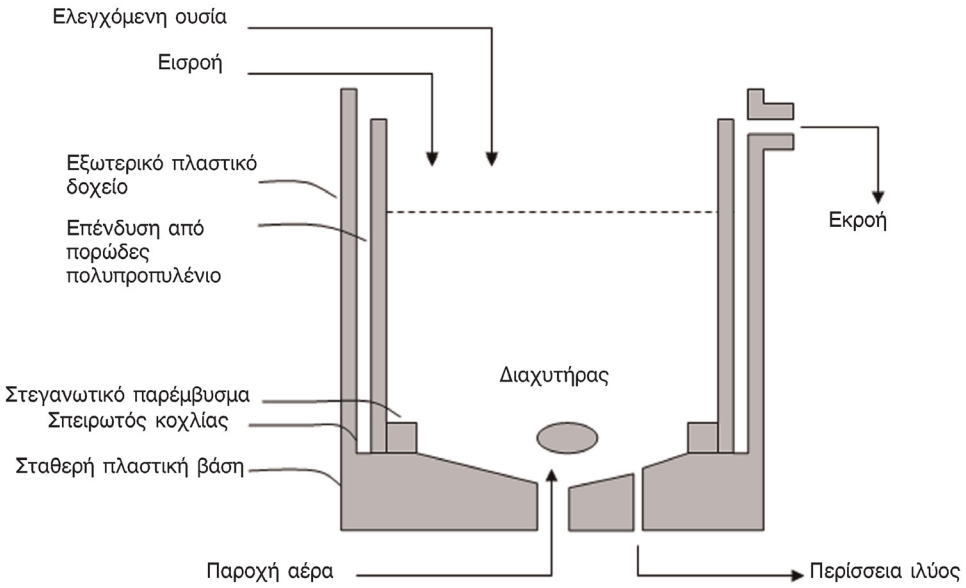
(4) Grady C.P.L., Smets B.F. και Barbeau D.S. (1996), Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology, *Wat. Res.* 30 (3): 742-748.

(5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997), Workshop at Port Sunlight, UK, Eds. Hales S.G., Feitjel T., King H., Fox K., Verstraete W., 4-6th Sept. 1996, SETAC- Europe, Brussels.

▼**M4**

Προσάρτημα 6.1

Πορώδες δοχείο με έλεγχο του χρόνου παραμονής της ιλύος (SRT)



▼M4

Προσάρτημα 6.2

Υπολογισμός των κινητικών σταθερών

1. Με την παραδοχή ότι εφαρμόζεται η κινητική Monod και λαμβάνοντας υπόψη το ισοζύγιο μάζας των ενεργών στερεών και του υποστρώματος σε όλο το σύστημα ενεργού ιλύος (1), μπορούν να ληφθούν οι ακόλουθες εκφράσεις σταθερής κατάστασης:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \qquad [1]$$

ή

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \qquad [2]$$

όπου

S_1 = συγκέντρωση του υποστρώματος στην εκροή, (mg/l)

K_S = σταθερά ημικορεσμού, συγκέντρωση στην οποία $\mu = \mu_m/2$ (mg/l)

μ = ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (ημέρα $^{-1}$)

μ_m = μέγιστη τιμή του μ_m (ημέρα $^{-1}$)

K_d = ειδική ταχύτητα διάσπασης των ενεργών στερεών (ημέρα $^{-1}$)

θ_S = μέσος χρόνος παραμονής της ιλύος, SRT (ημέρα)

Η εξέταση της εξίσωσης αυτής οδηγεί στα ακόλουθα συμπεράσματα:

i) Η συγκέντρωση στην εκροή είναι ανεξάρτητη από την αντίστοιχη στην εισροή (S_0). Ως εκ τούτου, η ποσοστιαία βιοαποικοδόμηση μεταβάλλεται ανάλογα με τη συγκέντρωση στην εισροή, S_0.

ii) Η μόνη παράμετρος ελέγχου της εγκατάστασης που επηρεάζει τη S_1 είναι ο χρόνος παραμονής της ιλύος, θ_S.

iii) Για δεδομένη συγκέντρωση στην εισροή, S_0, θα υπάρχει ένας κρίσιμος χρόνος παραμονής της ιλύος, έτσι ώστε:

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \qquad [3]$$

όπου

θ_{SC} = κρίσιμος χρόνος παραμονής της ιλύος, κάτω από τον οποίο οι σχετικοί μικροοργανισμοί θα απορρίπτονται από την εγκατάσταση.

iv) Δεδομένου ότι οι άλλες παράμετροι της εξίσωσης (2) συνδέονται με την κινητική ανάπτυξης, η θερμοκρασία είναι πιθανόν να επηρεάσει το επίπεδο υποστρώματος στην εκροή, ενώ η κρίσιμη ηλικία της ιλύος, δηλαδή ο χρόνος παραμονής της που απαιτείται για να ληφθεί ένας ορισμένος βαθμός επεξεργασίας, θα αυξάνεται με τη μείωση της θερμοκρασίας.

2. Από το ισοζύγιο μάζας των στερεών στο σύστημα πορώδους δοχείου και με την παραδοχή ότι η συγκέντρωση στερεών στην εκροή της εγκατάστασης, X_2 είναι χαμηλή σε σύγκριση με εκείνη στο δοχείο αερισμού, X_1, ο χρόνος παραμονής της ιλύος

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \qquad [4]$$

▼**M4**

και

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

όπου

V = όγκος του δοχείου αερισμού (l)

X_1 = συγκέντρωση στερεών στο δοχείο αερισμού (mg/l)

X_2 = συγκέντρωση στερεών στην εκροή (mg/l)

Q_0 = παροχή της εισροής (l/ημέρα)

Q_1 = παροχή της περίσσειας ιλύος (l/ημέρα)

Συνεπώς, είναι δυνατόν να ρυθμιστεί ο χρόνος παραμονής της ιλύος σε οποιαδήποτε προεπιλεγμένη τιμή μέσω του ελέγχου της παροχής της περίσσειας ιλύος, Q_1.

Συμπεράσματα:

3. Κύριος σκοπός της δοκιμής είναι συνεπώς να καταστήσει δυνατή την πρόβλεψη της συγκέντρωσης στις εκροές και, κατ' επέκταση, των επιπέδων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στα ύδατα υποδοχής.

4. Με γραφική παράσταση της S_1 συναρτήσει του θ_S, μπορεί μερικές φορές να αξιολογηθεί εύκολα ο κρίσιμος χρόνος παραμονής της ιλύος, θ_{SC}, π.χ. καμπύλη 3 στο σχήμα 1. Όταν αυτό δεν είναι εφικτό, ο θ_{SC}, καθώς και προσεγγιστικές τιμές των μ_m και K_S, μπορούν να υπολογιστούν με γραφική παράσταση της S_1, συναρτήσει του $S_1 \bullet \theta_S$.

Η αναδιάταξη της εξίσωσης (1) δίνει

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [5]$$

Εάν το K_d είναι μικρό, τότε $1 + \theta_s \bullet K_d \sim 1$ και η εξίσωση [5] γίνεται:

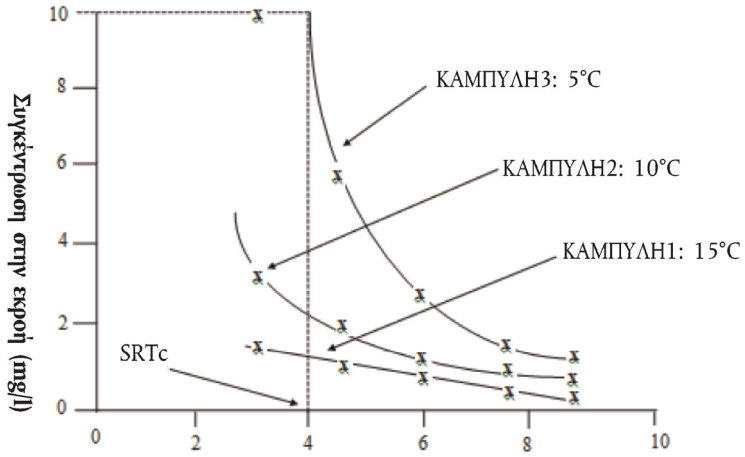
$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [6]$$

Επομένως, η γραφική παράσταση πρέπει να είναι ευθεία γραμμή (βλέπε σχήμα 2) με κλίση $1/\mu_m$ και με σημείο τομής K_S/μ_m, επίσης $\theta_S \sim 1/\mu_m$.

▼**M4**

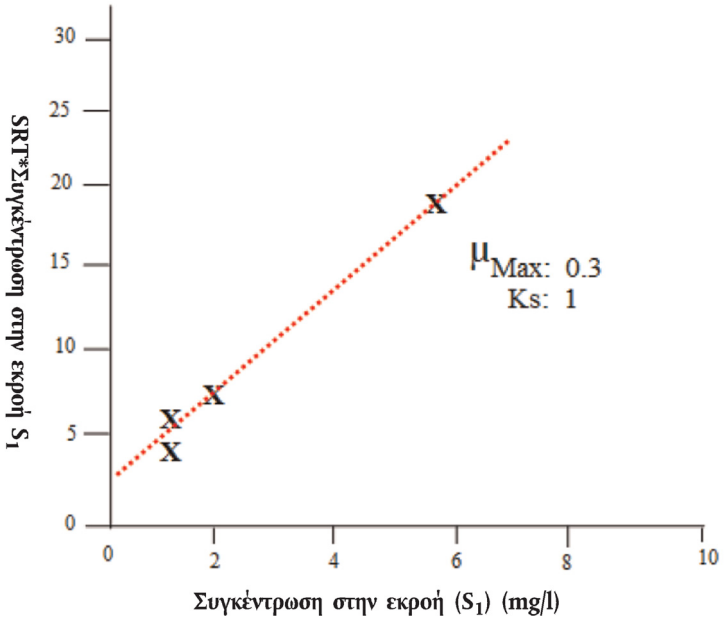
Σχήμα 1

Τρεις θερμοκρασίες, πέντε χρόνοι SRT



Σχήμα 2

Γραμμή παλινδρόμησης SRT· S_1 συναρτήσει του S_1 σε T = 5 °C



Γλωσσάριο:

Συγκέντρωση στην εκροή

Καμπύλη

▼M4

Προσάρτημα 7

ΔΟΚΙΜΗ ΣΕ ΧΑΜΗΛΟ ΕΥΡΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ (μg/l)

1. Υπό κανονικές συνθήκες, πολλές χημικές ουσίες υπάρχουν στο υδάτινο περιβάλλον, ακόμη και στα λύματα, σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (μg/l). Σε τέτοιες συγκεντρώσεις, σπανίως χρησιμεύουν ως πρωτογενή υποστρώματα για ανάπτυξη, αλλά είναι πιθανότερο να αποικοδομούνται ως δευτερογενή υποστρώματα χωρίς ανάπτυξη, ταυτόχρονα με ποικίλες φυσικές χημικές ενώσεις άνθρακα. Κατά συνέπεια, οι αποικοδομήσεις αυτών των χημικών ουσιών δεν ταιριάζουν με το μοντέλο που περιγράφεται στο προσάρτημα 6. Υπάρχουν πολλά μοντέλα που θα μπορούσαν να εφαρμοστούν και, υπό τις συνθήκες που επικρατούν στα συστήματα επεξεργασίας λυμάτων, ενδέχεται να είναι λειτουργικά περισσότερα από ένα ταυτόχρονα. Για τη λύση του προβλήματος αυτού θα χρειαστεί πολύ περισσότερη έρευνα.

2. Εν τω μεταξύ, είναι δυνατόν να ακολουθηθεί η διαδικασία που περιγράφεται στο κυρίως κείμενο (κεφάλαιο Γ.10-Α), αλλά μόνο για την πρωτοβάθμια βιοαποικοδομησιμότητα, με τη χρήση καταλλήλως χαμηλών συγκεντρώσεων (< 100 μg/l) και επικυρωμένης αναλυτικής διαδικασίας. Η ποσοστιαία βιοαποικοδόμηση μπορεί να υπολογιστεί (βλέπε παράγραφο 54 της μεθόδου δοκιμών), υπό την προϋπόθεση ότι λαμβάνονται υπόψη οι αβιοτικές διεργασίες (προσρόφηση, πτητικότητα κ.λπ.). Ένα παράδειγμα αποτελεί η μελέτη του Nyholm και των συνεργατών του (1)(2), στην οποία χρησιμοποιήθηκε ένας κύκλος 4 ωρών σε σύστημα πλήρωσης και εκκένωσης. Οι συγγραφείς ανέφεραν σταθερές ψευδο-πρώτης τάξης για 5 χημικές ουσίες που προστέθηκαν σε συνθετικά λύματα σε συγκεντρώσεις 5 έως 100 μg/l. (Για την τελική βιοαποικοδομησιμότητα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ελεγχόμενες χημικές ουσίες σημασμένες με ^{14}C. Η σχετική περιγραφή δεν εμπίπτει στο πεδίο εφαρμογής της παρούσας μεθόδου δοκιμών, δεδομένου ότι δεν έχουν ακόμη συμφωνηθεί οι διαδικασίες, αν και η προτεινόμενη μέθοδος για το πρότυπο ISO 14592 (3) περιλαμβάνει καθοδήγηση σχετικά με τη χρήση σημασμένων με ^{14}C χημικών ουσιών.

Δοκιμή SCAS

3. Αργότερα προτάθηκε μια απλούστερη δοκιμή δύο σταδίων (4)(5)(6): η μέθοδος ημισυνεχούς ενεργού ιλύος (Semi-Continuous Activated Sludge — SCAS) ακολουθείται από βραχυχρόνιες δοκιμές κινητικής σε δείγματα που λαμβάνονται από τις μονάδες SCAS. Το σύστημα SCAS λειτουργεί με γνωστές παροχές περίσσειας ιλύος (σε αντίθεση με την αρχική μέθοδο δοκιμών Γ.12) και τροφοδοτείται με τροποποιημένα συνθετικά λύματα του ΟΟΣΑ ή οικιακά λύματα. Τα συνθετικά λύματα τροποποιήθηκαν (λόγω μεταβαλλόμενης τιμής pH και ανεπαρκούς καθιζησιμότητας της ιλύος) με την προσθήκη φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος, εκχυλίσματος ζυμομυκήτων, χλωριούχου σιδήρου (III) και αλάτων ιχνοστοιχείων και το COD τους αυξήθηκε σε περίπου 750 mg/l, με αύξηση της συγκέντρωσης πεπτόνης και εκχυλίσματος κρέατος. Οι μονάδες λειτουργούσαν σε 24ωρο: αερισμός για 23 ώρες, απόρριψη περίσσειας ιλύος, καθίζηση, αφαίρεση του υπερκειμένου υγρού (εκροή) και, στη συνέχεια, προσθήκη συνθετικών λυμάτων με την ελεγχόμενη χημική ουσία σε συγκέντρωση έως 100 μg/l (δηλαδή στην ίδια περίπου συγκέντρωση με εκείνη που χρησιμοποιήθηκε στη βραχυχρόνια δοκιμή). Μία φορά εβδομαδιαίως το 10 % της συνολικής ιλύος αντικαθίστατο με πρόσφατη ιλύ προκειμένου να διατηρείται ισορροπημένος μικροβιακός πληθυσμός.

4. Μετρώνται οι συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας αρχικά και στο τέλος του αερισμού και η δοκιμή συνεχίζεται μέχρις ότου επιτευχθεί σταθερή απομάκρυνσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Αυτό μπορεί να διαρκέσει από μία εβδομάδα έως αρκετούς μήνες.

Βραχυχρόνια δοκιμή

5. Εφαρμόζεται μια σύντομη δοκιμή (π.χ. 8 ωρών) για τον προσδιορισμό της σταθεράς ταχύτητας κινητικής (ψευδο) πρώτης τάξης που εκφράζει τη διάσπαση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε ενεργό ιλύ γνωστών αλλά διαφορετικών προελεύσεων και ιστορικών. Συγκεκριμένα, λαμβάνονται δείγματα ιλύος από τους αντιδραστήρες SCAS —στο τέλος μιας περιόδου αερισμού, όταν η συγκέντρωση του οργανικού υποστρώματος είναι χαμηλή— κατά τη διάρκεια πειράματος εγκλιματισμού (παράγραφοι 3, 4). Για λόγους σύγκρισης, μπορεί επίσης να ληφθεί ιλύς από μια παράλληλη μονάδα SCAS

▼M4

η οποία δεν εκτίθεται στην ελεγχόμενη χημική ουσία. Τα μείγματα της ιλύος με την ελεγχόμενη χημική ουσία, που προστίθεται σε δύο ή περισσότερες συγκεντρώσεις του εύρους 1-50 μg/l, αερίζονται χωρίς προσθήκη συνθετικών λυμάτων ή άλλου οργανικού υποστρώματος. Η ελεγχόμενη χημική ουσία που παραμένει στο διάλυμα προσδιορίζεται σε τακτά διαστήματα, π.χ. ωριαία, ανάλογα με την αποικοδομησιμότητα της χημικής ουσίας, για μέγιστο χρονικό διάστημα 24 ωρών. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται πριν από την κατάλληλη ανάλυση.

Υπολογισμοί

6. Τα δεδομένα από τις μονάδες SCAS χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της ποσοστιαίας απομάκρυνσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας (παράγραφος 54). Είναι επίσης δυνατόν να υπολογιστεί μια σταθερά μέσης ταχύτητας, K_1 (κανονικοποιημένη ως προς τη συγκέντρωση αιωρούμενων στερεών) από τον τύπο:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g\ h)$$

όπου

t = χρόνος αερισμού (23 ώρες)

C_e = συγκέντρωση στο τέλος της περιόδου αερισμού (μg/l)

C_i = συγκέντρωση στην αρχή του αερισμού (μg/l)

SS = συγκέντρωση στερεών ενεργού ιλύος (g/l)

7. Στη βραχυχρόνια δοκιμή σχεδιάζεται γραφική παράσταση του λογάριθμου της εκατοστιαίας συγκέντρωσης που απομένει συναρτήσει του χρόνου· η κλίση του αρχικού μέρους του γραφήματος (αποικοδόμηση 10-50 %) είναι ισοδύναμη με την K_1, τη σταθερά (ψευδο)πρώτης τάξης. Η σταθερά κανονικοποιείται ως προς τη συγκέντρωση στερεών της ιλύος με διαίρεση της κλίσης διά της συγκέντρωσης των στερεών ιλύος. Το αναφερόμενο αποτέλεσμα πρέπει επίσης να περιλαμβάνει λεπτομερή στοιχεία για τις αρχικές συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και των αιωρούμενων στερεών, τον χρόνο παραμονής ιλύος, τη φόρτιση και την πηγή της ιλύος, καθώς και για την (τυχόν) προέκθεση στην ελεγχόμενη χημική ουσία.

Μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων

8. Η μεταβλητότητα και άλλες πτυχές της κινητικής της βιοαποικοδόμησης συζητήθηκαν σε πρόσφατη ημερίδα της SETAC (7). Από τέτοιες μελέτες, δημοσιευμένες και υπό δημοσίευση, αναμένεται σύντομα η διαμόρφωση σαφέστερης εικόνας για την κινητική στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, ώστε να καταστεί δυνατή η καλύτερη ερμηνεία των υπαρχόντων δεδομένων και να προταθούν καταλληλότερα σχέδια για μελλοντικές μεθόδους δοκιμών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) Nyholm N., Jacobsen B.N., Pedersen B.M., Poulsen O., Dambourg A. και Schultz B. (1992), Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. Biodegradability, *Wat. Res.* 26: 339-353.

(2) Jacobsen B.N., Nyholm N., Pedersen B.M., Poulsen O. και Ostfeldt P. (1993), Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption, *Wat. Res.* 27: 1505-1510.

(3) ISO 14592 (ISO/TC 147/SC5/WG4, N264) (1998), Water Quality - Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water.

▼**M4**

(4) Nyholm N., Ingerslev F., Berg U.T., Pedersen J.P. και Frimer-Larsen H. (1996), Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and μg/l range spiked concentrations, *Chemosphere* 33 (5): 851-864.

(5) Berg U.T. και Nyholm N. (1996), Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (μg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations, *Chemosphere* 33 (4): 711-735.

(6) Danish Environmental Protection Agency (1996), Activated sludge biodegradability simulation test, Environmental Project, No. 337, Nyholm N., Berg U.T., Ingerslev F., Min. of Env. and Energy, Copenhagen.

(7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997), Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales S.G., Feitjel T., King H., Fox K. και Verstraete W., 4-6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼M4

Γ.10-Β: Βιομεμβράνες

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Οι δοκιμές προσομοίωσης εφαρμόζονται κατά κανόνα σε χημικές ουσίες που έχουν αποτύχει σε δοκιμή διαλογής για άμεση βιοαποικοδομησιμότητα [κεφάλαιο Γ.4, μέθοδοι Α έως Ζ του παρόντος παραρτήματος (9)], αλλά έχουν επιτύχει σε δοκιμή εγγενούς βιοαποικοδομησιμότητας. Κατ' εξαίρεση, οι δοκιμές προσομοίωσης εφαρμόζονται επίσης σε οποιαδήποτε χημική ουσία για την οποία απαιτούνται περισσότερες πληροφορίες, ιδίως σε χημικές ουσίες που παράγονται σε μεγάλες ποσότητες, και κατά κανόνα εφαρμόζεται η δοκιμή ενεργού ιλύος (Γ.10-Α). Σε ορισμένες περιπτώσεις, ωστόσο, απαιτούνται ειδικές πληροφορίες σχετικά με τη συμπεριφορά μιας χημικής ουσίας σε μεθόδους επεξεργασίας λυμάτων που περιλαμβάνουν βιομεμβράνες, δηλαδή φίλτρα διήθησης ή χαλικοδιυλιστήρια, περιστρεφόμενους βιολογικούς δίσκους, ρευστοποιημένες κλίνες. Για την κάλυψη αυτής της ανάγκης έχουν αναπτυχθεί διάφορες συσκευές.

2. Οι Gerike et al. (1) χρησιμοποίησαν μεγάλα, πιλοτικής κλίμακας χαλικοδιυλιστήρια σε σύζευξη. Τα φίλτρα αυτά καταλάμβαναν πολύ χώρο και απαιτούσαν σχετικά μεγάλες ποσότητες λυμάτων ή συνθετικών λυμάτων. Οι Truesdale et al. (2) περιέγραψαν μικρότερα φίλτρα (6 πόδια × 6 ίντσες) τα οποία τροφοδοτούνταν με φυσικά λύματα χωρίς επιφανειοδραστικές ουσίες, αλλά εξακολουθούσαν να απαιτούν σχετικά μεγάλους όγκους. Χρειάζονταν 14 εβδομάδες για την ανάπτυξη μιας «ώριμης» βιομεμβράνης και επιπλέον 4-8 εβδομάδες μετά την πρώτη εισαγωγή της επιφανειοδραστικής ελεγχόμενης ουσίας, για τον εγκλιματισμό.

3. Οι Baumann et al. (3) ανέπτυξαν ένα πολύ μικρότερο φίλτρο, στο οποίο χρησιμοποιούνταν πολυεστερικό «πίλημα» που είχε προηγουμένως εμποτιστεί με ενεργό ιλύ, ως αδρανές μέσο υποστήριξης της βιομεμβράνης. Η ελεγχόμενη χημική ουσία χρησιμοποιούνταν ως η μοναδική πηγή άνθρακα και η εκτίμηση της βιοαποικοδομησιμότητας βασιζόταν σε μετρήσεις του διαλυμένου οργανικού άνθρακα (DOC) στις εισροές και τις εκροές, καθώς και στην ποσότητα CO_2 στο αέριο εξόδου.

4. Μια αρκετά διαφορετική προσέγγιση υιοθέτησαν οι Gloyna et al. (4), οι οποίοι εφηύραν τον περιστρεφόμενο σωληνοειδή αντιδραστήρα. Στην εσωτερική επιφάνεια του περιστρεφόμενου σωλήνα αναπτύχθηκε βιομεμβράνη πάνω σε επιφάνεια γνωστού εμβαδού, με τη διαβίβαση εισροής από το άνω άκρο του σωλήνα, ο οποίος διατηρούνταν υπό μικρή κλίση ως προς το οριζόντιο επίπεδο. Ο αντιδραστήρας έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της βιοαποικοδομησιμότητας των επιφανειοδραστικών ουσιών (5), καθώς και για τη διερεύνηση του βέλτιστου πάχους της βιομεμβράνης και της διάχυσης μέσω της μεμβράνης (6). Οι τελευταίοι αυτοί συγγραφείς ανέπτυξαν περαιτέρω τον αντιδραστήρα, μεταξύ άλλων με τροποποίησή του ώστε να παρέχει τη δυνατότητα προσδιορισμού του CO_2 στο αέριο εξόδου.

5. Ο περιστρεφόμενος σωληνοειδής αντιδραστήρας έχει εγκριθεί από τη Μόνιμη Επιτροπή Αναλυτών (Ηνωμένο Βασίλειο) ως πρότυπη μέθοδος για την εκτίμηση τόσο της βιοαποικοδομησιμότητας των χημικών ουσιών (7) όσο και της επεξεργασιμότητας και της τοξικότητας των λυμάτων (8). Η μέθοδος που περιγράφεται στο παρόν κεφάλαιο προσφέρει τα πλεονεκτήματα της απλότητας, του μικρού μεγέθους, της αναπαραγωγιμότητας και των σχετικά μικρών αναγκαίων όγκων οργανικού μέσου.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

6. Συνθετικά ή οικιακά λύματα και η ελεγχόμενη χημική ουσία, σε πρόσμιξη ή μεμονωμένα, εφαρμόζονται στην εσωτερική επιφάνεια ενός αργά περιστρεφόμενου κεκλιμένου σωλήνα. Πάνω στην εσωτερική επιφάνεια αναπτύσσεται ένα στρώμα μικροοργανισμών, παρόμοιο με εκείνο που απαντά σε βιόφιλτρα. Οι συνθήκες λειτουργίας του αντιδραστήρα επιλέγονται κατά τρόπο ώστε να επιτυγχάνεται επαρκής απομάκρυνση της οργανικής ύλης και, εάν απαιτείται, οξείδωση του αμμωνίου.

▼M4

7. Συλλέγεται η εκροή του σωλήνα και αφήνεται να καθιζήσει και/ή διηθείται πριν από την ανάλυση για διαλυμένο οργανικό άνθρακα (DOC) και/ή την ελεγχόμενη χημική ουσία με ειδική μέθοδο. Για λόγους σύγκρισης, λειτουργούν παράλληλα υπό τις ίδιες συνθήκες μονάδες-μάρτυρες που δεν δέχονται ελεγχόμενη χημική ουσία. Η διαφορά μεταξύ των συγκεντρώσεων DOC στις εκροές των μονάδων δοκιμής και μάρτυρα υποτίθεται ότι οφείλεται στην ελεγχόμενη χημική ουσία και στους οργανικούς μεταβολίτες της. Η διαφορά αυτή συγκρίνεται με τη συγκέντρωση της προστεθείσας ελεγχόμενης χημικής ουσίας (ως DOC) για τον υπολογισμό της απομάκρυνσης της ουσίας.

8. Κατά κανόνα, η βιοαποικοδόμηση μπορεί να διακριθεί από τη βιοπροσρόφηση με προσεκτική εξέταση της καμπύλης απομάκρυνσης-χρόνου. Η επιβεβαίωση επιτυγχάνεται συνήθως με τη διεξαγωγή δοκιμής άμεσης βιοαποικοδόμηση (πρόσληψη οξυγόνου ή παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα), με εγκλιματισμένο εμβόλιο που λαμβάνεται στο τέλος της δοκιμής από τους αντιδραστήρες οι οποίοι δέχονται την ελεγχόμενη χημική ουσία.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

9. Για να είναι δυνατή η ορθή ερμηνεία των αποτελεσμάτων, πρέπει να είναι γνωστά τα χαρακτηριστικά καθαρότητας, υδατοδιαλυτότητας, πτητικότητας και προσρόφησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

10. Κατά κανόνα, οι πτητικές και οι δυσδιάλυτες χημικές ουσίες μπορούν να ελεγχθούν μόνο εφόσον λαμβάνονται ειδικές προφυλάξεις (βλέπε προσάρτημα 5 του κεφαλαίου Γ.10-Α). Θα πρέπει επίσης να είναι γνωστή η χημική δομή, ή τουλάχιστον ο εμπειρικός τύπος, ώστε να υπολογίζονται οι θεωρητικές τιμές και/ή να ελέγχονται οι μετρούμενες τιμές των παραμέτρων, π.χ. θεωρητικά απαιτούμενο οξυγόνο (ThOD), διαλυμένος οργανικός άνθρακας (DOC).

11. Οι πληροφορίες σχετικά με την τοξικότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας για μικροοργανισμούς (βλέπε προσάρτημα 4 του κεφαλαίου Γ.10-Α) μπορεί να είναι χρήσιμες για την επιλογή κατάλληλων συγκεντρώσεων για τη δοκιμή και ουσιαστικής σημασίας για την ορθή ερμηνεία των χαμηλών τιμών βιοαποικοδόμησης.

ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΠΙΤΥΧΙΑΣ

12. Αρχικά, η πρωτοβάθμια βιοαποικοδόμηση των επιφανειοδραστικών ουσιών έπρεπε να φθάνει ή και να υπερβαίνει το 80 %, προκειμένου να επιτραπεί η διάθεσή τους στο εμπόριο. Εάν δεν επιτυγχάνεται η τιμή του 80 %, μπορεί να εφαρμοστεί η παρούσα (επιβεβαιωτική) δοκιμή προσομοίωσης και η επιφανειοδραστική ουσία μπορεί να διατεθεί στο εμπόριο μόνον εάν απομακρύνεται περισσότερο από το 90 % της συγκεκριμένης χημικής ουσίας. Με τις χημικές ουσίες, γενικά, δεν τίθεται ζήτημα επιπέδων επιτυχίας/αποτυχίας και η τιμή ποσοστιαίας απομάκρυνσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε προσεγγιστικούς υπολογισμούς της πιθανής συγκέντρωσης στο περιβάλλον, η οποία πρέπει να χρησιμοποιείται στις εκτιμήσεις των κινδύνων από χημικές ουσίες. Σε μια σειρά μελετών με καθαρές χημικές ουσίες, η ποσοστιαία απομάκρυνση DOC διαπιστώθηκε ότι είναι > 90 % για περισσότερο από τα τρία τέταρτα και > 80 % για πάνω από το 90 % των χημικών ουσιών που παρουσίασαν σημαντικό βαθμό βιοαποικοδομησιμότητας.

ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

13. Για να διασφαλίζεται η ορθή διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας, είναι χρήσιμη η κατά καιρούς δοκιμασία χημικών ουσιών αναφοράς, των οποίων η συμπεριφορά είναι γνωστή. Στις χημικές ουσίες αναφοράς συγκαταλέγονται το αδιπικό οξύ, η 2-φαινυλο φαινόλη, η 1-ναφθόλη, το διφαινικό οξύ και το 1-ναφθοϊκό οξύ.

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

14. Σε εργαστήριο του Ηνωμένου Βασιλείου διαπιστώθηκε ότι η σχετική τυπική απόκλιση εντός των δοκιμών ανέρχεται σε 3,5 % και μεταξύ των δοκιμών σε 5 % (7).

▼M4

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Εξοπλισμός

Περιστρεφόμενοι σωληνοειδείς αντιδραστήρες

15. Η συσκευή (βλέπε προσάρτημα 8, σχήματα 1 και 2) αποτελείται από μια τράπεζα με ακρυλικούς σωλήνες μήκους 30,5 cm και εσωτερικής διαμέτρου 5 cm ο καθένας, που στηρίζονται σε τροχούς με ελαστικά επίσωτρα, τοποθετημένους μέσα σε μεταλλικό πλαίσιο υποστήριξης. Κάθε σωλήνας διαθέτει εξωτερικό χείλος, βάθους περίπου 0,5 cm, ώστε να συγκρατείται πάνω στους τροχούς, ενώ η εσωτερική του επιφάνεια τραχύνεται με χοντρό ατσαλόσυρμα και στο άνω άκρο (τροφοδοσίας) υπάρχει ένα εσωτερικό χείλος βάθους 0,5 cm προκειμένου να συγκρατείται το υγρό. Οι σωλήνες έχουν κλίση περίπου μιας μοίρας ως προς το οριζόντιο επίπεδο για να επιτυγχάνεται ο απαιτούμενος χρόνος επαφής όταν το μέσο δοκιμής εισάγεται σε καθαρό σωλήνα. Οι τροχοί με τα ελαστικά επίσωτρα περιστρέφονται από κινητήρα μικρής, μεταβλητής ταχύτητας. Η θερμοκρασία των σωλήνων ελέγχεται μέσω της εγκατάστασής τους σε αίθουσα σταθερής θερμοκρασίας.

16. Με την τοποθέτηση κάθε σωληνοειδούς αντιδραστήρα μέσα σε έναν ελαφρώς μεγαλύτερο, πωματισμένο σωλήνα και τη διασφάλιση της αεροστεγανότητας των συνδέσεων, καθίσταται δυνατή η συλλογή του αερίου εξόδου CO_2 σε αλκαλικό διάλυμα για επακόλουθη μέτρηση (6).

17. Σε ένα αποθηκευτικό δοχείο χωρητικότητας 20 L, περιέχεται, για κάθε σωλήνα, προμήθεια 24ώρου του οργανικού μέσου, στο οποίο έχει προστεθεί η ελεγχόμενη χημική ουσία, κατά περίπτωση (A) (βλέπε σχήμα 2). Εάν απαιτείται, το διάλυμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας μπορεί να εισάγεται χωριστά. Κοντά στον πυθμένα κάθε δοχείου αποθήκευσης υπάρχει ένα στόμιο το οποίο συνδέεται με κατάλληλη σωλήνωση, π.χ. από ελαστικό σιλικόνης, μέσω περισταλτικής αντλίας (B), με έναν γυάλινο ή ακρυλικό σωλήνα διανομής που εισχωρεί κατά 2 έως 4 cm στο ανώτερο άκρο (τροφοδοσίας) του κεκλιμένου σωλήνα (C). Η εκροή αφήνεται να σταλάξει από το κατώτερο άκρο του κεκλιμένου σωλήνα, για να συλλεχθεί σε άλλο δοχείο αποθήκευσης (D). Η εκροή υποβάλλεται σε καθίζηση ή διήθηση πριν από την ανάλυση.

Συσκευή διήθησης ή φυγόκεντρος

18. Συσκευή για τη διήθηση δειγμάτων με διηθητικές μεμβράνες κατάλληλου πορώδους (ονομαστική διάμετρος οπών 0,45μm), οι οποίες προσροφούν οργανικές χημικές ουσίες ή ελευθερώνουν οργανικό άνθρακα σε ελάχιστο βαθμό. Εάν χρησιμοποιούνται ηθμοί που ελευθερώνουν οργανικό άνθρακα, εκπλύνονται επιμελώς με θερμό νερό για την απομάκρυνση του στραγγίσιμου οργανικού άνθρακα. Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί φυγόκεντρος ικανή να λειτουργεί σε 40 000 m/s^2.

19. Αναλυτικός εξοπλισμός για να προσδιοριστούν τα εξής:

— DOC/ολικός οργανικός άνθρακας (TOC) ή χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD),

— συγκεκριμένες χημικές ουσίες (HPLC, αεριοχρωματογραφία κ.λπ.), εάν απαιτείται,

— pH, θερμοκρασία, οξύτητα και αλκαλικότητα,

— αμμώνιο και νιτρώδη και νιτρικά ιόντα, εάν η δοκιμή εκτελείται υπό συνθήκες νιτροποίησης.

Νερό

20. Νερό βρύσης, που περιέχει λιγότερο από 3 mg/l DOC.

21. Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό που περιέχει λιγότερο από 2 mg/l DOC.

▼M4

Οργανικό μέσο

22. Ως οργανικό μέσο μπορούν να χρησιμοποιούνται συνθετικά λύματα, οικιακά λύματα ή μείγμα των δύο. Έχει αποδειχθεί ότι η χρήση μόνο οικιακών λυμάτων εξασφαλίζει συχνά αυξημένη ποσοστιαία απομάκρυνση DOC (σε μονάδες ενεργού ιλύος) και επιτρέπει ακόμη και τη βιοαποικοδόμηση ορισμένων χημικών ουσιών που δεν βιοαποικοδομούνται όταν χρησιμοποιούνται συνθετικά λύματα του ΟΟΣΑ. Συνιστάται, επομένως, η χρήση οικιακών λυμάτων. Μετράται η συγκέντρωση DOC ή COD σε κάθε νέα παρτίδα οργανικού μέσου. Η οξύτητα ή αλκαλικότητα του οργανικού μέσου θα πρέπει να είναι γνωστή. Εάν το μέσο είναι χαμηλής οξύτητας ή αλκαλικότητας, ενδέχεται να απαιτηθεί η προσθήκη κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος (όξινου ανθρακικού νατρίου ή όξινου φωσφορικού καλίου) για τη διατήρηση του pH στην τιμή 7,5 ± 0,5 στο δοχείο αερισμού κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Η ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος που θα προστεθεί και ο χρόνος προσθήκης του πρέπει να αποφασίζονται κατά περίπτωση.

Συνθετικά λύματα

23. Διαλύονται σε 1 λίτρο νερού βρύσης: πεπτόνη, 160 mg· εκχύλισμα κρέατος, 110 mg· ουρία, 30 mg· άνυδρο όξινο φωσφορικό κάλιο (K_2HPO_4), 28 mg· χλωριούχο νάτριο (NaCl), 7 mg· διένυδρο χλωριούχο ασβέστιο ($CaCl_2.2H_2O$), 4 mg· επταένυδρο θειικό μαγνήσιο ($MgSO_4.7H_2O$), 2 mg. Τα συγκεκριμένα συνθετικά λύματα του ΟΟΣΑ αποτελούν παράδειγμα και παρέχουν μέση συγκέντρωση DOC στην εισροή της τάξης των 100 mg/l. Εναλλακτικά, χρησιμοποιούνται άλλες συνθέσεις, με περίπου τις ίδιες συγκεντρώσεις DOC, οι οποίες προσεγγίζουν περισσότερο τα πραγματικά λύματα. Αυτά τα συνθετικά λύματα μπορούν να παρασκευάζονται με αποσταγμένο νερό σε συμπυκνωμένη μορφή και να φυλάσσονται σε θερμοκρασία περίπου 1 °C για μέγιστο διάστημα μία εβδομάδας. Όταν χρειάζεται, αραιώνονται με νερό βρύσης. (Το μέσο αυτό δεν είναι ικανοποιητικό, π.χ. η συγκέντρωση αζώτου είναι πολύ υψηλή, η περιεκτικότητα σε άνθρακα σχετικά χαμηλή, αλλά δεν έχει προταθεί καλύτερη εναλλακτική λύση, εκτός από την προσθήκη περισσότερου φωσφορικού άλατος ως ρυθμιστικού διαλύματος και επιπλέον πεπτόνης).

Οικιακά λύματα

24. Χρησιμοποιούνται πρόσφατα καθιζημένα λύματα που συλλέγονται καθημερινά από εγκαταστάσεις επεξεργασίας οι οποίες δέχονται κατά κύριο λόγο οικιακά λύματα. Θα πρέπει να συλλέγονται από την τάφρο υπερχείλισης της δεξαμενής πρωτοβάθμιας καθίζησης ή από την τροφοδοσία της εγκατάστασης ενεργού ιλύος και να είναι σε μεγάλο βαθμό απαλλαγμένα από χονδρόκοκκα σωματίδια. Τα λύματα μπορούν να χρησιμοποιούνται μετά την αποθήκευση για αρκετές ημέρες στους 4 °C περίπου, εάν έχει αποδειχθεί ότι ο DOC (ή το COD) δεν μειώνεται σημαντικά (δηλαδή κατά λιγότερο από 20 %) κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Προκειμένου να περιορίζονται οι διαταραχές στο σύστημα, ο DOC (ή το COD) κάθε νέας παρτίδας θα πρέπει να ρυθμίζεται, πριν από τη χρήση, σε κατάλληλη σταθερή τιμή, π.χ. μέσω αραίωσης με νερό βρύσης.

Λιπαντικό

25. Για τη λίπανση των κυλίνδρων της περισταλτικής αντλίας μπορεί να χρησιμοποιείται γλυκερόλη ή ελαιόλαδο: και τα δύο είναι κατάλληλα για χρήση σε σωληνώσεις από ελαστικό σιλικόνης.

Διαλύματα παρακαταθήκης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας

26. Για χημικές ενώσεις επαρκούς διαλυτότητας, παρασκευάζονται διαλύματα παρακαταθήκης με κατάλληλες συγκεντρώσεις (π.χ. 1 έως 5 g/l) σε απιονισμένο νερό ή στο ανόργανο τμήμα των συνθετικών λυμάτων. Για αδιάλυτες χημικές ουσίες, βλέπε προσάρτημα 5 του κεφαλαίου Γ.10-Α. Η μέθοδος αυτή δεν είναι κατάλληλη για τις πτητικές χημικές ουσίες, χωρίς τροποποιήσεις στους σωληνοειδείς αντιδραστήρες (παράγραφος 16). Προσδιορίζονται ο DOC και ο TOC του διαλύματος παρακαταθήκης και επαναλαμβάνονται οι μετρήσεις για κάθε νέα παρτίδα. Εάν η διαφορά μεταξύ του DOC και του TOC είναι μεγαλύτερη από 20 %, ελέγχεται η υδατοδιαλυτότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Συγκρίνεται ο DOC ή η συγκέντρωση της ελεγχόμενης

▼M4

χημικής ουσίας, που έχει μετρηθεί με ειδική ανάλυση του διαλύματος παρακαταθήκης, με την ονομαστική τιμή, προκειμένου να εξακριβωθεί κατά πόσον η ανάκτηση είναι αρκετά ικανοποιητική (κανονικά αναμένεται > 90 %). Εξακριβώνεται, ειδικά για τις διασπορές, κατά πόσον ο DOC μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αναλυτική παράμετρος ή αν μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο μια ειδική για την ελεγχόμενη χημική ουσία αναλυτική τεχνική. Για τις διασπορές απαιτείται φυγοκέντρηση των δειγμάτων. Για κάθε νέα παρτίδα, μετράται ο DOC, το COD ή η ελεγχόμενη χημική ουσία με ειδική ανάλυση.

27. Προσδιορίζεται το pH του διαλύματος παρακαταθήκης. Τυχόν ακραίες τιμές υποδηλώνουν ότι η προσθήκη της χημικής ουσίας μπορεί να επιδρά στο pH της ενεργού ιλύος στο σύστημα δοκιμής. Στην περίπτωση αυτή, εξουδετερώνεται το διάλυμα παρακαταθήκης, ώστε να επιτευχθεί pH 7 ± 0,5, με μικρές ποσότητες ανόργανου οξέος ή ανόργανης βάσης, αλλά πρέπει να αποφεύγεται η καθίζηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Παρασκευή του οργανικού μέσου για τροφοδοσία

28. Εξακριβώνεται ότι όλα τα δοχεία των εισροών και των εκροών και οι σωληνώσεις από δοχεία εισροών προς δοχεία εκροών έχουν καθαριστεί επιμελώς προκειμένου να αφαιρεθεί η μικροβιακή χλωρίδα, τόσο στην αρχή όσο και σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής.

29. Παρασκευάζονται καθημερινά νέα συνθετικά λύματα (παράγραφος 23), είτε από τα στερεά είτε από το πυκνό διάλυμα παρακαταθήκης, με κατάλληλη αραίωση με νερό βρύσης. Μετράται η απαιτούμενη ποσότητα σε κύλινδρο και προστίθεται σε καθαρό δοχείο εισροής. Επίσης, όπου είναι απαραίτητο, προστίθεται στα συνθετικά λύματα, πριν από την αραίωση, η απαιτούμενη ποσότητα διαλύματος παρακαταθήκης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας ή της χημικής ουσίας αναφοράς. Εφόσον εξυπηρετεί περισσότερο ή είναι απαραίτητο για να αποφευχθεί η απώλεια ελεγχόμενης χημικής ουσίας, παρασκευάζεται χωριστό αραιωμένο διάλυμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε χωριστό δοχείο και διανέμεται στους κεκλιμένους σωλήνες με διαφορετική δοσομετρική αντλία.

30. Εναλλακτικά (και κατά προτίμηση), χρησιμοποιούνται καθιζημένα οικιακά λύματα (παράγραφος 24) τα οποία είναι πρόσφατα και συλλέγονται καθημερινά, εάν είναι δυνατόν.

Λειτουργία των περιστρεφόμενων σωληνοειδών αντιδραστήρων

31. Για την αξιολόγηση μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας, απαιτούνται δύο πανομοιότυποι σωληνοειδείς αντιδραστήρες οι οποίοι συναρμολογούνται σε αίθουσα σταθερής θερμοκρασίας, κατά κανόνα 22 ± 2 °C.

32. Ρυθμίζονται οι περισταλτικές αντλίες κατά τρόπο ώστε να διανέμουν 250 ± 25 ml/ώρα του οργανικού μέσου (χωρίς ελεγχόμενη χημική ουσία) στους κεκλιμένους σωλήνες, οι οποίοι περιστρέφονται μεν ταχύτητα 18 ± 2 rpm (σ.α.λ.). Στην αρχή της δοκιμής και περιοδικά κατά τη διάρκειά της, απλώνεται το λιπαντικό (παράγραφος 25) στους σωλήνες της αντλίας για να εξασφαλιστεί η εύρυθμη λειτουργία και να παραταθεί η διάρκεια ζωής των σωληνώσεων.

33. Ρυθμίζεται η γωνία κλίσης των σωλήνων ως προς το οριζόντιο επίπεδο για να επιτευχθεί χρόνος παραμονής του υλικού τροφοδοσίας σε καθαρό σωλήνα 125 ± 12,5 δευτερόλεπτα. Υπολογίζεται ο χρόνος παραμονής με την προσθήκη μη βιολογικού δείκτη (π.χ. NaCl, αδρανής χρωστική) στο υλικό τροφοδοσίας: ο χρόνος που απαιτείται για την επίτευξη μέγιστης συγκέντρωσης στην εκροή θεωρείται ως ο μέσος χρόνος παραμονής (όταν υπάρχει η μέγιστη μεμβράνη, ο χρόνος παραμονής μπορεί να αυξηθεί μέχρι τα 30 λεπτά περίπου).

34. Έχει διαπιστωθεί ότι ανωτέρω παροχές, ταχύτητες και χρόνοι παρέχουν επαρκείς απομακρύνσεις (> 80 %) του DOC (ή COD) και νιτροποιημένες εκροές. Η ταχύτητα ροής θα πρέπει να αλλάζει, εάν η απομάκρυνση είναι ανεπαρκής ή εάν πρόκειται να προσομοιωθούν οι επιδόσεις συγκεκριμένης εγκατάστασης επεξεργασίας. Στη δεύτερη περίπτωση, ρυθμίζεται η δοσομέτρηση του οργανικού μέσου έως ότου οι επιδόσεις του αντιδραστήρα αντιστοιχούν σε εκείνες της εγκατάστασης επεξεργασίας.

▼M4

Εμβολιασμός

35. Ο αερόφερτος εμβολιασμός μπορεί να είναι επαρκής για να αρχίσει η ανάπτυξη των μικροοργανισμών, όταν χρησιμοποιούνται συνθετικά λύματα. Σε αντίθετη περίπτωση, προστίθεται 1 ml/l καθιζημένων λυμάτων στην τροφοδοσία για 3 ημέρες.

Μετρήσεις

36. Ανά τακτά διαστήματα εξακριβώνεται ότι η δοσομέτρηση και οι ταχύτητες περιστροφής περικλείονται εντός των απαιτούμενων ορίων. Επίσης, μετράται το pH της εκροής, ιδίως εάν αναμένεται νιτροποίηση.

Δειγματοληψία και ανάλυση

37. Η μέθοδος, ο τύπος και η συχνότητα της δειγματοληψίας επιλέγονται έτσι ώστε να εξυπηρετούν τον σκοπό της δοκιμής. Για παράδειγμα, λαμβάνονται στιγμιαία δείγματα εισροής και εκροής ή συλλέγονται δείγματα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, π.χ. 3-6 ώρες. Κατά την πρώτη περίοδο, χωρίς την παρουσία ελεγχόμενης χημικής ουσίας, λαμβάνονται δείγματα δύο φορές την εβδομάδα. Τα δείγματα διηθούνται μέσω μεμβρανών ή φυγοκεντρούνται σε περίπου 40 000 m/sec^2 για περίπου 15 λεπτά (παράγραφος 18). Ενδέχεται να είναι απαραίτητη η καθίζηση και/ή η διήθηση με χοντρό ηθμό των δειγμάτων, πριν από τη διήθηση με μεμβράνη. Προσδιορίζεται ο DOC (ή το COD) τουλάχιστον εις διπλούν και, εφόσον απαιτείται, το BOD, το αμμώνιο και τα νιτρώδη/νιτρικά ιόντα.

38. Όλες οι αναλύσεις θα πρέπει να εκτελούνται το συντομότερο δυνατόν μετά τη συλλογή και την προετοιμασία των δειγμάτων. Εάν πρέπει να αναβληθούν οι αναλύσεις, τα δείγματα φυλάσσονται στους 4 °C περίπου, στο σκοτάδι, μέσα σε πλήρεις, ερμητικά σφραγισμένες φιάλες. Εάν χρειάζεται να φυλαχθούν τα δείγματα για περισσότερο από 48 ώρες, διατηρούνται με κατάψυξη, οξίνιση ή με την προσθήκη κατάλληλης τοξικής χημικής ουσίας [π.χ. 20 ml/l διαλύματος χλωριούχου υδραργύρου (II) 10 g/l]. Εξακριβώνεται ότι η τεχνική διατήρησης δεν επηρεάζει τα αποτελέσματα της ανάλυσης.

Περίοδος κανονικής λειτουργίας

39. Κατά την περίοδο αυτή, αναπτύσσεται η επιφανειακή βιομεμβράνη για να αποκτήσει βέλτιστο πάχος, διαδικασία για την οποία συνήθως χρειάζονται περίπου 2 εβδομάδες, ενώ δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τις 6 εβδομάδες. Η απομάκρυνση (παράγραφος 44) του DOC (ή COD) αυξάνεται και φθάνει σε μια τιμή οριζοντίωσης (σταθερή κατάσταση). Όταν επιτευχθεί οριζοντίωση σε παρόμοια τιμή και στους δύο σωλήνες, επιλέγεται ο ένας ως μάρτυρας για το υπόλοιπο διάστημα της δοκιμής, κατά το οποίο οι επιδόσεις τους θα πρέπει να συμφωνούν μεταξύ τους.

Εισαγωγή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας

40. Σε αυτό το στάδιο προστίθεται η ελεγχόμενη χημική ουσία στον άλλο αντιδραστήρα στην απαιτούμενη συγκέντρωση, συνήθως 10-20 mg C/l. Ο σωλήνας-μάρτυρας εξακολουθεί να δέχεται μόνο το οργανικό μέσο.

Περίοδος εγκλιματισμού

41. Συνεχίζονται οι αναλύσεις για DOC (ή COD) δύο φορές την εβδομάδα και, σε περίπτωση που πρέπει να εκτιμηθεί η πρωτοβάθμια βιοαποικοδομησιμότητα, μετράται επίσης η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας με ειδική ανάλυση. Αφήνεται περιθώριο μιας έως έξι εβδομάδων (ή και περισσότερο, υπό ειδικές συνθήκες) μετά την εισαγωγή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, για εγκλιματισμό. Όταν η ποσοστιαία απομάκρυνση (παράγραφοι 43-45) φθάσει στη μέγιστη τιμή, λαμβάνονται 12-15 έγκυρες τιμές στη φάση οριζοντίωσης επί 3 εβδομάδες περίπου για την αξιολόγηση της μέσης ποσοστιαίας απομάκρυνσης. Η δοκιμή θεωρείται ότι ολοκληρώνεται εάν έχει επιτευχθεί επαρκώς υψηλός βαθμός απομάκρυνσης. Κατά κανόνα, η διάρκεια της δοκιμής δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 12 εβδομάδες από την πρώτη προσθήκη της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

▼M4

Απόσπαση της μεμβράνης

42. Η αιφνίδια απόσπαση μεγάλων ποσοτήτων περίσσειας μεμβράνης από τους σωλήνες (sloughing) εμφανίζεται σε σχετικά τακτά χρονικά διαστήματα. Για να εξασφαλίζεται ότι η συγκρισιμότητα των αποτελεσμάτων παραμένει ανεπηρέαστη, οι δοκιμές πρέπει να καλύπτουν τουλάχιστον δύο πλήρεις κύκλους ανάπτυξης και απόσπασης.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

43. Υπολογίζεται το ποσοστό απομάκρυνσης DOC (ή COD) της ελεγχόμενης χημικής ουσίας για κάθε χρόνο εκτίμησης, με τη βοήθεια της εξίσωσης:

$$D_t = 100\ [C_s - (E - E_o)]/C_s\ \%$$

όπου

D_t = ποσοστό απομάκρυνσης DOC (ή COD) σε χρόνο t,

Cs = συγκέντρωση DOC ή COD στην εισροή λόγω της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, υπολογιζόμενη, κατά προτίμηση, από τη συγκέντρωση στο διάλυμα παρακαταθήκης και τον προστιθέμενο όγκο του (mg/l),

E = μετρούμενη τιμή DOC ή COD στην εκροή της μονάδας δοκιμής σε χρόνο t (mg/l),

Eo = μετρούμενη τιμή DOC ή COD στην εκροή της μονάδας-μάρτυρα σε χρόνο t (mg/l).

Επαναλαμβάνεται ο υπολογισμός για τη χημική ουσία αναφοράς, εάν έχει χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή.

Επιδόσεις του αντιδραστήρα-μάρτυρα

44. Ο βαθμός απομάκρυνσης του DOC (ή COD) του οργανικού μέσου (D_B) στους αντιδραστήρες-μάρτυρες αποτελεί χρήσιμο στοιχείο για την εκτίμηση της βιοαποικοδομητικής δραστικότητας της βιομεμβράνης κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Υπολογίζεται η ποσοστιαία απομάκρυνση από την εξίσωση:

$$D_B = 100\ (1 - E_o/C_m)\%$$

όπου

Cm = DOC (ή COD) του οργανικού μέσου στην εισροή της μονάδας-μάρτυρα (mg/l).

45. Υπολογίζεται η απομάκρυνση (D_{ST}) της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, εάν μετράται με ειδική μέθοδο ανάλυσης, για κάθε χρόνο εκτίμησης, από την εξίσωση:

$$DST = 100\ (1 - Se/Si)\%$$

όπου

Si = μετρούμενη ή, κατά προτίμηση, εκτιμώμενη συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην εισροή της μονάδας δοκιμής (mg/l)

Se = μετρούμενη συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην εκροή της μονάδας δοκιμής σε χρόνο t (mg/l)

▼M4

Εάν η αναλυτική μέθοδος παρέχει θετική τιμή για μη τροποποιημένα λύματα ισοδύναμη με S_c mg/l, υπολογίζεται η ποσοστιαία απομάκρυνση (D_{SC}) από τον τύπο:

$$DSC = 100\ (Si - Se + Sc)/(Si + Sc)\%$$

Έκφραση των αποτελεσμάτων της δοκιμής

46. Σχεδιάζεται γραφική παράσταση του ποσοστού απομάκρυνσης D_t και D_{ST} (ή D_{SC}), εάν διατίθεται, συναρτήσει του χρόνου (βλέπε προσάρτημα 2 του κεφαλαίου Γ.10-Α). Ως ποσοστιαία απομάκρυνση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας θεωρείται ο αριθμητικός μέσος (στρογγυλοποιημένος στον πλησιέστερο ακέραιο αριθμό) με την τυπική απόκλιση των 12-15 τιμών που έχουν ληφθεί για την D_T (και την D_{ST}, αν διατίθεται) στη φάση οριζοντίωσης. Από το σχήμα της καμπύλης απομάκρυνσης είναι δυνατόν να συναχθούν ορισμένα συμπεράσματα σχετικά με τις διεργασίες απομάκρυνσης.

Προσρόφηση

47. Εάν παρατηρείται υψηλός βαθμός απομάκρυνσης DOC της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην αρχή της δοκιμής, η ελεγχόμενη χημική ουσία απομακρύνεται ενδεχομένως μέσω προσρόφησης στη βιομεμβράνη. Η απόδειξη αυτού είναι δυνατή με τον προσδιορισμό της προσροφημένης ελεγχόμενης χημικής ουσίας στα στερεά που αποσπώνται από τη μεμβράνη. Δεν είθισται να παραμένει υψηλός ο βαθμός απομάκρυνσης DOC των προσροφήσιμων χημικών ουσιών καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Κατά κανόνα, ο βαθμός απομάκρυνσης είναι αρχικά υψηλός και στη συνέχεια μειώνεται σταδιακά, για να φθάσει σε μια τιμή ισορροπίας. Εάν, ωστόσο, η προσροφημένη ελεγχόμενη χημική ουσία ήταν ικανή να προκαλέσει εγκλιματισμό του μικροβιακού πληθυσμού, η απομάκρυνση DOC της ελεγχόμενης χημικής ουσίας θα αυξανόταν στη συνέχεια, φθάνοντας σε υψηλή τιμή οριζοντίωσης.

Λανθάνουσα φάση

48. Όπως και στις στατικές δοκιμές διαλογής, για πολλές ελεγχόμενες χημικές ουσίες απαιτείται μια λανθάνουσα φάση πριν από την πλήρη βιοαποικοδόμηση. Κατά τη λανθάνουσα φάση, λαμβάνει συντελείται ο εγκλιματισμός (ή η προσαρμογή) των βακτηριδίων αποικοδόμησης, με σχεδόν μηδενική απομάκρυνση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Στη συνέχεια, σημειώνεται η αρχική ανάπτυξη των βακτηριδίων αυτών. Η συγκεκριμένη φάση ολοκληρώνεται και η φάση της αποικοδόμησης θεωρείται αυθαίρετα ότι αρχίζει, όταν έχει απομακρυνθεί περίπου το 10 % της αρχικής ποσότητας της ελεγχόμενης χημικής ουσίας (λαμβανομένης υπόψη της προσρόφησης, εάν υπάρξει). Η λανθάνουσα φάση παρουσιάζει συχνά μεγάλη μεταβλητότητα και μικρή αναπαραγωγιμότητα.

Φάση οριζοντίωσης

49. Η φάση οριζοντίωσης της καμπύλης απομάκρυνσης σε μια συνεχόμενη δοκιμή ορίζεται ως η φάση κατά την οποία σημειώνεται η μέγιστη αποικοδόμηση. Η φάση αυτή θα πρέπει να διαρκεί τουλάχιστον 3 εβδομάδες και να εμφανίζει 12-15 έγκυρες μετρηθείσες τιμές.

Μέσος βαθμός απομάκρυνσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας

50. Υπολογίζεται η μέση τιμή από τις τιμές απομάκρυνσης (D_t) (και D_{st}, εάν είναι διαθέσιμη) της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στη φάση οριζοντίωσης. Η τιμή αυτή, αφού στρογγυλοποιηθεί στον πλησιέστερο ακέραιο αριθμό (1 %), είναι ο βαθμός απομάκρυνσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Συνιστάται, επίσης, ο υπολογισμός του διαστήματος εμπιστοσύνης 95 % της μέσης τιμής. Με παρόμοιο τρόπο υπολογίζεται ο μέσος βαθμός απομάκρυνσης (D_B) του οργανικού μέσου στο δοχείο-μάρτυρα.

▼M4

Ένδειξη βιοαποικοδόμησης

51. Εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία δεν προσροφάται σημαντικά στη βιομεμβράνη και η καμπύλη απομάκρυνσης έχει το τυπικό σχήμα μιας καμπύλης βιοαποικοδόμησης, με λανθάνουσα φάση, φάση αποικοδόμησης και φάση οριζοντίωσης (παράγραφοι 48, 49), η μετρούμενη απομάκρυνση μπορεί με ασφάλεια να αποδοθεί στη βιοαποικοδόμηση. Εάν έχει σημειωθεί υψηλός αρχικός βαθμός απομάκρυνσης, η δοκιμή προσομοίωσης δεν μπορεί να κάνει διάκριση μεταξύ βιολογικών και αβιοτικών διεργασιών απομάκρυνσης. Σε τέτοιες περιπτώσεις, καθώς και σε άλλες όπου υπάρχει αμφιβολία σχετικά με τη βιοαποικοδόμηση (π.χ. εάν συντελείται αφαίρεση), εκτελείται ανάλυση της προσροφημένης ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε δείγματα της μεμβράνης ή διεξάγονται πρόσθετες στατικές δοκιμές (διαλογής) για βιοαποικοδομησιμότητα, με βάση παραμέτρους που αποτελούν σαφείς ενδείξεις βιολογικών διεργασιών. Τέτοιες δοκιμές είναι οι μέθοδοι πρόσληψης οξυγόνου (κεφάλαιο Γ.4 του παρόντος παραρτήματος, μέθοδοι Δ, Ε και Ζ) (9) ή μια δοκιμή μέτρησης της παραγωγής CO_2 (κεφάλαιο Γ.4, μέθοδος Γ του παρόντος παραρτήματος, ή η μέθοδος υπερκείμενης φάσης) (10). Ως εμβόλιο χρησιμοποιείται προεκτεθειμένη βιομεμβράνη από τον κατάλληλο αντιδραστήρα.

52. Εάν έχουν μετρηθεί τόσο η απομάκρυνση DOC, όσο και η απομάκρυνση συγκεκριμένων χημικών ουσιών, σημαντικές διαφορές μεταξύ των ποσοστών που απομακρύνονται (το πρώτο να είναι χαμηλότερο από τη δεύτερο) υποδηλώνουν την παρουσία ενδιάμεσων οργανικών προϊόντων στις εκροές, τα οποία μπορεί να είναι πιο δύσκολο να αποικοδομηθούν. Τα προϊόντα αυτά θα πρέπει να διερευνώνται.

Εγκυρότητα των αποτελεσμάτων της δοκιμής

53. Η δοκιμή θεωρείται έγκυρη, εάν ο βαθμός απομάκρυνσης DOC (ή COD) (D_B) στις μονάδες-μάρτυρες είναι > 80 % μετά από λειτουργία 2 εβδομάδων και δεν έχουν καταγραφεί ασυνήθιστες παρατηρήσεις.

54. Εάν υποβλήθηκε σε δοκιμή μια ευκόλως βιοαποικοδομήσιμη χημική ουσία (αναφοράς), ο βαθμός βιοαποικοδόμησης θα πρέπει να είναι > 90 % και η διαφορά μεταξύ των εις διπλούν τιμών δεν πρέπει να υπερβαίνει το 5 %. Εάν δεν πληρούνται τα δύο αυτά κριτήρια, επανεξετάζονται οι πειραματικές διαδικασίες και/ή χρησιμοποιούνται οικιακά λύματα από άλλη πηγή.

55. Ομοίως, οι διαφορές μεταξύ των τιμών βιοαποικοδόμησης από διπλές μονάδες (εάν χρησιμοποιούνται) που επεξεργάζονται μια ελεγχόμενη χημική ουσία δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν το 5 %. Εάν το κριτήριο αυτό δεν πληρούται, αλλά οι βαθμοί απομάκρυνσης είναι υψηλοί, συνεχίζεται η ανάλυση για τρεις ακόμη εβδομάδες. Εάν η απομάκρυνση είναι χαμηλή, διερευνώνται οι ανασταλτικές επιδράσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, εφόσον δεν είναι γνωστές, και επαναλαμβάνεται η δοκιμή με χαμηλότερη συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, εάν αυτό είναι εφικτό.

Έκθεση δοκιμής

56. Η έκθεση της δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Ελεγχόμενη χημική ουσία:

— δεδομένα ταυτοποίησης,

— φυσική μορφή και, όπου απαιτείται, φυσικοχημικές ιδιότητες.

Συνθήκες δοκιμής:

— τυχόν τροποποιήσεις του συστήματος δοκιμής, ειδικά εάν έχουν υποβληθεί σε δοκιμή αδιάλυτες ή πτητικές ουσίες,

— τύπος οργανικού μέσου,

— αναλογία και είδος των βιομηχανικών αποβλήτων στα λύματα, εφόσον χρησιμοποιήθηκαν και τα στοιχεία αυτά είναι γνωστά,

— μέθοδος εμβολιασμού,

▼M4

— διάλυμα παρακαταθήκης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας — περιεκτικότητα σε DOC (διαλυμένος οργανικός άνθρακας) και TOC (ολικός οργανικός άνθρακας), τρόπος παρασκευής, εναιώρημα ή όχι, συγκεντρώσεις δοκιμής, λόγοι για τους οποίους ο DOC δεν κυμαινόταν μεταξύ 10 και 20 mg/l, μέθοδος προσθήκης, ημερομηνία πρώτης προσθήκης, τυχόν μεταβολές της συγκέντρωσης,

— μέσος υδραυλικός χρόνος παραμονής (χωρίς ανάπτυξη), ταχύτητα περιστροφής του σωλήνα, κατά προσέγγιση γωνία κλίσης, εάν είναι δυνατόν,

— λεπτομέρειες σχετικά με την απόσπαση μεμβράνης, χρόνος και ένταση,

— θερμοκρασία δοκιμής και εύρος,

— αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν.

Αποτελέσματα της δοκιμής:

— όλα τα μετρηθέντα δεδομένα DOC, COD, ειδικές αναλύσεις, pH, θερμοκρασία, αζωτούχες χημικές ουσίες, εάν έχουν σημασία,

— όλα τα μετρηθέντα δεδομένα D_t (ή D_{tc}), D_B, D_S σε μορφή πίνακα και οι καμπύλες απομάκρυνσης,

— πληροφορίες σχετικά με τη λανθάνουσα φάση και τη φάση οριζοντίωσης, τη διάρκεια δοκιμής, τον βαθμό απομάκρυνσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, της χημικής ουσίας αναφοράς (εάν χρησιμοποιήθηκε στη δοκιμή) και του οργανικού μέσου (στη μονάδα-μάρτυρα), συνοδευόμενες από στατιστικά στοιχεία και δηλώσεις για τη βιοαποικοδομησιμότητα και την εγκυρότητα της δοκιμής,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) Gerike P., Fischer W., Holtmann W. (1980), Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test, *Wat. Res.* 14: 753-758.

(2) Truesdale G.A., Jones K., Vandyke K.G. (1959), Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material, *Wat. Waste Tr. J.* 7: 441-444.

(3) Baumann U., Kuhn G. και Benz M. (1998), Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, *UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox.* 10: 214-220.

(4) Gloyna E.F., Comstock R.F., Renn C.E. (1952), Rotary tubes as experimental trickling filters, *Sewage ind. Waste* 24: 1355-1357.

(5) Kumke G.W., Renn C.E. (1966), LAS removal across an institutional trickling filter, *J.A.O.C.S.* 43: 92-94.

(6) Tomlinson T.G., Snaddon D.H.M. (1966), Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms, *Int.J. Air Wat. Pollut.* 10: 865-881.

(7) Her Majesty's Stationery Office (1982), Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, London.

(8) Her Majesty's Stationery Office (1984), Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, London.

(9) Κεφάλαιο Γ.4 του παρόντος παραρτήματος: Προσδιορισμός «άμεσης» βιοαποικοδομησιμότητας.

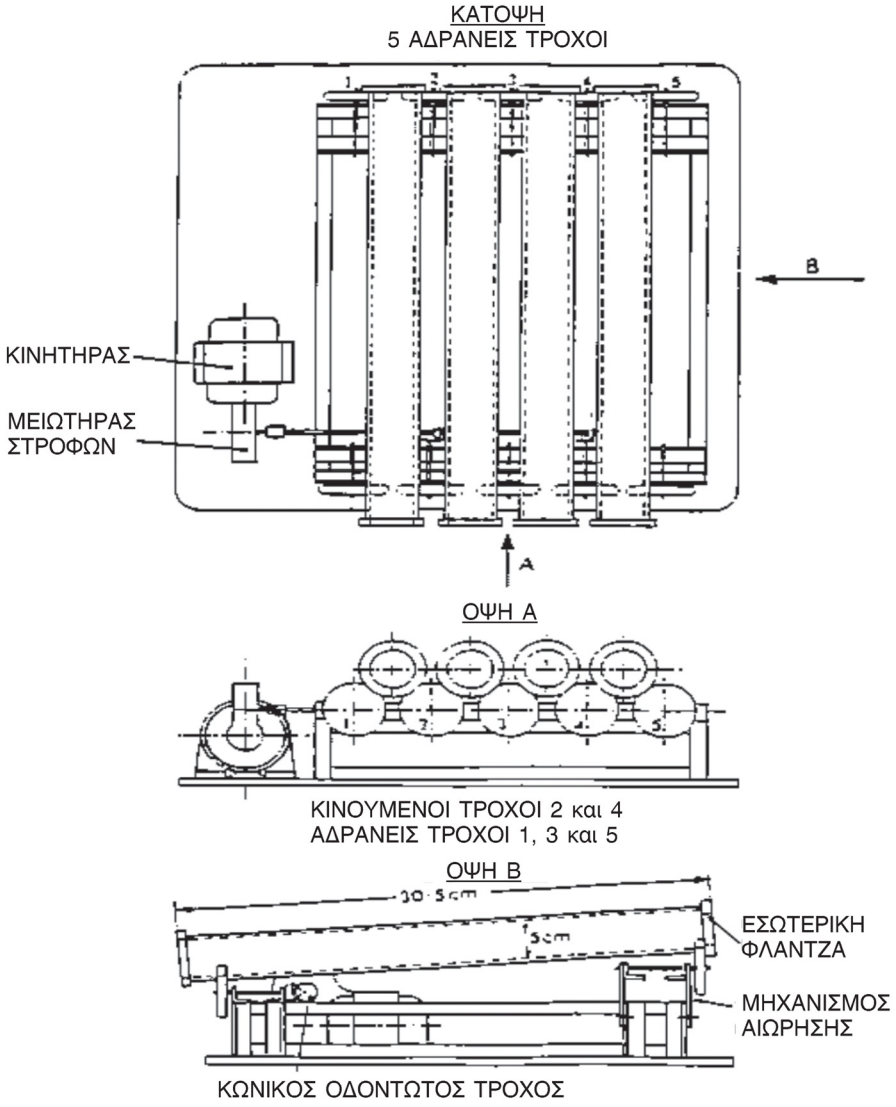
(10) ISO 14593 (1998), Water Quality-Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic substances, Method by analysis of released inorganic carbon in sealed vessels.

▼**M4**

Προσάρτημα 8

Σχήμα 1

Περιστρεφόμενοι σωλήνες



Γλωσσάριο:

Κάτοψη

Όψη A/B

Κινούμενοι τροχοί

Αδρανείς τροχοί

Κινητήρας

Μειωτήρας στροφών

Εσωτερική φλάντζα

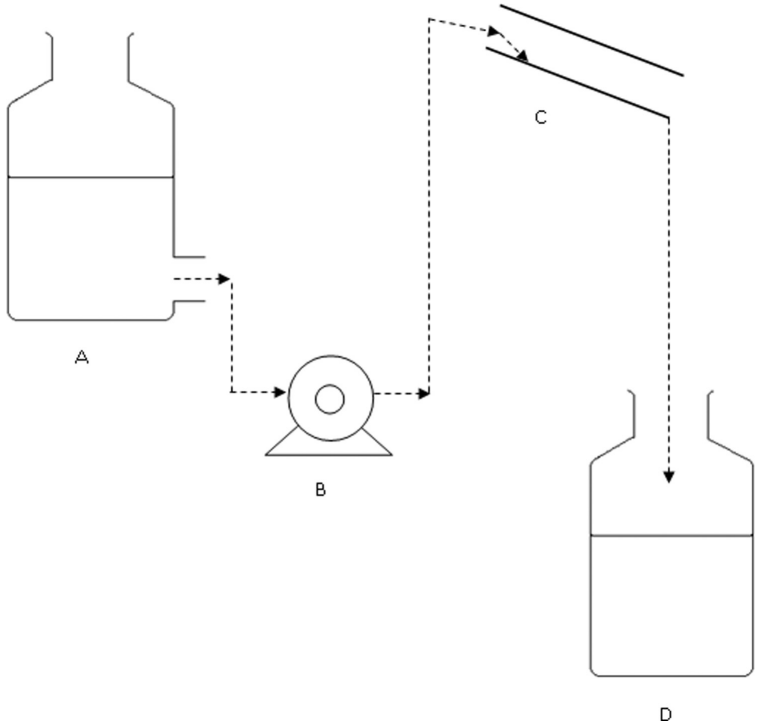
Μηχανισμός αιώρησης

Κωνικός οδοντωτός τροχός

▼**M4**

Σχήμα 2

Διάγραμμα ροής



A: Δεξαμενή τροφοδοσίας

B: Περισταλτική αντλία

C: Περιστρεφόμενος σωλήνας

D: Δοχείο συλλογής εκροών

ΟΡΙΣΜΟΙ:

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

Χημικές ουσίες: «Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο όρος “χημική ουσία” χρησιμοποιείται με την ευρεία έννοια στις συμφωνίες της UNCED και στα συνακόλουθα έγγραφα και καλύπτει τις ουσίες, τα προϊόντα, τα μείγματα, τα παρασκευάσματα και κάθε άλλον όρο που μπορεί να χρησιμοποιείται σε υπάρχοντα συστήματα.»

▼M6

Γ.11. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΙΛΥΣ, ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΟΗΣ (ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΚΑΙ ΑΜΜΩΝΙΟΥ)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 209 του ΟΟΣΑ (2010). Με τη μέθοδο που περιγράφεται προσδιορίζεται η επίδραση μιας χημικής ουσίας στους μικροοργανισμούς ενεργοποιημένης ιλύος (κυρίως, βακτήρια) με μέτρηση του ρυθμού αναπνοής τους (οξείδωση άνθρακα και/ή αμμωνίου) υπό καθορισμένες συνθήκες, με την παρουσία διάφορων συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Η μέθοδος δοκιμών βασίζεται στη δοκιμή της ETAD (Ecological and Toxicological Association of the Dyestuffs Manufacturing industry) (1)(2), στην προηγούμενη κατευθυντήρια γραμμή (TG) 209 του ΟΟΣΑ (3) και στο αναθεωρημένο πρότυπο ISO 8192 (4). Σκοπός της μεθόδου αυτής είναι να προσφέρει ταχεία μέθοδο εξέτασης με την οποία να είναι δυνατόν να εκτιμηθούν οι επιδράσεις των χημικών ουσιών στους μικροοργανισμούς της ενεργοποιημένης ιλύος κατά το βιολογικό (αερόβιο) στάδιο καθαρισμού στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων. Τα αποτελέσματα της δοκιμής μπορούν επίσης να λειτουργήσουν ως δείκτης των κατάλληλων μη ανασταλτικών συγκεντρώσεων των υπό δοκιμή χημικών ουσιών που πρέπει να χρησιμοποιηθούν σε δοκιμές βιοαποικοδομησιμότητας (π.χ. κεφάλαια Γ.4 Α-ΣΤ, Γ.9, Γ.10, Γ.12 και Γ.29 του παρόντος παραρτήματος, TG 302C του ΟΟΣΑ). Στην περίπτωση αυτή, η δοκιμή μπορεί να εκτελεστεί ως δοκιμή διαλογής, παρόμοια με τη δοκιμή προσδιορισμού του εύρους τιμών ή με την οριακή δοκιμή (βλ. σημείο 39), λαμβανομένης υπόψη μόνο της συνολικής αναπνοής. Ωστόσο, τα στοιχεία αυτά θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με προσοχή όταν πρόκειται για δοκιμές άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας (κεφάλαια Γ.4 Α-ΣΤ και Γ.29 του παρόντος παραρτήματος), για τις οποίες η συγκέντρωση του ενοφθαλμίσματος είναι σημαντικά χαμηλότερη από εκείνη που χρησιμοποιείται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών. Πράγματι, η απουσία αναστολής στη συγκεκριμένη δοκιμή αναπνοής δεν συνεπάγεται αυτομάτως μη ανασταλτικές συνθήκες στη δοκιμή άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας των κεφαλαίων Γ.4 Α-ΣΤ ή Γ.29 του παρόντος παραρτήματος.

2. Γενικά, η δοκιμή αναστολής της αναπνοής φαίνεται ότι έχει εφαρμοστεί με επιτυχία από τότε που δημοσιεύτηκε για πρώτη φορά αλλά, σε ορισμένες περιπτώσεις, αναφέρθηκαν εσφαλμένα αποτελέσματα, π.χ. (2) (4) (5). Οι καμπύλες αναπνοής σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση είναι ενίοτε διφασικές, οι καμπύλες δόσης-απόκρισης έχουν παραμορφωθεί και οι τιμές EC_{50} κυμαίνονται σε μη αναμενόμενα χαμηλά επίπεδα (5). Έρευνες έχουν δείξει ότι αυτά τα αποτελέσματα λαμβάνονται όταν η ενεργοποιημένη ιλύς που χρησιμοποιείται στη δοκιμή νιτροποιείται σημαντικά και η υπό δοκιμή χημική ουσία έχει μεγαλύτερη επίδραση στην οξείδωση του αμμωνίου απ' ό,τι στη γενική ετεροτροφική οξείδωση. Κατά συνέπεια, τα εσφαλμένα αποτελέσματα μπορεί να διορθωθούν με τη διενέργεια επιπλέον δοκιμών στις οποίες θα χρησιμοποιείται ειδικός αναστολέας νιτροποίησης. Εάν προσδιοριστεί ο ρυθμός πρόσληψης οξυγόνου με και χωρίς τον εν λόγω αναστολέα, π.χ. την N-αλλυλοθειουρία (ATU), μπορούν να υπολογιστούν οι αντίστοιχοι ρυθμοί πρόσληψης οξυγόνου κατά τη συνολική, ετεροτροφική οξείδωση και τη νιτροποίηση (4) (7) (8). Με τον τρόπο αυτό, μπορούν να προσδιοριστούν οι ανασταλτικές επιδράσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στις δύο διεργασίες και μπορούν να υπολογιστούν, με τον συνήθη τρόπο, οι τιμές EC_{50} τόσο για την οξείδωση οργανικού άνθρακα (ετεροτροφική οξείδωση) όσο και για την οξείδωση αμμωνίου (νιτροποίηση). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, σε σπάνιες περιπτώσεις, η ανασταλτική επίδραση της N-αλλυλοθειουρίας μπορεί να εξουδετερωθεί εν μέρει ή πλήρως εάν δημιουργηθούν σύμπλοκα με υπό δοκιμή χημικές ουσίες ή συμπληρώματα του θρεπτικού μέσου, π.χ. ιόντα Cu^{++} (6). Τα ιόντα Cu^{++} είναι ιδιαίτερα σημαντικά για το βακτήριο *Nitrosomonas*, αλλά είναι τοξικά σε υψηλότερη συγκέντρωση.

3. Η νιτροποίηση κατά την αερόβια επεξεργασία λυμάτων συνιστά απαραίτητο στάδιο για την απομάκρυνση αζωτούχων ενώσεων από λύματα μέσω απονίτρωσης αέριων προϊόντων. Η ανάγκη αυτής της διεργασίας έχει καταστεί πιεστική ιδιαίτερα στις ευρωπαϊκές χώρες. Η ΕΕ έχει πλέον θεσπίσει χαμηλότερα όρια όσον αφορά τη συγκέντρωση αζώτου στα επεξεργασμένα υγρά απόβλητα που απορρίπτονται στους υδάτινους αποδέκτες ([1]).

([1]) Οδηγία 91/271/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 21ης Μαΐου 1991, για την επεξεργασία των αστικών λυμάτων (ΕΕ L 135 της 30.5.1991, σ. 40).

▼M6

4. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η μέθοδος που εκτιμά μόνο την επίδραση στις διεργασίες οξείδωσης οργανικού άνθρακα είναι κατάλληλη. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, απαιτείται εξέταση της επίδρασης μόνο στη νιτροποίηση, ή στη νιτροποίηση και την οξείδωση οργανικού άνθρακα χωριστά, προκειμένου να ερμηνευθούν τα αποτελέσματα και να κατανοηθούν οι επιδράσεις.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

5. Οι ρυθμοί αναπνοής των δειγμάτων ενεργοποιημένης ιλύος που τροφοδοτούνται με συνθετικά απόβλητα μετρώνται σε ερμητικά κλειστή κυψελίδα που περιέχει ηλεκτρόδιο οξυγόνου έπειτα από χρόνο επαφής 3 ωρών. Με βάση ένα ρεαλιστικό σενάριο έκθεσης, θα μπορούσαν να ενδείκνυνται μεγαλύτεροι χρόνοι επαφής. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία βιοαποικοδομείται γρήγορα –π.χ. αβιοτικά μέσω υδρόλυσης– ή είναι πτητική και η συγκέντρωση δεν είναι δυνατόν να διατηρηθεί σταθερή, μπορεί να χρησιμοποιείται επιπλέον μια συντομότερη περίοδος έκθεσης, π.χ. 30 λεπτών. Η ευαισθησία κάθε παρτίδας ενεργοποιημένης ιλύος θα πρέπει να ελέγχεται με τη βοήθεια κατάλληλης χημικής ουσίας αναφοράς την ημέρα της έκθεσης. Κατά κανόνα, η δοκιμή χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί η EC_x (π.χ. η EC_{50}) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και/ή η συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίπτωσης (NOEC).

6. Η αναστολή πρόσληψης οξυγόνου από μικροοργανισμούς που οξειδώνουν τον οργανικό άνθρακα μπορεί να εκφράζεται χωριστά από την αναστολή πρόσληψης οξυγόνου από μικροοργανισμούς που οξειδώνουν το αμμώνιο, εάν μετρηθούν οι ρυθμοί πρόσληψης οξυγόνου με και χωρίς την Ν-αλλυλοθειουρία, έναν ειδικό αναστολέα της οξείδωσης του αμμωνίου σε νιτρώδη από τα νιτροποιητικά βακτήρια πρώτου σταδίου. Στην περίπτωση αυτή, η εκατοστιαία αναστολή του ρυθμού πρόσληψης οξυγόνου υπολογίζεται με τη σύγκριση του ρυθμού πρόσληψης οξυγόνου παρουσία της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και του μέσου ρυθμού πρόσληψης οξυγόνου των αντίστοιχων μαρτύρων που δεν περιέχουν την υπό δοκιμή χημική ουσία, τόσο με όσο και χωρίς τον ειδικό αναστολέα, την Ν-αλλυλοθειουρία.

7. Τυχόν πρόσληψη οξυγόνου που προκύπτει από αβιοτικές διεργασίες μπορεί να ανιχνευθεί με τον προσδιορισμό του ρυθμού της σε μείγματα που περιλαμβάνουν την υπό δοκιμή χημική ουσία, θρεπτικό μέσο συνθετικών αποβλήτων και νερό, και δεν περιλαμβάνουν ενεργοποιημένη ιλύ.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

8. Για να είναι δυνατή η ορθή ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει να είναι γνωστά η ταυτοποίηση (κατά προτίμηση, ο αριθμός CAS), η ονομασία (IUPAC), τα χαρακτηριστικά καθαρότητας, υδατοδιαλυτότητας, τάσης ατμών, πτητικότητας και προσρόφησης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Κατά κανόνα, οι πτητικές χημικές ουσίες μπορούν να ελεγχθούν επαρκώς μόνο εάν λαμβάνονται ειδικές προφυλάξεις (βλ. σημείο 21).

ΕΦΑΡΜΟΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

9. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών εφαρμόζεται σε υδατοδιαλυτές, δυσδιάλυτες και πτητικές χημικές ουσίες. Ωστόσο, ενδέχεται να μην είναι πάντα δυνατόν να ληφθούν οι τιμές EC_{50} με χημικές ουσίες περιορισμένης διαλυτότητας, ενώ έγκυρα αποτελέσματα με πτητικές χημικές ουσίες μπορούν να ληφθούν μόνο υπό τον όρο ότι το μεγαλύτερο μέρος (π.χ. > 80 %) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας παραμένει στο μείγμα της αντίδρασης στο τέλος της(των) περιόδου(-ων) έκθεσης. Όταν υπάρχει αμφιβολία ως προς τη σταθερότητα ή την πτητικότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, θα πρέπει να υποβάλλονται επιπλέον αναλυτικά στοιχεία, ώστε να προσδιορίζεται ακριβέστερα η συγκέντρωση EC_x.

▼M6

ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

10. Οι χημικές ουσίες αναφοράς θα πρέπει να ελέγχονται περιοδικά, ώστε να διασφαλίζεται η αξιοπιστία της μεθόδου δοκιμών και των συνθηκών δοκιμής, και να ελέγχεται η ευαισθησία κάθε παρτίδας ενεργοποιημένης ιλύος που χρησιμοποιείται ως μικροβιακό ενοφθάλμισμα την ημέρα της έκθεσης. Ως αναστολέας αναφοράς συνιστάται η χημική ουσία 3,5-διχλωροφαινόλη (3,5-DCP), αφού είναι γνωστός αναστολέας της αναπνοής και χρησιμοποιείται σε πολλούς τύπους δοκιμών αναστολής/τοξικότητας (4). Επίσης, ως χημική ουσία αναφοράς μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο πενταένυδρος θειικός χαλκός (II), για την αναστολή της ολικής αναπνοής (9). Η N-μεθυλανιλίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ειδική χημική ουσία αναφοράς για την αναστολή νιτροποίησης (4).

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ

11. Ο ρυθμός πρόσληψης οξυγόνου των τυφλών μαρτύρων (που δεν περιέχουν την υπό δοκιμή χημική ουσία ή χημική ουσία αναφοράς) δεν θα πρέπει να είναι μικρότερος από 20 mg οξυγόνου ανά γραμμάριο ενεργοποιημένης ιλύος (ξηρό βάρος των αιωρούμενων στερεών) ανά ώρα. Εάν ο ρυθμός είναι χαμηλότερος, η δοκιμή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται με πλυμένη ενεργοποιημένη ιλύ ή με ιλύ από άλλη πηγή. Ο συντελεστής μεταβολής του ρυθμού πρόσληψης οξυγόνου στις επαναλήψεις ελέγχου δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 30 % στο τέλος της οριστικής δοκιμής.

12. Στο πλαίσιο διεθνούς δοκιμής δακτυλίου (ring test) που διοργανώθηκε το 2004 από τον ISO (4) και κατά την οποία χρησιμοποιήθηκε ενεργοποιημένη ιλύς προερχόμενη από οικιακά λύματα, διαπιστώθηκε ότι η EC_{50} της 3,5-DCP κυμαινόταν μεταξύ 2 mg/l και 25 mg/l για τη ολική αναπνοή, μεταξύ 5 mg/l και 40 mg/l για την ετεροτροφική αναπνοή και μεταξύ 0,1 mg/l και 10 mg/l για την αναπνοή κατά τη νιτροποίηση. Εάν η EC_{50} της 3,5-DCP δεν βρίσκεται εντός του αναμενόμενου εύρους τιμών, η δοκιμή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται με ενεργοποιημένη ιλύ από άλλη πηγή. Η EC_{50} του πενταένυδρου θειικού χαλκού (II) θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 53 και 155 mg/l για την ολική αναπνοή (9).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Δοχεία και συσκευές δοκιμής

13. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται ο συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός, καθώς και τα εξής:

α) δοχεία δοκιμής — π.χ. ποτήρια ζέσεως 1 000 ml που θα περιέχουν 500 ml μείγματος της αντίδρασης (βλ. 5 στο σχήμα 1)·

β) κυψελίδες και συνδετήρες για τη μέτρηση της συγκέντρωσης του διαλυμένου οξυγόνου· κατάλληλο ηλεκτρόδιο οξυγόνου· ερμητικά κλειστή κυψελίδα η οποία θα περιέχει το δείγμα χωρίς υπερκείμενο χώρο και θα διαθέτει καταγραφέα (π.χ. 7, 8, 9 στο σχήμα 1 του προσαρτήματος 2)· εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιείται φιάλη BOD με κατάλληλο προσαρμοστικό κολάρο ώστε το ηλεκτρόδιο οξυγόνου να συγκρατείται στον λαιμό της φιάλης (βλ. σχήμα 2 του προσαρτήματος 3). Για να αποφευχθεί η απώλεια υγρού λόγω υπερχείλισης κατά την εισαγωγή του ηλεκτροδίου οξυγόνου, συνιστάται να εισάγεται στην αρχή χοάνη ή γυάλινος σωλήνας μέσω του κολάρου, ή να χρησιμοποιούνται δοχεία με διευρυμένο περιστόμιο. Και στις δύο περιπτώσεις, θα πρέπει να χρησιμοποιείται μαγνητικός αναδευτήρας ή εναλλακτική μέθοδος ανάδευσης, π.χ. αυτοκινούμενος ανιχνευτήρας ανάδευσης·

γ) μαγνητικοί αναδευτήρες και μαγνητικές ράβδοι (καλυμμένες με αδρανές υλικό), που χρησιμοποιούνται στον θάλαμο μέτρησης και/ή στα δοχεία δοκιμής·

δ) διάταξη αερισμού: εάν είναι αναγκαίο, ο συμπιεσμένος αέρας θα πρέπει να διέλθει μέσα από κατάλληλο φίλτρο, ώστε να απομακρυνθούν σκόνες και έλαια, και μέσα από φιάλες έκπλυσης που περιέχουν νερό, ώστε

▼M6

να υγροποιηθεί. Το περιεχόμενο των δοχείων θα πρέπει να αεριστεί με σιφώνια Pasteur, ή άλλες διατάξεις αερισμού, που δεν απορροφούν χημικές ουσίες. Μπορεί να χρησιμοποιείται ανακινητήρας ελλειψοειδούς κίνησης ο οποίος να λειτουργεί με ταχύτητες μεταξύ 150 και 250 rpm με φιάλες χωρητικότητας, π.χ. 2 000 ml, ώστε να καλύπτεται το απαιτούμενο οξυγόνο για την ιλύ και να παρακάμπτονται οι δυσκολίες που οφείλονται σε χημικές ουσίες που προκαλούν υπερβολικό αφρισμό, είναι πτητικές και, ως εκ τούτου, χάνονται, ή είναι δύσκολο να διασπαρούν με διαβίβαση αέρα. Κατά κανόνα, το σύστημα δοκιμής αποτελείται από μια σειρά ποτηριών ζέσεως που αερίζονται συνεχώς και τοποθετούνται διαδοχικά (π.χ. ανά διαστήματα των περίπου 10 - 15 λεπτών) και στη συνέχεια αναλύονται διαδοχικά. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιείται επικυρωμένος εξοπλισμός που επιτρέπει τον ταυτόχρονο αερισμό και τη μέτρηση του ρυθμού κατανάλωσης οξυγόνου στα μείγματα·

ε) πεχάμετρο·

στ) φυγόκεντρος, απλή επιτραπέζια φυγόκεντρος για ιλύ, με μέγιστη ταχύτητα 10 000 m/s^2.

Αντιδραστήρια

14. Αντιδραστήρια αναλυτικής καθαρότητας θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής.

Νερό

15. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό, το οποίο να περιέχει λιγότερο από 1 mg/l DOC, εκτός εάν ορίζεται ρητά η χρήση νερού βρύσης χωρίς χλώριο.

Συνθετικά απόβλητα

16. Το θρεπτικό μέσο θα πρέπει να παρασκευάζεται ώστε να περιέχει τα ακόλουθα συστατικά στις αναφερόμενες ποσότητες:

— πεπτόνη	16 g
— εκχύλισμα κρέατος (ή συγκρίσιμο φυτικό εκχύλισμα)	11 g
— ουρία	3 g
— χλωριούχο νάτριο (NaCl)	0,7 g
— διένυδρο χλωριούχο ασβέστιο ($CaC1_2 \cdot 2H_2O$)	0,4 g
— επταένυδρο θειικό μαγνήσιο ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,2 g
— άνυδρο όξινο φωσφορικό κάλιο (K_2HPO_4)	2,8 g
— απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό έως 1 λίτρο	

17. Το pH αυτού του διαλύματος θα πρέπει να είναι 7,5 ± 0,5. Εάν το παρασκευαζόμενο θρεπτικό μέσο δεν χρησιμοποιείται αμέσως, θα πρέπει να φυλάσσεται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία 0 °C έως 4 °C, για μέγιστο διάστημα 1 εβδομάδας ή υπό συνθήκες που δεν αλλοιώνουν τη σύνθεσή του. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι τα συγκεκριμένα συνθετικά απόβλητα είναι 100 φορές πυκνότερα από αυτά που περιγράφονται στην τεχνική έκθεση του ΟΟΣΑ «Προτεινόμενη μέθοδος για τον προσδιορισμό της βιοαποικοδομησιμότητας των επιφανειοδραστικών ουσιών που χρησιμοποιούνται στα συνθετικά απορρυπαντικά» (11 Ιουνίου 1976), με την προσθήκη επιπλέον μονόξινου φωσφορικού καλίου.

▼M6

18. Εναλλακτικά, τα συστατικά του θρεπτικού μέσου μπορούν να αποστειρώνονται χωριστά πριν από τη φύλαξή τους, ή μπορεί να προστίθενται η πεπτόνη και το εκχύλισμα κρέατος λίγο πριν από την εκτέλεση της δοκιμής. Το θρεπτικό μέσο, προτού χρησιμοποιηθεί, θα πρέπει να αναμειγνύεται πλήρως και, αν κρίνεται αναγκαίο, να προσαρμόζεται η τιμή του pH στο 7,5 ± 0,5.

Υπό δοκιμή χημική ουσία

19. Σε περίπτωση εύκολα υδατοδιαλυτών υπό δοκιμή χημικών ουσιών, θα πρέπει να παρασκευάζεται διάλυμα παρακαταθήκης μόνο μέχρι το μέγιστο όριο υδατοδιαλυτότητας (οι καθιζήσεις δεν είναι αποδεκτές). Σε περίπτωση δυσδιάλυτων στο νερό ουσιών, τα μείγματα ουσιών με διαφορετική υδατοδιαλυτότητα και οι προσροφητικές ουσίες θα πρέπει να ζυγίζονται απευθείας στα δοχεία δοκιμής. Σ' αυτές τις περιπτώσεις, η χρήση διαλυμάτων παρακαταθήκης μπορεί να αποτελεί εναλλακτική, εάν διαλυμένες συγκεντρώσεις των υπό δοκιμή χημικών ουσιών προσδιορίζονται αναλυτικά στα δοχεία δοκιμής (πριν από την προσθήκη της ενεργοποιημένης ιλύος). Εάν παρασκευάζονται κλάσματα περιεχόμενα στο νερό (WAF), ο αναλυτικός προσδιορισμός των διαλυμένων συγκεντρώσεων των υπό δοκιμή χημικών ουσιών στα δοχεία δοκιμής είναι επίσης ουσιώδης. Θα πρέπει να αποφεύγεται η χρήση οργανικών διαλυτών, μέσων διασποράς ή γαλακτωματοποιητών για να βελτιωθεί η διαλυτότητα. Όταν υπάρχουν αρκετά στοιχεία σχετικά με τη σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας υπό αυτές τις συνθήκες, είναι δυνατόν να γίνεται υπερήχηση στα διαλύματα παρακαταθήκης και προηγούμενη ανάδευση στα εναιωρήματα, π.χ. ολονυκτίως.

20. Η υπό δοκιμή χημική ουσία μπορεί να επηρεάσει αρνητικά το pH στο σύστημα δοκιμής. Πριν από την εκτέλεση της δοκιμής, θα πρέπει να προσδιορίζεται το pH των μειγμάτων που υφίστανται αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία, στο πλαίσιο προκαταρκτικής δοκιμασίας, για να βεβαιωθεί κατά πόσον είναι αναγκαίο να προσαρμοστεί το pH πριν από την κυρίως δοκιμή και, ξανά, κατά την ημέρα της κυρίως δοκιμής. Τα διαλύματα/εναιωρήματα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο νερό θα πρέπει να εξουδετερώνονται πριν από την προσθήκη ενοφθαλμίσματος, αν κρίνεται αναγκαίο. Ωστόσο, επειδή η εξουδετέρωση μπορεί να μεταβάλει τις χημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή ουσίας, θα μπορούσε να διενεργούνται περαιτέρω δοκιμές, ανάλογα με τους σκοπούς της μελέτης, ώστε να εκτιμάται η επίδραση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην ιλύ χωρίς προσαρμογή του pH.

21. Οι τοξικές επιδράσεις των πτητικών χημικών ουσιών, ιδίως σε δοκιμές κατά τις οποίες διοχετεύεται στο σύστημα αέριο με τη μορφή φυσαλίδων, μπορούν να ποικίλλουν σε ένταση λόγω απωλειών της ουσίας κατά την περίοδο έκθεσης. Θα πρέπει να δίνεται προσοχή όταν πρόκειται για τις ουσίες αυτές, δηλ. να διενεργείται ειδική ανάλυση των εν λόγω ουσιών στα μείγματα ελέγχου που τις περιέχουν και να τροποποιείται το σύστημα αερισμού.

Χημική ουσία αναφοράς

22. Εάν χρησιμοποιείται ως χημική ουσία αναφοράς η 3,5-διχλωροφαινόλη, θα πρέπει να παρασκευάζεται διάλυμα 1,00 g 3,5-διχλωροφαινόλης σε 1 000 ml νερού (15). Θα πρέπει να χρησιμοποιείται θερμό νερό και/ή υπερήχηση για να επιταχυνθεί η διάλυση· το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι χαραγής, αφού θα έχει ψυχθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ωστόσο, θα πρέπει να βεβαιώνεται ότι δεν έχει μεταβληθεί η δομή της χημικής ουσίας αναφοράς. Το pH του διαλύματος θα πρέπει να ελέγχεται και, αν είναι αναγκαίο, να προσαρμόζεται σε pH 7 - 8 με NaOH ή H_2SO_4.

23. Εάν χρησιμοποιείται ως χημική ουσία αναφοράς πενταένυδρος θειικός χαλκός (II), χρησιμοποιούνται συγκεντρώσεις 58 mg/l, 100 mg/l και 180 mg/l (συντελεστής 1,8). Η ουσία ζυγίζεται απευθείας στα δοχεία δοκιμής (29 - 50 - 90 mg για συνολικό όγκο 500 ml). Στη συνέχεια, διαλύεται σε 234 ml νερού βρύσης αποστειρωμένου σε αυτόκαυστο. Ο πενταένυδρος θειικός χαλκός (II) είναι ευδιάλυτη ουσία. Κατά την έναρξη της δοκιμής, προστίθενται 16 ml συνθετικών αποβλήτων και 250 ml ενεργοποιημένης ιλύος.

▼M6

Ειδικός αναστολέας της νιτροποίησης

24. Θα πρέπει να παρασκευάζεται διάλυμα παρακαταθήκης N-αλλυλοθειουρίας (ATU) 2,32 g/l. Με την προσθήκη 2,5 ml αυτού του διαλύματος παρακαταθήκης σε μείγμα επώασης τελικού όγκου 500 ml προκύπτει τελική συγκέντρωση 11,6 mg ATU/l (10^{-4} mol/l), η οποία είναι γνωστό ότι επαρκεί (4) για να προκαλέσει 100 % αναστολή της νιτροποίησης σε νιτροποιητική ενεργοποιημένη ιλύ που περιέχει 1,5 g/l αιωρούμενα στερεά.

Αβιοτικοί μάρτυρες

25. Σε σπάνιες περιπτώσεις, μια υπό δοκιμή χημική ουσία με ισχυρές αναγωγικές ιδιότητες ενδέχεται να προκαλέσει μετρήσιμη αβιοτική κατανάλωση οξυγόνου. Σ' αυτές τις περιπτώσεις, οι αβιοτικοί μάρτυρες είναι αναγκαίοι για να γίνεται διάκριση μεταξύ της αβιοτικής πρόσληψης οξυγόνου από την υπό δοκιμή χημική ουσία και της μικροβιακής αναπνοής. Οι αβιοτικοί μάρτυρες μπορούν να παρασκευάζονται με αφαίρεση του ενοφθαλμίσματος από τα μείγματα δοκιμής. Ομοίως, μπορούν να συμπεριλαμβάνονται αβιοτικοί μάρτυρες χωρίς ενοφθάλμισμα, όταν διενεργούνται υποστηρικτικές αναλυτικές μετρήσεις για να προσδιοριστεί η επιτευχθείσα συγκέντρωση κατά τη φάση έκθεσης της δοκιμής, π.χ. όταν χρησιμοποιούνται διαλύματα παρακαταθήκης δυσδιάλυτων στο νερό χημικών ουσιών των οποίων τα συστατικά παρουσιάζουν διαφορετική υδατοδιαλυτότητα. Σε συγκεκριμένες περιπτώσεις, μπορεί να είναι αναγκαίο να παρασκευαστεί αβιοτικός μάρτυρας με αποστειρωμένο ενοφθάλμισμα (π.χ. με αυτόκαυστο ή με την προσθήκη αποστειρωτικών τοξικών ουσιών). Ορισμένες χημικές ουσίες μπορούν να παράγουν ή να καταναλώνουν οξυγόνο μόνο εάν η αντιδρώσα επιφάνεια είναι αρκετά μεγάλη, ακόμα και αν συνήθως απαιτούν πολύ υψηλότερη θερμοκρασία ή πίεση για να γίνει η αντίδραση. Ως προς αυτό, θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στα υπεροξέα. Το αποστειρωμένο ενοφθάλμισμα παρέχει μεγάλη επιφάνεια.

Ενοφθάλμισμα

26. Για γενική χρήση, η ενεργοποιημένη ιλύς θα πρέπει να συλλέγεται από την έξοδο της δεξαμενής αερισμού, ή κοντά στην έξοδο της δεξαμενής, σε έναν σταθμό επεξεργασίας λυμάτων σε καλή κατάσταση λειτουργίας ο οποίος επεξεργάζεται, κατά κύριο λόγο, οικιακά λύματα. Με βάση τον σκοπό της δοκιμής, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι κατάλληλοι τύποι ή πηγές ενεργοποιημένης ιλύος, όπως π.χ. η ιλύς που έχει αναπτυχθεί στο εργαστήριο, σε ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις αιωρούμενων στερεών 2 g/l έως 4 g/l. Ωστόσο, οι τύποι ιλύος που προέρχονται από διαφορετικές εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων είναι πιθανό να εμφανίζουν διαφορετικά χαρακτηριστικά και διαφορετικό βαθμό ευαισθησίας.

27. Η ιλύς μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη μορφή με την οποία συλλέγεται, αλλά θα πρέπει να απομακρύνονται τα χονδρόκοκκα σωματίδια με καθίζηση για σύντομο χρονικό διάστημα, π.χ. 5 έως 15 λεπτά, και απόχυση της υπερκείμενης στιβάδας που αποτελείται από λεπτότερα σωματίδια ή με κοσκίνισμα (π.χ. με μέγεθος οπής 1 mm^2). Εναλλακτικά, η ιλύς μπορεί να ομογενοποιείται σε αναμείκτη για περίπου 15 δευτερόλεπτα ή περισσότερο, αλλά απαιτείται προσοχή όσον αφορά τις δυνάμεις διάτμησης και τη μεταβολή της θερμοκρασίας που μπορεί να επέλθει σε περίπτωση ανάμειξης για μεγάλο χρονικό διάστημα.

28. Η έκπλυση της ιλύος είναι συχνά αναγκαία, π.χ. αν ο ρυθμός της ενδογενούς αναπνοής είναι βραδύς. Η ιλύς θα πρέπει, στην αρχή, να φυγοκεντρείται έως ότου παραχθούν καθαρό υπερκείμενο υγρό και συσσωματώματα στερεών σωματιδίων αποβλήτων, π.χ. 10 λεπτά σε περίπου 10 000 m/s^2. Το υπερκείμενο υγρό θα πρέπει να απορρίπτεται και η ιλύς θα πρέπει να επαναιωρείται με ανατάραξη σε νερό βρύσης που δεν περιέχει χλώριο και, στη συνέχεια, το νερό έκπλυσης θα πρέπει να απομακρύνεται με επαναφυγοκέντρηση και εκ νέου απόρριψη. Η διαδικασία έκπλυσης και φυγοκέντρησης θα πρέπει να επαναλαμβάνεται, αν κρίνεται αναγκαίο. Θα πρέπει να προσδιορίζεται η ξηρή μάζα γνωστού όγκου της ιλύος που έχει επαναιωρηθεί, η οποία συμπυκνώνεται με την αφαίρεση υγρού ή διαλύεται περαιτέρω σε νερό βρύσης που δεν περιέχει χλώριο για να επιτευχθεί η απαιτούμενη συγκέντρωση στερών σωματιδίων της ιλύος, δηλ. 3 g/l. Η

▼M6

ενεργοποιημένη ιλύς θα πρέπει να αερίζεται συνεχώς (π.χ. 2 l/λεπτό) στη θερμοκρασία της δοκιμής και, όταν είναι δυνατό, να χρησιμοποιείται την ημέρα της συλλογής. Εάν αυτό δεν είναι δυνατόν, η ιλύς θα πρέπει να τροφοδοτείται καθημερινά με θρεπτικό υλικό από συνθετικά απόβλητα (50 ml θρεπτικό υλικό από συνθετικά απόβλητα ανά λίτρο ενεργοποιημένης ιλύος) για δύο επιπλέον ημέρες. Ακολούθως, η ιλύς χρησιμοποιείται για τη δοκιμή και τα αποτελέσματα θεωρούνται έγκυρα, υπό τον όρο ότι δεν έχει επέλθει καμία σημαντική μεταβολή στη δραστηριότητά της, με βάση τον ρυθμό της ενδογενούς ετεροτροφικής αναπνοής της και της αναπνοής της κατά τη νιτροποίηση.

29. Μπορεί να ανακύψουν δυσκολίες κατά την επώαση, σε περίπτωση αφρισμού σε τέτοιον βαθμό ώστε ο αφρός και τα στερεά σωματίδια της ιλύος που αυτός μεταφέρει να υπερχειλίζουν τα δοχεία αερισμού. Ενίοτε, ο αφρισμός μπορεί απλώς να προκαλείται από την παρουσία των συνθετικών αποβλήτων, αλλά αφρισμός θα πρέπει να αναμένεται σε περίπτωση που η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι, ή περιέχει, επιφανειοδραστική ουσία. Η απώλεια στερεών σωματιδίων της ιλύος στα μείγματα δοκιμής θα έχει ως αποτέλεσμα τεχνητά μειωμένους ρυθμούς αναπνοής, οι οποίοι θα μπορούσαν εσφαλμένα να εκληφθούν ως αποτέλεσμα αναστολής. Επιπλέον, ο αερισμός διαλύματος επιφανειοδραστικών ουσιών συγκεντρώνει την επιφανειοδραστική ουσία στο στρώμα του αφρού· η απώλεια αφρού από το σύστημα της δοκιμής θα ελαττώσει τις συγκεντρώσεις έκθεσης. Ο αφρισμός μπορεί να ελέγχεται με απλές μηχανικές μεθόδους (π.χ. περιστασιακή ανάδευση με το χέρι με τη χρήση γυάλινης ράβδου) ή με την προσθήκη αντιαφριστικού παράγοντα σε μορφή σιλικονούχου γαλακτώματος που δεν περιέχει επιφανειοδραστική ουσία και/ή με την εφαρμογή της μεθόδου αερισμού με ανακίνηση των φιαλών. Εάν το πρόβλημα συνδέεται με την παρουσία των συνθετικών αποβλήτων, η σύνθεση των αποβλήτων θα πρέπει να τροποποιείται με την προσθήκη αντιαφριστικού παράγοντα σε αναλογία, π.χ., 50 μl/l. Εάν ο αφρισμός οφείλεται στην υπό δοκιμή χημική ουσία, η ποσότητα που απαιτείται για την ελάττωση του αφρού θα πρέπει να προσδιορίζεται στη μέγιστη συγκέντρωση δοκιμής και, στη συνέχεια, κάθε μεμονωμένο δοχείο αερισμού θα πρέπει να υποβάλλεται σε πανομοιότυπη αγωγή (συμπεριλαμβανομένων εκείνων που δεν περιέχουν αφρό, όπως οι τυφλοί μάρτυρες και τα δοχεία αναφοράς). Εάν χρησιμοποιούνται αντιαφριστικοί παράγοντες, δεν θα πρέπει να υπάρχει αλληλεπίδραση με το ενοφθάλμισμα και/ή την υπό δοκιμή χημική ουσία.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

30. Η αναστολή μπορεί να προσδιοριστεί για τρεις διαφορετικούς τύπους πρόσληψης οξυγόνου: την ολική, την αμιγώς ετεροτροφική και την οφειλόμενη στη νιτροποίηση. Κατά κανόνα, η μέτρηση της αναστολής της ολικής πρόσληψης οξυγόνου θα πρέπει να επαρκεί. Οι επιδράσεις που έχουν η οξείδωση οργανικού άνθρακα και η οξείδωση αμμωνίου στην ετεροτροφική πρόσληψη οξυγόνου πρέπει να προσδιορίζονται όταν υπάρχει ειδική απαίτηση για τα δύο αυτά χωριστά τελικά σημεία σε σχέση με συγκεκριμένη χημική ουσία ή (κατά περίπτωση) για να ερμηνευθούν άτυπες καμπύλες δόσης-απόκρισης όσον αφορά την αναστολή της ολικής πρόσληψης οξυγόνου.

Συνθήκες δοκιμής

31. Η δοκιμή θα πρέπει να εκτελείται σε θερμοκρασία 20 ± 2 °C.

Μείγματα δοκιμής

32. Τα μείγματα δοκιμής (εμφανίζονται ως F_T στον πίνακα 1) που περιέχουν νερό, θρεπτικό υλικό από συνθετικά απόβλητα και την υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να παρασκευάζονται ώστε να λαμβάνονται διαφορετικές ονομαστικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (βλ. πίνακα 1 για ενδεικτικές τιμές όγκου των συστατικών). Το pH θα πρέπει να προσαρμόζεται στο 7,5 ± 0,5, αν είναι αναγκαίο. Τα μείγματα θα πρέπει να διαλύονται με νερό και το ενοφθάλμισμα θα πρέπει να προστίθεται για να ληφθούν ίσοι τελικοί όγκοι στα δοχεία και να ξεκινήσει ο αερισμός.

Μείγματα αναφοράς

33. Τα μείγματα (F_R) θα πρέπει να παρασκευάζονται με τη χημική ουσία αναφοράς, π.χ. 3,5-διχλωροφαινόλη, αντί της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, κατά τον ίδιο τρόπο με τα μείγματα δοκιμής.

▼M6

Τυφλοί μάρτυρες

34. Οι τυφλοί μάρτυρες (F_B) θα πρέπει να παρασκευάζονται στην αρχή και στο τέλος της περιόδου έκθεσης, όταν πρόκειται για δοκιμές στις οποίες τα ποτήρια ζέσεως τοποθετούνται διαδοχικά ανά διαστήματα. Όταν εκτελούνται δοκιμές που χρησιμοποιούν εξοπλισμό ο οποίος επιτρέπει την ταυτόχρονη μέτρηση της κατανάλωσης οξυγόνου, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται τουλάχιστον δύο τυφλοί μάρτυρες σε κάθε παρτίδα ταυτόχρονης ανάλυσης. Οι τυφλοί μάρτυρες περιέχουν ίσο όγκο ενεργοποιημένης ιλύος και συνθετικού θρεπτικού μέσου, αλλά δεν περιέχουν την υπό δοκιμή χημική ουσία ή τη χημική ουσία αναφοράς. Θα πρέπει να διαλύονται με νερό στον ίδιο όγκο με τα μείγματα δοκιμής και αναφοράς.

Αβιοτικοί μάρτυρες

35. Εάν είναι απαραίτητο, για παράδειγμα εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι γνωστό ή πιθανολογείται ότι έχει ισχυρές αναγωγικές ιδιότητες, θα πρέπει να παρασκευάζεται μείγμα F_A, για να μετράται η αβιοτική κατανάλωση οξυγόνου. Το μείγμα θα πρέπει να περιέχει τις ίδιες ποσότητες υπό δοκιμή χημικής ουσίας και θρεπτικού υλικού από συνθετικά απόβλητα και τον ίδιο όγκο με τα μείγματα δοκιμής, αλλά να μην περιέχει ενεργοποιημένη ιλύ.

Γενική διαδικασία και μετρήσεις

36. Τα μείγματα δοκιμής, τα μείγματα αναφοράς και οι τυφλοί και οι αβιοτικοί μάρτυρες επωάζονται στη θερμοκρασία δοκιμής υπό συνθήκες αναγκαστικού αερισμού (0,5 - 1 l/min), ώστε να διατηρείται η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου πάνω από το 60 - 70 % του κορεσμού και να διατηρούνται οι κροκίδες ιλύος σε εναιώρημα. Η ανάδευση των καλλιεργειών είναι επίσης απαραίτητη για να διατηρούνται οι κροκίδες ιλύος σε εναιώρημα. Η επώαση θεωρείται ότι ξεκινά όταν το ενοφθάλμισμα της ενεργοποιημένης ιλύος έρχεται για πρώτη φορά σε επαφή με τα άλλα συστατικά του τελικού μείγματος. Στο τέλος της επώασης, μετά τους καθορισμένους χρόνους έκθεσης, οι οποίοι διαρκούν συνήθως 3 ώρες, τα δείγματα λαμβάνονται για να μετρηθεί ο ρυθμός με τον οποίο μειώνεται η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου στην κυψελίδα που προορίζεται για τον συγκεκριμένο σκοπό (σχήμα 2 του προσαρτήματος 3) ή σε πλήρως γεμάτη φιάλη BOD. Ο τρόπος με τον οποίο ξεκινά η επώαση εξαρτάται επίσης από τη χωρητικότητα του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται για να μετρηθούν οι ρυθμοί κατανάλωσης οξυγόνου. Για παράδειγμα, εάν περιλαμβάνει έναν μόνο αισθητήρα οξυγόνου, οι μετρήσεις πραγματοποιούνται μεμονωμένα. Στην περίπτωση αυτή, θα πρέπει να παρασκευάζονται τα διάφορα μείγματα που είναι αναγκαία για τη δοκιμή με συνθετικά απόβλητα, χωρίς να προστίθεται το ενοφθάλμισμα, και οι απαιτούμενες ποσότητες ιλύος θα πρέπει να προστίθενται σε κάθε δοχείο της σειράς. Κάθε επώαση θα πρέπει να ξεκινά με τη σειρά, ανά κατάλληλα χρονικά διαστήματα, π.χ. 10 έως 15 λεπτών. Εναλλακτικά, το σύστημα μέτρησης μπορεί να περιλαμβάνει περισσότερους από έναν αισθητήρες οι οποίοι διευκολύνουν τις πολλαπλές ταυτόχρονες μετρήσεις· σ' αυτή την περίπτωση, το εμβόλιο μπορεί να προστίθεται την ίδια στιγμή στις κατάλληλες ομάδες δοχείων.

37. Η ονομαστική συγκέντρωση ενεργοποιημένης ιλύος σε όλα τα δείγματα δοκιμής και αναφοράς και στους τυφλούς (αλλά όχι αβιοτικούς) μάρτυρες είναι 1,5 g/l των αιωρούμενων στερεών. Η κατανάλωση οξυγόνου θα πρέπει να μετράται έπειτα από έκθεση 3 ωρών. Κατά περίπτωση, θα πρέπει να διενεργούνται μετρήσεις έπειτα από επιπλέον έκθεση διάρκειας 30 λεπτών, όπως περιγράφεται προηγουμένως στο σημείο 5.

Νιτροποιητική ικανότητα της ιλύος

38. Για να αποφασιστεί κατά πόσον η ιλύς έχει την ικανότητα να νιτροποιεί και, εάν ναι, με ποιο ρυθμό, θα πρέπει να παρασκευαστούν μείγματα (F_B), όπως τα μείγματα τυφλών μαρτύρων και τα άλλα μείγματα «ελέγχου» (F_N), τα οποία όμως περιέχουν επίσης N-αλλυλοθειουρία σε αναλογία 11,6 mg/l.

▼M6

Τα μείγματα θα πρέπει να αερίζονται και να επωάζονται σε θερμοκρασία 20 °C ± 2 °C επί 3 ώρες. Ακολούθως, θα πρέπει να μετρώνται οι ρυθμοί πρόσληψης οξυγόνου και να υπολογίζεται ο ρυθμός πρόσληψης οξυγόνου λόγω νιτροποίησης.

Μοντέλα δοκιμών

Δοκιμή προσδιορισμού του εύρους τιμών

39. Εκτελείται προκαταρκτική δοκιμή, κατά περίπτωση, για να εκτιμηθεί το εύρος συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που είναι απαραίτητες στην οριστική δοκιμή για τον προσδιορισμό της αναστολής της κατανάλωσης οξυγόνου. Εναλλακτικά, η απουσία αναστολής της κατανάλωσης οξυγόνου από την υπό δοκιμή χημική ουσία στο πλαίσιο προκαταρκτικής δοκιμής μπορεί να αποδεικνύει ότι η οριστική δοκιμή είναι περιττή. Ωστόσο, θα πρέπει να διενεργούνται δοκιμές εις τριπλούν με την υψηλότερη συγκέντρωση δοκιμής της προκαταρκτικής δοκιμής (κατά κανόνα 1 000 mg/l· τιμή η οποία εξαρτάται από τις απαιτήσεις δεδομένων).

Πίνακας 1

Παραδείγματα μειγμάτων για την προκαταρκτική δοκιμή

Αντιδραστήριο	Αρχική συγκέντρωση				
Διάλυμα παρακαταθήκης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας	10 g/l				
Διάλυμα παρακαταθήκης συνθετικού θρεπτικού μέσου	Βλ. σημείο 16				
Εναιώρημα παρακαταθήκης ενεργοποιημένης ιλύος	3 g/l αιωρούμενα στερεά				
Συστατικά των μειγμάτων	Χορήγηση δόσεων στα δοχεία δοκιμής [α]				
	F_{T1}	F_{T2}	F_{T3-5}	F_{B1-2}	F_A
Διάλυμα παρακαταθήκης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (ml) (σημεία 19 έως 21)	0,5	5	50	0	50
Διάλυμα παρακαταθήκης θρεπτικού υλικού από συνθετικά απόβλητα (ml) (σημείο 16)	16	16	16	16	16
Εναιώρημα ενεργοποιημένης ιλύος (ml) (σημεία 26 έως 29)	250	250	250	250	250
Νερό (σημείο 15)	233,5	229	184	234	434
Συνολικός όγκος των μειγμάτων (ml)	500	500	500	500	500
Συγκεντρώσεις στο μείγμα					
Εναιώρημα δοκιμής (mg/l) Ενεργοποιημένη ιλύς	10	10	1 000	0	1 000
(αιωρούμενα στερεά) (mg/l)	1 500	1 500	1 500	1 500	0

[α] Θα πρέπει να ακολουθείται η ίδια διαδικασία με τη χημική ουσία αναφοράς, για να λαμβάνονται φιάλες F_{R1-3}.

40. Στη δοκιμή θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τρεις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, π.χ. 10 mg/l, 100 mg/l και 1 000 mg/l με έναν τυφλό μάρτυρα και, αν είναι απαραίτητο, τουλάχιστον τρεις αβιοτικοί μάρτυρες με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής

▼M6

ουσίας (βλ. ενδεικτικά τον πίνακα 1). Στην ιδανική περίπτωση, η χαμηλότερη συγκέντρωση δεν θα πρέπει να έχει καμία επίδραση στην κατανάλωση οξυγόνου. Εάν κρίνεται σκόπιμο, θα πρέπει να υπολογίζονται οι ρυθμοί πρόσληψης οξυγόνου και ο ρυθμός νιτροποίησης· στη συνέχεια, θα πρέπει να υπολογίζεται το ποσοστό αναστολής. Ανάλογα με τον σκοπό της δοκιμής, είναι επίσης πιθανό να προσδιορίζεται απλώς η τοξικότητα μιας οριακής συγκέντρωσης, π.χ. 1 000 mg/l. Εάν δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές τοξικές επιδράσεις σε αυτή τη συγκέντρωση, δεν είναι αναγκαίο να διεξαχθούν περαιτέρω δοκιμές σε υψηλότερες ή χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι οι δυσδιάλυτες στο νερό ουσίες, τα μείγματα των οποίων τα συστατικά παρουσιάζουν διαφορετικό βαθμό υδατοδιαλυτότητας και οι προσροφητικές ουσίες θα πρέπει να ζυγίζονται απευθείας στα δοχεία δοκιμής. Στην περίπτωση αυτή, ο όγκος που προορίζεται για το διάλυμα παρακαταθήκης της υπό δοκιμή ουσίας θα πρέπει να αντικαθίσταται με νερό αραίωσης.

Οριστική δοκιμή

Αναστολή της συνολικής πρόσληψης οξυγόνου

41. Στη δοκιμή θα πρέπει να χρησιμοποιείται ένα εύρος συγκεντρώσεων που να προκύπτει από την προκαταρκτική δοκιμή. Για τον υπολογισμό της NOEC και της EC_x (π.χ. EC_{50}) συνιστάται, στις περισσότερες περιπτώσεις, να χρησιμοποιούνται έξι μάρτυρες και πέντε συγκεντρώσεις αγωγής σε γεωμετρική σειρά με πέντε επαναλήψεις. Η δοκιμή με τον αβιοτικό μάρτυρα δεν χρειάζεται να επαναληφθεί, εάν δεν υπήρξε πρόσληψη οξυγόνου κατά την προκαταρκτική δοκιμή, αλλά, εάν συντελείται σημαντική πρόσληψη, τότε θα πρέπει να περιλαμβάνονται αβιοτικοί μάρτυρες για κάθε συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Η ευαισθησία της ιλύος θα πρέπει να ελέγχεται με τη βοήθεια της ουσίας αναφοράς 3,5-διχλωροφαινόλη. Η ευαισθησία της ιλύος θα πρέπει να ελέγχεται για κάθε σειρά δοκιμών, αφού είναι γνωστό ότι η ευαισθησία παρουσιάζει διακυμάνσεις. Σε κάθε περίπτωση, τα δείγματα λαμβάνονται από τα δοχεία δοκιμής έπειτα από 3 ώρες, και μετά την πάροδο επιπλέον 30 λεπτών, αν κρίνεται αναγκαίο, για να μετρηθεί ο ρυθμός πρόσληψης οξυγόνου στην κυψελίδα που περιέχει ηλεκτρόδιο οξυγόνου. Οι συγκεκριμένοι ρυθμοί αναπνοής του μάρτυρα και των μειγμάτων δοκιμής υπολογίζονται με βάση τα στοιχεία που συλλέγονται· στη συνέχεια, υπολογίζεται το ποσοστό αναστολής με βάση την εξίσωση 7 κατωτέρω.

Διαφοροποίηση μεταξύ της αναστολής της ετεροτροφικής αναπνοής και της νιτροποίησης

42. Η χρήση του ειδικού αναστολέα της νιτροποίησης, ATU, επιτρέπει την άμεση εκτίμηση των ανασταλτικών επιδράσεων που έχουν οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες στην ετεροτροφική οξείδωση και, εάν αφαιρεθεί ο ρυθμός πρόσληψης οξυγόνου παρουσία της ATU από τον συνολικό ρυθμό πρόσληψης (χωρίς την παρουσία ATU), μπορούν να υπολογιστούν οι επιδράσεις στον ρυθμό νιτροποίησης. Θα πρέπει να παρασκευάζονται δύο σειρές μειγμάτων αντίδρασης σύμφωνα με τα μοντέλα δοκιμών για την EC_x ή την NOEC τα οποία περιγράφονται στο σημείο 41, αλλά, συμπληρωματικά, η ATU θα πρέπει να προστίθεται σε κάθε μείγμα της μίας από τις δύο σειρές σε τελική συγκέντρωση 11,6 mg/l, που έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει πλήρως τη νιτροποίηση σε ιλύ που περιλαμβάνει αιωρούμενα στερεά σε συγκεντρώσεις έως 3 000 mg/l (4). Οι ρυθμοί πρόσληψης οξυγόνου θα πρέπει να μετρώνται μετά την περίοδο έκθεσης· αυτές οι άμεσες τιμές εκφράζουν μόνο την ετεροτροφική αναπνοή, οι δε διαφορές μεταξύ αυτών των τιμών και των αντίστοιχων ρυθμών ολικής αναπνοής εκφράζουν τη νιτροποίηση. Στη συνέχεια, υπολογίζονται οι διάφοροι βαθμοί αναστολής.

Μετρήσεις

43. Μετά την(τις) περίοδο(-όδους) έκθεσης, θα πρέπει να μεταφερθεί ένα δείγμα από το πρώτο δοχείο αερισμού στην κυψελίδα που περιέχει ηλεκτρόδιο οξυγόνου (σχήμα 1 του προσαρτήματος 2) και η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου θα πρέπει να μετριέται αμέσως. Σε περίπτωση συστήματος με περισσότερα από ένα ηλεκτρόδια, οι μετρήσεις μπορούν να γίνονται ταυτόχρονα. Είναι σημαντικό η ανάδευση (με τη βοήθεια καλυμμένου μαγνήτη) να γίνεται με την ίδια ταχύτητα με εκείνη που χρησιμοποιείται όταν το ηλεκτρόδιο βαθμονομείται, ώστε να εξασφαλιστεί ότι ο καθετήρας ανταποκρίνεται με την ελάχιστη δυνατή καθυστέρηση στη μεταβολή των

▼M6

συγκεντρώσεων οξυγόνου, και να μπορέσουν να πραγματοποιηθούν τακτικές και αναπαραγώγιμες μετρήσεις οξυγόνου στα δοχεία μέτρησης. Συνήθως, το σύστημα αυτοκινούμενου ανιχνευτήρα ανάδευσης που περιέχει ορισμένα ηλεκτρόδια οξυγόνου θεωρείται κατάλληλο. Η κυψελίδα θα πρέπει να εκπλένεται με νερό έπειτα από κάθε μέτρηση. Εναλλακτικά, το δείγμα μπορεί να χρησιμοποιείται για την πλήρωση μιας φιάλης BOD (σχήμα 2 του προσαρτήματος 3) η οποία να διαθέτει μαγνητικό αναδευτήρα. Στη συνέχεια, θα πρέπει να εισάγεται στον λαιμό της φιάλης ένας αισθητήρας οξυγόνου με προσαρμοστικό κολάρο και να τίθεται σε λειτουργία ο μαγνητικός αναδευτήρας. Και στις δύο περιπτώσεις, η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου θα πρέπει να μετριέται συνεχώς και να καταγράφεται για περίοδο διάρκειας 5 έως 10 λεπτών, συνήθως, ή έως ότου η συγκέντρωση οξυγόνου μειωθεί σε επίπεδα κάτω των 2 mg/l. Το ηλεκτρόδιο θα πρέπει να αφαιρείται, το μείγμα θα πρέπει να μεταφέρεται εκ νέου στο δοχείο αερισμού και η διαδικασία αερισμού και ανάδευσης θα πρέπει να συνεχίζεται, εάν κριθεί αναγκαία η μέτρηση έπειτα από μεγαλύτερες περιόδους έκθεσης.

Επαλήθευση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας

44. Για ορισμένους σκοπούς, ενδέχεται να είναι απαραίτητο να μετρηθεί η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στα δοχεία δοκιμής. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι, εάν χρησιμοποιούνται διαλύματα παρακαταθήκης που περιέχουν:

— δυσδιάλυτες στο νερό ουσίες,

— μείγματα με συστατικά τα οποία παρουσιάζουν διαφορετικό βαθμό υδατοδιαλυτότητας, ή

— ευδιάλυτες στο νερό ουσίες, στις οποίες όμως η συγκέντρωση του διαλύματος παρακαταθήκης προσεγγίζει το μέγιστο όριο υδατοδιαλυτότητας,

το διαλυμένο κλάσμα είναι άγνωστο, και η πραγματική συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που μεταφέρεται στα δοχεία δοκιμής δεν είναι γνωστή. Για τον χαρακτηρισμό της έκθεσης, είναι απαραίτητη η αναλυτική εκτίμηση των συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στα δοχεία δοκιμής. Για λόγους διευκόλυνσης, η αναλυτική εκτίμηση θα πρέπει να πραγματοποιείται πριν από την προσθήκη του ενοφθαλμίσματος. Επειδή στα δοχεία δοκιμής θα μεταφέρονται μόνο διαλυμένα κλάσματα, οι συγκεντρώσεις που θα μετρώνται ενδέχεται να είναι ιδιαίτερα χαμηλές.

45. Για να αποφευχθούν χρονοβόρες και δαπανηρές αναλύσεις, συνιστάται να ζυγίζεται απλώς η υπό δοκιμή χημική ουσία απευθείας μέσα στα δοχεία δοκιμής και, για μεταγενέστερους υπολογισμούς, να λαμβάνεται ως βάση η αρχική ονομαστική συγκέντρωση που ζυγίστηκε. Δεν είναι απαραίτητο να γίνεται διαφοροποίηση μεταξύ διαλυμένων, αδιάλυτων ή προσροφημένων κλασμάτων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, γιατί όλα αυτά τα κλάσματα εμφανίζονται υπό πραγματικές συνθήκες και στους σταθμούς επεξεργασίας λυμάτων και ενδέχεται να ποικίλλουν ανάλογα με τη σύνθεση των λυμάτων. Ο σκοπός της μεθόδου δοκιμής είναι να εκτιμηθεί ρεαλιστικά η μη ανασταλτική συγκέντρωση και δεν ενδείκνυται να εξετάζεται λεπτομερώς ποια κλάσματα συμβάλλουν στην αναστολή των οργανισμών της ενεργοποιημένης ιλύος. Τέλος, οι προσροφητικές ουσίες θα πρέπει επίσης να ζυγίζονται απευθείας μέσα στα δοχεία δοκιμής, για τα οποία θα πρέπει να χρησιμοποιείται σιλανιωμένο γυαλί, ώστε να ελαχιστοποιούνται οι απώλειες μέσω της προσρόφησης.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΕΙΣ

Υπολογισμός των ρυθμών πρόσληψης οξυγόνου

46. Οι ρυθμοί πρόσληψης οξυγόνου θα πρέπει να υπολογίζονται με βάση τον μέσο όρο των μετρούμενων τιμών, π.χ. με βάση το γραμμικό τμήμα των γραφημάτων της συγκέντρωσης οξυγόνου συναρτήσει του χρόνου, ενώ οι υπολογισμοί θα πρέπει να περιορίζονται στις συγκεντρώσεις οξυγόνου μεταξύ 2,0 mg/l και 7,0 mg/l, αφού οι υψηλότερες και οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις μπορεί, με τη σειρά τους, να επηρεάσουν τους ρυθμούς

▼M6

κατανάλωσης. Μερικές φορές είναι αναπόφευκτο και αναγκαίο να χρησιμοποιούνται ζώνες συγκεντρώσεων που βρίσκονται πάνω ή κάτω από αυτές τις τιμές, π.χ. όταν η αναπνοή καταστέλλεται έντονα και, κατά συνέπεια, γίνεται πολύ αργή ή εάν μια συγκεκριμένη ενεργοποιημένη ιλύς αναπνέει πολύ γρήγορα. Αυτό είναι αποδεκτό, υπό τον όρο ότι τα διευρυμένα τμήματα της καμπύλης πρόσληψης είναι ευθύγραμμα και η κλίση τους δεν μεταβάλλεται όταν περνά από τα όρια των 2,0 mg/l ή 7,0 mg/l O_2. Τα τυχόν μη ευθύγραμμα τμήματα της καμπύλης δηλώνουν ότι το σύστημα μέτρησης σταθεροποιείται ή ότι ο ρυθμός πρόσληψης μεταβάλλεται, και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό των ρυθμών αναπνοής. Ο ρυθμός πρόσληψης οξυγόνου θα πρέπει να εκφράζεται σε χιλιοστογραμμάρια ανά λίτρο ανά ώρα (mg/lh) ή σε χιλιοστογραμμάρια ανά γραμμάριο ξηρής ιλύος ανά ώρα (mg/gh). Ο ρυθμός κατανάλωσης οξυγόνου, R, σε mg/lh, μπορεί να υπολογίζεται ή να παρεμβάλλεται με βάση το ευθύγραμμο τμήμα της καμπύλης της καταγεγραμμένης μείωσης του οξυγόνου σύμφωνα με την εξίσωση 1:

$$R = (Q_1 - Q_2)/\Delta_t \times 60 \qquad (1)$$

όπου:

Q_1 είναι η συγκέντρωση οξυγόνου στην αρχή του επιλεγμένου ευθύγραμμου τμήματος της καμπύλης (mg/l)·

Q_2 είναι η συγκέντρωση οξυγόνου στο τέλος του επιλεγμένου ευθύγραμμου τμήματος της καμπύλης (mg/l)·

Δ_t είναι το χρονικό διάστημα μεταξύ των δύο μετρήσεων (min).

47. Ο ειδικός ρυθμός αναπνοής (R_s) εκφράζεται ως η ποσότητα του οξυγόνου που καταναλώνεται ανά γραμμάριο ξηρού βάρους της ιλύος ανά ώρα (mg/gh), σύμφωνα με την εξίσωση 2:

$$R_s = R/SS \qquad (2)$$

όπου SS είναι η συγκέντρωση αιωρούμενων στερών στο μείγμα δοκιμής (g/l).

48. Οι διάφοροι δείκτες του R που μπορούν να συνδυαστούν μεταξύ τους είναι οι εξής:

S ειδικός ρυθμός

T συνολικός ρυθμός αναπνοής

N ρυθμός αναπνοής λόγω νιτροποίησης

H ρυθμός ετεροτροφικής αναπνοής

A ρυθμός αναπνοής λόγω αβιοτικών διεργασιών

B ρυθμός αναπνοής με βάση τυφλές δοκιμασίες (μέσος όρος)

Υπολογισμός του ρυθμού πρόσληψης οξυγόνου λόγω νιτροποίησης

49. Η σχέση μεταξύ ολικής αναπνοής (R_T), αναπνοής λόγω νιτροποίησης (R_N) και ετεροτροφικής αναπνοής (R_H) δίνεται από την εξίσωση 3:

$$R_N = R_T - R_H \qquad (3)$$

όπου:

R_N είναι ο ρυθμός πρόσληψης οξυγόνου λόγω νιτροποίησης (mg/lh)·

R_T είναι ο μετρηθείς ρυθμός πρόσληψης οξυγόνου από τον τυφλό μάρτυρα (χωρίς ATU· F_B) (mg/lh)·

R_H είναι ο μετρηθείς ρυθμός πρόσληψης οξυγόνου από τον τυφλό μάρτυρα με την προσθήκη ATU (F_N) (mg/lh).

▼M6

50. Η σχέση αυτή ισχύει για τις τιμές των τυφλών μαρτύρων (R_{NB}, R_{TB}, R_{HB}), των αβιοτικών μαρτύρων (R_{NA}, R_{TA}, R_{HA}) και των δοκιμασιών με υπό δοκιμή χημικές ουσίες (R_{NS}, R_{TS}, R_{HS}) (mg/gh). Οι ειδικοί ρυθμοί αναπνοής υπολογίζονται ως εξής:

$$R_{NS} = R_N/SS \quad (4)$$

$$R_{TS} = R_T/SS \quad (5)$$

$$R_{HS} = R_H/SS \quad (6)$$

51. Εάν η τιμή του R_N είναι αμελητέα (π.χ. < 5 % του R_T στους τυφλούς μάρτυρες) κατά την προκαταρκτική δοκιμή, μπορεί να υποτεθεί ότι η ετεροτροφική πρόσληψη οξυγόνου ισούται με την ολική πρόσληψη και ότι δεν συντελείται νιτροποίηση. Εάν οι δοκιμές εξετάζουν τις επιδράσεις στους ετεροτροφικούς και τους νιτροποιητικούς μικροοργανισμούς, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί εναλλακτική πηγή ενεργοποιημένης ιλύος. Διενεργείται οριστική δοκιμή εάν υπάρχουν στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι οι ρυθμοί πρόσληψης οξυγόνου καταστέλλονται σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Υπολογισμός του ποσοστού αναστολής

52. Το ποσοστό αναστολής, I_T, της συνολικής κατανάλωσης οξυγόνου σε κάθε συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας δίνεται από την εξίσωση 7:

$$I_T = [1 - (R_T - R_{TA})/R_{TB}] \times 100\ \% \quad (7)$$

53. Ομοίως, το ποσοστό αναστολής της ετεροτροφικής πρόσληψης οξυγόνου, I_H, σε κάθε συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, δίνεται από την εξίσωση 8:

$$I_H = [1 - (R_H - R_{HA})/R_{HB}] \times 100\ \% \quad (8)$$

54. Τέλος, η αναστολή της πρόσληψης οξυγόνου λόγω νιτροποίησης, I_N, σε κάθε συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, δίνεται από την εξίσωση 9:

$$I_N = [1 - (R_T - R_H)/(R_{TB} - R_{HB})] \times 100\ \% \quad (9)$$

55. Το ποσοστό αναστολής της πρόσληψης οξυγόνου θα πρέπει να σχεδιάζεται ως συνάρτηση του λογαρίθμου της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (καμπύλη αναστολής, βλ. σχήμα 3 του προσαρτήματος 4). Καμπύλες αναστολής σχεδιάζονται για κάθε περίοδο αερισμού διάρκειας 3 ωρών ή έπειτα από την πάροδο επιπλέον 30 λεπτών. Η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που αναστέλλει την πρόσληψη οξυγόνου κατά 50 % (EC_{50}) θα πρέπει να υπολογίζεται ή να παρεμβάλλεται με βάση τη συγκεκριμένη καμπύλη. Εάν είναι διαθέσιμα τα κατάλληλα στοιχεία, μπορούν να υπολογιστούν ή να παρεμβληθούν τα όρια εμπιστοσύνης 95 % της EC_{50}, η κλίση της καμπύλης και οι κατάλληλες τιμές που σηματοδοτούν την αρχή της αναστολής (π.χ. EC_{10} ή EC_{20}) και το τέλος της αναστολής (π.χ. EC_{80} ή EC_{90}).

56. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι, δεδομένης της συχνά παρατηρούμενης μεταβλητότητας των αποτελεσμάτων, μπορεί σε πολλές περιπτώσεις να αρκεί να εκφραστούν τα αποτελέσματα και κατά τάξεις μεγέθους, π.χ.:

EC_{50} < 1 mg/l

EC_{50} 1 mg/l έως 10 mg/l

EC_{50} 10 mg/l έως 100 mg/l

EC_{50} > 100 mg/l

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

EC_x

▼M6

57. Οι τιμές της EC_x, συμπεριλαμβανομένων των αντίστοιχων κατώτατων και ανώτατων ορίων εμπιστοσύνης 95 % για την παράμετρο, υπολογίζονται με κατάλληλες στατιστικές μεθόδους [π.χ. ανάλυση Probit, λογιστική συνάρτηση ή συνάρτηση Weibull, απλοποιημένη μέθοδος Spearman-Karber ή απλή παρεμβολή (11)]. Η EC_x λαμβάνεται εάν εισαχθεί στην εξίσωση τιμή που να αντιστοιχεί στο x % του μέσου όρου του μάρτυρα. Για τον υπολογισμό της EC_{50} ή οποιασδήποτε άλλης EC_x, οι μέσοι όροι ανά αγωγή (x) θα πρέπει να υποβάλλονται σε ανάλυση παλινδρόμησης.

Εκτίμηση NOEC

58. Εάν εφαρμόζεται στατιστική ανάλυση για τον προσδιορισμό της NOEC, είναι απαραίτητο να υπάρχουν στατιστικά στοιχεία ανά δοχείο (κάθε μεμονωμένο δοχείο θεωρείται πανομοιότυπο). Θα πρέπει να ακολουθούνται κατάλληλες στατιστικές μέθοδοι σύμφωνα με το έγγραφο του ΟΟΣΑ με τίτλο Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application (11). Γενικώς, οι δυσμενείς επιδράσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε σύγκριση με τον μάρτυρα διερευνώνται μέσω μονόπλευρου (μικρότερου) ελέγχου στατιστικής υπόθεσης με $p \leq 0,05$.

Έκθεση δοκιμής

59. Στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία

— κοινή ονομασία, χημική ονομασία, αριθμός CAS, καθαρότητα·

— φυσικοχημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας [π.χ. log K_{ow}, υδατοδιαλυτότητα, τάση ατμών, σταθερά του Henry (H) και πιθανά στοιχεία σχετικά με την πορεία της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, π.χ. προσρόφηση σε ενεργοποιημένη ιλύ]·

Σύστημα δοκιμής

— πηγή, συνθήκες λειτουργίας του σταθμού επεξεργασίας λυμάτων και φύση των εισροών που λαμβάνει, συγκέντρωση, προεπεξεργασία και διατήρηση της ενεργοποιημένης ιλύος·

Συνθήκες δοκιμής

— θερμοκρασία δοκιμής, pH κατά τη δοκιμή και διάρκεια της(των) περιόδου(-ων) έκθεσης·

Αποτελέσματα

— ειδική κατανάλωση οξυγόνου των μαρτύρων (mg O_2/(g ιλύος × h)·

— όλα τα δεδομένα που έχουν μετρηθεί, καμπύλη(-ες) αναστολής και μέθοδος υπολογισμού της EC_{50}·

— EC_{50} και, εάν είναι δυνατόν, όρια εμπιστοσύνης 95 %, κατά περίπτωση EC_{20}, EC_{80}· ενδεχομένως η NOEC και οι εφαρμοσθείσες στατιστικές μέθοδοι, εάν δεν μπορεί να προσδιοριστεί η EC_{50}·

— αποτελέσματα για την ολική αναπνοή και, κατά περίπτωση, για την ετεροτροφική αναπνοή και την αναπνοή λόγω νιτροποίησης·

— αβιοτική πρόσληψη οξυγόνου στον φυσικοχημικό μάρτυρα (που τυχόν χρησιμοποιείται)·

— ονομασία της χημικής ουσίας αναφοράς και αποτελέσματα με τη συγκεκριμένη χημική ουσία·

— κάθε παρατήρηση και παρέκκλιση από την τυποποιημένη διαδικασία που θα μπορούσε να έχει επηρεάσει τα αποτελέσματα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Brown, D., Hitz, H.R. and Schäfer, L. (1981). The assessment of the possible inhibitory effect of dyestuffs on aerobic waste-water bacteria, Experience with a screening test. *Chemosphere* 10 (3): 245-261.

▼**M6**

(2) King, E. F. and Painter H. A. (1986). Inhibition of respiration of activated sludge; variability and reproducibility of results. *Toxicity Assessment* 1(1): 27-39.

(3) ΟΟΣΑ (1984), Ενεργοποιημένη ιλύς, δοκιμή αναστολής της αναπνοής, κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 209, Κατευθυντήριες γραμμές για τις δοκιμές χημικών ουσιών, ΟΟΣΑ, Παρίσι.

(4) ISO (2007). ISO 8192 Water Quality- Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation, International Organization for Standardization (ΕΛΟΤ EN ISO 8192 Ποιότητα νερού — Δοκιμή αναστολής της κατανάλωσης οξυγόνου από την ενεργό ιλύ για την οξείδωση του άνθρακα και του αμμωνίου).

(5) Bealing, D. J. (2003). Document ISO/TC147/WGI/N.183, International Organization for Standardization.

(6) Painter, H A, Jones K (1963). The use of the wide-bore dropping-mercury electrode for the determination of the rates of oxygen uptake and oxidation of ammonia by micro-orgranisms. *Journal of Applied Bacteriology* 26 (3): 471-483.

(7) Painter, H. A. (1986). Testing the toxicity of chemicals by the inhibition of respiration of activated sludge. *Toxicity Assessment* 1:515-524.

(8) Robra, B. (1976). Wasser/Abwasser 117, 80.

(9) Fiebig S. and Noack, U. (2004). The use of copper(II)sulphate pentahydrate as reference substance in the activated sludge respiration inhibition test — συνοδεύει την κατευθυντήρια γραμμή 209 του ΟΟΣΑ. *Fresenius Environmental Bulletin* 13 No. 12b: 1556-1557.

(10) ISO (1995). ISO 10634 Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in aqueous medium, International Organization for Standardization (ΕΛΟΤ EN ISO 10634 Κατευθυντήριες οδηγίες για την παρασκευή και την επεξεργασία των ελάχιστα υδατοδιαλυτών οργανικών ενώσεων με προοπτική την αξιολόγηση της βιοδιασπασιμότητάς τους σε υδατικό περιβάλλον).

(11) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application, Series on testing and assessment No. 54, ENV/JM/MONO(2006)18, ΟΟΣΑ, Παρίσι.

▼**M6**

Προσάρτημα 1

Ορισμοί

Για την παρούσα μέθοδο δοκιμών ισχύουν οι ακόλουθοι ορισμοί:

Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα.

ECx (αποτελεσματική συγκέντρωση για επίδραση x %): η συγκέντρωση που προκαλεί επίδραση x % σε οργανισμούς δοκιμής εντός συγκεκριμένης περιόδου έκθεσης σε σύγκριση με μάρτυρα. Για παράδειγμα, η EC_{50} είναι η συγκέντρωση που εκτιμάται ότι προκαλεί επίδραση στο τελικό σημείο δοκιμής σε ποσοστό 50 % του εκτιθέμενου πληθυσμού επί καθορισμένη περίοδο έκθεσης.

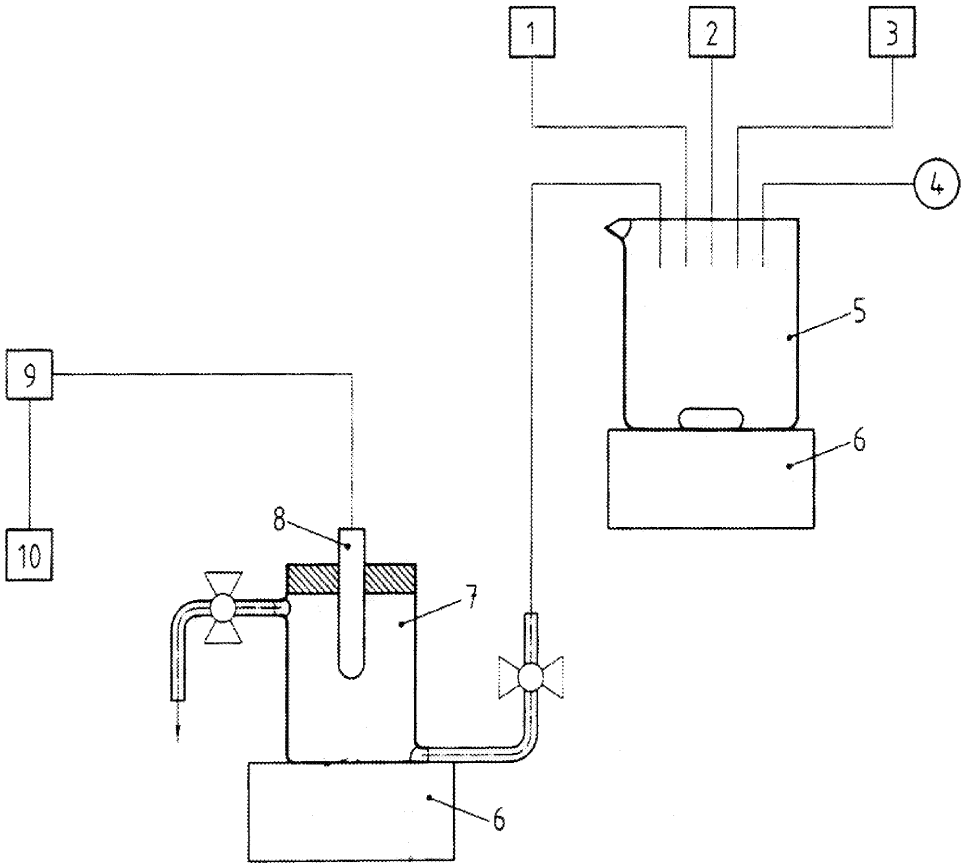
NOEC (συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης): η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην οποία δεν παρατηρείται καμία επίδραση. Στην παρούσα δοκιμή, η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στη NOEC δεν έχει στατιστικώς σημαντική επίδραση ($p < 0,05$) εντός δεδομένης περιόδου έκθεσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

▼**M6**

Προσάρτημα 2

Σχήμα 1: **Παραδείγματα συσκευών μέτρησης**



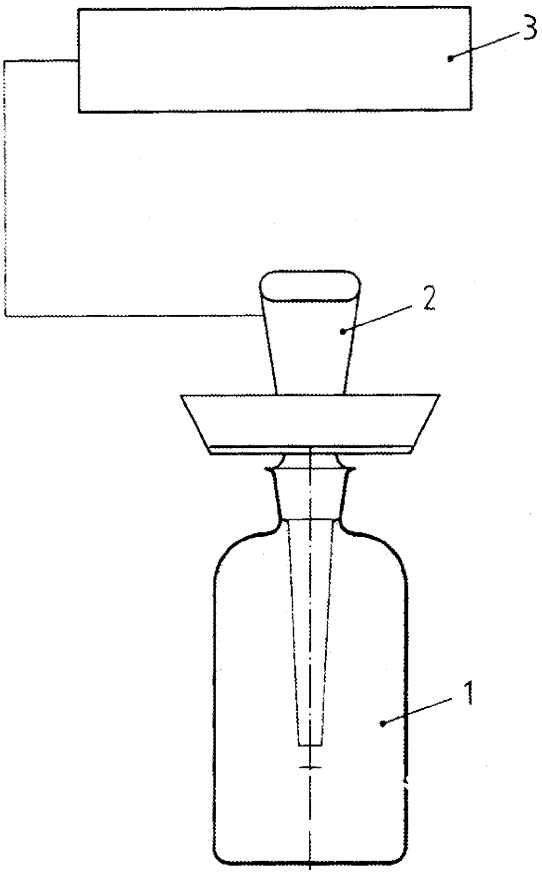
Επεξήγηση

1	ενεργοποιημένη ιλύς	6	μαγνητικός αναδευτήρας
2	συνθετικό θρεπτικό μέσο	7	κυψελίδα μέτρησης οξυγόνου
3	υπό δοκιμή χημική ουσία	8	ηλεκτρόδιο οξυγόνου
4	αέρας	9	συσκευή μέτρησης οξυγόνου
5	δοχείο ανάμειξης	10	καταγραφέας

▼**M6**

Προσάρτημα 3

Σχήμα 2: **Παράδειγμα συσκευής μέτρησης με φιάλη BOD**



Επεξήγηση

1 δοχείο δοκιμής

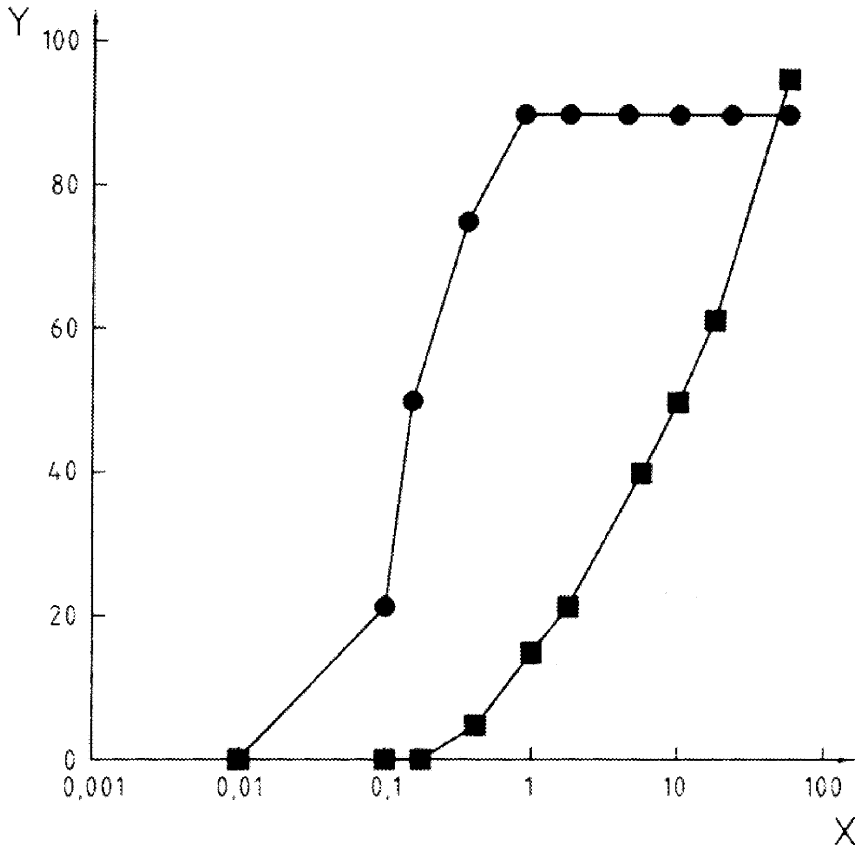
2 ηλεκτρόδιο οξυγόνου

3 συσκευή μέτρησης οξυγόνου

▼**M6**

Προσάρτημα 4

Σχήμα 3: **Παράδειγμα καμπυλών αναστολής**



Επεξήγηση

X συγκέντρωση 3,5-διχλωροφαινόλης (mg/l)

Y αναστολή (%)

■ αναστολή ετεροτροφικής αναπνοής με τη χρήση νιτροποιητικής ιλύος

● αναστολή νιτροποίησης με τη χρήση νιτροποιητικής ιλύος

▼B

Γ.12 ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ

ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ SCAS

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σκοπός της μεθόδου είναι η αξιολόγηση της ενδεχόμενης τελικής βιοαποικοδομησιμότητας υδατοδιαλυτών, μη πτητικών οργανικών ουσιών, όταν εκτίθενται σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις μικροοργανισμών για μεγάλο χρονικό διάστημα. Κατά τη διάρκεια της περιόδου αυτής η βιωσιμότητα των μικροοργανισμών εξασφαλίζεται με την καθημερινή προσθήκη διαυγασμένων λυμάτων ως υλικού τροφοδοσίας. (Για τις απαιτήσεις του Σαββατοκύριακου, τα λύματα μπορούν να φυλαχθούν στους 4 °C. Εναλλακτική δυνατότητα είναι η χρησιμοποίηση των συνθετικών λυμάτων της δοκιμασίας επιβεβαίωσης του ΟΟΣΑ.)

Είναι δυνατόν να σημειωθεί φυσικοχημική προσρόφηση των αιωρούμενων στερεών υλών, πράγμα που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων (βλέπε σημείο 3.2).

Εξαιτίας του μεγάλου χρόνου κατακράτησης της υγρής φάσης (36 ώρες) και της διακεκομμένης προσθήκης θρεπτικών υλικών, η δοκιμή δεν αποτελεί προσομοίωση των συνθηκών που απαντούν σε μια εγκατάσταση κατεργασίας λυμάτων. Τα αποτελέσματα που έχουν ληφθεί με διάφορες ελεγχόμενες ουσίες δείχνουν ότι η δοκιμή διαθέτει υψηλό δυναμικό βιοαποικοδόμησης.

O_2 συνθήκες που παρέχονται από τη δοκιμή είναι πολύ ευνοϊκές για την επιλογή ή/και την προσαρμογή μικροοργανισμών ικανών να αποικοδομήσουν την ελεγχόμενη ένωση. (Η δοκιμή μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή εγκλιματισμένων ενοφθαλμισμό των για χρήση σε άλλες δοκιμές.)

Στη μέθοδο αυτή, η μέτρηση της συγκέντρωσης του διαλυμένου οργανικού άνθρακα (DOC) χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της τελικής βιοαποικοδομησιμότητας των ελεγχόμενων ουσιών. Είναι προτιμότερο να προσδιορίζεται η τιμή DOC μετά από οξίνιση και καθαρισμό παρά σαν διαφορά μεταξύ $C_{ολικό}$ - $C_{ανόργανο}$.

Η ταυτόχρονη χρησιμοποίηση μιας ειδικής αναλυτικής μεθόδου μπορεί να επιτρέψει να εκτιμηθεί η αρχική αποικοδόμηση της ουσίας (εξαφάνιση της μητρικής χημικής σύνταξης).

Η μέθοδος μπορεί να εφαρμοσθεί μόνο στις ελεγχόμενες οργανικές ουσίες, οι οποίες, στη συγκέντρωση που χρησιμοποιείται στη δοκιμή:

— είναι διαλυτές στο νερό (τουλάχιστον 200 mg διαλυμένου οργανικού άνθρακα/l),

— έχουν αμελητέα τάση ατμών,

— δεν ασκούν ανασταλτική δράση στα βακτηρίδια,

— δεν προσροφώνται σημαντικά μέσα στο σύστημα ελέγχου,

— δεν παρουσιάζουν απώλειες μέσω αφρισμού από το διάλυμα ελέγχου.

Η περιεκτικότητα του ελεγχόμενου υλικού σε οργανικό άνθρακα πρέπει να είναι καθορισμένη.

▼B

Τα στοιχεία για τις σχετικές αναλογίες των κυριότερων συστατικών του ελεγχόμενου υλικού είναι χρήσιμο για την ερμηνεία των λαμβανομένων αποτελεσμάτων, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις χαμηλών ή οριακών αποτελεσμάτων.

Τα στοιχεία για την τοξικότητα της ουσίας απέναντι στους μικροοργανισμούς μπορεί να είναι χρήσιμα για την ερμηνεία χαμηλών αποτελεσμάτων και την επιλογή κατάλληλης συγκέντρωσης για τη δοκιμή.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

C_T = συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας, εκφρασμένη σε οργανικό άνθρακα, όπως απαντά ή προστίθεται στα διαυγασμένα λύματα στην αρχή της περιόδου αερισμού (mg/l),

C_t = συγκέντρωση διαλυμένου οργανικού άνθρακα που βρίσκεται στο υπερκείμενο υγρό της μονάδας ελέγχου στο τέλος της περιόδου αερισμού (mg/l),

C_C = συγκέντρωση διαλυμένου οργανικού άνθρακα που βρίσκεται στο υπερκείμενο υγρό του μάρτυρα στο τέλος της περιόδου αερισμού (mg/l).

Στη μέθοδο αυτή, η βιοαποικοδόμηση ορίζεται ως η εξαφάνιση του οργανικού άνθρακα και μπορεί να εκφράζεται ως:

1. το επί τοις εκατό ποσοστό απομάκρυνσης D_{da}, του ποσού της ουσίας που προστίθεται καθημερινά:

$$D_{da} = \frac{C_t - (C_T - C_c)}{C_T} \times 100 \qquad [1]$$

όπου:

D_{da} = αποικοδόμηση/καθημερινή προσθήκη·

2. το επί τοις εκατό ποσοστό απομάκρυνσης D_{53d} του ποσού της ουσίας που υπάρχει στην αρχή κάθε ημέρας:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2\ (\alpha)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2\ (\beta)]$$

όπου;

D_{ssd} = αποικοδόμηση/ουσία στην αρχή της ημέρας·

οι δείκτες i και (i+1) αναφέρονται στην ημέρα της μέτρησης.

Η εξίσωση 2(α) συνιστάται στην περίπτωση που η τιμή DOC των αποβλήτων μεταβάλλεται από ημέρα σε ημέρα, ενώ η εξίσωση 2(β) μπορεί να χρησιμοποιηθεί όταν η τιμή DOC των αποβλήτων παραμένει σχετικά σταθερή από ημέρα σε ημέρα.

▼B

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Σε ορισμένες περιπτώσεις, όταν μελετάται μια νέα ουσία, μπορεί να είναι χρήσιμες οι ουσίες αναφοράς παρόλα αυτά δεν συνιστάται στο παρόν έγγραφο καμιά ειδική ουσία αναφοράς.

Παρέχονται δεδομένα για πολλές ενώσεις που έχουν αξιολογηθεί με κυκλικές δοκιμές (βλέπε προσάρτημα 1), κυρίως για να μπορεί να γίνεται βαθμονόμηση της μεθόδου από καιρό σε καιρό και προκειμένου να επιτραπεί η σύγκριση των αποτελεσμάτων όταν χρησιμοποιείται άλλη μέθοδος.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

Σεμονάδα ενεργοποιημένης ιλύος ημισυνεχούς λειτουργίας (SCAS) τοποθετείται ενεργοποιημένη ιλύς από εγκατάσταση κατεργασίας λυμάτων. Προτίθενται η ελεγχόμενη ουσία και οικιακά λύματα που έχουν υποστεί καθίζηση και το μείγμα αερίζεται για 23 ώρες. Στη συνέχεια παύει ο αερισμός, η ιλύς αφήνεται να καθιζάνει και το υπερκείμενο υγρό απομακρύνεται.

Η ιλύς που παραμένει στο θάλαμο αερισμού αναμειγνύεται κατόπιν με νέο κλάσμα ελεγχόμενης ουσίας και λυμάτων και ο κύκλος επαναλαμβάνεται.

Η βιοαποικοδόμηση υπολογίζεται με προσδιορισμό της περιεκτικότητας του υπερκείμενου υγρού σε διαλυμένο οργανικό άνθρακα. Η τιμή αυτή συγκρίνεται με την τιμή που βρίσκεται στο υγρό που λαμβάνεται από ένα σωλήνα μάρτυρα, στον οποίο έχουν προστεθεί μόνο διαυγασμένα λύματα.

Όταν χρησιμοποιείται ειδική αναλυτική μέθοδος, μπορούν να μετρηθούν σι μεταβολές στη συγκέντρωση του μητρικού μορίου που οφείλεται στη βιοαποικοδόμηση (αρχική βιοαποικοδομησιμότητα).

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Η αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου αυτής, που βασίζεται στην απομάκρυνση του διαλυμένου οργανικού άνθρακα, δεν έχει ακόμη αποδειχθεί. (Όταν εξετάζεται η αρχική βιοαποικοδόμηση, λαμβάνονται δεδομένα μεγάλης ακρίβειας για υλικό που βιοαποικοδομείται σε μεγάλο βαθμό.)

Η ευαισθησία της μεθόδου καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τις διακυμάνσεις του τυφλού και, σε μικρότερη έκταση, από την ακρίβεια στον προσδιορισμό του διαλυμένου οργανικού άνθρακα καθώς και από τα επίπεδα της ελεγχόμενης ένωσης στο υγρό στην αρχή κάθε κύκλου.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

1.6.1. *Προετοιμασία*

Συναρμολογείται επαρκής αριθμός καθαρών μονάδων αερισμού (εναλλακτική δυνατότητα είναι η χρησιμοποίηση της πρωτότυπης μονάδας ελέγχου SCAS των 1,5 l) και σωλήνων εισαγωγής του αέρα (σχήμα 1) για κάθε ελεγχόμενη ουσία και για τους μάρτυρες. Ο συμπιεσμένος αέρας, που διοχετεύεται στις μονάδες ελέγχου, αφού καθαριστεί με τη βοήθεια ηθμού από φαρμακευτικό βαμβάκι, πρέπει να είναι απαλλαγμένος από οργανικό άνθρακα και να έχει προηγουμένως κορεσθεί με νερό ώστε να ελαττωθούν οι απώλειες που οφείλονται σε εξάτμιση.

Από εγκατάσταση ενεργοποιημένης ιλύος, που επεξεργάζεται κυρίως αστικά λύματα, λαμβάνεται δείγμα ανάμεικτου υγρού με περιεκτικότητα 1 έως 4 g αιωρούμενων στερεών. Για κάθε μονάδα αερισμού απαιτούνται κατά προσέγγιση 150 ml ανάμεικτου υγρού.

▼B

Παρασκευάζονται μητρικά διαλύματα της ελεγχόμενης ουσίας σε απεσταγμένο νερό απαιτείται συνήθως συγκέντρωση 400 mg/l σε οργανικό άνθρακα, που δίνει συγκέντρωση ελεγχόμενης ουσίας

20 mg/l σε οργανικό άνθρακα στην αρχή κάθε κύκλου αερισμού, εφόσον δεν σημειώνεται καθόλου βιοαποικοδόμηση.

Επιτρέπονται και υψηλότερες συγκεντρώσεις, εφόσον το επιτρέπει η τοξικότητα απέναντι στους μικροοργανισμούς.

Μετράται η περιεκτικότητα των μητρικών διαλυμάτων σε οργανικό άνθρακα.

1.6.2. *Συνθήκες της δοκιμής*

Η δοκιμή θα πρέπει να εκτελείται στους 20 έως 25 °C

Χρησιμοποιείται υψηλή συγκέντρωση αερόβιων μικροοργανισμών (από I έως 4 g/l αιωρούμενων στερεών υλών) και ο πραγματικός χρόνος κατακράτησης είναι 36 ώρες. Το ανθρακούχο υλικό στα λύματα τροφοδότησης οξειδώνεται εξαντλητικά, συνήθως μέσα σε οκτώ ώρες μετά την έναρξη κάθε κύκλου αερισμού. Στη συνέχεια, η ιλύς αναπνέει ενδογενώς για το υπόλοιπο της περιόδου αερισμού, διάστημα κατά το οποίο το μόνο διαθέσιμο υπόστρωμα είναι η ελεγχόμενη ένωση, εκτός εάν και αυτή μεταβολίζεται εύκολα. Τα χαρακτηριστικά αυτά, σε συνδυασμό με τον καθημερινό επανεμβολιασμό του ελέγχου με εμβόλιο από αστικά λύματα, παρέχουν εξαιρετικά ευνοϊκές συνθήκες τόσο για εγκλιματισμό όσο και για μεγάλους βαθμούς βιοαποικοδόμησης.

1.6.3. *Εκτέλεση της δοκιμασίας*

Λαμβάνεται δείγμα ανάμεικτου υγρού από κατάλληλη εγκατάσταση ενεργοποιημένης ιλύος επεξεργασίας αστικών κυρίως λυμάτων ή εργαστηριακή μονάδα και διατηρείται σε αερόβιες συνθήκες μέχρι να χρησιμοποιηθεί στο εργαστήριο. Σε κάθε μονάδα αερισμού καθώς και στη μονάδα μάρτυρα μεταφέρονται 150 ml (όταν χρησιμοποιείται η πρωτότυπη μονάδα ελέγχου SCAS, να πολλαπλασιάζονται οι αναφερόμενοι όγκοι επί 10) ανάμεικτου υγρού και αρχίζει ο αερισμός, Μετά από 23 ώρες ο αερισμός σταματά και η ιλύς αφήνεται να καθιζάνει για 45 λεπτά. Ανοίγεται η στρόφιγγα κάθε δοχείου με τη σειρά και αφαιρούνται ποσότητες 100 ml από το υπερκείμενο υγρό. Λαμβάνεται δείγμα διαυγασμένων αστικών λυμάτων αμέσως πριν από τη χρήση και 100 ml από αυτό προστίθενται στην ιλύ που έχει απομείνει σε κάθε μονάδα αερισμού, Αρχίζει πάλι ο αερισμός. Στο στάδιο αυτό δεν προστίθενται ελεγχόμενα υλικά και οι μονάδες τροφοδοτούνται καθημερινά μόνο με αστικά λύματα, μέχρι να ληφθεί καθαρό υπερκείμενο υγρό μετά την καθίζηση. Η διαδικασία αυτή απαιτεί συνήθως δύο εβδομάδες, στο τέλος των οποίων ο διαλυμένος οργανικός άνθρακας που περιέχεται στο υπερκείμενο υγρό στο τέλος κάθε κύκλου αερισμού πλησιάζει μια σταθερή τιμή.

Στο τέλος της περιόδου αυτής αναμειγνύονται οι επιμέρους διαυγασμένες ιλύες και σε κάθε μονάδα προστίθενται 50 ml της προκύπτουσας σύνθετης ιλύος.

Στις μονάδες μάρτυρες προστίθενται 100 ml διαυγασμένων λυμάτων, ενώ στις μονάδες ελέγχου 95 ml συν 5 ml από το κατάλληλο μητρικό διάλυμα της ελεγχόμενης ουσίας (400 mg/l). Αρχίζει πάλι ο αερισμός, που συνεχίζεται για 23 ώρες. Η ιλύς αφήνεται κατόπιν να καθιζάνει για 45 λεπτά και το υπερκείμενο υγρό αφαιρείται και αναλύεται για την περιεκτικότητά του σε διαλυμένο οργανικό άνθρακα.

Η παραπάνω διαδικασία πλήρωσης και αφαίρεσης επαναλαμβάνεται καθημερινά σε όλη τη διάρκεια της δοκιμασίας.

▼B

Πριν από την καθίζηση είναι πιθανόν να χρειαστεί καθαρισμός των τοιχωμάτων των μονάδων, ώστε να αποτραπεί η συσσώρευση στερεών υλών πάνω από τη στάθμη του υγρού, Για κάθε μονάδα χρησιμοποιείται διαφορετικό ξέστρο ή ψήκτρα, ώστε να αποφευχθεί η αλληλομόλυνση.

Θεωρητικά, ο διαλυμένος οργανικός άνθρακας στα υπερκείμενα υγρά προσδιορίζεται καθημερινά, παρόλο που επιτρέπονται και λιγότερο συχνές αναλύσεις. Πριν από την ανάλυση, τα υγρά διηθούνται μέσω διηθητικών μεμβρανών των 0,45 μm, που έχουν υποστεί έκπλυση ή φυγοκεντρούνται. Οι διηθητικές μεμβράνες είναι κατάλληλες, εφόσον εξασφαλίζεται ότι δεν ελευθερώνουν άνθρακα ούτε προσροφούν την ουσία στο στάδιο της διήθησης. Η θερμοκρασία του δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει τους 40 °C, όταν αυτό βρίσκεται στη φυγόκεντρο.

Η διάρκεια της δοκιμασίας για ουσίες που παρουσιάζουν μικρή ή δεν παρουσιάζουν καθόλου βιοαποικοδόμηση είναι απροσδιόριστη, αλλά από την πείρα προκύπτει ότι θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 12 εβδομάδες κατά κανόνα, όχι όμως μεγαλύτερη από 26 εβδομάδες.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ**

Χαράσσεται καμπύλη των τιμών του διαλυμένου οργανικού άνθρακα στα υπερκείμενα υγρά των μονάδων ελέγχου και των μονάδων μαρτύρων συναρτήσει του χρόνου.

Όταν ολοκληρώνεται η βιοαποικοδόμηση, τα επίπεδα που βρίσκονται στη μονάδα ελέγχου τείνουν να πλησιάσουν τα επίπεδα του μάρτυρα. Μόλις διαπιστωθεί ότι η διαφορά μεταξύ των δύο επιπέδων είναι σταθερή επί τρεις διαδοχικές μετρήσεις, εκτελούνται τόσες περαιτέρω μετρήσεις όσες αρκούν για να επιτρέψουν τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων και υπολογίζεται η επί τοις εκατό βιοαποικοδόμηση της ελεγχόμενης ένωσης (D_{da} ή D_{ssd}, βλέπε σημείο 1.2).

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Η έκθεση των αποτελεσμάτων της δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει:

— κάθε πληροφορία για το είδος των λυμάτων, τον τύπο της μονάδας που χρησιμοποιήθηκε και τα πειραματικά αποτελέσματα σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία, την ουσία αναφοράς, εφόσον χρησιμοποιήθηκε, και τον τυφλό προσδιορισμό,

— τη θερμοκρασία,

— την καμπύλη απομάκρυνσης με περιγραφή, του τρόπο υπολογισμού (βλέπε σημείο 1.2).

— την ημερομηνία και την τοποθεσία της δειγματοληψίας για την ενεργοποιημένη ιλύ και τα λύματα, την κατάσταση προσαρμογής, τη συγκέντρωση κλπ.,

— τους επιστημονικούς λόγους για τυχόν αλλαγές στην πειραματική διαδικασία,

— υπογραφή και ημερομηνία.

▼B

3.2. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Δεδομένου ότι η ουσία που πρόκειται να ελεγχθεί με τη μέθοδο αυτή δεν μπορεί εύκολα να βιοαποικοδομηθεί, οποιαδήποτε απομάκρυνση DOC οφειλόμενη αποκλειστικά σε βιοαποικοδόμηση θα είναι κανονικά σταδιακή σε διάστημα ημερών ή εβδομάδων, εκτός από τις περιπτώσεις κατά τις οποίες εκδηλώνεται αιφνίδιος εγκλιματισμός, πράγμα που φαίνεται από μια ραγδαία εξαφάνιση μετά από μερικές εβδομάδες.

Η φυσικοχημική ωστόσο προσρόφηση μπορεί μερικές φορές να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο αυτό φαίνεται με την πλήρη ή μερική απομάκρυνση του DOC που έχει προστεθεί στην αρχή. Το τι θα συμβεί κατόπιν εξαρτάται από παράγοντες όπως οι βαθμοί προσρόφησης και η συγκέντρωση αιωρούμενων στερεών στα απόβλητα που αποχύνονται. Συνήθως, η διαφορά μεταξύ των συγκεντρώσεων DOC στα υπερκείμενα υγρά του μάρτυρα και της μονάδας ελέγχου αυξάνεται σταδιακά από την αρχικά χαμηλή τιμή και η διαφορά αυτή παραμένει κατόπιν στα νέα επίπεδα για το υπόλοιπο μέρος του πειράματος, εκτός αν συμβεί εγκλιματισμός.

Για να γίνει διάκριση ανάμεσα στη βιοαποικοδόμηση (ή τη μερική βιοαποικοδόμηση) και την προσρόφηση απαιτούνται περισσότερα πειράματα. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους, ο πειστικότερος όμως είναι να χρησιμοποιηθεί το υπερκείμενο υγρό ή η ιλύς ως ενοφθάλμισμα σε μια δοκιμασία βασικής σειράς (base-set test) (κατά προτίμηση δοκιμασία αναπνοομετρίας).

Οι ελεγχόμενες ουσίες που παρουσιάζουν μεγάλη, μη οφειλόμενη σε προσρόφηση απομάκρυνση του DOC στη δοκιμασία αυτή, θα πρέπει να θεωρούνται ως ισχυρά βιοαποικοδομήσιμες. Η μερική, μη οφειλόμενη σε προσρόφηση απομάκρυνση δείχνει ότι η χημική ένωση επιδέχεται βιοαποικοδόμηση τουλάχιστον ως ένα βαθμό.

Η χαμηλή ή μηδενική απομάκρυνση DOC μπορεί να οφείλεται σε αναστολή των μικροοργανισμών από την ελεγχόμενη ουσία, και αυτό μπορεί επίσης να φανεί με τη λύση και την απώλεια ιλύος, που οδηγεί σε θολά υπερκείμενα υγρά. Η δοκιμασία θα πρέπει να επαναληφθεί με χαμηλότερη συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας.

Η χρήση μιας ειδικής αναλυτικής μεθόδου ή σημασμένης ελεγχόμενης ουσίας με ισότοπο ^{14}C μπορεί να επιτρέψει μεγαλύτερη ευαισθησία. Στην περίπτωση ελεγχόμενης ουσίας με ^{14}C, η ανάκτηση του $^{14}C0_2$ επιβεβαιώνει ότι έχει σημειωθεί βιοαποικοδόμηση.

Όταν τα αποτελέσματα εκφράζονται σε αρχική βιοαποικοδόμηση, θα πρέπει, αν είναι δυνατόν, να επεξηγείται η αλλαγή στη χημική σύνταξη, που οδηγεί σε απώλεια της απόκρισης της μητρικής ελεγχόμενης ουσίας.

Η εγκυρότητα της αναλυτικής μεθόδου πρέπει να αναφέρεται μαζί με την απόκρισή της κατά τον προσπορισμό της στον τυφλό έλεγχο.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

(1) ΟΟΣΑ, Παρίσι, 1982, *Test Guideline 302 A,* απόφαση του Συμβουλίου C(81) 30 τελικό.

▼B

Προσάρτημα 1

Δοκιμασία SCAS: παράδειγμα αποτελεσμάτων

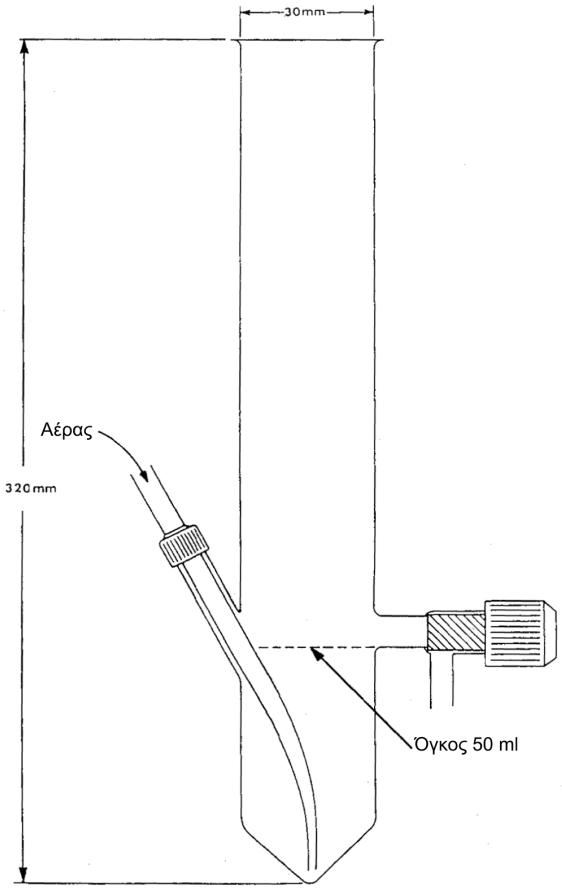
Ουσία	C_T (mg/l)	C_t - C_c (mg/l)	Εκατοστιαίο ποσοστό βιοαποικοδόμησης D_{da}	Διάρκεια δοκιμασίας (ημέρες)
Θειικό άλας του 4-ακετυλο-αμινοβενζολίου	17,2	2,0	85	40
Θειικό άλας του τετρα-προπυλενο-βενζολίου	17,3	8,4	51,4	40
4-Νιτροφαινόλη	16,9	0,8	95,3	40
Διαιθυλενογλυκόλη	16,5	0,2	98,8	40
Ανιλίνη	16,9	1,7	95,9	40
Τετρα-καρβοξυλικό άλας του κυκλοπεντανίου	17,9	3,2	81,1	120

▼B

Προσάρτημα 2

Παράδειγμα συσκευής δοκιμασίας

Σχήμα 1



▼M7

Γ.13. ΒΙΟΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΣΕ ΨΆΡΙΑ: ΥΔΑΤΙΚΉ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΉ ΈΚΘΕΣΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 305 του ΟΟΣΑ (2012). Ο βασικός στόχος της παρούσας αναθεώρησης της μεθόδου δοκιμών είναι διττός. Πρώτον, επιδιώκεται να ενσωματωθεί στη μέθοδο μια δοκιμή διατροφικής βιοσυσσώρευσης ([1]) κατάλληλη για τον προσδιορισμό του δυναμικού βιοσυσσώρευσης ουσιών με πολύ χαμηλή υδατοδιαλυτότητα. Δεύτερον, επιδιώκεται να καταρτιστεί μια μέθοδος δοκιμών που, για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων, απαιτεί τη χρήση μικρότερου αριθμού ψαριών, κατά περίπτωση, και είναι οικονομικά αποδοτικότερη.

Στο διάστημα που μεσολάβησε από τη θέσπιση της κωδικοποιημένης μεθόδου δοκιμών Γ.13 (1), υποβλήθηκαν σε δοκιμές πολυάριθμες ουσίες και τόσο τα εργαστήρια όσο και οι ρυθμιστικές αρχές απόκτησαν σημαντική πείρα. Κατόπιν τούτου, διαμορφώθηκε η πεποίθηση ότι η πολυπλοκότητα της δοκιμής μπορεί να μειωθεί, εάν πληρούνται συγκεκριμένα κριτήρια (βλ. παράγραφο 88), και ότι είναι δυνατή η εφαρμογή κλιμακωτής προσέγγισης. Η πείρα έχει επίσης δείξει ότι βιολογικοί παράγοντες όπως η ανάπτυξη και το λιπιδικό περιεχόμενο των ψαριών μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τα αποτελέσματα και θα πρέπει ενδεχομένως να λαμβάνονται υπόψη. Επιπλέον, αναγνωρίζεται πλέον ότι η δοκιμή πολύ δυσδιάλυτων στο νερό ουσιών μπορεί να μην είναι τεχνικά εφικτή. Επιπλέον, για τις ουσίες πολύ χαμηλής υδατοδιαλυτότητας στο υδάτινο περιβάλλον, η έκθεση μέσω του νερού ενδέχεται να έχει περιορισμένη σημασία σε σχέση με τη διατροφική οδό. Για τους λόγους αυτούς, αναπτύχθηκε μέθοδος δοκιμών σύμφωνα με την οποία τα ψάρια εκτίθενται μέσω της διατροφής τους (βλ. παραγράφους 7-14 και 97 και επόμενες). Η επικύρωση [διεργαστηριακή δοκιμή τεχνικής ικανότητας (ring test)] της δοκιμής διατροφικής έκθεσης πραγματοποιήθηκε το 2010 (51).

Στις βασικές αλλαγές συγκαταλέγονται οι ακόλουθες:

— Η εξέταση μόνο μίας συγκέντρωσης δοκιμής μπορεί να θεωρηθεί επαρκής, όταν ο συντελεστής βιοσυγκέντρωσης (Bioconcentration Factor/BCF) είναι πιθανότατα ανεξάρτητος από τη συγκέντρωση δοκιμής.

— Προβλέπεται σχεδιασμός ελαχιστοποιημένης δοκιμής υδατικής έκθεσης, ο οποίος παρέχει τη δυνατότητα μείωσης των χρονικών σημείων δειγματοληψίας, εάν πληρούνται συγκεκριμένα κριτήρια.

— Θα πρέπει να μετράται η περιεκτικότητα των ψαριών σε λιπίδια, ώστε ο BCF να μπορεί να εκφράζεται με αναγωγή σε περιεκτικότητα 5 % σε λιπίδια.

— Δίνεται μεγαλύτερη έμφαση στην εκτίμηση του κινητικού BCF (όταν είναι εφικτή) παράλληλα με την εκτίμηση του BCF σε σταθερή κατάσταση.

— Για ορισμένες ομάδες ουσιών, προτείνεται δοκιμή διατροφικής έκθεσης, όταν αυτή κρίνεται καταλληλότερη από τη δοκιμή υδατικής έκθεσης.

— Θα πρέπει να μετράται το βάρος των ψαριών, ώστε να είναι δυνατή η διόρθωση του κινητικού BCF_k ως προς την αναπτυξιακή αραίωση.

Πριν από τη διεξαγωγή οποιασδήποτε από τις δοκιμές βιοσυσσώρευσης, θα πρέπει να είναι γνωστά τα ακόλουθα στοιχεία σχετικά με την υπό δοκιμή χημική ουσία:

α) Ευαισθησία της αναλυτικής τεχνικής για τη μέτρηση των συγκεντρώσεων, τόσο της υπό δοκιμή ουσίας όσο και των πιθανών μεταβολιτών, στους ιστούς και στο νερό ή την τροφή (βλ. παράγραφο 65).

β) Υδατοδιαλυτότητα [μέθοδος δοκιμών Α.6· (2)]· θα πρέπει να προσδιορίζεται σύμφωνα με μέθοδο κατάλληλη για το (εκτιμώμενο) εύρος τιμών διαλυτότητας, ώστε να προκύπτει αξιόπιστη τιμή. Για τις υδρόφοβες ουσίες, κατάλληλη είναι γενικά η μέθοδος έκλουσης στήλης.

([1]) Βλ. προσάρτημα 1 για τους ορισμούς και τις μονάδες

▼M7

γ) Συντελεστής κατανομής σε μίγμα n-οκτανόλης/νερού, K_{OW} [1] [μέθοδοι δοκιμών Α.8 (4), Α.24 (5), Α.23 (6)]· ή άλλες κατάλληλες πληροφορίες σχετικά με τη συμπεριφορά κατανομής (π.χ. ρόφηση σε λιπίδια, K_{OC}). Ο συντελεστής K_{OW} θα πρέπει να προσδιορίζεται σύμφωνα με μέθοδο κατάλληλη για το (εκτιμώμενο) εύρος τιμών του, ώστε να προκύπτει αξιόπιστη τιμή. Για τις υδρόφοβες ουσίες, κατάλληλη είναι, κατά κανόνα, η μέθοδος της αργής ανάδευσης [μέθοδος δοκιμών Α.23 (6)].

δ) Σταθερότητα της ουσίας στο νερό (υδρόλυση) [μέθοδος δοκιμών Γ.7 (7)].

ε) Σταθερότητα της ουσίας στην τροφή (ιδίως όταν επιλέγεται η προσέγγιση της διατροφικής έκθεσης για τη δοκιμή).

στ) Στοιχεία σχετικά με τον φωτομετασχηματισμό, που έχουν σημασία για τις συνθήκες ακτινοβολίας κατά τη δοκιμή (8).

ζ) Επιφανειακή τάση (για ουσίες των οποίων ο log K_{OW} δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστεί) [μέθοδος δοκιμών Α.5 (9)].

η) Τάση ατμών [μέθοδος δοκιμών Α.4 (10)].

θ) Κάθε πληροφορία σχετικά με τη βιοτική ή αβιοτική αποδόμηση στα ύδατα, όπως (ενδεικτικά) η άμεση βιοαποδομησιμότητα [μέθοδοι δοκιμών Γ.4, μέρη II έως VII (11), Γ.29 (12)], κατά περίπτωση.

ι) Πληροφορίες σχετικά με τους μεταβολίτες: δομή, log K_{OW}, σχηματισμός και αποδομησιμότητα, κατά περίπτωση.

ια) Σταθερά διάστασης οξέος (pK_a) για ουσίες που είναι πιθανόν να ιοντίζονται. Εάν είναι αναγκαίο, το pH του νερού δοκιμής θα πρέπει να ρυθμίζεται σε τιμή που εξασφαλίζει ότι η ουσία δεν είναι ιοντισμένη κατά τη δοκιμή, αν αυτό είναι συμβατό με το είδος ψαριών.

Ανεξάρτητα από τη μέθοδο έκθεσης ή το σχήμα δειγματοληψίας που επιλέγεται, στην παρούσα μέθοδο δοκιμών περιγράφεται διαδικασία για τον χαρακτηρισμό του δυναμικού βιοσυσσώρευσης ουσιών σε ψάρια. Αν και τα συστήματα δοκιμής με συνεχή ροή είναι κατά πολύ προτιμότερα, επιτρέπεται η χρήση ημιστατικών συστημάτων υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται τα κριτήρια εγκυρότητας (βλ. παραγράφους 24 και 113). Στην έκθεση μέσω της διατροφικής οδού, το σύστημα συνεχούς ροής δεν είναι απαραίτητο για τη διατήρηση των συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή ουσίας στο νερό, αλλά διευκολύνει τη διατήρηση επαρκών συγκεντρώσεων διαλυμένου οξυγόνου και συμβάλλει στην εξασφάλιση καθαρού νερού και στην εξάλειψη των επιδράσεων, λόγου χάριν, των προϊόντων απέκκρισης.

Ανεξάρτητα από την επιλεγόμενη δοκιμή, στην παρούσα μέθοδο δοκιμών παρέχονται επαρκείς λεπτομέρειες για τη διεξαγωγή της δοκιμής, ενώ παράλληλα παρέχεται ελευθερία για την προσαρμογή του σχεδιασμού του πειράματος στις συνθήκες του εκάστοτε εργαστηρίου και στα ποικίλα χαρακτηριστικά των υπό δοκιμή ουσιών. Η δοκιμή υδατικής έκθεσης εφαρμόζεται κατά προτίμηση σε σταθερές οργανικές ουσίες με τιμές log K_{OW} που κυμαίνονται μεταξύ 1,5 και 6,0 (13), αλλά μπορεί να εφαρμοστεί και σε έντονα υδρόφοβες ουσίες (με log K_{OW} > 6,0), εάν μπορεί να αποδειχθεί ότι η υπό δοκιμή ουσία διαλύεται πλήρως στο νερό και διατηρεί σταθερή τη συγκέντρωσή της. Εάν δεν είναι δυνατόν να αποδειχθεί η σταθερότητα της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στο νερό, η μελέτη υδατικής έκθεσης δεν θα είναι κατάλληλη και, συνεπώς, θα απαιτείται η διατροφική προσέγγιση για τη δοκιμή της ουσίας σε ψάρια (αν και η ερμηνεία και η χρήση των αποτελεσμάτων της διατροφικής δοκιμής μπορεί να εξαρτώνται από το ρυθμιστικό πλαίσιο). Προεκτιμήσεις του συντελεστή βιοσυγκέντρωσης (BCF, συμβολίζεται ενίοτε και ως K_B) για οργανικές ουσίες με τιμές log K_{OW} περίπου έως 9,0 μπορούν να ληφθούν με τη χρήση της εξίσωσης των Bintein και συν. (14). Η προεκτίμηση του συντελεστή βιοσυγκέντρωσης για τέτοιου είδους

[1] Ορισμένες φορές δηλώνεται με το σύμβολο P_{OW}· προσδιορίζεται με μέθοδο ανακινούμενης φιάλης κατά τη μέθοδο δοκιμών Α.8 (3), με HPLC κατά τη μέθοδο δοκιμών Α.24 (4) και με μέθοδο αργής ανάδευσης κατά τη μέθοδο δοκιμών Α.23 (5). Για τον προσδιορισμό του log K_{OW} χρησιμοποιείται περιστασιακά η τεχνική της κατανομής σε στήλη (generator column). Ο αριθμός των διαθέσιμων μελετών στις οποίες έχει χρησιμοποιηθεί η τεχνική αυτή, κυρίως για τα χλωριωμένα διφαινύλια και τις διβενζοδιοξίνες, είναι περιορισμένος (π.χ. Li και Doucette, 1993) (3). Για ουσίες που είναι πιθανόν να ιοντίζονται, ο log K_{OW} θα πρέπει να αναφέρεται στη μη ιοντισμένη μορφή.

▼M7

έντονα υδρόφοβες ουσίες ενδέχεται να είναι υψηλότερη από την τιμή του συντελεστή βιοσυγκέντρωσης σε σταθερή κατάσταση (BCF_{SS}) που αναμένεται να προκύψει από εργαστηριακά πειράματα, ιδίως όταν χρησιμοποιείται απλό γραμμικό μοντέλο για την προεκτίμηση. Οι παράμετροι που χαρακτηρίζουν το δυναμικό βιοσυσσώρευσης περιλαμβάνουν τη σταθερά ρυθμού πρόσληψης (k_1), τις σταθερές ρυθμού απώλειας που περιλαμβάνουν τη σταθερά ρυθμού αποβολής (k_2), τον συντελεστή βιοσυγκέντρωσης σε σταθερή κατάσταση (BCF_{SS}), τον κινητικό συντελεστή βιοσυγκέντρωσης (BCF_K) και τον διατροφικό συντελεστή βιομεγέθυνσης (BMF) ([1]).

Οι ραδιοσημασμένες υπό δοκιμή ουσίες μπορούν να διευκολύνουν την ανάλυση δειγμάτων νερού, τροφής και ψαριών και επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται για να διαπιστώνεται αν είναι αναγκαίο να γίνει ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση μεταβολιτών. Εάν μετρώνται μόνο τα ολικά ραδιενεργά κατάλοιπα (π.χ. με καύση ή με διαλυτοποίηση ιστών), ο BCF ή ο BMF βασίζεται στο σύνολο της μητρικής ουσίας, τυχόν κατακρατούμενων μεταβολιτών και του αφομοιωμένου άνθρακα. Οι τιμές BCF ή BMF που βασίζονται στα ολικά ραδιενεργά κατάλοιπα ενδέχεται να μην είναι, συνεπώς, ευθέως συγκρίσιμες με τις τιμές του BCF ή του BMF που προκύπτουν από ειδική χημική ανάλυση μόνο της μητρικής ουσίας. Στις μελέτες με ραδιοσήμανση μπορούν να χρησιμοποιούνται, πριν από την ανάλυση, διαδικασίες διαχωρισμού, όπως οι TLC, HPLC ή GC ([2]), με σκοπό τον προσδιορισμό του BCF ή του BMF με βάση τη μητρική ουσία. Όταν εφαρμόζονται τεχνικές διαχωρισμού, θα πρέπει να γίνεται ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση της μητρικής ουσίας και των σχετικών μεταβολιτών ([3]) (βλ. παράγραφο 65), εάν ο BCF ή ο BMF πρόκειται να βασίζεται στη συγκέντρωση της μητρικής ουσίας στα ψάρια και όχι στα ολικά ραδιοσημασμένα κατάλοιπα. Είναι επίσης δυνατόν να συνδυαστεί μια μελέτη μεταβολισμού σε ψάρια ή κατανομής in vivo με μελέτη βιοσυσσώρευσης με ανάλυση και ταυτοποίηση των καταλοίπων σε ιστούς. Η πιθανότητα μεταβολισμού μπορεί να προβλεφθεί με κατάλληλα εργαλεία [π.χ. εργαλειοθήκη QSAR του ΟΟΣΑ (15) ή ιδιόκτητα προγράμματα QSAR].

Η απόφαση για το αν θα διεξαχθεί δοκιμή υδατικής ή διατροφικής έκθεσης και με ποιο σχεδιασμό θα πρέπει να βασίζεται σε συνεκτίμηση των παραγόντων της παραγράφου 3 και του σχετικού ρυθμιστικού πλαισίου. Για παράδειγμα, για ουσίες με υψηλό K_{OW} που παρουσιάζουν, όμως, ικανοποιητική υδατοδιαλυτότητα σε σχέση με την ευαισθησία των διαθέσιμων αναλυτικών τεχνικών, θα πρέπει να εξετάζεται πρώτα η δυνατότητα διεξαγωγής δοκιμής υδατικής έκθεσης. Επειδή, ωστόσο, είναι πιθανόν τα στοιχεία για την υδατοδιαλυτότητα να μην είναι οριστικά γι' αυτά τα είδη υδρόφοβων ουσιών, θα πρέπει να εξετάζεται η δυνατότητα επίτευξης σταθερών, μετρήσιμων συγκεντρώσεων διαλυμένης ουσίας στο νερό (δεν επιτρέπονται τα σταθερά γαλακτώματα) που να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μελέτη υδατικής έκθεσης, πριν από τη λήψη απόφασης για τη μέθοδο δοκιμών που θα χρησιμοποιηθεί (16). Δεν είναι δυνατόν να δοθούν ακριβείς αναλυτικές οδηγίες σχετικά με τη μέθοδο που πρέπει να χρησιμοποιείται με βάση κριτήρια αποκλεισμού σχετικά με την υδατοδιαλυτότητα και τον συντελεστή κατανομής σε μείγμα οκτανόλης-νερού, διότι και άλλοι παράγοντες (αναλυτικές τεχνικές, αποδόμηση, προσρόφηση κ.λπ.) μπορούν να έχουν σημαντική επίδραση στην εφαρμοσιμότητα της μεθόδου για τους προαναφερθέντες λόγους. Ωστόσο, τιμές log K_{OW} υψηλότερες από 5 και υδατοδιαλυτότητας χαμηλότερες από ~0,01-0,1 mg/l οριοθετούν το φάσμα ουσιών για τις οποίες η διεξαγωγή δοκιμών υδατικής έκθεσης ενδεχομένως καθίσταται πιο δύσκολη.

Θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη και άλλοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την επιλογή δοκιμής, όπως το δυναμικό προσρόφησης της ουσίας στα δοχεία και τα όργανα της δοκιμής, η σταθερότητά της σε υδατικό διάλυμα σε σχέση με τη σταθερότητά της στην ιχθυοτροφή (17) (18) κ.λπ.

Πληροφορίες σχετικά με αυτές τις πρακτικές πτυχές μπορεί να είναι διαθέσιμες από άλλες ολοκληρωμένες μελέτες υδατικής έκθεσης. Πρόσθετες πληροφορίες για την αξιολόγηση των πτυχών που αφορούν τη διεξαγωγή μελετών βιοσυσσώρευσης είναι διαθέσιμες στη βιβλιογραφία [π.χ. (19)].

Όσον αφορά τις ουσίες για τις οποίες η διαλυτότητα ή η διατήρηση των συγκεντρώσεων στο νερό, καθώς και η ανάλυση των συγκεντρώσεων αυτών δεν

([1]) Βλ. ορισμούς και μονάδες στο προσάρτημα 1

([2]) TLC: Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας· HPLC: υγροχρωματογραφία υψηλής πίεσης (απόδοσης)· GC: αεριοχρωματογραφία,

([3]) Βάσει ορισμένων ρυθμιστικών πλαισίων, η ανάλυση των μεταβολιτών ενδέχεται να είναι υποχρεωτική υπό ορισμένες προϋποθέσεις (βλ. παράγραφο 65).

▼M7

θέτουν περιορισμούς στην εφαρμογή μεθόδου υδατικής έκθεσης, αυτή είναι η προτιμώμενη μέθοδος για τον προσδιορισμό του δυναμικού βιοσυγκέντρωσης της ουσίας. Σε κάθε περίπτωση, θα πρέπει να επαληθεύεται ότι οι συγκεντρώσεις υδατικής έκθεσης που θα εφαρμοστούν είναι εντός της υδατοδιαλυτότητας στα μέσα δοκιμής. Μπορούν να χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι για τη διατήρηση σταθερών συγκεντρώσεων της διαλυμένης υπό δοκιμή ουσίας, όπως η χρήση διαλυμάτων παρακαταθήκης ή παθητικών δοσιμετρικών συστημάτων (π.χ. μέθοδος έκλουσης στήλης), εφόσον είναι δυνατόν να αποδειχθεί ότι οι συγκεντρώσεις διατηρούνται σταθερές και τα μέσα της δοκιμής δεν διαφέρουν από τα συνιστώμενα στην παράγραφο 27.

Για εξαιρετικά υδρόφοβες ουσίες (με log K_{OW} > 5 και διαλυτότητα μικρότερη από ~ 0,01-0,1 mg/l), η δοκιμή μέσω υδατικής έκθεσης μπορεί να γίνεται σταδιακά δυσκολότερη. Οι λόγοι που επιβάλλουν περιορισμούς μπορεί να είναι το ότι η συγκέντρωση στο νερό δεν μπορεί να διατηρηθεί σε επίπεδο που θεωρείται επαρκώς σταθερό (π.χ. εξαιτίας ρόφησης στο γυαλί των δοχείων έκθεσης ή ταχείας πρόσληψης από τα ψάρια) ή το ότι πρόκειται να χρησιμοποιηθούν τόσο χαμηλές συγκεντρώσεις στο νερό, ώστε να είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με το όριο ποσοτικοποίησης ή και χαμηλότερες ([1]). Για τις εν λόγω εξαιρετικά υδρόφοβες ουσίες, συνιστάται η δοκιμή διατροφικής έκθεσης, υπό την προϋπόθεση ότι είναι σύμφωνη με το σχετικό ρυθμιστικό πλαίσιο και τις απαιτήσεις εκτίμησης κινδύνου.

Για τις επιφανειοδραστικές (τασιενεργές) ουσίες θα πρέπει να εξετάζεται κατά πόσον είναι εφικτή η δοκιμή βιοσυγκέντρωσης με υδατική έκθεση, λαμβανομένων υπόψη των ιδιοτήτων της ουσίας· διαφορετικά, η μελέτη διατροφικής έκθεσης είναι μάλλον καταλληλότερη. Οι επιφανειοδραστικές ουσίες είναι μέσα επιφανειακής δράσης που μειώνουν την τάση στη μεσεπιφάνεια μεταξύ δύο υγρών. Ο αμφίφιλος χαρακτήρας τους (δηλ. περιέχουν και υδρόφιλο και υδρόφοβο μέρος) προκαλεί τη συσσώρευσή τους σε μεσεπιφάνειες, όπως οι μεσεπιφάνειες νερού-αέρα και νερού-τροφής, καθώς και στα γυάλινα τοιχώματα, φαινόμενο που δυσχεραίνει τον προσδιορισμό της συγκέντρωσής τους στο νερό.

Με τη δοκιμή διατροφικής έκθεσης μπορούν να παρακαμφθούν ορισμένες πτυχές της έκθεσης σε πολύπλοκα μείγματα με συστατικά που παρουσιάζουν διαφορετικά όρια υδατοδιαλυτότητας, υπό την έννοια ότι η συγκρίσιμη έκθεση σε όλα τα συστατικά του μείγματος είναι πιο πιθανή από ό,τι στη μέθοδο υδατικής έκθεσης [βλ. (20)].

Πρέπει να σημειωθεί ότι με τη διατροφική προσέγγιση λαμβάνεται συντελεστής διατροφικής βιομεγέθυνσης (BMF) και όχι συντελεστής βιοσυγκέντρωσης (BCF) ([2]). Υπάρχουν προσεγγίσεις για την εκτίμηση του κινητικού συντελεστή βιοσυγκέντρωσης (BCF_K) από δεδομένα που παράγονται με τη μελέτη διατροφικής έκθεσης (όπως εξηγείται στο προσάρτημα 8), αλλά θα πρέπει να εφαρμόζονται με προσοχή. Οι προσεγγίσεις αυτές βασίζονται σε παραδοχή κινητικής πρώτης τάξης και μπορούν να εφαρμοστούν μόνο σε ορισμένες ομάδες ενώσεων. Είναι μάλλον απίθανο να μπορούν να εφαρμοστούν στις επιφανειοδραστικές ουσίες (βλ. παράγραφο 12).

Ο σχεδιασμός ελαχιστοποιημένης δοκιμής υδατικής έκθεσης με λιγότερα χρονικά σημεία δειγματοληψίας, που αποσκοπεί στην εξοικονόμηση ζώων και/ή πόρων (βλ. παράγραφο 83 και επόμενες), θα πρέπει να εφαρμόζεται μόνο σε ουσίες για τις οποίες αναμένεται εύλογα ότι η πρόσληψη και η αποβολή ακολουθούν κατά προσέγγιση κινητική πρώτης τάξης (δηλ., γενικά, σε μη ιονισμένες οργανικές ουσίες, βλ. παράγραφο 88).

Γ.13 — I: **Δοκιμή βιοσυγκέντρωσης σε ψάρια με υδατική έκθεση**

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η δοκιμή αποτελείται από δύο φάσεις: τη φάση της έκθεσης (πρόσληψη) και τη φάση μετά την έκθεση (αποβολή). Κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης, μια ομάδα ψαριών ενός είδους εκτίθεται στην υπό δοκιμή ουσία σε μία ή περισσότερες επιλεγμένες συγκεντρώσεις, ανάλογα με τις ιδιότητες της ουσίας (βλ.

([1]) Οι μετρούμενες συγκεντρώσεις στο νερό κατά τη φάση πρόσληψης θα πρέπει γενικά να υπερβαίνουν τουλάχιστον κατά μία τάξη μεγέθους το όριο ποσοτικοποίησης, ώστε να είναι δυνατή η μέτρηση περισσότερων του ενός υποδιπλασιασμών της επιβάρυνσης του σώματος κατά τη φάση αποβολής της μελέτης.

([2]) Βλ. ορισμούς και μονάδες στο προσάρτημα 1

▼M7

παράγραφο 49). Στη συνέχεια, τα ψάρια μεταφέρονται σε μέσο χωρίς την υπό δοκιμή ουσία για τη φάση αποβολής. Η φάση αποβολής είναι πάντα απαραίτητη, εκτός εάν η πρόσληψη της υπό δοκιμή ουσίας κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης είναι ασήμαντη. Καθ' όλη τη διάρκεια και των δύο φάσεων της δοκιμής παρακολουθείται η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στη μάζα/επιφάνεια των ψαριών (ή σε συγκεκριμένους ιστούς τους). Επιπλέον της εκτιθέμενης ομάδας, μία ομάδα ψαριών διατηρείται ως μάρτυρας υπό τις ίδιες ακριβώς συνθήκες με μόνη διαφορά την απουσία της υπό δοκιμή ουσίας, με σκοπό τη σύγκριση των πιθανών δυσμενών επιδράσεων που παρατηρούνται κατά τη δοκιμή βιοσυγκέντρωσης με μία αντίστοιχη ομάδα-μάρτυρα και τη διαπίστωση των συγκεντρώσεων υποβάθρου της υπό δοκιμή ουσίας ([1]).

Κατά τη δοκιμή υδατικής έκθεσης, η φάση πρόσληψης διαρκεί συνήθως 28 ημέρες. Η διάρκεια μπορεί να παραταθεί, εάν είναι αναγκαίο (βλ. παράγραφο 18), ή να συντομευθεί, εφόσον αποδειχθεί ότι επιτυγχάνεται νωρίτερα σταθερή κατάσταση (βλ. προσάρτημα 1 «Ορισμοί και μονάδες»). Η διάρκεια της φάσης πρόσληψης και ο χρόνος που χρειάζεται για την επίτευξη σταθερής κατάστασης μπορούν να προβλεφθούν με τις εξισώσεις του προσαρτήματος 5. Στη συνέχεια αρχίζει η περίοδος αποβολής, όταν τα ψάρια δεν εκτίθενται πλέον στην υπό δοκιμή ουσία, με τη μεταφορά τους στο ίδιο μέσο, αλλά χωρίς την υπό δοκιμή ουσία, σε καθαρό δοχείο. Εφόσον είναι δυνατόν, ο συντελεστής βιοσυγκέντρωσης υπολογίζεται κατά προτίμηση τόσο ως ο λόγος της συγκέντρωσης στα ψάρια (C_f) προς τη συγκέντρωση στο νερό (C_w) σε σταθερή κατάσταση (BCF_{SS}, βλ. ορισμό στο προσάρτημα 1), όσο και ως κινητικός συντελεστής βιοσυγκέντρωσης (BCF_K· βλ. προσάρτημα 1 «Ορισμοί και μονάδες»), που υπολογίζεται ως ο λόγος των σταθερών ρυθμού πρόσληψης (k_1) και αποβολής (k_2) με την παραδοχή ότι η κινητική είναι πρώτης τάξεως ([2]).

Εάν δεν επιτυγχάνεται σταθερή κατάσταση εντός 28 ημερών, είτε υπολογίζεται ο BCF με την κινητική προσέγγιση (βλ. παράγραφο 38) είτε μπορεί να παραταθεί η φάση πρόσληψης. Εάν η παράταση αυτή έχει ως αποτέλεσμα πρακτικά ανέφικτη διάρκεια της φάσης πρόσληψης για την επίτευξη σταθερής κατάστασης (βλ. παραγράφους 37 και 38 και προσάρτημα 5), προτιμάται η κινητική προσέγγιση. Εναλλακτικά, όταν πρόκειται για εξαιρετικά υδρόφοβες ουσίες, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο διεξαγωγής δοκιμής διατροφικής έκθεσης ([3]), υπό την προϋπόθεση ότι η διατροφική δοκιμή είναι σύμφωνη με το σχετικό κανονιστικό πλαίσιο.

Η σταθερά ρυθμού πρόσληψης, η σταθερά ρυθμού αποβολής (απώλειας) — ή οι σταθερές, αν χρησιμοποιούνται πιο σύνθετα μοντέλα –, ο συντελεστής βιοσυγκέντρωσης (σε σταθερή κατάσταση και/ή κινητικός) και, όπου είναι δυνατόν, τα όρια εμπιστοσύνης καθεμίας από τις παραμέτρους αυτές υπολογίζονται από το μοντέλο που περιγράφει ακριβέστερα τις μετρούμενες συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας στα ψάρια και το νερό (βλ. προσάρτημα 5).

Η αύξηση της μάζας των ψαριών κατά τη διάρκεια της δοκιμής θα έχει ως αποτέλεσμα μείωση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στα αναπτυσσόμενα ψάρια (καλούμενη αναπτυξιακή αραίωση) και, ως εκ τούτου, ο κινητικός BCF θα είναι υποεκτιμημένος, εάν δεν διορθωθεί για να ληφθεί υπόψη η ανάπτυξη (βλ. παραγράφους 72 και 73).

Ο BCF βασίζεται στη συνολική συγκέντρωση στα ψάρια (δηλ. ανά μονάδα συνολικού νωπού βάρους των ψαριών). Εντούτοις, για ειδικούς λόγους, επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται συγκεκριμένοι ιστοί ή όργανα (π.χ. μύες, ήπαρ), εάν τα ψάρια είναι αρκετά μεγάλα, ή να χωρίζονται αυτά σε βρώσιμα (φιλέτα) και μη βρώσιμα (εντόσθια) τμήματα. Δεδομένου ότι στην περίπτωση πολλών οργανικών ουσιών υπάρχει σαφής σχέση μεταξύ του δυναμικού βιοσυγκέντρωσης και της υδροφοβικότητας, υπάρχει και αντίστοιχη σχέση μεταξύ της περιεκτικότητας των υπό δοκιμή ψαριών σε λιπίδια και της παρατηρούμενης βιοσυγκέντρωσης των

([1]) Για τις περισσότερες υπό δοκιμή ουσίες, δεν θα πρέπει, στην ιδανική περίπτωση, να ανιχνεύονται συγκεντρώσεις στο νερό των μαρτύρων. Οι συγκεντρώσεις υποβάθρου αφορούν μόνο υλικά που συναντώνται στη φύση (π.χ. ορισμένα μέταλλα) και ουσίες που είναι πανταχού παρούσες στο περιβάλλον.

([2]) Εάν είναι προφανές ότι δεν ακολουθείται κινητική πρώτης τάξης, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πιο σύνθετα μοντέλα (βλ. παραπομπές στο *προσάρτημα* 5) και να ζητείται η γνώμη βιοστατιστικολόγου.

([3]) Η πρόσληψη μπορεί να περιοριστεί από χαμηλές συγκεντρώσεις έκθεσης, λόγω της χαμηλής υδατοδιαλυτότητας στη δοκιμή βιοσυγκέντρωσης, ενώ με τη δοκιμή διατροφικής έκθεσης είναι δυνατόν να επιτευχθούν πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις έκθεσης.

▼M7

ουσιών αυτών. Συνεπώς, για να περιοριστεί αυτή η πηγή μεταβλητότητας των αποτελεσμάτων της δοκιμής για τις ουσίες με υψηλή λιποφιλικότητα (δηλ. με log K_{OW} > 3), η βιοσυγκέντρωση θα πρέπει να εκφράζεται κανονικοποιημένη σε ψάρι με περιεκτικότητα 5 % σε λιπίδια (με βάση το νωπό βάρος ολόκληρου του σώματος) επιπλέον της τιμής που προκύπτει απευθείας από τη μελέτη. Αυτό είναι απαραίτητο για να υπάρχει βάση σύγκρισης μεταξύ των αποτελεσμάτων για διαφορετικές ουσίες και/ή εξεταζόμενα είδη ψαριών. Η περιεκτικότητα 5 % σε λιπίδια χρησιμοποιείται ευρέως διότι αντιπροσωπεύει τη μέση περιεκτικότητα των ψαριών που συνήθως χρησιμοποιούνται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών (21).

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΟΥΣΙΑ

Εκτός από τις ιδιότητες της υπό δοκιμή ουσίας που αναφέρονται στην εισαγωγή (παράγραφος 3), άλλα στοιχεία που απαιτούνται είναι η τοξικότητα για το είδος ψαριών που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή, κατά προτίμηση η ασυμπτωτική (δηλ. ανεξάρτητη από τον χρόνο) LC_{50} και/ή η τοξικότητα που εκτιμάται με μακροχρόνιες δοκιμές σε ψάρια [π.χ. μέθοδοι δοκιμών Γ.47 (22), Γ.15 (23), Γ.14 (24)].

Θα πρέπει να είναι διαθέσιμη κατάλληλη αναλυτική μέθοδος, γνωστής ορθότητας, ακρίβειας και ευαισθησίας, για την ποσοτικοποίηση της ουσίας στα διαλύματα δοκιμής και σε βιολογικά υλικά, με λεπτομερείς οδηγίες για την προετοιμασία και τη φύλαξη των δειγμάτων. Θα πρέπει επίσης να είναι γνωστό το όριο ποσοτικοποίησης της υπό δοκιμή ουσίας, τόσο στο νερό όσο και στους ιστούς των ψαριών. Όταν χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένη υπό δοκιμή ουσία, θα πρέπει να έχει την ανώτατη καθαρότητα (π.χ. κατά προτίμηση > 98 %) και να είναι γνωστό το ποσοστό ραδιενέργειας που αντιστοιχεί σε ξένες προσμείξεις.

ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Οι προϋποθέσεις εγκυρότητας της δοκιμής είναι οι ακόλουθες:

Η διακύμανση της θερμοκρασίας του νερού είναι μικρότερη από ± 2 °C, διότι οι μεγάλες αποκλίσεις, εκτός του ότι μπορούν να επηρεάσουν τις βιολογικές παραμέτρους που σχετίζονται με την πρόσληψη και την αποβολή, καταπονούν επίσης τα ζώα.

Η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου δεν μειώνεται σε ποσοστό κάτω του 60 % της συγκέντρωσης κορεσμού.

Η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στους θαλάμους διατηρείται εντός ορίων ± 20 % του μέσου όρου των τιμών που μετρώνται κατά τη φάση πρόσληψης.

Η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας είναι μικρότερη από το όριο διαλυτότητάς της στο νερό, λαμβανομένης υπόψη της επίδρασης που μπορεί να έχει το νερό της δοκιμής στην ωφέλιμη διαλυτότητα ([1]).

Η θνησιμότητα ή άλλες δυσμενείς επιδράσεις/ασθένειες, τόσο στα ψάρια-μάρτυρες όσο και στα εκτιθέμενα ψάρια, είναι μικρότερη από 10 % στο τέλος της δοκιμής. Όταν η δοκιμή παρατείνεται για εβδομάδες ή μήνες, οι θάνατοι ή άλλα δυσμενή φαινόμενα και στις δύο σειρές ψαριών θα πρέπει να είναι μικρότερη από 5 % μηνιαίως και να μην υπερβαίνει το 30 % συνολικά. Σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων δοκιμής και των ομάδων μαρτύρων ως προς τη μέση ανάπτυξη των ψαριών των αντίστοιχων δειγμάτων μπορεί να αποτελούν ένδειξη τοξικής επίδρασης της υπό δοκιμή ουσίας.

ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Η χρησιμοποίηση ουσιών αναφοράς γνωστού δυναμικού βιοσυγκέντρωσης και χαμηλού μεταβολισμού είναι χρήσιμη για τον έλεγχο της πειραματικής διαδικασίας, εφόσον απαιτείται (π.χ. όταν ένα εργαστήριο δεν έχει προηγούμενη πείρα στη δοκιμή ή τροποποιούνται οι πειραματικές συνθήκες).

([1]) Για τις πολυσυστατικές ουσίες, τις UVCB και τα μείγματα, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η υδατοδιαλυτότητα κάθε ουσιώδους συστατικού για τον καθορισμό των κατάλληλων συγκεντρώσεων έκθεσης.

▼M7

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Εργαστηριακός εξοπλισμός

Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγεται η χρήση υλικών, για οποιοδήποτε τμήμα του εξοπλισμού, τα οποία μπορεί να διαλυθούν, να ροφηθούν ή να εκπλυθούν και να έχουν δυσμενή επίδραση στα ψάρια. Μπορούν να χρησιμοποιούνται συνήθεις ορθογώνιες ή κυλινδρικές δεξαμενές, κατασκευασμένες από χημικώς αδρανές υλικό και με κατάλληλη χωρητικότητα ανάλογα με τον πληθυσμιακό φόρτο (βλ. παράγραφο 43). Θα πρέπει να ελαχιστοποιείται η χρήση εύκαμπτων πλαστικών σωλήνων. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σωλήνες από πολυτετραφθοροαιθυλένιο (PTFE), ανοξείδωτο χάλυβα ή/και γυαλί. Η εμπειρία έχει δείξει ότι για υπό δοκιμή ουσίες με υψηλό συντελεστή προσρόφησης. όπως τα συνθετικά πυρεθροειδή, μπορεί να απαιτείται η χρήση σιλανιωμένου γυαλιού. Στις περιπτώσεις αυτές, ο εξοπλισμός θα πρέπει να απορρίπτεται μετά τη χρήση. Είναι προτιμότερο να εκτίθενται τα συστήματα της δοκιμής στις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στη μελέτη, για όσο χρονικό διάστημα απαιτείται για να αποδειχθεί η διατήρηση σταθερών συγκεντρώσεων έκθεσης, πριν από την εισαγωγή των υπό δοκιμή οργανισμών.

Νερό

Στη δοκιμή χρησιμοποιείται γενικά φυσικό νερό, το οποίο θα πρέπει να λαμβάνεται από μη μολυσμένες πηγές που παρέχουν νερό ομοιόμορφης ποιότητας. Ωστόσο, το ανασυσταθέν νερό (δηλ. απιονισμένο νερό με συγκεκριμένα θρεπτικά στοιχεία που προστίθενται σε γνωστές ποσότητες) μπορεί να είναι καταλληλότερο για τη διασφάλιση ομοιόμορφης ποιότητας με την πάροδο του χρόνου. Η ποιότητα του νερού αραίωσης, δηλαδή του νερού που αναμειγνύεται με την υπό δοκιμή ουσία πριν από την εισαγωγή στο δοχείο δοκιμής (βλ. παράγραφο 30), θα πρέπει να επιτρέπει την επιβίωση του επιλεγμένου είδους ψαριών κατά τη διάρκεια των περιόδων εγκλιματισμού και δοκιμής χωρίς αυτά να παρουσιάζουν ανωμαλίες στην εμφάνιση ή τη συμπεριφορά. Στην ιδανική περίπτωση, θα πρέπει να καταδεικνύεται ότι το υπό δοκιμή είδος ψαριών μπορεί να επιζήσει, να αναπτυχθεί και να αναπαραχθεί στο νερό αραίωσης (π.χ. με καλλιέργεια στο εργαστήριο ή με δοκιμή τοξικότητας κύκλου ζωής). Το νερό θα πρέπει να χαρακτηρίζεται τουλάχιστον με το pH, τη σκληρότητα, τα ολικά στερεά, τον ολικό οργανικό άνθρακα (TOC ([1])) και, κατά προτίμηση, με την περιεκτικότητά του σε αμμώνιο και νιτρώδη άλατα, την αλκαλικότητα και, για τα θαλάσσια είδη ψαριών, την αλατότητά του. Οι παράμετροι που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην άριστη διαβίωση των ψαριών δεν είναι πλήρως γνωστές, αλλά στο παράρτημα 2 συνιστώνται μέγιστες συγκεντρώσεις για ορισμένες παραμέτρους γλυκού και θαλάσσιου νερού δοκιμής.

Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, το νερό αραίωσης θα πρέπει να είναι σταθερής ποιότητας. Η τιμή του pH θα πρέπει να κυμαίνεται από 6,0 έως 8,5 κατά την έναρξη δεδομένης δοκιμής, αλλά κατά τη διάρκειά της θα πρέπει να παραμένει εντός εύρους ± 0,5 μονάδων pH. Για να διασφαλίζεται ότι το νερό αραίωσης δεν επηρεάζει αδικαιολόγητα το αποτέλεσμα της δοκιμής (π.χ. συμπλοκοποιώντας την υπό δοκιμή ουσία) ούτε έχει δυσμενή επίδραση στις επιδόσεις του αποθέματος ψαριών, θα πρέπει κατά διαστήματα να λαμβάνονται δείγματα για ανάλυση, τουλάχιστον στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής. Όταν είναι γνωστό ότι το νερό αραίωσης είναι σχετικά σταθερής ποιότητας, θα πρέπει να προσδιορίζονται, π.χ. ανά τρίμηνο, τα βαρέα μέταλλα (π.χ. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), τα κυριότερα ανιόντα και κατιόντα (π.χ. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} και SO_4^{2-}), τα γεωργικά φάρμακα (π.χ. ολικά οργανοφωσφορικά και ολικά οργανοχλωριούχα γεωργικά φάρμακα), ο ολικός οργανικός άνθρακας και τα αιωρούμενα στερεά. Εάν έχει αποδειχθεί ότι η ποιότητα του νερού αραίωσης είναι σταθερή επί ένα τουλάχιστον έτος, η συχνότητα των προσδιορισμών μπορεί να περιοριστεί και τα μεσοδιαστήματα να αυξηθούν (π.χ. ανά εξάμηνο).

Η φυσική περιεκτικότητα του νερού αραίωσης σε σωματίδια, καθώς και η περιεκτικότητά του σε ολικό οργανικό άνθρακα θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν χαμηλότερες για να αποφεύγεται η προσρόφηση της υπό δοκιμή ουσίας στην οργανική ύλη, η οποία μπορεί να μειώσει τη βιοδιαθεσιμότητά της και, κατά συνέπεια, να οδηγήσει σε υποεκτίμηση του BCF. Η μέγιστη αποδεκτή τιμή είναι 5 mg/l όσον αφορά τα σωματίδια (ξηρά ουσία, μη διερχόμενη από ηθμό των 0,45 μm) και 2 mg/l για τον ολικό οργανικό άνθρακα (βλ. προσάρτημα 2). Αν

([1]) Ο TOC περιλαμβάνει τα σωματίδια οργανικού άνθρακα και τον διαλυμένο οργανικό άνθρακα, δηλ. TOC = POC + DOC.

▼M7

είναι αναγκαίο, το νερό αραίωσης θα πρέπει να διηθείται πριν χρησιμοποιηθεί. Η συνεισφορά των υπό δοκιμή ψαριών (περιττώματα) και των υπολειμμάτων τροφών στη συγκέντρωση οργανικού άνθρακα στο νερό δοκιμής θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν χαμηλότερη (βλ. παράγραφο 46).

Διαλύματα δοκιμής

Παρασκευάζεται διάλυμα παρακαταθήκης της υπό δοκιμή ουσίας σε κατάλληλη συγκέντρωση. Το διάλυμα παρακαταθήκης θα πρέπει κατά προτίμηση να παρασκευάζεται με απλή ανάμειξη ή ανάδευση της υπό δοκιμή ουσίας στο νερό αραίωσης. Μια εναλλακτική λύση, η οποία μπορεί να ενδείκνυται σε ορισμένες περιπτώσεις, είναι η χρήση δοσιμετρικού συστήματος εκρόφησης στερεάς φάσης. Δεν συνιστάται γενικά η χρήση διαλυτών και μέσων διασποράς (μέσων διαλυτοποίησης) [βλ. (25)]· ωστόσο, η χρήση αυτών των υλικών μπορεί να είναι αποδεκτή για την παρασκευή κατάλληλα πυκνού διαλύματος παρακαταθήκης, αλλά θα πρέπει να καταβάλλεται κάθε δυνατή προσπάθεια να περιορίζεται στο ελάχιστο, και επιπλέον να μη σημειώνεται υπέρβαση της κρίσιμης μικκυλιακής συγκέντρωσης (κατά περίπτωση). Οι διαλύτες που επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται είναι η ακετόνη, η αιθανόλη, η μεθανόλη, το διμεθυλοφορμαμίδιο και η τριαιθυλενογλυκόλη· μέσα διασποράς που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι το Tween 80, η μεθυλοκυτταρίνη 0,01 % και η HCO-40. Η συγκέντρωση του διαλύτη στο τελικό μέσο δοκιμής θα πρέπει να είναι η ίδια σε κάθε μεταχείριση (δηλ. ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας) και να μην υπερβαίνει τις αντίστοιχες τιμές κατωφλίου τοξικότητας που έχουν προσδιοριστεί για τον διαλύτη στις συνθήκες της δοκιμής. Το ανώτατο επίπεδο είναι συγκέντρωση 100 mg/l (ή 0,1 ml/l). Μια συγκέντρωση διαλύτη 100 mg/l είναι απίθανο να τροποποιεί σημαντικά τη μέγιστη διαλυμένη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας που μπορεί να επιτευχθεί μεσοπρόθεσμα (25). Θα πρέπει να είναι γνωστή η συνεισφορά του διαλύτη (σε συνδυασμό με την υπό δοκιμή ουσία) στη συνολική περιεκτικότητα του νερού δοκιμής σε οργανικό άνθρακα. Καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής, η συγκέντρωση ολικού οργανικού άνθρακα στα δοχεία δοκιμής δεν θα πρέπει να υπερβαίνει κατά περισσότερο από 10 mg/l (± 20 %) τη συγκέντρωση του οργανικού άνθρακα που προέρχεται από την υπό δοκιμή ουσία και από τον διαλύτη ή το μέσο διαλυτοποίησης ([1]), εφόσον χρησιμοποιείται. Η περιεκτικότητα σε οργανική ύλη μπορεί να έχει σημαντική επίδραση στην ποσότητα ελεύθερης διαλυμένης υπό δοκιμή ουσίας κατά τη διάρκεια των δοκιμών σε ψάρια με σύστημα συνεχούς ροής, ιδίως όταν πρόκειται για εξαιρετικά λιπόφιλες ουσίες. Η μικροεκχύλιση σε στερεή φάση (βλ. παράγραφο 60) μπορεί να προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για την αναλογία μεταξύ δεσμευμένων και ελεύθερων διαλυμένων ενώσεων, όπου οι τελευταίες θεωρείται ότι αντιπροσωπεύουν το βιοδιαθέσιμο κλάσμα. Η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας πρέπει να είναι μικρότερη από το όριο διαλυτότητάς της στο μέσο δοκιμής, παρά τη χρήση διαλύτη ή μέσου διαλυτοποίησης. Όταν χρησιμοποιούνται εύκολα βιοαποδομήσιμοι διαλύτες, θα πρέπει να λαμβάνονται προφυλάξεις γιατί αυτοί μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα λόγω ανάπτυξης βακτηρίων στις δοκιμές με σύστημα συνεχούς ροής. Εάν δεν είναι δυνατή η παρασκευή διαλύματος παρακαταθήκης χωρίς τη χρήση μέσου διαλυτοποίησης, θα πρέπει να εξετάζεται η καταλληλότητα της διενέργειας μελέτης υδατικής έκθεσης σε αντιδιαστολή με μελέτη διατροφικής έκθεσης.

Στις δοκιμές με σύστημα συνεχούς ροής, για την παροχή των συγκεντρώσεων δοκιμής στους θαλάμους δοκιμής απαιτείται σύστημα που διανέμει και αραιώνει συνεχώς ένα διάλυμα παρακαταθήκης της υπό δοκιμή ουσίας (π.χ. αντλία μέτρησης, αναλογικός αραιωτής, σύστημα κορεσμού) ή δοσιμετρικό σύστημα εκρόφησης στερεάς φάσης. Προβλέπονται, κατά προτίμηση, τουλάχιστον πέντε αντικαταστάσεις του όγκου του νερού σε κάθε θάλαμο δοκιμής ημερησίως. Η μέθοδος συνεχούς ροής προτιμάται, όταν όμως η εφαρμογή της δεν είναι εφικτή (π.χ. έχει δυσμενή επίδραση στους υπό δοκιμή οργανισμούς) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ημιστατική τεχνική υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται τα κριτήρια εγκυρότητας (βλ. παράγραφο 24). Η ταχύτητα ροής των διαλυμάτων παρακαταθήκης και του νερού αραίωσης θα πρέπει να ελέγχεται 48 ώρες πριν από τη δοκιμή και, κατόπιν, τουλάχιστον ημερησίως κατά τη διάρκειά της. Στον έλεγχο αυτό συμπεριλαμβάνεται ο προσδιορισμός της ταχύτητας ροής διαμέσου κάθε θαλάμου δοκιμής και διασφαλίζεται ότι δεν μεταβάλλεται κατά περισσότερο από 20 % είτε στον ίδιο θάλαμο είτε μεταξύ των θαλάμων.

([1]) Σε περίπτωση χρήσης διαλύτη ή μέσου διαλυτοποίησης, αν και γενικά δεν συνιστάται, ο οργανικός άνθρακας που προέρχεται από το εν λόγω μέσο θα πρέπει να προστίθεται στον οργανικό άνθρακα από την υπό δοκιμή ουσία για την αξιολόγηση της συγκέντρωσης οργανικού άνθρακα στα δοχεία δοκιμής.

▼M7

Επιλογή ζωικού είδους

Σημαντικά κριτήρια για την επιλογή είδους είναι η άμεση διαθεσιμότητα, η προσφορά σε κατάλληλα μεγέθη και η δυνατότητα ικανοποιητικής διατήρησης στις συνθήκες του εργαστηρίου. Άλλα κριτήρια για την επιλογή είδους ψαριών είναι η ψυχαγωγική, εμπορική και οικολογική σημασία, καθώς και η συγκρίσιμη ευαισθησία, η επιτυχής χρήση στο παρελθόν κ.λπ. Τα συνιστώμενα είδη παρατίθενται στο προσάρτημα 3. Επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται και άλλα είδη, αλλά μπορεί να χρειάζεται προσαρμογή της διαδικασίας δοκιμής, ώστε να εξασφαλίζονται οι κατάλληλες συνθήκες δοκιμής. Στην περίπτωση αυτή θα πρέπει να αναφέρεται η αιτιολογία της επιλογής του υπό δοκιμή είδους και της πειραματικής μεθόδου. Η χρήση μικρότερων ειδών ψαριών συντομεύει γενικά τον χρόνο επίτευξης σταθερής κατάστασης, αλλά ενδέχεται να χρειάζονται περισσότερα ψάρια (δείγματα) για την επαρκή ανάλυση της περιεκτικότητας των ψαριών σε λιπίδια και των συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή ουσίας στα ψάρια. Επιπλέον, οι διαφορές στον ρυθμό αναπνοής και τον μεταβολισμό μεταξύ των νεαρών και των μεγαλύτερης ηλικίας ψαριών ενδέχεται να παρεμποδίσουν τις συγκρίσεις μεταξύ των αποτελεσμάτων διαφορετικών δοκιμών και διαφορετικών υπό δοκιμή ειδών ψαριών. Επισημαίνεται ότι η διενέργεια δοκιμών σε στάδιο του κύκλου ζωής όπου πραγματοποιείται ταχεία ανάπτυξη (ιχθύδια) μπορεί να περιπλέξει την ερμηνεία των δεδομένων.

Διατήρηση ψαριών (αφορά την υδατική και διατροφική έκθεση)

Ο πληθυσμός του αποθέματος ψαριών θα πρέπει να εγκλιματίζεται για δύο τουλάχιστον εβδομάδες σε νερό (βλ. παράγραφο 28) στη θερμοκρασία δοκιμής και να τρέφεται επαρκώς κατά το διάστημα αυτό (βλ. παράγραφο 45). Τόσο το νερό όσο και η τροφή θα πρέπει να είναι του ίδιου τύπου με εκείνα που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν κατά τη δοκιμή.

Έπειτα από μια περίοδο εγκατάστασης 48 ωρών, καταγράφονται οι θνησιμότητες και εφαρμόζονται τα ακόλουθα κριτήρια:

— θνησιμότητα άνω του 10 % του πληθυσμού σε επτά ημέρες: απορρίπτεται ολόκληρη η παρτίδα·

— θνησιμότητα μεταξύ 5 % και 10 % του πληθυσμού σε επτά ημέρες: ο εγκλιματισμός παρατείνεται για επτά ημέρες — εάν, κατά τη διάρκεια του δεύτερου επταημέρου, καταγραφεί θνησιμότητα άνω του 5 %, απορρίπτεται ολόκληρη η παρτίδα·

— ποσοστά θνησιμότητας κατώτερα του 5 % του πληθυσμού σε επτά ημέρες: η παρτίδα γίνεται αποδεκτή.

Τα ψάρια που χρησιμοποιούνται στις δοκιμές θα πρέπει να μην εμφανίζουν παρατηρήσιμες νόσους και ανωμαλίες. Τα ασθενή ψάρια θα πρέπει να απορρίπτονται. Τα ψάρια δεν θα πρέπει να υποβάλλονται σε θεραπευτική αγωγή κατά τις δύο εβδομάδες που προηγούνται της δοκιμής ούτε κατά τη διάρκειά της.

ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Προκαταρκτική δοκιμή

Μπορεί να είναι χρήσιμο να διεξαχθεί προκαταρκτικό πείραμα για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών της οριστικής δοκιμής, π.χ. επιλογή της ή των συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή ουσίας, καθορισμός της διάρκειας των φάσεων πρόσληψης και αποβολής, ή για να κριθεί αν χρειάζεται πλήρης δοκιμή. Ο σχεδιασμός της προκαταρκτικής δοκιμής θα πρέπει να εξασφαλίζει τη συγκέντρωση των απαιτούμενων πληροφοριών. Μπορεί να εξετάζεται αν αρκεί μια ελαχιστοποιημένη δοκιμή για τη συναγωγή του BCF ή χρειάζεται πλήρης μελέτη (βλ. παραγράφους 83-95 σχετικά με την ελαχιστοποιημένη δοκιμή).

Συνθήκες έκθεσης

Διάρκεια της φάσης πρόσληψης

Η διάρκεια της φάσης πρόσληψης μπορεί να προβλεφθεί από την πρακτική εμπειρία (π.χ. από προγενέστερη μελέτη ή μελέτη συσσώρευσης ουσιών ανάλογης δομής) ή από ορισμένες εμπειρικές σχέσεις στις οποίες χρησιμοποιείται είτε η γνωστή υδατοδιαλυτότητα είτε ο γνωστός συντελεστής κατανομής σε μείγμα οκτανόλης/νερού της υπό δοκιμή ουσίας (υπό την προϋπόθεση ότι η πρόσληψη ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης, βλ. προσάρτημα 5).

▼M7

Η φάση πρόσληψης θα πρέπει να διαρκεί 28 ημέρες, εκτός εάν μπορεί να αποδειχθεί ότι επιτυγχάνεται σταθερή κατάσταση νωρίτερα (βλ. προσάρτημα 1 «Ορισμοί και μονάδες»). Σταθερή κατάσταση στο διάγραμμα της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στα ψάρια (C_f) σε συνάρτηση με τον χρόνο επιτυγχάνεται όταν η καμπύλη καθίσταται παράλληλη με τον άξονα του χρόνου και τρεις διαδοχικές αναλύσεις της C_f σε δείγματα που λαμβάνονται ανά διαστήματα τουλάχιστον δύο ημερών δεν διαφέρουν μεταξύ τους κατά περισσότερο από ± 20 % και δεν παρατηρείται σημαντική αύξηση της C_f στο διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ της πρώτης και της τελευταίας διαδοχικής ανάλυσης. Όταν αναλύονται συγχωνευμένα δείγματα, απαιτούνται τουλάχιστον τέσσερις διαδοχικές αναλύσεις. Όταν οι υπό δοκιμή ουσίες προσλαμβάνονται με αργό ρυθμό, ενδείκνυνται περισσότερο τα μεσοδιαστήματα επτά ημερών. Εάν δεν έχει επιτευχθεί σταθερή κατάσταση εντός 28 ημερών, είτε υπολογίζεται ο BCF με τη χρήση μόνον της κινητικής προσέγγισης, η οποία δεν βασίζεται σε σταθερή κατάσταση, είτε μπορεί να παραταθεί η φάση πρόσληψης και να προστεθούν μετρήσεις, μέχρις ότου επιτευχθεί σταθερή κατάσταση ή για 60 ημέρες, ανάλογα με το ποιο διάστημα είναι συντομότερο. Επίσης, η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στα ψάρια στο τέλος της περιόδου πρόσληψης πρέπει να είναι επαρκώς υψηλή για να εξασφαλίζεται αξιόπιστη εκτίμηση της σταθεράς k_2 από τη φάση αποβολής. Εάν δεν διαπιστωθεί σημαντική πρόσληψη μετά από 28 ημέρες, η δοκιμή μπορεί να διακοπεί.

Διάρκεια της φάσης αποβολής

Για ουσίες που ακολουθούν κινητική πρώτης τάξης, ένα διάστημα ίσο με το ήμισυ της διάρκειας της φάσης πρόσληψης συνήθως επαρκεί για την ενδεδειγμένη (π.χ. κατά 95 %) μείωση της επιβάρυνσης του σώματος από την ουσία (βλ. επεξήγηση της εκτίμησης στο προσάρτημα 5). Εάν ο χρόνος που απαιτείται για να σημειωθεί απώλεια 95 % είναι υπερβολικά μεγάλος, π.χ. υπερβαίνει το διπλάσιο της κανονικής διάρκειας της φάσης πρόσληψης (δηλ. πάνω από 56 ημέρες), μπορεί να χρησιμοποιηθεί μικρότερο χρονικό διάστημα (π.χ. μέχρις ότου η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας να είναι μικρότερη από το 10 % της συγκέντρωσης σε σταθερή κατάσταση). Εντούτοις, μπορεί να είναι απαραίτητες φάσεις αποβολής μεγαλύτερης διάρκειας για ουσίες με πιο σύνθετη τυπολογία πρόσληψης και αποβολής από εκείνη που προκύπτει από το μονοδιαμερισματικό μοντέλο ψαριού, το οποίο αποδίδει κινητική πρώτης τάξης. Εάν παρατηρείται και/ή προβλέπεται τέτοια σύνθετη τυπολογία, συνιστάται να ζητείται η γνώμη βιοστατιστικολόγου και/ή ειδικού στη φαρμακοκινητική για να εξασφαλιστεί ο κατάλληλος σχεδιασμός της δοκιμής. Όταν παρατείνεται η περίοδος αποβολής, οι αριθμοί ψαριών προς δειγματοληψία μπορεί να γίνουν περιοριστικοί παράγοντες και οι αναπτυξιακές διαφορές μεταξύ των ψαριών να επηρεάσουν τα αποτελέσματα. Η περίοδος θα καθορίζεται επίσης από το χρονικό διάστημα επί το οποίο η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στα ψάρια παραμένει υψηλότερη από το όριο ποσοτικοποίησης.

Αριθμός των υπό δοκιμή ψαριών

Ο αριθμός ψαριών ανά συγκέντρωση δοκιμής επιλέγεται κατά τρόπο ώστε σε κάθε χρονικό σημείο δειγματοληψίας να είναι διαθέσιμα τουλάχιστον τέσσερα ψάρια. Τα ψάρια θα πρέπει να εξετάζονται ομαδικά μόνο αν δεν είναι εφικτή η ανάλυση μεμονωμένων ψαριών. Εάν επιδιώκεται μεγαλύτερη ακρίβεια προσαρμογής των καμπυλών (και των παραμέτρων που προκύπτουν) ή αν απαιτούνται μελέτες μεταβολισμού (π.χ. για να γίνει διάκριση μεταξύ μεταβολιτών και μητρικής ουσίας, όταν χρησιμοποιούνται ραδιοσημασμένες υπό δοκιμή ουσίες), χρειάζεται μεγαλύτερος αριθμών ψαριών ανά χρονικό σημείο δειγματοληψίας. Η περιεκτικότητα σε λιπίδια θα πρέπει να προσδιορίζεται στο βιολογικό υλικό που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας. Εάν αυτό δεν είναι εφικτό, μπορεί να χρειαστούν επιπλέον ψάρια (βλ. παραγράφους 56 και 57).

Εάν χρησιμοποιούνται ενήλικα ψάρια (δηλ. ώριμα για αναπαραγωγή), αυτά δεν πρέπει να βρίσκονται σε κατάσταση ωοτοκίας ούτε να έχουν προσφάτως αποθέσει αυγά είτε πριν από τη δοκιμή είτε κατά τη διάρκειά της. Θα πρέπει επίσης να αναφέρεται αν χρησιμοποιούνται στο πείραμα αρσενικά ή θηλυκά άτομα ή και τα δύο. Εάν χρησιμοποιούνται άτομα και των δύο φύλων, θα πρέπει να τεκμηριώνεται, πριν από την έναρξη της έκθεσης, ότι οι διαφορές στην ανάπτυξη και στην περιεκτικότητα σε λιπίδια μεταξύ των δύο φύλων δεν είναι σημαντικές, ιδίως εάν αναμένεται να χρειαστεί ομαδική εξέταση αρσενικών και θηλυκών ψαριών για να εξασφαλιστούν ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις της ουσίας και/ή περιεκτικότητα σε λιπίδια.

▼M7

Για κάθε δοκιμή επιλέγονται ψάρια παρόμοιου βάρους, κατά τρόπο ώστε το βάρος των μικρότερων ψαριών να μην είναι μικρότερο από τα δύο τρίτα του βάρους των μεγαλύτερων. Όλα τα ψάρια θα πρέπει να είναι της ίδιας ηλικιακής τάξης και να προέρχονται από την ίδια πηγή. Επειδή το βάρος και η ηλικία των ψαριών μπορεί να έχουν σημαντική επίδραση στις τιμές του BCF (12), τα στοιχεία αυτά θα πρέπει να καταγράφονται με ακρίβεια. Συνιστάται η ζύγιση μερικού δείγματος του αποθέματος ψαριών λίγο πριν από την έναρξη της δοκιμής, για την εκτίμηση του μέσου βάρους (βλ. παράγραφο 61).

Πληθυσμιακός φόρτος

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υψηλές αναλογίες νερού-ψαριών, για να ελαχιστοποιείται η μείωση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ένωσης στο νερό, που προκαλείται από την προσθήκη των ψαριών κατά την έναρξη της δοκιμής, και για να αποφεύγεται επίσης η ελάττωση της συγκέντρωσης διαλυμένου οξυγόνου. Είναι σημαντικό ο πληθυσμιακός φόρτος να είναι κατάλληλος για το χρησιμοποιούμενο είδος ψαριών. Σε κάθε περίπτωση, συνιστάται κατά κανόνα πληθυσμιακός φόρτος 0,1-1,0 g ψαριών (νωπό βάρος) ανά λίτρο νερού ανά ημέρα. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί υψηλότερος πληθυσμιακός φόρτος εάν αποδεικνύεται ότι η απαιτούμενη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας μπορεί να διατηρηθεί εντός ορίων ± 20 % και ότι η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου δεν μειώνεται σε επίπεδα χαμηλότερα από το 60 % της συγκέντρωσης κορεσμού (βλ. παράγραφο 24).

Για την επιλογή του κατάλληλου φόρτου, λαμβάνεται υπόψη το φυσικό ενδιαίτημα του είδους ψαριών. Για παράδειγμα, τα βενθικά είδη μπορεί να χρειάζονται ενυδρείο με μεγαλύτερο εμβαδόν πυθμένα για τον ίδιο όγκο νερού σε σύγκριση με τα πελαγικά είδη.

Σίτιση

Κατά τη διάρκεια των περιόδων εγκλιματισμού και δοκιμής, χορηγείται στα ψάρια κατάλληλο σιτηρέσιο γνωστής περιεκτικότητας σε λιπίδια και ολικές πρωτεΐνες, σε ποσότητα επαρκή ώστε η υγεία τους να είναι σε καλή κατάσταση και να διατηρούν το σωματικό τους βάρος (επιτρέπεται η αύξηση ως έναν βαθμό). Χορηγείται καθημερινά τροφή καθ' όλη τη διάρκεια των περιόδων εγκλιματισμού και δοκιμής σε καθορισμένη ποσότητα, ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο είδος ψαριών, τις πειραματικές συνθήκες και τη θερμιδική αξία της τροφής (για παράδειγμα, για την ιριδίζουσα πέστροφα, περίπου 1 έως 2 % του σωματικού τους βάρους ημερησίως). Ο ρυθμός σίτισης θα πρέπει να επιλέγεται κατά τρόπο ώστε να αποφεύγονται η ταχεία ανάπτυξη και η μεγάλη αύξηση της περιεκτικότητας σε λιπίδια. Για τη διατήρηση του ίδιου ρυθμού σίτισης, η ποσότητα της τροφής θα πρέπει να επανυπολογίζεται, π.χ. εβδομαδιαίως. Για τον υπολογισμό αυτό, το βάρος των ψαριών σε κάθε θάλαμο δοκιμής μπορεί να εκτιμηθεί από το βάρος των ψαριών του θαλάμου που ελήφθησαν πιο πρόσφατα ως δείγματα. Τα ψάρια που παραμένουν στον θάλαμο δεν ζυγίζονται.

Τα περισσεύματα τροφής και τα περιττώματα θα πρέπει να απομακρύνονται καθημερινά από τους θαλάμους δοκιμής με σιφωνισμό σε σύντομο χρόνο μετά τη σίτιση (30 λεπτά έως 1 ώρα). Οι θάλαμοι θα πρέπει να διατηρούνται όσο το δυνατόν καθαρότεροι καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής, ώστε η συγκέντρωση οργανικής ύλης να παραμένει σε όσο το δυνατόν χαμηλότερα επίπεδα (βλ. παράγραφο 29), δεδομένου ότι η παρουσία οργανικού άνθρακα μπορεί να περιορίσει τη βιοδιαθεσιμότητα της υπό δοκιμή ουσίας (12).

Επειδή πολλές τροφές προέρχονται από ιχθυάλευρα, θα πρέπει να διασφαλίζεται ότι η ζωοτροφή δεν θα επηρεάσει τα αποτελέσματα της δοκιμής ούτε θα έχει δυσμενείς επιδράσεις, π.χ. επειδή περιέχει (ίχνη) γεωργικών φαρμάκων, βαρέων μετάλλων και/ή της ίδιας της υπό δοκιμή ουσίας.

Φως και θερμοκρασία

Συνιστάται φωτοπερίοδος 12 έως 16 ωρών, η δε θερμοκρασία (± 2 °C) θα πρέπει να είναι κατάλληλη για το είδος των ψαριών της δοκιμής (βλ. προσάρτημα 3). Ο τύπος και τα χαρακτηριστικά του φωτισμού θα πρέπει να είναι γνωστά. Θα πρέπει να αποδίδεται ιδιαίτερη προσοχή στην πιθανότητα φωτομετασχηματισμού της υπό δοκιμής ουσίας στις συνθήκες ακτινοβολίας της δοκιμής. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται κατάλληλος φωτισμός για να αποφεύγεται η έκθεση των ψαριών σε μη φυσικά φωτοπροϊόντα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να είναι σκόπιμη η χρήση φίλτρου για την αποκοπή των μηκών κύματος υπεριώδους ακτινοβολίας κάτω των 290 nm.

▼M7

Συγκεντρώσεις δοκιμής

Η δοκιμή σχεδιάστηκε αρχικά για μη πολικές οργανικές ουσίες. Για ουσίες αυτού του είδους, η έκθεση των ψαριών σε μία μόνο συγκέντρωση αναμένεται ότι θα αρκεί, καθώς δεν αναμένονται επιδράσεις της συγκέντρωσης, αν και το σχετικό ρυθμιστικό πλαίσιο μπορεί να επιβάλλει δύο συγκεντρώσεις. Εάν εξετάζονται ουσίες που δεν εμπίπτουν σε αυτό το πεδίο εφαρμογής ή εάν είναι γνωστές άλλες ενδείξεις πιθανής εξάρτησης από τη συγκέντρωση, η δοκιμή θα πρέπει να εκτελείται με δύο ή περισσότερες συγκεντρώσεις. Όταν υποβάλλεται σε δοκιμή μία μόνο συγκέντρωση, πρέπει να αιτιολογείται η επιλογή αυτή (βλ. παράγραφο 79). Επίσης, η εξεταζόμενη συγκέντρωση θα πρέπει να είναι τόσο χαμηλή όσο είναι πρακτικά ή τεχνικά εφικτό (δηλ. να μην προσεγγίζει το όριο διαλυτότητας).

Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να προβλεφθεί ότι η βιοσυγκέντρωση της ουσίας θα εξαρτάται από τη συγκέντρωσή της στο νερό (π.χ. για τα μέταλλα, των οποίων η πρόσληψη από τα ψάρια μπορεί να υπόκειται σε ρύθμιση, τουλάχιστον εν μέρει). Σε αυτή την περίπτωση, είναι απαραίτητο να εξετάζονται τουλάχιστον δύο και κατά προτίμηση περισσότερες συγκεντρώσεις (βλ. παράγραφο 49) με περιβαλλοντική σημασία. Επίσης, όσον αφορά τις ουσίες για τις οποίες οι συγκεντρώσεις δοκιμής πρέπει να προσεγγίζουν το όριο διαλυτότητας για πρακτικούς λόγους, συνιστάται η διεξαγωγή της δοκιμής με δύο τουλάχιστον συγκεντρώσεις, διότι με τον τρόπο αυτό είναι δυνατόν να διαμορφωθεί αντίληψη σχετικά με την αξιοπιστία των συγκεντρώσεων έκθεσης. Στις επιλεγόμενες συγκεντρώσεις δοκιμής θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται η περιβαλλοντικά ρεαλιστική συγκέντρωση, καθώς και η συγκέντρωση που έχει σημασία για τους σκοπούς της συγκεκριμένης εκτίμησης.

Οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας θα πρέπει να επιλέγονται κατά τρόπο ώστε να είναι χαμηλότερες από το επίπεδο στο οποίο αυτή έχει χρόνιες επιδράσεις ή από 1 % της οξείας ασυμπτωτικής της LC_{50}, να βρίσκονται εντός εύρους τιμών που συναντάται στο περιβάλλον και να υπερβαίνουν τουλάχιστον κατά μία τάξη μεγέθους το όριο ποσοτικοποίησης της ουσίας στο νερό με τη χρησιμοποιούμενη αναλυτική μέθοδο. Η ανώτατη επιτρεπτή συγκέντρωση δοκιμής μπορεί επίσης να προσδιοριστεί με διαίρεση της οξείας LC_{50} 96 ωρών διά του κατάλληλου λόγου οξείας προς χρόνια τοξικότητα (π.χ. οι κατάλληλοι λόγοι για ορισμένες χημικές ουσίες είναι περίπου 3, αλλά για ορισμένες υπερβαίνουν το 100). Εάν χρησιμοποιείται δεύτερη συγκέντρωση, αυτή θα πρέπει να διαφέρει από την προαναφερθείσα κατά παράγοντα ίσο με δέκα. Εάν αυτό δεν είναι εφικτό λόγω του κριτηρίου τοξικότητας (το οποίο θέτει όριο στην ανώτατη συγκέντρωση δοκιμής) και του αναλυτικού ορίου (το οποίο θέτει όριο στην κατώτατη συγκέντρωση δοκιμής), μπορεί να χρησιμοποιηθεί παράγοντας μικρότερος από δέκα και θα πρέπει να εξεταστεί το ενδεχόμενο χρησιμοποίησης ραδιοσημασμένης υπό δοκιμή ουσίας (με τη μέγιστη καθαρότητα, κατά προτίμηση > 98 %). Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε καμία από τις χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις να μην υπερβαίνει το όριο διαλυτότητας της υπό δοκιμή ουσίας στα μέσα δοκιμής.

Μάρτυρες

Επιπλέον της σειράς δοκιμής, θα πρέπει να ελέγχεται ένας μάρτυρας με νερό αραίωσης ή, εάν χρησιμοποιείται διαλύτης (βλ. παραγράφους 30 και 31), ένας μάρτυρας με διαλύτη.

Συχνότητα μετρήσεων της ποιότητας του νερού

Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, θα πρέπει να εκτελούνται μετρήσεις του διαλυμένου οξυγόνου, του TOC, του pH και της θερμοκρασίας σε όλα τα δοχεία δοκιμής και μαρτύρων. Η ολική σκληρότητα και η αλατότητα (κατά περίπτωση) θα πρέπει να μετριούνται στους μάρτυρες και σε ένα δοχείο. Εάν εξετάζονται δύο ή περισσότερες συγκεντρώσεις, οι παράμετροι αυτές μετρώνται στην υψηλότερη (ή την ανώτατη) συγκέντρωση. Το διαλυμένο οξυγόνο και η αλατότητα (κατά περίπτωση) θα πρέπει να μετριούνται τουλάχιστον τρεις φορές — στην αρχή, περί τα μέσα και στο τέλος της περιόδου πρόσληψης — και εβδομαδιαίως κατά την περίοδο αποβολής. Ο TOC θα πρέπει να μετριέται στην αρχή της δοκιμής (24 και 48 ώρες πριν από την έναρξη της φάσης πρόσληψης) πριν προστεθούν τα ψάρια και τουλάχιστον εβδομαδιαίως κατά τη διάρκεια των φάσεων πρόσληψης και αποβολής. Η θερμοκρασία θα πρέπει να μετριέται και να καταγράφεται κάθε ημέρα, το pH στην αρχή και στο τέλος κάθε περιόδου και η σκληρότητα μία φορά σε κάθε δοκιμή. Η θερμοκρασία θα πρέπει κατά προτίμηση να παρακολουθείται συνεχώς σε ένα τουλάχιστον δοχείο.

▼M7

Δειγματοληψία και ανάλυση ψαριών και νερού

Πρόγραμμα δειγματοληψίας ψαριών και νερού

Θα πρέπει να λαμβάνονται δείγματα νερού από τους θαλάμους δοκιμής για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της υπό δοκιμής ουσίας, πριν από την προσθήκη των ψαριών και κατά τη διάρκεια των φάσεων πρόσληψης και αποβολής. Τα δείγματα νερού θα πρέπει να λαμβάνονται πριν από τη σίτιση, συγχρόνως με τη δειγματοληψία ψαριών. Μια αύξηση των συχνοτήτων δειγματοληψίας μπορεί να είναι χρήσιμη για να εξασφαλίζονται σταθερές συγκεντρώσεις μετά την εισαγωγή των ψαριών. Κατά τη φάση πρόσληψης, θα πρέπει να προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας ώστε να ελέγχεται η συμμόρφωση με τα κριτήρια εγκυρότητας (παράγραφος 24). Εάν από αναλύσεις δειγμάτων νερού κατά την έναρξη της φάσης αποβολής προκύπτει ότι η υπό δοκιμή ουσία δεν ανιχνεύεται, αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αιτιολογία για την παράλειψη της μέτρησης της υπό δοκιμή ουσίας στο νερό των δοχείων δοκιμής και μαρτύρων για το υπόλοιπο της φάσης αποβολής.

Θα πρέπει να λαμβάνονται δείγματα ψαριών τουλάχιστον πέντε φορές κατά τη φάση πρόσληψης και τουλάχιστον τέσσερις φορές κατά τη διάρκεια της φάσης αποβολής για τη μέτρηση της υπό δοκιμή ουσίας. Επειδή ορισμένες φορές είναι δύσκολο να υπολογιστεί μια εύλογα ακριβής τιμή του BCF με βάση τον εν λόγω αριθμό δειγμάτων (ιδίως όταν υπάρχουν ενδείξεις ότι η κινητική της πρόσληψης και της αποβολής δεν είναι απλή κινητική πρώτης τάξης), μπορεί να είναι σκόπιμο να λαμβάνονται δείγματα με υψηλότερες συχνότητες και τις δύο περιόδους (βλ. παράρτημα 4).

Η περιεκτικότητα σε λιπίδια θα πρέπει να προσδιορίζεται στο βιολογικό υλικό που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας, τουλάχιστον στην αρχή και στο τέλος της φάσης πρόσληψης και στο τέλος της φάσης αποβολής. Εάν αυτό δεν είναι εφικτό, θα πρέπει να λαμβάνονται ως δείγματα τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα ψάρια για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε λιπίδια σε καθεμία από αυτές τις τρεις χρονικές στιγμές. Ο αριθμός των ψαριών ανά δεξαμενή κατά την έναρξη του πειράματος θα πρέπει να προσαρμόζεται αναλόγως ([1]). Εναλλακτικά, εάν δεν ανιχνεύονται σημαντικές ποσότητες της υπό δοκιμή ουσίας στα ψάρια-μάρτυρες (δηλ. ψάρια από τον πληθυσμό του αποθέματος), μπορεί να προσδιορίζεται στα ψάρια-μάρτυρες της δοκιμής μόνο η περιεκτικότητα σε λιπίδια και να διορθώνεται το αποτέλεσμα της ανάλυσης της υπό δοκιμή ουσίας στις ομάδες δοκιμής (και οι σχετικές τιμές σταθεράς ρυθμού πρόσληψης, σταθεράς ρυθμού αποβολής και BCF) για να λαμβάνονται υπόψη οι μεταβολές ανάλογα με την περιεκτικότητα των ομάδων-μαρτύρων σε λιπίδια κατά τη διάρκεια της δοκιμής ([2]).

Η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας και των λιπιδίων δεν θα πρέπει να αναλύεται σε νεκρά ή ασθενή ψάρια.

Παράδειγμα αποδεκτού προγράμματος δειγματοληψίας δίδεται στο προσάρτημα 4. Μπορούν εύκολα να καταρτιστούν και άλλα προγράμματα με τη χρήση άλλων κατά παραδοχή τιμών K_{OW} για τον υπολογισμό του χρόνου έκθεσης για πρόσληψη 95 % (βλ. υπολογισμούς στο προσάρτημα 5).

Η δειγματοληψία θα πρέπει να συνεχίζεται κατά τη φάση πρόσληψης μέχρις ότου αποκατασταθεί σταθερή κατάσταση (βλ. προσάρτημα 1 «Ορισμοί και μονάδες») ή τερματιστεί η εν λόγω φάση με άλλον τρόπο (μετά από 28 ή 60 ημέρες, βλ. παραγράφους 37 και 38). Πριν από την έναρξη της φάσης αποβολής, τα ψάρια θα πρέπει να μεταφέρονται σε καθαρά δοχεία.

Δειγματοληψία και παρασκευή δείγματος

Θα πρέπει να λαμβάνονται δείγματα νερού για ανάλυση, π.χ. με σιφωνισμό μέσω αδρανών σωληνώσεων από κεντρικό σημείο του θαλάμου δοκιμής. Ούτε η διήθηση ούτε η φυγοκέντρηση φαίνεται να διαχωρίζουν πάντοτε το μη βιοδιαθέσιμο

([1]) Εάν η περιεκτικότητα σε λιπίδια δεν αναλύεται στα ίδια ψάρια με την υπό δοκιμή ουσία, τα ψάρια θα πρέπει τουλάχιστον να έχουν παρόμοιο βάρος και (κατά περίπτωση) να είναι του ίδιου φύλου.

([2]) Η εναλλακτική αυτή λύση είναι έγκυρη μόνο εάν τα ψάρια όλων των ομάδων δοκιμής διατηρούνται σε ομάδες παρόμοιου μεγέθους, απομακρύνονται από τα δοχεία σύμφωνα με το ίδιο μοντέλο και σιτίζονται με τον ίδιο τρόπο. Με τον τρόπο αυτό διασφαλίζεται παρόμοια ανάπτυξη των ψαριών όλων των ομάδων δοκιμής, εάν η εξεταζόμενη συγκέντρωση είναι μικρότερη από το τοξικό εύρος. Εάν η ανάπτυξη είναι παρόμοια, αναμένεται να είναι παρόμοια και η περιεκτικότητα σε λιπίδια. Οι αναπτυξιακές διαφορές στην ομάδα μάρτυρα θα υποδηλώνουν επίδραση ουσίας και θα ακυρώνουν τη μελέτη.

▼M7

κλάσμα της υπό δοκιμή ουσίας από το βιοδιαθέσιμο. Εάν εφαρμόζεται τεχνική διαχωρισμού, η έκθεση δοκιμής θα πρέπει πάντοτε να περιλαμβάνει αιτιολόγηση ή επικύρωση της τεχνικής διαχωρισμού, δεδομένων των δυσχερειών ως προς τη βιοδιαθεσιμότητα (25). Τα δείγματα δεν θα πρέπει να υποβάλλονται σε αυτές τις κατεργασίες, ιδίως προκειμένου για εξαιρετικά υδρόφοβες ουσίες (δηλ. ουσίες με $\log K_{OW} > 5$) (12) (26), στην περίπτωση των οποίων υπάρχει πιθανότητα προσρόφησης στον φορέα του ηθμού ή στους σωλήνες φυγοκέντρησης. Αντ' αυτού, θα πρέπει αφενός να λαμβάνονται μέτρα ώστε οι δεξαμενές να διατηρούνται όσο το δυνατόν καθαρότερες (βλ. παράγραφο 46) και, αφετέρου, να παρακολουθείται η περιεκτικότητα σε ολικό οργανικό άνθρακα κατά τη διάρκεια τόσο της φάσης πρόσληψης όσο και της φάσης αποβολής (βλ. παράγραφο 53). Για την αποφυγή τυχόν προβλημάτων μειωμένης βιοδιαθεσιμότητας, μπορεί να εφαρμοστεί δειγματοληψία με τεχνικές μικροεκχύλισης σε στερεά φάση για τις δυσδιάλυτες και εξαιρετικά υδρόφοβες ουσίες.

Τα ψάρια των δειγμάτων θα πρέπει να υποβάλλονται σε ευθανασία αμέσως, με την πλέον ενδεδειγμένη και ανώδυνη μέθοδο [για μετρήσεις σε ολόκληρα ψάρια, δεν θα πρέπει να εφαρμόζονται άλλες διαδικασίες εκτός από έκπλυση με νερό (βλ. παράγραφο 28) και στέγνωμα των ψαριών με απορροφητικό χαρτί]. Κατόπιν μετριέται το βάρος και το ολικό μήκος των ψαριών [1]. Για κάθε ψάρι, το μετρούμενο βάρος και μήκος θα πρέπει να αντιστοιχίζονται με τη συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας (και την περιεκτικότητα σε λιπίδια, κατά περίπτωση) που προσδιορίζεται με την ανάλυση, για παράδειγμα με τη χρήση αποκλειστικού αναγνωριστικού κωδικού για κάθε ψάρι δείγματος.

Είναι προτιμότερο η ανάλυση των ψαριών και του νερού να διενεργείται αμέσως μετά τη δειγματοληψία, για να αποτρέπονται τυχόν αποδόμηση ή άλλες απώλειες και να υπολογίζονται κατά προσέγγιση σταθερές ρυθμού πρόσληψης και αποβολής με την πρόοδο της δοκιμής. Με την άμεση ανάλυση αποφεύγονται επίσης καθυστερήσεις στον προσδιορισμό του χρόνου οριζοντίωσης της καμπύλης (επίτευξη σταθερής κατάστασης).

Εάν δεν διενεργείται άμεση ανάλυση, τα δείγματα θα πρέπει να φυλάσσονται με κατάλληλη μέθοδο. Πριν από την έναρξη της μελέτης, θα πρέπει να συγκεντρώνονται πληροφορίες σχετικά με την κατάλληλη μέθοδο φύλαξης της συγκεκριμένης υπό δοκιμή ουσίας — π.χ. βαθιά κατάψυξη, διατήρηση στους 4 °C, εκχύλιση κ.λπ. Η διάρκεια φύλαξης θα πρέπει να επιλέγεται κατά τρόπο που να εξασφαλίζει ότι η ουσία δεν αποδομείται στο διάστημα αυτό.

Ποιότητα της αναλυτικής μεθόδου

Επειδή η όλη διαδικασία εξαρτάται ουσιαστικά από την ορθότητα, την ακρίβεια και την ευαισθησία της αναλυτικής μεθόδου που χρησιμοποιείται για την υπό δοκιμή ουσία, ελέγχεται πειραματικά αν η ορθότητα, η ακρίβεια και αναπαραγωγιμότητα της ανάλυσης της ουσίας, καθώς και η ανάκτησή της από το νερό και τα ψάρια είναι ικανοποιητικές για τη συγκεκριμένη μέθοδο. Ο εν λόγω πειραματικός έλεγχος θα πρέπει να αποτελεί μέρος των προκαταρκτικών δοκιμών. Εξακριβώνεται, επίσης, ότι η υπό δοκιμή ουσία δεν ανιχνεύεται στο χρησιμοποιούμενο νερό αραίωσης. Εάν είναι αναγκαίο, οι τιμές συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στο νερό και στα ψάρια, που προκύπτουν από τη δοκιμή, διορθώνονται για να ληφθούν υπόψη οι τιμές ανάκτησης και συγκεντρώσεων υποβάθρου στους μάρτυρες. Ο χειρισμός των δειγμάτων ψαριών και νερού θα πρέπει να ελαχιστοποιεί τις μολύνσεις και τις απώλειες (που οφείλονται, π.χ., σε προσρόφηση στη συσκευή δειγματοληψίας) σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής.

Ανάλυση του δείγματος ψαριών

Εάν στη δοκιμή χρησιμοποιούνται ραδιοσημασμένα υλικά, είναι δυνατόν να προσδιοριστεί το σύνολο της ραδιοσήμανσης (δηλ. μητρική ουσία και μεταβολίτες) ή να καθαριστούν τα δείγματα ώστε να μπορεί να αναλυθεί χωριστά η μητρική ουσία. Εάν ο BCF πρόκειται να βασίζεται στη μητρική ουσία, θα πρέπει να χαρακτηρίζονται οι βασικοί μεταβολίτες, τουλάχιστον στο τέλος της φάσης πρόσληψης (βλ. παράγραφο 6). Σημαντικοί μεταβολίτες είναι όσοι αντιπροσωπεύουν ποσοστό ≥ 10 % των ολικών καταλοίπων στους ιστούς των ψαριών, όσοι αντιπροσωπεύουν ποσοστό ≥ 5 % σε δύο διαδοχικά χρονικά σημεία δειγματοληψίας, όσοι εμφανίζουν αυξανόμενα επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης και όσοι είναι γνωστό ότι προκαλούν ανησυχίες από τοξικολογικής πλευράς. Εάν ο BCF για ολόκληρο το ψάρι ως προς τα ολικά ραδιοσημασμένα

[1] Εκτός από το βάρος, θα πρέπει να καταγράφεται και το ολικό μήκος, διότι η σύγκριση των αυξήσεων του μήκους κατά τη διάρκεια της δοκιμής αποτελεί καλό δείκτη της επέλευσης δυσμενών επιδράσεων.

▼M7

κατάλοιπα είναι ≥ 500, ενδέχεται να είναι σκόπιμη — και για ορισμένες κατηγορίες ουσιών, όπως τα γεωργικά φάρμακα, συνιστάται ένθερμα — η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση των σημαντικών μεταβολιτών. Η ποσοτικοποίηση των εν λόγω μεταβολιτών ενδέχεται να απαιτείται από ορισμένες ρυθμιστικές αρχές. Εάν ταυτοποιούνται και ποσοτικοποιούνται προϊόντα αποδόμησης που αντιπροσωπεύουν ποσοστό ≥ 10 % των ολικών ραδιοσημασμένων καταλοίπων στους ιστούς των ψαριών, συνιστάται η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των προϊόντων αποδόμησης και στο νερό δοκιμής. Εάν αυτό δεν είναι εφικτό, αυτό θα πρέπει να εξηγείται στην έκθεση.

Η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας πρέπει συνήθως να προσδιορίζεται σε κάθε ζυγισμένο ψάρι χωριστά. Εάν αυτό δεν είναι εφικτό, επιτρέπεται η συγχώνευση δειγμάτων σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας, η οποία, ωστόσο, περιορίζει τις στατιστικές διαδικασίες που μπορούν να εφαρμοστούν στα δεδομένα και, κατά συνέπεια, θα πρέπει να περιλαμβάνεται στη δοκιμή κατάλληλος αριθμός ψαριών που να εξυπηρετεί την επιθυμητή συγχώνευση, καθώς και τη στατιστική διαδικασία και ισχύ. Οι βιβλιογραφικές παραπομπές (27) και (28) μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εισαγωγή στις σχετικές διαδικασίες συγχώνευσης.

Ο BCF θα πρέπει να εκφράζεται κανονικοποιημένος σε ψάρι με περιεκτικότητα 5 % σε λιπίδια (με βάση το νωπό βάρος), επιπλέον της τιμής που προκύπτει απευθείας από τη μελέτη (βλ. παράγραφο 21), εκτός εάν είναι δυνατόν να υποστηριχθεί ότι η υπό δοκιμή ουσία δεν συσσωρεύεται κατά κύριο λόγο σε λιπίδια. Εφόσον είναι δυνατόν, η περιεκτικότητα των ψαριών σε λιπίδια θα πρέπει να προσδιορίζεται σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας, κατά προτίμηση στο εκχύλισμα που παρασκευάζεται για την ανάλυση της υπό δοκιμή ουσίας, δεδομένου ότι τα λιπίδια πρέπει συχνά να απομακρύνονται από το εκχύλισμα πριν αυτό υποβληθεί σε χρωματογραφική ανάλυση. Ωστόσο, η ανάλυση των υπό δοκιμή ουσιών απαιτεί συχνά ειδικές διαδικασίες εκχύλισης που ενδεχομένως δεν είναι σύμφωνες με τις μεθόδους δοκιμών για τον προσδιορισμό των λιπιδίων. Στην περίπτωση αυτή (έως ότου καταστούν διαθέσιμες κατάλληλες μη καταστροφικές μέθοδοι ενόργανης ανάλυσης), συνιστάται να ακολουθείται διαφορετική στρατηγική για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας των ψαριών σε λιπίδια (βλ. παράγραφο 56). Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες μέθοδοι για τον προσδιορισμό της εν λόγω περιεκτικότητας (20). Ενώ συνιστάται η τεχνική της εκχύλισης με χλωροφόρμιο/μεθανόλη (29) ως πρότυπη μέθοδος (30), συνιστάται επίσης η μέθοδος Smedes (31) ως εναλλακτική τεχνική. Η τελευταία χαρακτηρίζεται από συγκρίσιμη απόδοση εκχύλισης, υψηλή ορθότητα, χρήση λιγότερο τοξικών οργανικών διαλυτών και ευχρηστία. Μπορούν να χρησιμοποιούνται και άλλες μέθοδοι, η ορθότητα των οποίων είναι εφάμιλλη εκείνης των συνιστώμενων μεθόδων, εφόσον παρέχεται η δέουσα αιτιολόγηση. Είναι σημαντικό να παρέχονται λεπτομερή στοιχεία για τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο.

Μέτρηση της ανάπτυξης των ψαριών

Κατά την έναρξη της δοκιμής, πρέπει να ζυγίζονται χωριστά πέντε έως δέκα ψάρια από τον πληθυσμό του αποθέματος ψαριών και να μετράται το ολικό τους μήκος. Τα ίδια ψάρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την ανάλυση των λιπιδίων (βλ. παράγραφο 56). Το βάρος και το μήκος των ψαριών που χρησιμοποιούνται για κάθε δειγματοληψία, τόσο από την ομάδα δοκιμής όσο και από την ομάδα μαρτύρων, θα πρέπει να μετράται πριν από την ανάλυση της χημικής ουσίας ή των λιπιδίων. Οι μετρήσεις σε αυτά τα δείγματα ψαριών μπορούν να χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση του βάρους και του μήκους των ψαριών που απομένουν στις δεξαμενές δοκιμής και μαρτύρων (βλ. παράγραφο 45).

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Η καμπύλη πρόσληψης της υπό δοκιμή ουσίας θα πρέπει να λαμβάνεται με γραφική παράσταση της συγκέντρωσής της στη μάζα/επιφάνεια των ψαριών (ή συγκεκριμένων ιστών) κατά τη φάση πρόσληψης σε συνάρτηση με τον χρόνο σε αριθμητική κλίμακα. Εάν η καμπύλη έχει οριζοντιωθεί, αν δηλαδή τείνει ασυμπτωτικά προς τον άξονα του χρόνου, ο BCF σε σταθερή κατάσταση (BCF_{SS}) θα πρέπει να υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\frac{C_f \text{σταθερής κατάστασης(μέση)}}{C_w \text{σταθερής κατάστασης(μέση)}}$$

▼M7

Η εξέλιξη της συγκέντρωσης C_f μπορεί να επηρεαστεί από την ανάπτυξη των ψαριών (βλ. παραγράφους 72 και 73). Η μέση συγκέντρωση έκθεσης (C_w) επηρεάζεται από τη μεταβολή με την πάροδο του χρόνου. Μπορεί να αναμένεται ότι η χρονοσταθμισμένη μέση συγκέντρωση είναι καταλληλότερη και ακριβέστερη για τις μελέτες βιοσυγκέντρωσης, ακόμη και αν η μεταβλητότητα βρίσκεται εντός της ενδεδειγμένης περιοχής εγκυρότητας (βλ. παράγραφο 24). Η χρονοσταθμισμένη μέση (TWA) συγκέντρωση στο νερό μπορεί να υπολογιστεί σύμφωνα με το προσάρτημα 5, τμήμα 1.

Ο κινητικός συντελεστής βιοσυγκέντρωσης (BCF_K) θα πρέπει να προσδιορίζεται ως ο λόγος k_1/k_2, ήτοι των δύο σταθερών ρυθμού της κινητικής πρώτης τάξης. Οι σταθερές ρυθμού k_1 και k_2 και BCF_K μπορούν να ληφθούν με ταυτόχρονη προσαρμογή τόσο της φάσης πρόσληψης όσο και της φάσης αποβολής. Εναλλακτικά, η k_1 και η k_2 μπορούν να προσδιορίζονται διαδοχικά (βλ. παράρτημα 5 για περιγραφή και σύγκριση αυτών των μεθόδων). Η σταθερά ρυθμού αποβολής (k_2) μπορεί να χρειαστεί διόρθωση για να ληφθεί υπόψη η αναπτυξιακή αραίωση (βλ. παραγράφους 72 και 73). Εάν είναι προφανές ότι η καμπύλη πρόσληψης και/ή αποβολής δεν είναι πρώτης τάξης, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πιο σύνθετα μοντέλα (βλ. παραπομπές στο προσάρτημα 5) και να ζητούνται οδηγίες από βιοστατιστικολόγο και/ή ειδικό στη φαρμακοκινητική.

Δεδομένα για το βάρος/μήκος των ψαριών

Το νωπό βάρος και το ολικό μήκος κάθε ψαριού, σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας, παρουσιάζονται σε πίνακα χωριστά για τις ομάδες δοκιμής και τις ομάδες μαρτύρων κατά τις φάσεις πρόσληψης και αποβολής (συμπεριλαμβανομένου του πληθυσμού του αποθέματος κατά την έναρξη της πρόσληψης. Το μετρούμενο βάρος και μήκος κάθε ψαριού θα πρέπει να αντιστοιχίζεται με τη συγκέντρωση της χημικής ουσίας που προκύπτει από την ανάλυση, για παράδειγμα με τη χρήση αποκλειστικού αναγνωριστικού κωδικού για κάθε δείγμα ψαριών. Το βάρος είναι η προτιμώμενη παράμετρος ανάπτυξης για τη διόρθωση των τιμών του BCF κινητικής προκειμένου να ληφθεί υπόψη η αναπτυξιακή αραίωση (βλ. μέθοδο που χρησιμοποιείται για την εν λόγω διόρθωση των δεδομένων στην παράγραφο 73 και στο προσάρτημα).

Διόρθωση ως προς την αναπτυξιακή αραίωση και κανονικοποίηση ως προς τα λιπίδια

Η ανάπτυξη των ψαριών κατά τη φάση αποβολής μπορεί να ελαττώσει τις μετρούμενες συγκεντρώσεις χημικών ουσιών στα ψάρια, με αποτέλεσμα η συνολική σταθερά ρυθμού αποβολής (k_2) να είναι μεγαλύτερη από αυτήν που θα προέκυπτε μόνο από διεργασίες απομάκρυνσης (π.χ. αναπνοή, μεταβολισμός, εκκένωση). Οι συντελεστές βιοσυγκέντρωσης κινητικής θα πρέπει να διορθώνονται ως προς την αναπτυξιακή αραίωση. Ο BCF_{SS} επηρεάζεται επίσης από την ανάπτυξη, αλλά δεν έχει συμφωνηθεί διαδικασία για τη σχετική διόρθωση αυτού του παράγοντα. Σε περιπτώσεις σημαντικής ανάπτυξης, θα πρέπει επίσης να συνάγεται ο διορθωμένος ως προς την ανάπτυξη BCF_K (BCF_{Kg}), καθώς μπορεί να είναι πιο κατάλληλη παράμετρος βιοσυγκέντρωσης. Η περιεκτικότητα των ψαριών της δοκιμής σε λιπίδια (που συνδέεται στενά με τη βιοσυσσώρευση των υδρόφοβων ουσιών) μπορεί να ποικίλλει στην πράξη, σε βαθμό ώστε να είναι αναγκαία η κανονικοποίηση σε καθορισμένη περιεκτικότητα των ψαριών σε λιπίδια [5 % (κ.β.)] για λήψη χρήσιμων παραγόντων βιοσυγκέντρωσης, τόσο σε σταθερή κατάσταση όσο και κινητικής, εκτός εάν είναι δυνατόν να υποστηριχθεί ότι η υπό δοκιμή ουσία δεν συσσωρεύεται κατά κύριο λόγο σε λιπίδια (π.χ. ορισμένες υπερφθοριωμένες ουσίες μπορεί να δεσμεύονται από πρωτεΐνες). Εξισώσεις και παραδείγματα για τους υπολογισμούς αυτούς παρατίθενται στο προσάρτημα 5.

Για τη διόρθωση του κινητικού BCF ως προς την αναπτυξιακή αραίωση, η σταθερά ρυθμού αποβολής θα πρέπει να διορθώνεται ως προς την ανάπτυξη. Αυτή η διορθωμένη ως προς την ανάπτυξη σταθερά ρυθμού αποβολής (k_{2g}) υπολογίζεται με την αφαίρεση της σταθεράς ρυθμού ανάπτυξης (k_g, όπως λαμβάνεται από τα στοιχεία του μετρούμενου βάρους) από τη συνολική σταθερά ρυθμού αποβολής (k_2). Στη συνέχεια, υπολογίζεται ο διορθωμένος ως προς την ανάπτυξη κινητικός συντελεστής βιοσυγκέντρωσης με διαίρεση της σταθεράς ρυθμού πρόσληψης (k_1) διά της διορθωμένης ως προς την ανάπτυξη σταθεράς ρυθμού αποβολής (k_{2g}) (βλ. προσάρτημα 5). Σε ορισμένες περιπτώσεις, η προσέγγιση αυτή υπονομεύεται: για παράδειγμα, για ουσίες με πολύ αργό ρυθμό αποβολής που εξετάζονται σε ταχέως αναπτυσσόμενα ψάρια, η προκύπτουσα τιμή k_{2g} μπορεί να είναι πολύ μικρή και, ως εκ τούτου, το σφάλμα στις δύο

▼M7

σταθερές ρυθμού που χρησιμοποιούνται για να ληφθεί αυτή η τιμή καθίσταται κρίσιμο και, σε ορισμένες περιπτώσεις, οι εκτιμήσεις της σταθεράς k_g μπορεί να είναι μεγαλύτερες από την k_2. Μια εναλλακτική προσέγγιση, με την οποία παρακάμπτεται η ανάγκη διόρθωσης ως προς την αναπτυξιακή αραίωση, συνίσταται στη χρήση δεδομένων αποβολής που εκφράζονται σε μάζα της υπό δοκιμή ουσίας ανά ψάρι (για ολόκληρα ψάρια) αντί των συνήθων δεδομένων που εκφράζονται σε μάζα της υπό δοκιμή ουσίας ανά μονάδα μάζας ψαριού (συγκέντρωση). Αυτό μπορεί να επιτευχθεί εύκολα, δεδομένου ότι στις δοκιμές σύμφωνα με την παρούσα μέθοδο οι καταγραφόμενες συγκεντρώσεις σε ιστούς θα πρέπει να αντιστοιχίζονται με το βάρος των επιμέρους ψαριών. Η απλή διαδικασία που εφαρμόζεται για τον σκοπό αυτό περιγράφεται συνοπτικά στο προσάρτημα 5. Επισημαίνεται ότι η k_2 θα πρέπει να αναφέρεται ακόμη κι αν ακολουθείται αυτή η εναλλακτική προσέγγιση.

Οι παράγοντες βιοσυγκέντρωσης, κινητικός και σε σταθερή κατάσταση, θα πρέπει επίσης να αναφέρονται σε σχέση με την προεπιλεγμένη περιεκτικότητα 5 % κ.β. των ψαριών σε λιπίδια, εκτός εάν είναι δυνατόν να υποστηριχθεί ότι η υπό δοκιμή ουσία δεν συσσωρεύεται κατά κύριο λόγο σε λιπίδια. Τα δεδομένα συγκέντρωσης στα ψάρια, ή ο BCF, κανονικοποιούνται σύμφωνα με τον λόγο της περιεκτικότητας 5 % προς την πραγματική (ατομική) μέση περιεκτικότητα σε λιπίδια (σε % του νωπού βάρους) (βλ. προσάρτημα 5).

Εάν οι αναλύσεις της χημικής ουσίας και των λιπιδίων έχουν διεξαχθεί στο ίδιο ψάρι, τα κανονικοποιημένα δεδομένα για την περιεκτικότητα κάθε ψαριού σε λιπίδια θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό κανονικοποιημένου ως προς τα λιπίδια BCF. Εναλλακτικά, εάν η ανάπτυξη των ψαριών-μαρτύρων είναι παρόμοια με εκείνη των εκτιθέμενων ψαριών, μπορεί να χρησιμοποιείται για τη διόρθωση ως προς τα λιπίδια μόνο η περιεκτικότητα των ψαριών-μαρτύρων σε λιπίδια (βλ. παράγραφο 56). Μια μέθοδος για τον υπολογισμό κανονικοποιημένου ως προς τα λιπίδια BCF περιγράφεται στο προσάρτημα 5.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή όταν οι μετρούμενες συγκεντρώσεις των διαλυμάτων δοκιμής βρίσκονται σε επίπεδα κοντά στο όριο ανίχνευσης της αναλυτικής μεθόδου.

Η μέση ανάπτυξη στις ομάδες δοκιμής και στις ομάδες μαρτύρων θα πρέπει, κατ' αρχήν, να μην παρουσιάζει σημαντικές διαφορές, ώστε να αποκλείεται το ενδεχόμενο τοξικών επιδράσεων. Οι σταθερές ρυθμού ανάπτυξης ή οι καμπύλες ανάπτυξης των δύο ομάδων θα πρέπει να συγκρίνονται με κατάλληλη διαδικασία ([1]).

Οι καλώς καθορισμένες καμπύλες πρόσληψης και αποβολής αποτελούν ένδειξη καλής ποιότητας των δεδομένων βιοσυγκέντρωσης. Για τις σταθερές ρυθμού, το αποτέλεσμα του ελέγχου ποιότητας προσαρμογής χ^2 θα πρέπει να παρουσιάζει ικανοποιητική προσαρμογή [δηλ. μικρό ποσοστό σφάλματος μετρήσεων (32)] του μοντέλου βιοσυσσώρευσης, ώστε οι σταθερές ρυθμού να μπορούν να θεωρηθούν αξιόπιστες (βλ. προσάρτημα 5). Εάν χρησιμοποιούνται περισσότερες από μία συγκεντρώσεις δοκιμής, η μεταβολή των σταθερών πρόσληψης/αποβολής μεταξύ των συγκεντρώσεων δοκιμής θα πρέπει να είναι μικρότερη από 20 % ([2]). Σε διαφορετική περίπτωση, μπορεί να αποτελεί ένδειξη εξάρτησης από τη συγκέντρωση. Η παρατήρηση σημαντικών διαφορών μεταξύ των χρησιμοποιούμενων συγκεντρώσεων δοκιμής ως προς τις σταθερές ρυθμού πρόσληψης/αποβολής θα πρέπει να καταγράφεται και να διατυπώνονται πιθανές εξηγήσεις. Γενικά, το όριο εμπιστοσύνης 95 % των BCF που προέρχονται από καλοσχεδιασμένες μελέτες προσεγγίζει το ± 20 % του προκύπτοντος BCF.

Εάν εξετάζονται δύο ή περισσότερες συγκεντρώσεις, τα αποτελέσματα και των δύο ή όλων των συγκεντρώσεων χρησιμοποιούνται για να διερευνηθεί αν τα

([1]) Οι σταθερές ρυθμού ανάπτυξης μπορούν να υποβληθούν σε στατιστικό έλεγχο t, για να διαπιστωθεί αν υπάρχει διαφορά ανάπτυξης μεταξύ των ομάδων δοκιμής και των ομάδων μαρτύρων, ή σε έλεγχο F σε περίπτωση ανάλυσης διασποράς. Σε περίπτωση ανάγκης, μπορεί να διενεργηθεί έλεγχος F ή έλεγχος λόγου πιθανοφανειών για να υποβοηθήσει την επιλογή του κατάλληλου αναπτυξιακού μοντέλου [μονογραφία αριθ. 54 του ΟΟΣΑ, (32)].

([2]) Τα ποσοστά αυτά προϋποθέτουν ότι οι αναλυτικές μέθοδοι είναι αξιόπιστες και ο χρόνος υποδιπλασιασμού είναι < 14 ημέρες. Εάν οι αναλυτικές μέθοδοι είναι λιγότερο αξιόπιστες ή ο χρόνος υποδιπλασιασμού είναι (κατά πολύ) μεγαλύτερος, οι αριθμοί αυτοί θα είναι μεγαλύτεροι.

▼M7

αποτελέσματα είναι σταθερά και να διαπιστωθεί κατά πόσον υπάρχει εξάρτηση από τη συγκέντρωση. Εάν εξετάζεται μόνο μία συγκέντρωση, για να μειωθεί η χρήση ζώων και/ή πόρων, θα πρέπει να παρέχεται αιτιολόγηση της χρήσης μίας συγκέντρωσης.

Η συναγόμενη τιμή BCF_{SS} είναι αμφίβολη αν η τιμή BCF_K είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από την BCF_{SS}, διότι αυτό μπορεί να αποτελεί ένδειξη ότι δεν επιτεύχθηκε σταθερή κατάσταση ή ότι δεν συνυπολογίστηκαν οι διεργασίες αναπτυξιακής αραίωσης και απώλειας. Όταν η τιμή BCF_{SS} είναι κατά πολύ υψηλότερη από την BCF_K, ο υπολογισμός των σταθερών ρυθμού πρόσληψης και αποβολής θα πρέπει να ελέγχεται για σφάλματα και να επαναξιολογείται. Μια διαφορετική διαδικασία προσαρμογής θα μπορούσε να βελτιώσει την εκτίμηση του BCF_K (βλ. προσάρτημα 5).

Έκθεση δοκιμής

Εκτός από τα στοιχεία για την υπό δοκιμή ουσία που αναφέρονται στην παράγραφο 3, η έκθεση δοκιμής περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Υπό δοκιμή ουσία:

Φυσική μορφή και, εφόσον έχουν σημασία, φυσικοχημικές ιδιότητες·

— στοιχεία ταυτοποίησης της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ. (συμπεριλαμβανομένης της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα, κατά περίπτωση).

— Για πολυσυστατικές ουσίες και UVCB (χημικές ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, πολύπλοκα προϊόντα αντιδράσεων και βιολογικά υλικά), περιγραφή, στο μέτρο του δυνατού, της χημικής ταυτότητας των επιμέρους συστατικών και, για το καθένα, εκατοστιαία αναλογία επί της συνολικής μάζας της ουσίας. Θα πρέπει να εξηγείται συνοπτικά ο τρόπος με τον οποίο η αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιείται στη δοκιμή επιτυγχάνει τη μέτρηση της συγκέντρωσης της ουσίας και να περιγράφονται όλες οι αναλυτικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένης της αναφοράς της ορθότητας, του ορίου ανίχνευσης και του ορίου ποσοτικοποίησης της μεθόδου.

— Σε περίπτωση ραδιοσήμανσης, ακριβής θέση των σημασμένων ατόμων και ποσοστό ραδιενέργειας που οφείλεται σε προσμείξεις.

— Πληροφορίες σχετικά με την τοξικότητα της υπό δοκιμή ουσίας για τα ψάρια (στην ιδανική περίπτωση, για το εξεταζόμενο είδος). Η τοξικότητα θα πρέπει να αναφέρεται μέσω τιμών οξείας LC_{50} 96 ωρών, NOAEC και LOAEC από χρόνια μελέτη (δηλ. δοκιμή σε πρώιμο στάδιο του κύκλου ζωής των ψαριών ή δοκιμή πλήρους κύκλου ζωής, εάν είναι διαθέσιμη).

— Συνθήκες φύλαξης του υπό δοκιμή χημικού προϊόντος ή χημικής ουσίας και, σε περίπτωση αποθήκευσης πριν από τη χρήση, σταθερότητα του προϊόντος ή της ουσίας στις συνθήκες αποθήκευσης.

Υπό δοκιμή είδος:

Επιστημονική ονομασία, φυλή, πηγή, τυχόν προηγηθείσα μεταχείριση, εγκλιματισμός, ηλικία, φύλο (κατά περίπτωση), κλίμακα μεγεθών (βάρος και μήκος) κ.λπ.

Συνθήκες δοκιμής:

— Χρησιμοποιηθείσα διαδικασία δοκιμής (π.χ. συνεχούς ροής ή ημιστατική)· συνήθης μελέτη ή σχεδιασμός ελαχιστοποιημένης δοκιμής (συμπεριλαμβανομένων του σκεπτικού και αιτιολόγησης).

— Τύπος και χαρακτηριστικά του χρησιμοποιηθέντος φωτισμού και φωτοπερίοδοι.

— Σχεδιασμός της δοκιμής (π.χ. αριθμός και μέγεθος των θαλάμων δοκιμής, ρυθμός ανανέωσης του όγκου του νερού, πληθυσμιακός φόρτος, αριθμός επαναλήψεων, αριθμός ψαριών ανά επανάληψη, αριθμός συγκεντρώσεων δοκιμής, διάρκεια των φάσεων πρόσληψης και αποβολής, συχνότητα λήψης δειγμάτων ψαριών και νερού).

▼M7

— Μέθοδος παρασκευής των διαλυμάτων παρακαταθήκης και συχνότητα ανανέωσης (θα πρέπει να αναφέρονται ο διαλύτης, εφόσον χρησιμοποιείται, η συγκέντρωσή του και η συνεισφορά του στην περιεκτικότητα του νερού δοκιμής σε οργανικό άνθρακα) ή περιγραφή εναλλακτικού δοσιμετρικού συστήματος.

— Ονομαστικές συγκεντρώσεις δοκιμής, μέσες μετρούμενες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις τους στα δοχεία δοκιμής, καθώς και η μέθοδος και η συχνότητα με την οποία επιτεύχθηκαν.

— Πηγή του νερού αραίωσης, περιγραφή τυχόν προκατεργασίας, αποτελέσματα τυχόν απόδειξης της ικανότητας των υπό δοκιμή ψαριών να ζουν στο συγκεκριμένο νερό και χαρακτηριστικά του νερού: pH, σκληρότητα, θερμοκρασία, συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου, επίπεδα υπολειμματικού χλωρίου (εφόσον μετράται), ολικός οργανικός άνθρακας (TOC), αιωρούμενα στερεά, αλατότητα του μέσου δοκιμής (κατά περίπτωση) και τυχόν άλλες μετρήσεις.

— Ποιότητα του νερού στα δοκιμαστικά δοχεία, pH, σκληρότητα, TOC, θερμοκρασία και συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου· χρησιμοποιούμενες μέθοδοι και συχνότητα των μετρήσεων.

— Λεπτομερείς πληροφορίες για τη διατροφή [π.χ. τύπος τροφής, πηγή, σύσταση (τουλάχιστον λιπιδικό και πρωτεϊνικό περιεχόμενο, εάν είναι δυνατόν), επιλεγμένος ρυθμός σίτισης, χορηγούμενες ποσότητες και συχνότητα].

— Στοιχεία για τη μεταχείριση των δειγμάτων ψαριών και νερού, συμπεριλαμβανομένων λεπτομερειών σχετικά με την προετοιμασία, τη φύλαξη και τις διαδικασίες εκχύλισης και ανάλυσης (με αναφορά της ακρίβειας) για την υπό δοκιμή ουσία και τα λιπίδια.

— Χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για την τυχαιοποίηση της μεταχείρισης και την κατανομή των ψαριών στα δοχεία δοκιμής.

— Ημερομηνία εισαγωγής των υπό δοκιμή οργανισμών στα διαλύματα της δοκιμής και διάρκεια της δοκιμής.

— Περιγραφή και αποτελέσματα δοκιμών προσδιορισμού εύρους τιμών, εάν είναι διαθέσιμα.

Αποτελέσματα:

— Αποτελέσματα από τυχόν πραγματοποιηθείσα προκαταρκτική μελέτη.

— Θνησιμότητα των ψαριών-μαρτύρων και των υπό δοκιμή ψαριών σε κάθε θάλαμο έκθεσης και τυχόν παρατηρηθείσα αφύσικη συμπεριφορά..

— Πληροφορίες σχετικά με τυχόν παρατηρηθείσες δυσμενείς επιδράσεις.

— Πλήρης περιγραφή όλων των χρησιμοποιούμενων διαδικασιών χημικής ανάλυσης, συμπεριλαμβανομένων των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού, της μεταβλητότητας και της ανάκτησης.

— Περιεκτικότητα των ψαριών σε λιπίδια, συμπεριλαμβανομένης της χρησιμοποιούμενης μεθόδου και, εάν συνάγεται, συντελεστής κανονικοποίησης για τα λιπίδια (L_n, συντελεστής που χρησιμοποιείται για την έκφραση των αποτελεσμάτων σε σχέση με ψάρι με περιεκτικότητα 5 % σε λιπίδια).

— Δεδομένα σε μορφή πίνακα για το βάρος (και το μήκος) των ψαριών, αντιστοιχισμένα με τις συγκεντρώσεις της χημικής ουσίας σε κάθε ψάρι (και με την περιεκτικότητα σε λιπίδια, κατά περίπτωση), τόσο για τις ομάδες μαρτύρων όσο και για τις ομάδες έκθεσης (για παράδειγμα, με τη χρήση αποκλειστικών αναγνωριστικών για κάθε ψάρι των δειγμάτων) και υπολογισμοί με τους οποίους ελήφθησαν οι σταθερές ρυθμού ανάπτυξης.

▼M7

— Δεδομένα σε μορφή πίνακα για τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στα ψάρια (C_f, αντιστοιχισμένη με τα επιμέρους ψάρια) και στο νερό (C_w) (με τις μέσες τιμές για τις ομάδες έκθεσης και τις ομάδες μαρτύρων, την τυπική απόκλιση και το εύρος τιμών, κατά περίπτωση) για κάθε χρόνο δειγματοληψίας (C_f σε mg/kg νωπού βάρους ολόκληρου του σώματος ή συγκεκριμένων ιστών, π.χ. του λιπώδους, και C_w σε mg/l). Οι τιμές C_w για τη σειρά των μαρτύρων (πρέπει επίσης να αναφέρονται οι τιμές υποβάθρου).

— Καμπύλες (συμπεριλαμβανομένων όλων των δεδομένων των μετρήσεων) που παρουσιάζουν τα ακόλουθα (κατά περίπτωση, οι συγκεντρώσεις μπορούν να εκφράζονται σε σχέση με ολόκληρο το σώμα και η περιεκτικότητα σε λιπίδια να κανονικοποιείται στο 5 % του ζώου ή συγκεκριμένων ιστών του):

  — ανάπτυξη, δηλ. βάρος των ψαριών σε συνάρτηση με τον χρόνο ή λογαριθμικά μετασχηματισμένο βάρος σε συνάρτηση με τον χρόνο (συμπεριλαμβανομένης της παραγόμενης σταθεράς ρυθμού ανάπτυξης k_g)·

  — πρόσληψη και αποβολή της υπό δοκιμή ουσίας στα ψάρια (στο ίδιο διάγραμμα)·

  — χρόνος επίτευξης σταθερής κατάστασης (εάν επιτυγχάνεται)·

  — λογαριθμικά μετασχηματισμένη συγκέντρωση σε συνάρτηση με τον χρόνο πρόσληψης (συμπεριλαμβανομένης της παράγωγης σταθεράς ρυθμού πρόσληψης k_1)·

  — λογαριθμικά μετασχηματισμένη συγκέντρωση (ln συγκέντρωσης) σε συνάρτηση με τον χρόνο αποβολής (συμπεριλαμβανομένης της παράγωγης σταθεράς ρυθμού αποβολής k_2)· και

  — καμπύλες της φάσης πρόσληψης και της φάσης αποβολής, που παρουσιάζουν τόσο τα δεδομένα όσο και το προσαρμοσμένο μοντέλο.

— Εάν με οπτική εξέταση ενός διαγράμματος διαπιστωθούν προφανείς έκτοπες τιμές, είναι δυνατό να εφαρμοστεί στατιστικά έγκυρος έλεγχος έκτοπων τιμών για την εξάλειψη των σημείων εσφαλμένων δεδομένων, καθώς και τεκμηριωμένη αιτιολόγηση της απάλειψής τους.

— Ο συντελεστής βιοσυγκέντρωσης σταθερής κατάστασης (BCF_{SS}), εάν έχει επιτευχθεί (σχεδόν) σταθερή κατάσταση.

— Κινητικός συντελεστής βιοσυγκέντρωσης (BCF_K) και οι παράγωγες σταθερές ρυθμού πρόσληψης και αποβολής k_1 και k_2, με τις διασπορές της k_2 (κλίση και τεταγμένη επί την αρχή), εάν χρησιμοποιείται διαδοχική προσαρμογή.

— Όρια εμπιστοσύνης, τυπική απόκλιση (εάν είναι διαθέσιμη) και μέθοδοι υπολογισμού/ανάλυσης δεδομένων ανά παράμετρο για κάθε χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας.

  — Κάθε πληροφορία σχετικά με μεταβολίτες ραδιοσημασμένων υπό δοκιμή ουσιών και τη συσσώρευσή τους.

  — Σταθερές ρυθμού ανάπτυξης (συμπεριλαμβανομένων των διαστημάτων εμπιστοσύνης 95 %) και υπολογισθείσες τιμές σταθεράς ρυθμού αποβολής, διορθωμένης ως προς την ανάπτυξη (k_{2g}), του χρόνου υποδιπλασιασμού και BCF (BCF_{Kg}).

  — Κάθε ασύνηθες στοιχείο σχετικά με τη δοκιμή, οποιαδήποτε απόκλιση από τις διαδικασίες αυτές και κάθε άλλη σχετική πληροφορία.

  — Συνοπτικός πίνακας των μετρούμενων και υπολογιζόμενων δεδομένων, ως ακολούθως:

▼M7

Σταθερές ρυθμού πρόσληψης και αποβολής ουσιών και συντελεστές βιοσυγκέντρωσης (BCF)	
k_g (σταθερά ρυθμού ανάπτυξης· ημέρα^{-1}):	Εγγράφεται η τιμή (95 % CI) (1)
k_1 (συνολική σταθερά ρυθμού πρόσληψης· l kg^{-1} ημέρα^{-1}):	Εγγράφεται η τιμή (95 % CI) (1)
k_2 (συνολική σταθερά ρυθμού αποβολής· ημέρα^{-1}):	Εγγράφεται η τιμή (95 % CI) (1)
k_{2g} (σταθερά ρυθμού αποβολής διορθωμένη ως προς την ανάπτυξη· ημέρα^{-1}):	Εγγράφεται η τιμή (95 % CI) (1)
C_f (συγκέντρωση της χημικής ουσίας στα ψάρια σε σταθερή κατάσταση· mg kg^{-1}):	Εγγράφεται η τιμή ± SD (2)
C_w (συγκέντρωσης της χημικής ουσίας στο νερό· mg l^{-1}):	Εγγράφεται η τιμή ± SD (2)
L_n (συντελεστής κανονικοποίησης για τα λιπίδια):	Εγγράφεται η τιμή (3)
BCF_{SS} (BCF σε σταθερή κατάσταση· l kg^{-1})	Εγγράφεται η τιμή ± SD (2)
BCF_{SSL} (BCF κανονικοποιημένος ως προς τα λιπίδια σε σταθερή κατάσταση· l kg^{-1}):	Εγγράφεται η τιμή (3) ± SD (2)
BCF_K (κινητικός BCF· l kg^{-1})	Εγγράφεται η τιμή (95 % CI) (1)
BCF_{Kg} (κινητικός BCF, διορθωμένος ως προς την ανάπτυξη· l kg^{-1})	Εγγράφεται η τιμή (95 % CI) (1)
$t_{1/2g}$ (χρόνος υποδιπλασιασμού, διορθωμένος ως προς την ανάπτυξη· ημέρα):	Εγγράφεται η τιμή (95 % CI) (1)
BCF_{KL} (κινητικός BCF, κανονικοποιημένος ως προς τα λιπίδια· l kg^{-1}):	Εγγράφεται η τιμή
BCF_{KLG} (κινητικός BCF, κανονικοποιημένος ως προς τα λιπίδια και διορθωμένος ως προς την ανάπτυξη· l kg^{-1}):	Εγγράφεται η τιμή

(1) CI: διάστημα εμπιστοσύνης (όταν είναι δυνατός ο υπολογισμός)
(2) SD: τυπική απόκλιση (όταν είναι δυνατός ο υπολογισμός)

Θα πρέπει να αποφεύγεται η αναφορά αποτελεσμάτων «δεν ανιχνεύθηκε/ποσοτικοποιήθηκε στο όριο ανίχνευσης/ποσοτικοποίησης» που προέκυψαν κατά την εφαρμογή της μεθόδου και τον σχεδιασμό του πειράματος πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμής, διότι τα αποτελέσματα αυτά δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό σταθερών ρυθμού.

Γ.13 — II: **Ελαχιστοποιημένη δοκιμή υδατικής έκθεσης σε ψάρια**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η πείρα που συσσωρεύουν τόσο τα εργαστήρια όσο και οι ρυθμιστικές αρχές από τη διεξαγωγή και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της πλήρους δοκιμής δείχνει ότι, πλην ορισμένων εξαιρέσεων, ισχύει κινητική πρώτης τάξης για την εκτίμηση των σταθερών ρυθμού πρόσληψης και αποβολής. Συνεπώς, μπορούν να εκτιμώνται οι σταθερές ρυθμού πρόσληψης και αποβολής και να συνάγεται ο κινητικός BCF με ελάχιστο αριθμό χρονικών σημείων δειγματοληψίας.

Ο αρχικός σκοπός της εξέτασης εναλλακτικών σχεδιασμών για μελέτες του BCF ήταν αφενός η ανάπτυξη δοκιμής μικρής κλίμακας που να χρησιμοποιείται ως ενδιάμεσο στάδιο δοκιμών για την απόρριψη ή την επιβεβαίωση εκτιμήσεων

▼M7

του BCF με βάση τη σταθερά K_{OW} και τα μοντέλα QSAR ώστε, με τον τρόπο αυτό, να εκλείψει η ανάγκη διεξαγωγής πλήρων μελετών για πολλές ουσίες και, αφετέρου, η ελαχιστοποίηση του κόστους και της χρήσης ζώων μέσω της μείωσης των δειγματοληψιών και του αριθμού των πραγματοποιούμενων διαδοχικών αναλύσεων. Στόχος ήταν να παρέχονται επαρκούς ορθότητας και ακρίβειας εκτιμήσεις του BCF για τις αποφάσεις εκτίμησης κινδύνου και, παράλληλα, να τηρείται ο βασικός σχεδιασμός της προγενέστερης μεθόδου δοκιμών ώστε να είναι δυνατή η ενσωμάτωση των αποτελεσμάτων των δοκιμών στα υφιστάμενα δεδομένα για τον BCF και να διευκολυνθεί η διεξαγωγή των δοκιμών και η ερμηνεία των δεδομένων. Ισχύουν πολλές από τις ίδιες εκτιμήσεις όπως για την πλήρη δοκιμή, π.χ. τα κριτήρια εγκυρότητας (βλ. παράγραφο 24) και η διακοπή της δοκιμής σε περίπτωση που ο βαθμός πρόσληψης στο τέλος της φάσης πρόσληψης είναι ασήμαντος (βλ. παραγράφους 16 και 38).

Οι ουσίες που θα είναι επιλέξιμες για τον σχεδιασμό ελαχιστοποιημένης δοκιμής θα πρέπει να εμπίπτουν στο γενικό πεδίο εφαρμογής για το οποίο αναπτύχθηκε η παρούσα μέθοδος δοκιμών, δηλ. μη πολικές οργανικές ουσίες (βλ. παράγραφο 49). Εάν υπάρχει οποιαδήποτε ένδειξη ότι η προς δοκιμή ουσία θα μπορούσε να επιδείξει διαφορετική συμπεριφορά (π.χ. σαφή απόκλιση από την κινητική πρώτης τάξεως), θα πρέπει να πραγματοποιηθεί πλήρης δοκιμή για κανονιστικούς σκοπούς.

Κατά κανόνα, η ελαχιστοποιημένη δοκιμή δεν διενεργείται σε λιγότερο χρόνο από την τυπική δοκιμή BCF, αλλά περιλαμβάνει δειγματοληψία λιγότερων ψαριών (βλ. προσάρτημα 6 για την αιτιολόγηση). Ωστόσο, η περίοδος αποβολής μπορεί να συντομευθεί για τις ταχέως αποβαλλόμενες ουσίες, ώστε να μη σημειώνονται στα ψάρια συγκεντρώσεις κάτω από το όριο ανίχνευσης/ποσοτικού προσδιορισμού πριν από το πέρας της δοκιμής. Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί δοκιμή ελαχιστοποιημένης έκθεσης ψαριών με μία μόνο συγκέντρωση για να κριθεί αν χρειάζεται πλήρης δοκιμή και, εφόσον τα προκύπτοντα δεδομένα που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό των σταθερών ρυθμού και του BCF είναι αξιόπιστα (βλ. παράγραφο 93), μπορεί να παραλειφθεί η διεξαγωγή πλήρους δοκιμής, εάν ο λαμβανόμενος BCF απέχει πολύ από τις ανησυχητικές τιμές που έχουν υπαχθεί σε κανονιστικές ρυθμίσεις.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να παρουσιάζει πλεονεκτήματα η εφαρμογή του σχεδιασμού ελαχιστοποιημένης δοκιμής με περισσότερες από μία συγκεντρώσεις δοκιμής ως προκαταρκτική δοκιμή για να διαπιστωθεί κατά πόσον οι εκτιμήσεις του BCF για μια ουσία εξαρτώνται από τη συγκέντρωση. Εάν οι εκτιμήσεις του BCF με την ελαχιστοποιημένη δοκιμή δείχνουν εξάρτηση από τη συγκέντρωση, θα είναι απαραίτητη η διεξαγωγή πλήρους δοκιμής. Εάν, με βάση την εν λόγω ελαχιστοποιημένη δοκιμή, οι εκτιμήσεις του BCF δεν εξαρτώνται από τη συγκέντρωση, αλλά τα αποτελέσματα δεν θεωρούνται οριστικά, κάθε μεταγενέστερη πλήρης δοκιμή θα μπορούσε να διεξάγεται με μία μόνο συγκέντρωση και, με τον τρόπο αυτό, να περιοριστεί η χρήση ζώων σε σύγκριση με μια πλήρη δοκιμή με δύο (ή περισσότερες) συγκεντρώσεις.

Οι εν δυνάμει επιλέξιμες ουσίες για την ελαχιστοποιημένη δοκιμή θα πρέπει:

— να είναι πιθανόν να εμφανίζουν κατά προσέγγιση πρώτης τάξης κινητική πρόσληψης και αποβολής, όπως συνάγεται, π.χ., από συγκριτική αξιολόγηση με παρόμοιες ουσίες·

— να έχουν log K_{OW} < 6, εκτός εάν αναμένεται ταχύς μεταβολισμός ([1])·

— να είναι επαρκώς υδατοδιαλυτές σε σχέση με την αναλυτική τεχνική (βλ. παράγραφο 24)·

— να είναι σαφώς ποσοτικοποιήσιμες (δηλ. οι συγκεντρώσεις θα πρέπει να υπερβαίνουν τουλάχιστον κατά μία τάξη μεγέθους το όριο ποσοτικοποίησης), τόσο στα ψάρια όσο και στο νερό, και συνιστάται η ραδιοσήμανση (βλ. παράγραφο 23)· και

— να έχουν περίοδο αποβολής μεγαλύτερη από τον προβλεπόμενο χρόνο υποδιπλασιασμού (βλ. προσάρτημα 5 για τους υπολογισμούς), ή η διάρκεια της αποβολής θα πρέπει να προσαρμοστεί αναλόγως (βλ. παράγραφο 91). Εξαίρεση από τον παραπάνω κανόνα επιτρέπεται εάν εκτιμάται ότι ο μεταβολισμός της ουσίας είναι ταχύς.

([1]) Η ελαχιστοποιημένη δοκιμή μπορεί στην πράξη να χρησιμοποιηθεί για να αποδειχθεί ο ταχύς μεταβολισμός, όταν είναι γνωστό ότι είναι πιθανό ο μεταβολισμός να είναι ταχύς.

▼M7

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΓΙΑ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΟΝ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟ ΕΛΑΧΙΣΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Δειγματοληψία ψαριών

Η δειγματοληψία ψαριών μειώνεται σε τέσσερα χρονικά σημεία δειγματοληψίας:

— Στο μέσο και στο τέλος της φάσης πρόσληψης (το οποίο αποτελεί και την έναρξη της φάσης αποβολής), π.χ. μετά από 14 και 28 ημέρες (33).

— Στα μέσα της φάσης αποβολής και στο τέλος της μελέτης (όταν η συγκέντρωση της ουσίας είναι < 10 % της μέγιστης συγκέντρωσης ή, τουλάχιστον, έχει σαφώς συμπληρωθεί ένας υποδιπλασιασμός της ουσίας), π.χ. μετά από 7 και 14 ημέρες αποβολής (33). Εάν αναμένεται ή παρατηρείται ταχεία αποβολή, είναι ενδεχομένως αναγκαίο να συντομευθεί η περίοδος αποβολής για να αποτραπεί η πτώση των συγκεντρώσεων στα ψάρια σε επίπεδα χαμηλότερα από το όριο ποσοτικοποίησης.

— Μέτρηση λιπιδίων όπως και στην πλήρη μελέτη.

— Διόρθωση ως προς την ανάπτυξη όπως στην πλήρη μελέτη.

— Ο BCF υπολογίζεται ως κινητικός BCF.

Δειγματοληψία νερού

Σύμφωνα με τον σχεδιασμό ελαχιστοποιημένης δοκιμής, η δειγματοληψία νερού διενεργείται όπως στην πλήρη μελέτη (βλ. παράγραφο 54) ή, τουλάχιστον, σε πέντε ισοκατανεμημένα χρονικά σημεία κατά τη φάση πρόσληψης και ανά εβδομάδα κατά τη φάση αποβολής.

Τροποποιήσεις σχεδιασμού

Μπορούν να εξεταστούν ορισμένες τροποποιήσεις του σχεδιασμού της μελέτης, λαμβανομένων υπόψη των ιδιοτήτων της υπό δοκιμή ουσίας, έγκυρων προβλέψεων με μοντέλα QSAR και του ειδικού σκοπού της μελέτης:

— Εάν απαιτείται μεγαλύτερη ακρίβεια, μπορούν να χρησιμοποιούνται περισσότερα ψάρια (6 ή 8 αντί των 4) για τη δειγματοληψία στο τέλος της φάσης πρόσληψης.

— Προσθήκη μιας επιπλέον ομάδας ψαριών για χρήση στην περίπτωση που η αποβολή σε 14 ημέρες (ή στο προβλεπόμενο τέλος της φάσης αποβολής) δεν δίνει ικανοποιητική αποβολή (δηλαδή > 50 %). Εάν η προβλεπόμενη διάρκεια της φάσης αποβολής είναι μικρότερη ή μεγαλύτερη από 14 ημέρες, το πρόγραμμα δειγματοληψίας θα πρέπει να προσαρμόζεται (δηλ. μία ομάδα ψαριών κατά την προβλεπόμενη λήξη της φάσης αποβολής και μία αφού παρέλθει το μισό του χρόνου αυτού).

— Χρήση των δύο συγκεντρώσεων δοκιμής για τη διερεύνηση πιθανής εξάρτησης από τη συγκέντρωση. Εάν τα αποτελέσματα της ελαχιστοποιημένης δοκιμής με δύο συγκεντρώσεις δοκιμής δείχνουν ότι ο BCF δεν εξαρτάται από τη συγκέντρωση (δηλ. η απόκλισή του είναι μικρότερη από 20 %), μία συγκέντρωση δοκιμής μπορεί να θεωρηθεί επαρκής για την πλήρη δοκιμή, εάν διεξαχθεί.

— Φαίνεται ότι είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν μοντέλα διεργασιών βιοσυσσώρευσης, όπως αυτά που προτείνουν οι Arnot και συν. (53), για τη διευκόλυνση του προγραμματισμού της διάρκειας των φάσεων πρόσληψης και αποβολής (βλ. επίσης προσάρτημα 5).

Υπολογισμοί

Η λογική αυτής της προσέγγισης έγκειται στο ότι ο συντελεστής βιοσυγκέντρωσης σε μια πλήρη δοκιμή μπορεί να προσδιοριστεί είτε ως συντελεστής βιοσυγκέντρωσης σε σταθερή κατάσταση (BCF_{SS}), με υπολογισμό του λόγου της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στον ιστό των ψαριών προς τη συγκέντρωσή της στο νερό, είτε με υπολογισμό του κινητικού συντελεστή βιοσυγκέντρωσης (BCF_K), ως ο λόγος της σταθεράς ρυθμού πρόσληψης k_1 προς τη σταθερά ρυθμού αποβολής k_2. Ο BCF_K είναι έγκυρος ακόμη και αν δεν επιτυγχάνεται συγκέντρωση σταθερής κατάστασης μιας ουσίας κατά την πρόσληψη, υπό την προϋπόθεση ότι η πρόσληψη και η αποβολή ακολουθούν διεργασίες

▼M7

κινητικής πρώτης τάξεως περίπου. Απαιτούνται τουλάχιστον δύο σημεία δεδομένων για την εκτίμηση των σταθερών ρυθμού πρόσληψης και αποβολής, ένα στο τέλος της φάσης πρόσληψης (δηλ. κατά την έναρξη της φάσης αποβολής) και ένα στο τέλος (ή αφού συμπληρωθεί σημαντικό μέρος) της φάσης αποβολής. Το ενδιάμεσο σημείο δειγματοληψίας συνιστάται για τον έλεγχο της κινητικής της πρόσληψης και της αποβολής ([1]). Για υπολογισμούς βλ. προσαρτήματα 5 και 6.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Για να αξιολογηθεί η εγκυρότητα και η διαφωτιστική αξία της δοκιμής, επαληθεύεται ότι η περίοδος αποβολής υπερβαίνει τον χρόνο υποδιπλασιασμού. Επίσης, ο BCF_{Km} (κινητικός BCF που προέρχεται από ελαχιστοποιημένη δοκιμή) θα πρέπει να συγκρίνεται με την ελαχιστοποιημένη τιμή BCF_{SS} (η οποία είναι ο BCF_{SS} που υπολογίζεται στο τέλος της φάσης πρόσληψης, με την παραδοχή ότι έχει επιτευχθεί σταθερή κατάσταση — αυτό μπορεί μόνο να υποτεθεί, διότι ο αριθμός των χρονικών σημείων δειγματοληψίας δεν αρκεί για να αποδειχθεί). Εάν ισχύει ότι BCF_{Km} < ελαχιστοποιημένο BCF_{SS}, ο ελαχιστοποιημένος BCF_{SS} θα πρέπει να είναι η προτιμώμενη αξία. Εάν ο BCF_{Km} είναι μικρότερος από το 70 % του ελαχιστοποιημένου BCF_{SS}, τα αποτελέσματα δεν είναι έγκυρα και θα πρέπει να πραγματοποιείται πλήρης δοκιμή.

Εάν η ελαχιστοποιημένη δοκιμή παρέχει τιμή BCF_{Km} της ίδιας τάξης με οποιαδήποτε τιμή κανονιστικού ενδιαφέροντος, θα πρέπει να διεξάγεται πλήρης δοκιμή. Εάν το αποτέλεσμα απέχει πολύ από κάθε τιμή κανονιστικού ενδιαφέροντος (είτε προς τα άνω είτε προς τα κάτω), μπορεί να μην είναι αναγκαία η διεξαγωγή πλήρους δοκιμής ή μπορεί να διεξαχθεί πλήρης δοκιμή με μία μόνο συγκέντρωση, εάν το επιβάλλει το σχετικό ρυθμιστικό πλαίσιο.

Εάν μετά από ελαχιστοποιημένη δοκιμή με μία συγκέντρωση κριθεί αναγκαία η πλήρης δοκιμή, αυτή μπορεί να διεξαχθεί με μια δεύτερη συγκέντρωση. Εάν τα αποτελέσματα συμφωνούν μεταξύ τους, μπορεί να παραλειφθεί η διεξαγωγή άλλης πλήρους δοκιμής με διαφορετική συγκέντρωση, δεδομένου ότι η βιοσυγκέντρωση της ουσίας δεν αναμένεται να εξαρτάται από τη συγκέντρωση. Εάν η ελαχιστοποιημένη δοκιμή έχει διεξαχθεί με δύο συγκεντρώσεις και τα αποτελέσματα δεν δείχνουν εξάρτηση από τη συγκέντρωση, η πλήρης δοκιμή μπορεί να διεξαχθεί με μία μόνο συγκέντρωση (βλ. παράγραφο 87).

Έκθεση δοκιμής

Η έκθεση δοκιμής για την ελαχιστοποιημένη δοκιμή θα πρέπει να περιλαμβάνει όλα τα στοιχεία που απαιτούνται για την πλήρη δοκιμή (βλ. παράγραφο 81), πλην εκείνων που δεν είναι δυνατόν να εκπονηθούν (δηλ. καμπύλη που να απεικονίζει τον χρόνο επίτευξης σταθερής κατάστασης και τον συντελεστή βιοσυγκέντρωσης σε σταθερή κατάσταση· αντί του τελευταίου, θα πρέπει να αναφέρεται ο ελαχιστοποιημένος BCF_{ss}). Επιπλέον, θα πρέπει επίσης να περιλαμβάνει αιτιολόγηση της εφαρμογής της ελαχιστοποιημένης δοκιμής και αναφορά του συνακόλουθου BCF_{Km}.

Γ.13 — III **Δοκιμή βιοσυσσώρευσης σε ψάρια με διατροφική έκθεση**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μέθοδος που περιγράφεται στο παρόν τμήμα θα πρέπει να χρησιμοποιείται για ουσίες στις οποίες δεν μπορεί να εφαρμοστεί πρακτικά η μεθοδολογία της υδατικής έκθεσης (π.χ. επειδή δεν είναι δυνατόν να διατηρηθούν σταθερές, μετρήσιμες συγκεντρώσεις στο νερό ή να επιτευχθεί επαρκής φόρτος στο σώμα εντός 60 ημερών έκθεσης· βλ. προηγούμενα τμήματα για τη μέθοδο υδατικής έκθεσης). Πρέπει ωστόσο να γίνει κατανοητό ότι το τελικό σημείο της παρούσας δοκιμής είναι ο διατροφικός συντελεστής βιομεγέθυνσης (BMF) και όχι ο συντελεστής βιοσυγκέντρωσης (BCF) ([2]).

Τον Μάιο του 2001 παρουσιάστηκε στο συνέδριο της SETAC Europe, που πραγματοποιήθηκε στη Μαδρίτη, μια νέα μέθοδος δοκιμών βιοσυσσώρευσης για δυσδιάλυτες στο νερό οργανικές ουσίες (36). Η εργασία αυτή στηρίχθηκε σε διάφορες μελέτες βιοσυσσώρευσης που είχαν αναφερθεί στη βιβλιογραφία και

([1]) Όταν μετρώνται μόνο δύο σημεία δεδομένων, εκτιμήσεις των ορίων εμπιστοσύνης για BCF_{Km} μπορούν να εκτιμηθούν με μεθόδους bootstrap. Όταν είναι επίσης διαθέσιμα ενδιάμεσα σημεία δεδομένων, μπορούν να υπολογιστούν επίσης όρια εμπιστοσύνης για BCF_{Km} όπως και στην πλήρη δοκιμή.

([2]) Βλ. ορισμούς και μονάδες στο προσάρτημα 1

▼M7

στις οποίες χρησιμοποιήθηκε δοσιμετρική μέθοδος με εμβολιασμένη ζωοτροφή [π.χ. (37)]. Στις αρχές του 2004, υποβλήθηκε σε ομάδα εργασίας της ΕΕ για τις ουσίες ΑΒΤ σχέδιο πρωτοκόλλου (38) που ήταν σχεδιασμένο για τη μέτρηση του δυναμικού βιοσυσσώρευσης δυσδιάλυτων στο νερό οργανικών ουσιών στις οποίες ήταν πρακτικά ανέφικτη η εφαρμογή της τυποποιημένης μεθόδου βιοσυγκέντρωσης με υδατική έκθεση, συνοδευόμενο από βασικό έγγραφο τεκμηρίωσης (39). Ένα άλλο επιχείρημα που προβλήθηκε για την αιτιολόγηση της μεθόδου ήταν ότι η πιθανή περιβαλλοντική έκθεση σε αυτές τις δυσδιάλυτες ουσίες (δηλ. με log K_{OW} > 5) μπορεί να συντελείται σε μεγάλο βαθμό μέσω της τροφής (βλ. (40) (41) (42) (43) (44)). Για τον λόγο αυτόν, υπάρχουν παραπομπές σε δοκιμές διατροφικής έκθεσης σε ορισμένους κανονισμούς που έχουν εκδοθεί σχετικά με τα χημικά προϊόντα ([1]). Ωστόσο, πρέπει να γίνει κατανοητό ότι, με τη μέθοδο που περιγράφεται στο παρόν τμήμα, η έκθεση μέσω της υδατικής φάσης αποφεύγεται επιμελώς και, συνεπώς, οι τιμές του BMF που προκύπτουν από την παρούσα μέθοδο δοκιμών δεν μπορούν να συγκριθούν ευθέως με τις τιμές του BMF από μελέτες πεδίου (όπου μπορεί να συνδυάζονται η υδατική και η διατροφική έκθεση).

Το παρόν τμήμα της παρούσας μεθόδου δοκιμών βασίζεται στο εν λόγω πρωτόκολλο (38) και είναι νέα μέθοδος που δεν περιλαμβανόταν στην προηγούμενη έκδοση της μεθόδου δοκιμών Γ.13. Η εν λόγω εναλλακτική δοκιμή επιτρέπει την άμεση διερεύνηση της διατροφικής πορείας έκθεσης υπό ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες.

Οι ενδιαφερόμενοι ερευνητές θα πρέπει να ανατρέχουν στις παραγράφους 1 έως 14 της παρούσας μεθόδου δοκιμών για πληροφορίες σχετικά με τις περιπτώσεις κατά τις οποίες η δοκιμή διατροφικής έκθεσης μπορεί να είναι προτιμότερη από τη δοκιμή υδατικής έκθεσης. Παρέχονται πληροφορίες σχετικά με τις διάφορες παραμέτρους των ουσιών, οι οποίες θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμής.

Η χρήση ραδιοσημασμένων υπό δοκιμή ουσιών μπορεί να μελετάται με παρόμοιο σκεπτικό όπως στη μέθοδο υδατικής έκθεσης (βλ. παραγράφους 6 και 65).

Η διατροφική μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιείται για την εξέταση περισσότερων της μιας ουσιών σε μία μόνο δοκιμή, εφόσον πληρούνται ορισμένα κριτήρια, τα οποία αναλύονται διεξοδικότερα στην παράγραφο 112. Για λόγους απλοποίησης, στη μεθοδολογία που παρατίθεται στο παρόν τμήμα περιγράφεται δοκιμή με τη χρήση μόνο μίας υπό δοκιμή ουσίας.

Η δοκιμή διατροφικής έκθεσης είναι παρόμοια με τη δοκιμή υδατικής έκθεσης από πολλές απόψεις, με προφανή εξαίρεση την οδό έκθεσης. Ως εκ τούτου, πολλές πτυχές της μεθόδου που περιγράφεται στο παρόν τμήμα αλληλεπικαλύπτονται με αυτές της μεθόδου υδατικής έκθεσης που περιγράφεται στο προηγούμενο. Γίνονται όσο το δυνατόν περισσότερες παραπομπές σε σχετικές παραγράφους του προηγούμενου τμήματος, αλλά για λόγους σαφήνειας και κατανόησης του κειμένου είναι αναπόφευκτες ορισμένες επαναλήψεις.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Μπορούν να χρησιμοποιούνται συνθήκες συνεχούς ροής ή ημιστατικές (βλ. παράγραφο 4)· συνιστάται η χρήση συνθηκών συνεχούς ροής για τον περιορισμό της δυνητικής έκθεσης στην υπό δοκιμή ουσία μέσω του νερού λόγω εκρόφησης από εμβολιασμένη τροφή ή περιττώματα. Η δοκιμή αποτελείται από δύο φάσεις: τη φάση πρόσληψης (τροφή εμβολιασμένη με την υπό δοκιμή ουσία) και τη φάση αποβολής (καθαρή, ακατέργαστη τροφή) (βλ. παράγραφο 16). Κατά τη φάση πρόσληψης, μια «δοκιμαστική» ομάδα ψαριών τρέφεται καθημερινά με καθορισμένο σιτηρέσιο, αποτελούμενο από ιχθυοτροφή του εμπορίου γνωστής σύνθεσης, που έχει εμβολιαστεί με την ελεγχόμενη ουσία. Στην ιδανική περίπτωση, τα ψάρια θα πρέπει να καταναλώνουν όλη την προσφερόμενη τροφή (βλ. παράγραφο 141). Στη συνέχεια, τα ψάρια σιτίζονται με την καθαρή, ακατέργαστη ιχθυοτροφή του εμπορίου κατά τη διάρκεια της φάσης αποβολής. Όπως και στη μέθοδο υδατικής έκθεσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν περισσότερες από μία ομάδες δοκιμής με διαφορετικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας στην

([1]) Για τους σκοπούς του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 για την καταχώριση, την αξιολόγηση, την αδειοδότηση και τους περιορισμούς των χημικών προϊόντων (REACH) (ΕΕ L 396 της 30.12.2006, σ. 1), το θέμα αυτό καλύπτεται από το έγγραφο «Καθοδήγηση σχετικά με τις απαιτήσεις πληροφοριών και την αξιολόγηση χημικής ασφάλειας», κεφάλαιο R.7c, σημεία R.7.10.3.1, σ. 13, R.7.10.4.1, σ. 31-32 και στο διάγραμμα R 7.10-2, σ. 50.

▼M7

εμβολιασμένη τροφή, αν είναι απαραίτητο, αλλά για τις περισσότερες από τις εξαιρετικά υδρόφοβες υπό δοκιμή οργανικές ουσίες αρκεί μία ομάδα δοκιμής (βλ. παραγράφους 49 και 107). Εάν χρησιμοποιούνται ημιστατικές συνθήκες, τα ψάρια θα πρέπει να μεταφέρονται σε νέο μέσο και/ή νέο θάλαμο δοκιμής στο τέλος της φάσης πρόσληψης (καθώς υπάρχει περίπτωση το μέσο και/ή η συσκευή που χρησιμοποιείται κατά τη φάση πρόσληψης να έχει μολυνθεί από την ελεγχόμενη ουσία μέσω έκπλυσης). Οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας στα ψάρια μετρώνται κατά τη διάρκεια και των δύο φάσεων της δοκιμής. Εκτός από την ομάδα ψαριών που τρέφεται με το εμβολιασμένο σιτηρέσιο (ομάδα δοκιμής), μια ομάδα ψαριών διατηρείται ως μάρτυρας υπό τις ίδιες ακριβώς συνθήκες και λαμβάνει ακριβώς την ίδια τροφή, με τη διαφορά ότι το σιτηρέσιο από ιχθυοτροφή του εμπορίου δεν είναι εμβολιασμένο με την υπό δοκιμή ουσία. Αυτή η ομάδα-μάρτυρας επιτρέπει την ποσοτικοποίηση των επιπέδων υποβάθρου της υπό δοκιμή ουσίας σε ψάρια που δεν έχουν εκτεθεί και χρησιμεύει ως μέτρο σύγκρισης για τυχόν δυσμενείς επιδράσεις που συνδέονται με τη μεταχείριση και παρατηρούνται στην/στις ομάδα/-ες δοκιμής ([1]). Επιτρέπει, επίσης, τη σύγκριση των σταθερών ρυθμού αύξησης μεταξύ των ομάδων, για να ελέγχεται αν καταναλώνονται παρόμοιες ποσότητες του χορηγούμενου σιτηρεσίου (για την ερμηνεία τυχόν διαφορετικών σταθερών ρυθμού ανάπτυξης θα πρέπει επίσης να λαμβάνονται υπόψη ενδεχόμενες διαφορές γευστικότητας μεταξύ των σιτηρεσίων· βλ. παράγραφο 138). Είναι σημαντικό να χορηγούνται στις ομάδες δοκιμής και μαρτύρων σιτηρέσια ισοδύναμης διατροφικής αξίας, τόσο κατά τη φάση πρόσληψης όσο και κατά τη φάση αποβολής.

Μια φάση πρόσληψης διάρκειας 7-14 ημερών κατά κανόνα επαρκεί, με βάση την εμπειρία των σχεδιαστών της μεθόδου (38) (39). Η διάρκεια αυτή θεωρητικά ελαχιστοποιεί το κόστος διεξαγωγής της δοκιμής, ενώ παράλληλα εξασφαλίζει επαρκή έκθεση για τις περισσότερες ουσίες. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, η φάση πρόσληψης μπορεί να παραταθεί (βλ. παράγραφο 127). Κατά τη φάση πρόσληψης, η συγκέντρωση της ουσίας στα ψάρια ενδέχεται να μη φθάσει σε σταθερή κατάσταση, με συνέπεια η επεξεργασία των δεδομένων και τα αποτελέσματα της παρούσας μεθόδου να βασίζονται συνήθως σε κινητική ανάλυση των υπολειμμάτων στους ιστούς. (Σημείωση: Οι εξισώσεις για τον υπολογισμό του χρόνου επίτευξης σταθερής κατάστασης μπορεί να εφαρμοσθούν εδώ, όπως για την δοκιμή υδατικής έκθεσης — βλ. προσάρτημα 5). Η φάση αποβολής αρχίζει με την πρώτη χορήγηση μη εμβολιασμένου σιτηρεσίου στα ψάρια και συνήθως διαρκεί έως 28 ημέρες ή έως καταστεί αδύνατο ο ποσοτικός προσδιορισμός της υπό δοκιμή ουσίας σε ολόκληρα ψάρια, ανάλογα με το ποιο από τα δύο διαστήματα είναι συντομότερο. Η φάση αποβολής μπορεί να συντομευθεί ή να παραταθεί πέραν των 28 ημερών, ανάλογα με τη μεταβολή των μετρούμενων συγκεντρώσεων και του μεγέθους των ψαριών με την πάροδο του χρόνου.

Η παρούσα μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό του χρόνου υποδιπλασιασμού της συγκεκριμένης ουσίας ($t_{1/2}$, από τη σταθερά του ρυθμού αποβολής, k_2), της απόδοσης της αφομοίωσης (απορρόφηση στο πεπτικό σύστημα· *a*), του κινητικού διατροφικού συντελεστή βιομεγέθυνσης (BMF_K), του διορθωμένου ως προς την ανάπτυξη κινητικού διατροφικού συντελεστή βιομεγέθυνσης (BMF_{Kg}), και του διορθωμένου ως προς τα λιπίδια ([2]) κινητικού διατροφικού συντελεστή βιομεγέθυνσης (BMF_{KL}) (και/ή του κινητικού διατροφικού συντελεστή βιομεγέθυνσης, διορθωμένου ως προς την ανάπτυξη και τα λιπίδια, BMF_{KgL}) για την υπό δοκιμή ουσία στα ψάρια. Όπως και στη μέθοδο υδατικής έκθεσης, η αύξηση της μάζας των ψαριών κατά τη διάρκεια της δοκιμής θα έχει ως αποτέλεσμα την αραίωση της υπό δοκιμή ουσίας στα αναπτυσσόμενα ψάρια και, ως εκ τούτου, ο (κινητικός) BCF θα είναι υποεκτιμημένος, εάν δεν διορθωθεί για να ληφθεί υπόψη η ανάπτυξη (βλ. παραγράφους 162 και 163). Επιπλέον, εάν εκτιμάται ότι επιτεύχθηκε σταθερή κατάσταση κατά τη φάση πρόσληψης, μπορεί να υπολογιστεί ενδεικτικός BMF σε σταθερή κατάσταση. Είναι διαθέσιμες προσεγγίσεις που καθιστούν εφικτή την εκτίμηση κινητικού συντελεστή βιοσυγκέντρωσης (BCF_K) από δεδομένα που παράγονται από τη μελέτη διατροφικής έκθεσης [π.χ. (44) (45) (46) (47) (48)]. Τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα αυτών των προσεγγίσεων εξηγούνται στο προσάρτημα 8.

([1]) Για τις περισσότερες υπό δοκιμή ουσίες, δεν θα πρέπει, στην ιδανική περίπτωση, να ανιχνεύονται συγκεντρώσεις στο νερό των μαρτύρων. Οι συγκεντρώσεις υποβάθρου αφορούν μόνο υλικά που συναντώνται στη φύση (π.χ. ορισμένα μέταλλα) και ουσίες που είναι πανταχού παρούσες στο περιβάλλον.

([2]) Εφόσον ο BMF ορίζεται ως ο λόγος της συγκέντρωσης μιας ουσίας σε έναν οργανισμό προς τη συγκέντρωση στην τροφή του οργανισμού σε σταθερή κατάσταση, τα λιπίδια λαμβάνονται υπόψη με διόρθωση ως προς την περιεκτικότητα του οργανισμού και της τροφής σε λιπίδια και, ως εκ τούτου, η εν λόγω διαδικασία περιγράφεται ακριβέστερα με τον όρο «διόρθωση». Η προσέγγιση αυτή διαφέρει από την «κανονικοποίηση» σε καθορισμένη περιεκτικότητα του οργανισμού σε λιπίδια, όπως στη δοκιμή βιοσυγκέντρωσης με υδατική έκθεση.

▼M7

Η δοκιμή σχεδιάστηκε πρωτίστως για δυσδιάλυτες μη πολικές οργανικές ουσίες, των οποίων η πρόσληψη και αποβολή από τα ψάρια ακολουθούν κατά προσέγγιση κινητική πρώτης τάξης. Όταν εξετάζεται μια ουσία της οποίας η πρόσληψη και η αποβολή δεν ακολουθούν κατά προσέγγιση κινητική πρώτης τάξης, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πιο σύνθετα μοντέλα (βλ. παραπομπές στο προσάρτημα 5) και να ζητείται η γνώμη βιοστατιστικολόγου και/ή ειδικού στη φαρμακοκινητική.

Ο BMF κατά κανόνα προσδιορίζεται με ανάλυση της υπό δοκιμή ουσίας σε ολόκληρα ψάρια (επί νωπού βάρους). Εάν έχει σημασία για τους στόχους της μελέτης, μπορούν να λαμβάνονται δείγματα συγκεκριμένων ιστών (π.χ. μυών, ήπατος), εάν τα ψάρια χωριστούν σε βρώσιμο και μη βρώσιμο μέρος (βλ. παράγραφο 21). Επιπλέον, μπορεί να πραγματοποιηθεί αφαίρεση και χωριστή ανάλυση του γαστρεντερικού σωλήνα για τον προσδιορισμό της συνεισφοράς του στις συγκεντρώσεις σε ολόκληρα ψάρια, σε χρονικά σημεία δειγματοληψίας στο τέλος της φάσης πρόσληψης και προς την έναρξη της φάσης αποβολής, ή στο πλαίσιο προσέγγισης ισοζυγίου μάζας.

Θα πρέπει να μετράται η περιεκτικότητα των ολόκληρων ψαριών του δείγματος σε λιπίδια, ώστε να είναι δυνατή η διόρθωση των συγκεντρώσεων ως προς τα λιπίδια, λαμβανομένης υπόψη της περιεκτικότητας τόσο της τροφής όσο και των ψαριών σε λιπίδια (βλ. παραγράφους 56 και 57 και προσάρτημα 7).

Το βάρος κάθε ψαριού του δείγματος θα πρέπει να μετράται, να καταγράφεται και να αντιστοιχίζεται με τη συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας στο εν λόγω άτομο (π.χ. με τη χρήση αποκλειστικού αναγνωριστικού κωδικού για κάθε ψάρι του δείγματος), με σκοπό τον υπολογισμό ενδεχόμενης ανάπτυξης κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Θα πρέπει επίσης να μετράται το ολικό μήκος των ψαριών, όταν είναι δυνατόν ([1]). Τα δεδομένα βάρους είναι επίσης απαραίτητα για την εκτίμηση του BCF με τη χρήση των δεδομένων αποβολής από τη δοκιμή διατροφικής έκθεσης.

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΟΥΣΙΑ

Θα πρέπει να είναι διαθέσιμες οι πληροφορίες για την υπό δοκιμή ουσία που αναφέρονται στις παραγράφους 3 και 22. Δεν είναι συνήθως απαραίτητο να υπάρχει αναλυτική μέθοδος για τις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας στο νερό· απαιτούνται μέθοδοι με κατάλληλη ευαισθησία για τη μέτρηση των συγκεντρώσεων σε ιχθυοτροφές και στους ιστούς των ψαριών.

Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εξέταση περισσότερων της μίας ουσιών σε μία μόνο δοκιμή. Ωστόσο, οι υπό δοκιμή ουσίες θα πρέπει να είναι συμβατές μεταξύ τους, ώστε να μην αλληλεπιδρούν ούτε να αλλάζουν χημική ταυτότητα κατά τον εμβολιασμό των ιχθυοτροφών. Το ζητούμενο είναι τα μετρούμενα αποτελέσματα για κάθε ουσία που συνυποβάλλεται σε δοκιμή να μη διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό από τα αποτελέσματα που θα προέκυπταν εάν είχαν διεξαχθεί μεμονωμένες δοκιμές για κάθε υπό δοκιμή ουσία. Με προκαταρκτικές αναλυτικές εργασίες θα πρέπει να αποδεικνύεται ότι κάθε ουσία μπορεί να ανακτηθεί από πολλαπλά εμβολιασμένη τροφή και από δείγμα ιστών ψαριών με i) υψηλά ποσοστά ανάκτησης (π.χ. > 85 % της ονομαστικής τιμής) και ii) την απαραίτητη για τη δοκιμή ευαισθησία. Η συνολική δόση των ουσιών που συνυποβάλλονται σε δοκιμή θα πρέπει να είναι κατώτερη από τη συνδυασμένη συγκέντρωση η οποία θα μπορούσε να έχει τοξικές επιδράσεις (βλ. παράγραφο 51). Επιπλέον, κατά τον σχεδιασμό του πειράματος θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι πιθανές δυσμενείς επιδράσεις στα ψάρια και το δυναμικό αλληλεπιδράσεων (π.χ. επιδράσεις στον μεταβολισμό) που συνδέονται με την ταυτόχρονη υποβολή πολλών ουσιών σε δοκιμή. Η ταυτόχρονη δοκιμή ιοντιζόμενων ουσιών θα πρέπει να αποφεύγεται. Όσον αφορά την έκθεση, η μέθοδος είναι επίσης κατάλληλη για πολύπλοκα μείγματα (βλ. παράγραφο 13, μολονότι η ανάλυση υπόκειται στους ίδιους περιορισμούς όπως σε κάθε άλλη μέθοδο).

ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Οι προϋποθέσεις εγκυρότητας της δοκιμής είναι οι ακόλουθες (βλ. παράγραφο 24):

— Η διακύμανση της θερμοκρασίας του νερού είναι μικρότερη από ± 2 °C στις ομάδες μεταχείρισης και στις ομάδες μαρτύρων.

([1]) Το ολικό μήκος θα πρέπει επίσης να καταγράφεται κατά τη διάρκεια της δοκιμής, διότι αποτελεί καλό δείκτη πρόκλησης δυσμενών επιδράσεων.

▼M7

— Η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου δεν μειώνεται σε ποσοστό κάτω του 60 % της τιμής κορεσμού με αέρα.

— Η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στην ιχθυοτροφή πριν από τη φάση πρόσληψης και στο τέλος της βρίσκεται εντός εύρους ± 20 % (με βάση τουλάχιστον τρία δείγματα λαμβανόμενα στα δύο αυτά χρονικά σημεία).

— Θα πρέπει να αποδεικνύεται υψηλός βαθμός ομοιογένειας της ουσίας στην τροφή με προκαταρκτική ανάλυση του εμβολιασμένου σιτηρεσίου· τουλάχιστον τρεις συγκεντρώσεις της ουσίας σε δείγματα που λαμβάνονται κατά την έναρξη της δοκιμής δεν θα πρέπει να αποκλίνουν περισσότερο από ± 15 % από τη μέση τιμή.

— Δεν ανιχνεύονται συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας, ή ανιχνεύονται τα συνήθη επίπεδα ιχνών, σε μη εμβολιασμένη τροφή ή σε ιστούς των ψαριών-μαρτύρων σε σχέση με τα κατεργασμένα δείγματα.

— Η θνησιμότητα ή άλλες δυσμενείς επιδράσεις/ασθένειες τόσο στις ομάδες μαρτύρων όσο και στις ομάδες δοκιμής θα πρέπει να είναι ≤ 10 % στο τέλος της δοκιμής· εάν η δοκιμή παραταθεί για οποιονδήποτε λόγο, οι δυσμενείς επιδράσεις και στις δύο ομάδες είναι ≤ 5 % μηνιαίως και ≤ 30 % σωρευτικά. Σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων δοκιμής και των ομάδων μαρτύρων ως προς τη μέση ανάπτυξη των ψαριών των αντίστοιχων δειγμάτων μπορεί να αποτελούν ένδειξη τοξικής επίδρασης της υπό δοκιμή ουσίας.

ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Εάν το εργαστήριο δεν έχει εκτελέσει τη δοκιμή στο παρελθόν ή έχουν επέλθει ουσιαστικές μεταβολές (π.χ. αλλαγή της φυλής ή του προμηθευτή των ψαριών, εξέταση διαφορετικού είδους ψαριών, σημαντική αλλαγή του μεγέθους των ψαριών, της ιχθυοτροφής ή της μεθόδου εμβολιασμού κ.λπ.), συνιστάται η διεξαγωγή μελέτης τεχνικής ικανότητας, με τη χρήση ουσίας αναφοράς. Η ουσία αναφοράς χρησιμοποιείται κυρίως για να διαπιστώνεται κατά πόσον η τεχνική εμβολιασμού της τροφής είναι επαρκής για την εξασφάλιση της μέγιστης δυνατής ομοιογένειας και βιοδιαθεσιμότητας των υπό δοκιμή ουσιών. Ένα παράδειγμα ουσίας που χρησιμοποιήθηκε στην περίπτωση των μη πολικών υδρόφοβων ουσιών είναι το εξαχλωροβενζόλιο (HCB) αλλά, λόγω των επικίνδυνων ιδιοτήτων του, θα πρέπει να εξετάζονται και άλλες ουσίες για τις οποίες υπάρχουν αξιόπιστα δεδομένα σχετικά με την πρόσληψη και τη βιομεγέθυνση ([1]). Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει βασικές πληροφορίες για την ουσία αναφοράς, εάν έχει χρησιμοποιηθεί, μεταξύ των οποίων την ονομασία, την καθαρότητα, τον αριθμό CAS, τη δομή, δεδομένα τοξικότητας (εάν είναι διαθέσιμα), όπως και για τις υπό δοκιμή ουσίες (βλ. παραγράφους 3 και 22).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Εργαστηριακός εξοπλισμός

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τα υλικά και οι συσκευές που περιγράφονται στη μέθοδο υδατικής έκθεσης (βλ. παράγραφο 26). Θα πρέπει να χρησιμοποιείται ένα σύστημα δοκιμής συνεχούς ροής ή στατικής ανανέωσης που παρέχει επαρκή όγκο νερού αραίωσης στις δεξαμενές δοκιμής. Οι ρυθμοί παροχής θα πρέπει να καταγράφονται.

Νερό

Θα πρέπει να χρησιμοποιείται το νερό δοκιμής που περιγράφεται στη μέθοδο υδατικής έκθεσης (βλ. παραγράφους 27-29). Το μέσο δοκιμής θα πρέπει να διαθέτει τα περιγραφόμενα χαρακτηριστικά και η ποιότητά του θα πρέπει να παραμένει σταθερή στη διάρκεια της δοκιμής. Η φυσική περιεκτικότητα σε σωματίδια και σε ολικό οργανικό άνθρακα (TOC) θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν χαμηλότερη (σωματίδια ≤ 5 mg/l· ολικός οργανικός άνθρακας ≤ 2 mg/l) πριν από την έναρξη της δοκιμής. Ο TOC χρειάζεται να μετράται μόνο πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμής, στο πλαίσιο του χαρακτηρισμού του νερού δοκιμής (βλ. παράγραφο 53).

([1]) Το HCB περιλαμβάνεται στα παραρτήματα Α και Γ της Σύμβασης της Στοκχόλμης και στα παραρτήματα Ι και ΙΙΙ του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 850/2004 για τους έμμονους οργανικούς ρύπους (ΕΕ L 158 της 30.4.2004, σ. 7)

▼M7

Σιτηρέσιο

Συνιστάται η χορήγηση ιχθυοτροφής του εμπορίου (επιπλέουσα και/ή βραδείας βύθισης, σε μορφή εξωθημένων κόκκων) που έχει χαρακτηριστεί τουλάχιστον ως προς την περιεκτικότητά της σε πρωτεΐνες και λιπαρές ύλες. Η τροφή θα πρέπει να έχει ομοιόμορφο μέγεθος κόκκων για να αυξάνεται η απόδοση της έκθεσης σε αυτή, δηλ. τα ψάρια να καταναλώνουν μεγαλύτερη ποσότητα τροφής αντί να τρώνε τα μεγαλύτερα τεμάχια και να αφήνουν τα μικρότερα. Το μέγεθος των κόκκων θα πρέπει να είναι κατάλληλο για το μέγεθος των ψαριών κατά την έναρξη της δοκιμής (π.χ. μπορούν να χρησιμοποιούνται κόκκοι με διάμετρο περίπου 0,6-0,85 mm για ψάρια ολικού μήκους 3 έως 7 cm και 0,85-1,2 mm για ψάρια ολικού μήκους 6 έως 12 cm). Το μέγεθος των κόκκων μπορεί να προσαρμόζεται ανάλογα με την ανάπτυξη των ψαριών κατά την έναρξη της φάσης αποβολής. Παράδειγμα τροφής κατάλληλης σύνθεσης που διατίθεται στο εμπόριο παρέχεται στο προσάρτημα 7. Κατά την ανάπτυξη της παρούσας μεθόδου δοκιμών χρησιμοποιήθηκαν ευρέως σιτηρέσια δοκιμής με συνολική περιεκτικότητα σε λιπίδια μεταξύ 15 και 20 % (κ.β.). Ιχθυοτροφές με τόσο υψηλή περιεκτικότητα σε λιπίδια ενδέχεται να μην είναι διαθέσιμες σε ορισμένες περιοχές. Στις περιπτώσεις αυτές, οι μελέτες θα μπορούσαν να διεξαχθούν με χαμηλότερη συγκέντρωση λιπιδίων στην τροφή και, εάν είναι απαραίτητο, κατάλληλη προσαρμογή του ρυθμού σίτισης για τη διατήρηση της υγείας των ψαριών (με βάση προκαταρκτικές δοκιμές). Η συνολική περιεκτικότητα σε λιπίδια των σιτηρεσίων της ομάδας δοκιμής και της ομάδας μαρτύρων πρέπει να μετράται και να καταγράφεται πριν από την έναρξη της δοκιμής και στο τέλος της φάσης πρόσληψης. Η έκθεση της μελέτης θα πρέπει να περιλαμβάνει λεπτομερή στοιχεία που παρέχονται από τον προμηθευτή των ζωοτροφών και αφορούν την ανάλυση θρεπτικών στοιχείων, υγρασίας, διαιτητικών ινών, τέφρας και, στο μέτρο του δυνατού, ανόργανων συστατικών και υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων (π.χ. «τυπικοί» ρύποι προτεραιότητας.

Κατά τον εμβολιασμό της τροφής με την υπό δοκιμή ουσία, θα πρέπει να καταβάλλεται κάθε δυνατή προσπάθεια ώστε να εξασφαλίζεται ομοιογένεια στο σύνολο της τροφής που χρησιμοποιείται στη δοκιμή. Για την επιλογή της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στην τροφή της ομάδας δοκιμής θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη η ευαισθησία της αναλυτικής τεχνικής, η τοξικότητα της υπό δοκιμή ουσίας (η NOEC, εάν είναι γνωστή) και τα σχετικά φυσικοχημικά δεδομένα. Η ουσία αναφοράς, εάν χρησιμοποιείται, θα πρέπει κατά προτίμηση να ενσωματώνεται σε συγκέντρωση ίση περίπου με το 10 % της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας (ή, σε κάθε περίπτωση, σε όσο το δυνατόν χαμηλότερη συγκέντρωση), με την επιφύλαξη της ευαισθησίας της ανάλυσης [π.χ. για το εξαχλωροβενζόλιο έχει κριθεί αποδεκτή η συγκέντρωση 1-100 μg/g στην τροφή· βλ. (47) για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τις αποδόσεις αφομοίωσης του HCB].

Η υπό δοκιμή ουσία μπορεί να εμβολιάζεται στην ιχθυοτροφή με διάφορους τρόπους ανάλογα με τα φυσικά χαρακτηριστικά και τη διαλυτότητά της (για περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με τις μεθόδους εμβολιασμού, βλ. προσάρτημα 7):

— Εάν η ουσία είναι διαλυτή και σταθερή σε τριγλυκερίδια, θα πρέπει να διαλύεται σε μικρή ποσότητα ιχθυελαίου ή βρώσιμου φυτικού ελαίου πριν αναμειχθεί με την ιχθυοτροφή. Στην περίπτωση αυτή, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγεται η παραγωγή σιτηρεσίου με υπερβολικά υψηλή περιεκτικότητα σε λιπίδια, λαμβανομένης υπόψη της φυσικής περιεκτικότητας της εμβολιασμένης ζωοτροφής σε λιπίδια, με την προσθήκη της ελάχιστης γνωστής ποσότητας ελαίου που απαιτείται για να επιτευχθεί η κατανομή και η ομοιογένεια της υπό δοκιμή ουσίας στην τροφή, ή

— η τροφή θα πρέπει να εμβολιάζεται με τη χρήση κατάλληλου οργανικού διαλύτη, εφόσον δεν διακυβεύονται η ομοιογένεια και η βιοδιαθεσιμότητα [είναι δυνατόν να σχηματιστούν (μικρο)κρύσταλλοι της υπό δοκιμή ουσίας στην τροφή, λόγω εξάτμισης του διαλύτη, και δεν υπάρχει εύκολος τρόπος να αποδειχθεί η απουσία αυτού του φαινομένου· βλ. (49)], ή

— τα μη παχύρρευστα υγρά θα πρέπει να προστίθενται απευθείας στην ιχθυοτροφή, αλλά με καλή ανάμειξη για να ευνοείται η ομοιογένεια και να διευκολύνεται η αφομοίωση. Η τεχνική ανάμειξης θα πρέπει να εξασφαλίζει την ομοιογένεια της εμβολιασμένης ιχθυοτροφής.

▼M7

Σε ορισμένες περιπτώσεις, π.χ. προκειμένου για λιγότερο υδρόφοβες υπό δοκιμή ουσίες που είναι πιθανότερο να εκροφηθούν από την τροφή, ενδέχεται να είναι απαραίτητη η επικάλυψη των κόκκων της παρασκευασμένης τροφής με μικρή ποσότητα αραβοσιτελαίου/ιχθυελαίου (βλ. παράγραφο 142). Στις περιπτώσεις αυτές, η τροφή των μαρτύρων θα πρέπει να υποβάλλεται σε παρόμοια κατεργασία και η τελική παρασκευασμένη ζωοτροφή να χρησιμοποιείται για τη μέτρηση των λιπιδίων.

Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με την ουσία αναφοράς, εάν χρησιμοποιείται, θα πρέπει να είναι συγκρίσιμα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα από μελέτες που έχουν διεξαχθεί υπό παρόμοιες συνθήκες με συγκρίσιμο ρυθμό σίτισης (βλ. παράγραφο 45) και οι ειδικές για την ουσία αναφοράς παράμετροι θα πρέπει να πληρούν τα σχετικά κριτήρια της παραγράφου 113 (τρίτη, τέταρτη και πέμπτη περίπτωση).

Εάν χρησιμοποιείται έλαιο ή διαλύτης ως φορέας για την υπό δοκιμή ουσία, θα πρέπει να αναμειγνύεται με το σιτηρέσιο των μαρτύρων ισοδύναμη ποσότητα του ίδιου φορέα (χωρίς την υπό δοκιμή ουσία), για να διατηρείται η ισοδυναμία με την εμβολιασμένη τροφή. Είναι σημαντικό να χορηγούνται στις ομάδες δοκιμής και μαρτύρων σιτηρέσια ισοδύναμης διατροφικής αξίας, τόσο κατά τη φάση πρόσληψης όσο και κατά τη φάση αποβολής.

Το εμβολιασμένο σιτηρέσιο θα πρέπει να αποθηκεύεται υπό συνθήκες που διατηρούν τη σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας στο μείγμα της τροφής (π.χ. ψύξη) και οι συνθήκες αυτές να αναφέρονται.

Επιλογή είδους ψαριών

Μπορούν να χρησιμοποιούνται τα είδη ψαριών που ορίζονται για την υδατική έκθεση (βλ. παράγραφο 32 και προσάρτημα 3). Η ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*), ο κυπρίνος (*Cyprinus carpio*) και ο χοντροκέφαλος φοξίνος (*Pimephales promelas*) έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε μελέτες διατροφικής βιοσυσσώρευσης με οργανικές ουσίες πριν από τη δημοσίευση της παρούσας μεθόδου δοκιμών. Η διατροφική συμπεριφορά του υπό δοκιμή είδους θα πρέπει να έχει ως αποτέλεσμα την ταχεία κατανάλωση της χορηγούμενης μερίδας τροφής ώστε να εξασφαλίζεται ότι κάθε παράγοντας που επηρεάζει τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στην τροφή (π.χ. έκπλυση προς το νερό και πιθανότητα υδατικής έκθεσης) περιορίζεται στο ελάχιστο δυνατό επίπεδο. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ψάρια με μέγεθος/βάρος εντός του συνιστώμενου εύρους τιμών (βλ. προσάρτημα 3). Το μέγεθος των ψαριών δεν θα πρέπει να είναι τόσο μικρό ώστε να παρεμποδίζει την ευχερή ανάλυση ανά άτομο. Η διενέργεια δοκιμών σε στάδιο του κύκλου ζωής όπου πραγματοποιείται ταχεία ανάπτυξη μπορεί να περιπλέξει την ερμηνεία των δεδομένων, ενώ οι υψηλοί ρυθμοί ανάπτυξης μπορούν να επηρεάσουν τον υπολογισμό της απόδοσης της αφομοίωσης ([1]).

Διατήρηση των ψαριών

Τα κριτήρια αποδοχής που αφορούν τον εγκλιματισμό, τη θνησιμότητα και τις ασθένειες είναι τα ίδια όπως για τη μέθοδο υδατικής έκθεσης πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμής (βλ. παραγράφους 33-35).

ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Εργασίες πριν από τη μελέτη και δοκιμή προσδιορισμού εύρους τιμών

Απαιτείται αναλυτική εργασία πριν από τη μελέτη για να αποδειχθεί η ανάκτηση της ουσίας από την εμβολιασμένη τροφή/τον εμβολιασμένο ιστών ψαριών. Δεν είναι πάντοτε αναγκαία η διεξαγωγή δοκιμής προσδιορισμού εύρους τιμών για την επιλογή της κατάλληλης συγκέντρωσης στην τροφή. Για να αποδειχθεί ότι δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις και να αξιολογηθούν η γευστικότητα της εμβολιασμένης τροφής, η ευαισθησία της αναλυτικής μεθόδου για τους ιστούς των ψαριών και τις ιχθυοτροφές και η επιλογή κατάλληλου ρυθμού σίτισης και συχνότητας δειγματοληψίας κατά τη φάση αποβολής κ.λπ., μπορούν να διενεργηθούν προκαταρκτικά πειράματα διατροφής, αλλά αυτά δεν είναι υποχρεωτικά. Μια προκαταρκτική μελέτη μπορεί να είναι χρήσιμη για την εκτίμηση του

([1]) Η ταχεία ανάπτυξη κατά τη φάση πρόσληψης συνεπάγεται ότι ο πραγματικός ρυθμός σίτισης θα μειωθεί σε επίπεδο χαμηλότερο από εκείνο που καθορίστηκε κατά την έναρξη της έκθεσης.

▼M7

αριθμού των ψαριών που απαιτούνται για τη δειγματοληψία κατά τη φάση αποβολής. Η εκτίμηση αυτή μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική μείωση του αριθμού των χρησιμοποιούμενων ψαριών, ιδίως για τις υπό δοκιμή ουσίες που είναι ιδιαίτερα επιρρεπείς σε μεταβολισμό.

Συνθήκες έκθεσης

Διάρκεια της φάσης πρόσληψης

Μια φάση πρόσληψης διάρκειας 7 έως 14 ημερών είναι κατά κανόνα επαρκής. Κατά τη διάρκειά της, σε μία ομάδα ψαριών χορηγείται καθημερινά το σιτηρέσιο-μάρτυρας και σε μια άλλη ομάδα το σιτηρέσιο δοκιμής, σε σταθερή ποσότητα που εξαρτάται από το εξεταζόμενο είδος ψαριών και τις πειραματικές συνθήκες, π.χ. 1-2 % του σωματικού βάρους (νωπό βάρος) στην περίπτωση της ιριδίζουσας πέστροφας. Ο ρυθμός σίτισης θα πρέπει να επιλέγεται κατά τρόπο ώστε να αποφεύγονται η ταχεία ανάπτυξη και η μεγάλη αύξηση της περιεκτικότητας σε λιπίδια. Εάν είναι απαραίτητο, η φάση πρόσληψης μπορεί να παραταθεί με βάση την πρακτική εμπειρία από προηγούμενες μελέτες ή τις γνώσεις σχετικά με την πρόσληψη/αποβολή της υπό δοκιμή ουσίας (ή ανάλογης) από τα ψάρια. Η έναρξη της δοκιμής ορίζεται ως ο χρόνος της πρώτης σίτισης με την εμβολιασμένη τροφή. Μια πειραματική ημέρα διαρκεί από την ώρα της σίτισης μέχρι λίγο πριν από την ώρα της επόμενης σίτισης (π.χ. μία ώρα). Επομένως, η πρώτη πειραματική ημέρα πρόσληψης αρχίζει την ώρα της πρώτης σίτισης με εμβολιασμένη τροφή και λήγει λίγο πριν από τη δεύτερη σίτιση με εμβολιασμένη τροφή. Στην πράξη, η φάση πρόσληψης λήγει λίγο πριν (π.χ. μία ώρα) από την πρώτη σίτιση με μη εμβολιασμένη με την υπό δοκιμή ουσία τροφή, δεδομένου ότι τα ψάρια θα συνεχίζουν να χωνεύουν την εμβολιασμένη τροφή και να απορροφούν την υπό δοκιμή ουσία κατά το ενδιάμεσο διάστημα των 24 ωρών. Είναι σημαντικό να διασφαλίζεται η επίτευξη αρκετά υψηλού (μη τοξικού) φόρτου της υπό δοκιμή ουσίας στο σώμα σε σχέση με την αναλυτική μέθοδο, ώστε να μπορεί να μετρηθεί μείωση τουλάχιστον κατά μία τάξη μεγέθους στη διάρκεια της φάσης αποβολής. Σε ειδικές περιπτώσεις, η φάση πρόσληψης μπορεί να παραταθεί (έως και σε 28 ημέρες), με πρόσθετη δειγματοληψία για να διαμορφωθεί αντίληψη σχετικά με την κινητική της πρόσληψης. Κατά τη φάση πρόσληψης η συγκέντρωση στα ψάρια ενδέχεται να μη φθάσει σε σταθερή κατάσταση. Μπορούν εν προκειμένω να εφαρμοστούν εξισώσεις για τον υπολογισμό του χρόνου που απαιτείται για την επίτευξη σταθερής κατάστασης, ως ένδειξης της πιθανής χρονικής περιόδου που απαιτείται για να επιτευχθούν σημαντικές συγκεντρώσεις στα ψάρια, όπως και στη δοκιμή υδατικής έκθεσης (βλ. προσάρτημα 5).

Σε ορισμένες περιπτώσεις, ενδέχεται να είναι γνωστό ότι η πρόσληψη της ουσίας από τα ψάρια σε διάστημα 7-14 ημερών δεν επαρκεί ώστε η χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση στην τροφή να έχει ως αποτέλεσμα αρκούντως υψηλή συγκέντρωση στα ψάρια για τη μέτρηση μείωσης τουλάχιστον κατά μια τάξη μεγέθους στη διάρκεια της φάσης αποβολής, είτε λόγω ανεπαρκούς ευαισθησίας της ανάλυσης είτε λόγω χαμηλής απόδοσης της αφομοίωσης. Σε αυτές τις περιπτώσεις, μπορεί να παρουσιάζει πλεονέκτημα η παράταση της αρχικής φάσης της σίτισης σε περισσότερο από 14 ημέρες ή, ιδίως για εξαιρετικά μεταβολίσιμες ουσίες, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο υψηλότερης συγκέντρωσης στην τροφή. Ωστόσο, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε ο φόρτος του σώματος να διατηρείται κατά τη φάση πρόσληψης σε επίπεδο κατώτερο από την (εκτιμώμενη) χρόνια συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρείται επίδραση (NOEC) στους ιστούς των ψαριών (βλ. παράγραφο 138).

Διάρκεια της φάσης αποβολής

Η αποβολή συνήθως διαρκεί έως 28 ημέρες και αρχίζει από τη στιγμή που η ομάδα δοκιμής των ψαριών θα τραφεί με καθαρή ακατέργαστη τροφή μετά τη φάση πρόσληψης. Η αποβολή αρχίζει με την πρώτη χορήγηση «μη εμβολιασμένης» τροφής και όχι αμέσως μετά την τελευταία χορήγηση «εμβολιασμένης» τροφής, διότι τα ψάρια θα συνεχίζουν να χωνεύουν την τροφή και να απορροφούν την υπό δοκιμή ουσία κατά το ενδιάμεσο διάστημα των 24 ωρών, όπως επισημαίνεται στην παράγραφο 126. Ως εκ τούτου, το πρώτο δείγμα της φάσης αποβολής λαμβάνεται λίγο πριν από τη δεύτερη χορήγηση μη εμβολιασμένου σιτηρεσίου. Αυτή η φάση αποβολής έχει σχεδιαστεί με σκοπό να ανιχνεύονται οι ουσίες με πιθανό χρόνο υποδιπλασιασμού έως 14 ημερών, που χαρακτηρίζει τις βιοσυσσωρεύσιμες ουσίες ([1]) και, ως εκ τούτου, οι 28 ημέρες περιλαμβάνουν δύο

([1]) Σε μελέτη υδατικής έκθεσης, ο χρόνος υποδιπλασιασμού 14 ημερών θα αντιστοιχούσε σε BCF περίπου 10 000 L/kg με τη χρήση ψαριών βάρους 1 g με ρυθμό πρόσληψης περίπου 500 L/kg/d (σύμφωνα με την εξίσωση των Sijm και συν. (46)).

▼M7

χρόνους υποδιπλασιασμού τέτοιων ουσιών. Σε περιπτώσεις άκρως βιοσυσσωρευόμενων ουσιών, μπορεί να είναι χρήσιμη η παράταση της φάσης αποβολής (εάν το υποδεικνύουν οι προκαταρκτικές δοκιμές).

Ακόμα κι αν μια ουσία αποβάλλεται με πολύ αργό ρυθμό, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατός ο προσδιορισμός του ακριβούς χρόνου υποδιπλασιασμού κατά τη φάση αποβολής, τα στοιχεία μπορεί να επαρκούν για τους σκοπούς της αξιολόγησης, ως ένδειξη υψηλού βαθμού βιοσυσσώρευσης. Αντιστρόφως, εάν μια ουσία αποβάλλεται με τόσο ταχύ ρυθμό ώστε να μην είναι εφικτή η συναγωγή αξιόπιστης συγκέντρωσης σε χρόνο 0 (συγκέντρωση κατά τη λήξη της πρόσληψης/έναρξη αποβολής, $C_{0,d}$) και σταθεράς k_2, μπορεί να γίνει συντηρητική εκτίμηση της k_2 (βλ. προσάρτημα 7).

Εάν από τις αναλύσεις των ψαριών σε προηγούμενα χρονικά διαστήματα (π.χ. 7 ή 14 ημερών) προκύψει ότι η ουσία έχει αποβληθεί σε επίπεδα χαμηλότερα από το όριο ποσοτικού προσδιορισμού πριν από την πλήρη περίοδο των 28 ημερών, η δειγματοληψία μπορεί να διακοπεί και η δοκιμή να τερματιστεί.

Σε ελάχιστες περιπτώσεις, η πρόσληψη της υπό δοκιμή ουσίας ενδέχεται να μην είναι μετρήσιμη στο τέλος της περιόδου πρόσληψης (ή στο δεύτερο δείγμα της φάσης αποβολής). Εάν μπορεί να καταδειχθεί ότι: i) πληρούνται τα κριτήρια εγκυρότητας της παραγράφου 113 και ii) η απουσία πρόσληψης δεν οφείλεται σε άλλη αδυναμία της δοκιμής (π.χ. ανεπαρκής διάρκεια πρόσληψης, ελαττώματα της τεχνικής εμβολιασμού τροφών που συνεπάγονται χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα, έλλειψη ευαισθησίας της αναλυτικής μεθόδου, μη κατανάλωση τροφής από τα ψάρια κ.λπ.), είναι δυνατόν να τερματιστεί η μελέτη χωρίς να χρειάζεται να επαναληφθεί με μεγαλύτερη διάρκεια πρόσληψης. Εάν από τις προκαταρκτικές εργασίες συνάγεται ότι πρόκειται για τέτοια περίπτωση, μπορεί να είναι σκόπιμη η ανάλυση των περιττωμάτων, στο μέτρο του δυνατού, για την ανίχνευση της υπό δοκιμή ουσίας που δεν χωνεύθηκε, στο πλαίσιο προσέγγισης «ισοζυγίου μάζας».

Αριθμός των υπό δοκιμή ψαριών

Όπως και στη δοκιμή υδατικής έκθεσης, θα πρέπει να επιλέγονται ψάρια παρόμοιου βάρους και μήκους και το βάρος των μικρότερων ψαριών θα πρέπει να μην είναι μικρότερο από τα δύο τρίτα του βάρους των μεγαλύτερων (βλ. παραγράφους 40-42).

Ο συνολικός αριθμός ψαριών για τη μελέτη θα πρέπει να επιλέγεται με βάση το πρόγραμμα δειγματοληψίας (τουλάχιστον ένα δείγμα στο τέλος της φάσης πρόσληψης και τέσσερα έως έξι δείγματα κατά τη φάση αποβολής, αλλά ανάλογα με τη διάρκεια των φάσεων), λαμβανομένων υπόψη της ευαισθησίας της αναλυτικής μεθόδου, της συγκέντρωσης που αναμένεται να επιτευχθεί στο τέλος της φάσης πρόσληψης (με βάση τη διαθέσιμη γνώση) και της διάρκειας της αποβολής (εάν μπορεί να εκτιμηθεί, από τη διαθέσιμη γνώση). Θα πρέπει κάθε φορά να λαμβάνονται ως δείγμα πέντε έως δέκα ψάρια και οι παράμετροι ανάπτυξης (βάρος και ολικό μήκος) να μετρώνται πριν από την ανάλυση της χημικής ουσίας ή των λιπιδίων.

Λόγω της εγγενούς μεταβλητότητας του μεγέθους, του ρυθμού ανάπτυξης και της φυσιολογίας των ψαριών, καθώς και της πιθανής διακύμανσης της ποσότητας της χορηγούμενης τροφής που καταναλώνει κάθε ψάρι, θα πρέπει να λαμβάνονται ως δείγμα σε κάθε χρονικό διάστημα τουλάχιστον πέντε ψάρια από την ομάδα δοκιμής και πέντε από την ομάδα μαρτύρων, για τον ορθό προσδιορισμό της μέσης συγκέντρωσης και της μεταβλητότητάς της. Η μεταβλητότητα μεταξύ των χρησιμοποιούμενων ψαριών είναι πιθανό να συμβάλλει περισσότερο στη συνολική ανεξέλεγκτη μεταβλητότητα της δοκιμής απ' όσο η εγγενής μεταβλητότητα των χρησιμοποιούμενων αναλυτικών μεθόδων και, ως εκ τούτου, δικαιολογεί τη χρήση έως δέκα ψαριών ανά χρονικό σημείο δειγματοληψίας σε ορισμένες περιπτώσεις. Ωστόσο, εάν οι συγκεντρώσεις υποβάθρου της υπό δοκιμή ουσίας στα ψάρια-μάρτυρες δεν είναι μετρήσιμες κατά την έναρξη της αποβολής, μπορεί να αρκεί η ανάλυση της ουσίας σε δύο έως τρία ψάρια-μάρτυρες μόνο στο τελικό διάστημα δειγματοληψίας, εφόσον συνεχιστεί η λήψη δειγμάτων από τα υπόλοιπα ψάρια-μάρτυρες σε όλα τα χρονικά σημεία δειγματοληψίας για τη μέτρηση του βάρους και του ολικού μήκους (έτσι ώστε να λαμβάνεται ο ίδιος αριθμός δειγμάτων από τις ομάδες δοκιμής και τις ομάδες μαρτύρων για τον έλεγχο της ανάπτυξης). Τα ψάρια θα πρέπει να φυλάσσονται, να ζυγίζονται ατομικά (ακόμη και αν κριθεί αναγκαίο να συνδυαστούν αργότερα τα αποτελέσματα του δείγματος) και να μετράται το ολικό μήκος.

▼M7

Για μια τυπική δοκιμή, για παράδειγμα, με διάρκεια αποβολής 28 ημερών και πέντε δείγματα αποβολής, αυτό συνεπάγεται συνολικά 59-120 ψάρια από την ομάδα δοκιμής και 50-110 ψάρια από την ομάδα μαρτύρων, με την παραδοχή ότι η αναλυτική τεχνική για την ουσία επιτρέπει τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε λιπίδια στα ίδια ψάρια. Εάν η ανάλυση των λιπιδίων δεν μπορεί να διενεργηθεί στα ίδια ψάρια στα οποία πραγματοποιείται η ανάλυση της χημικής ουσίας και δεν είναι εφικτή ούτε η χρήση μόνο των ψαριών-μαρτύρων για την ανάλυση των λιπιδίων (βλ. παράγραφο 56), θα απαιτούνται επιπλέον 15 ψάρια (τρία από τον πληθυσμό του αποθέματος κατά την έναρξη της δοκιμής, τρία από την ομάδα μαρτύρων και την ομάδα δοκιμής κατά την έναρξη της αποβολής και τρία από την ομάδα μαρτύρων και την ομάδα δοκιμής στο τέλος του πειράματος). Παράδειγμα προγράμματος δειγματοληψίας με αριθμούς ψαριών παρατίθεται στο προσάρτημα 4.

Πληθυσμιακός φόρτος

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται αναλογίες νερού-ψαριών παρόμοιου ύψους όπως στη μέθοδο υδατικής έκθεσης (βλ. παραγράφους 43 και 44). Μολονότι ο πληθυσμιακός φόρτος ψαριών δεν επηρεάζει τις συγκεντρώσεις έκθεσης στην παρούσα δοκιμή, συνιστάται πληθυσμιακός φόρτος 0,1-1,0 g ψαριών (νωπό βάρος) ανά λίτρο νερού ημερησίως για να διατηρούνται επαρκείς συγκεντρώσεις διαλυμένου οξυγόνου και να ελαχιστοποιείται η καταπόνηση των υπό δοκιμή οργανισμών.

Σιτηρέσιο δοκιμής και σίτιση

Κατά τη διάρκεια της περιόδου εγκλιματισμού, τα ψάρια θα πρέπει να τρέφονται με κατάλληλο σιτηρέσιο, όπως περιγράφεται ανωτέρω (παράγραφος 117). Εάν η δοκιμή διεξάγεται υπό συνθήκες συνεχούς ροής, η ροή θα πρέπει να διακόπτεται κατά τη σίτιση των ψαριών.

Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, το σιτηρέσιο της ομάδας δοκιμής θα πρέπει να ανταποκρίνεται στην ανωτέρω περιγραφή (παράγραφοι 116-121). Επιπλέον της συνεκτίμησης των ειδικών για την ουσία παραγόντων, της αναλυτικής ευαισθησίας, της αναμενόμενης συγκέντρωσης στην τροφή υπό τις περιβαλλοντικές συνθήκες και των επιπέδων χρόνιας τοξικότητας/φόρτου του σώματος, κατά την επιλογή της στοχευόμενης συγκέντρωσης εμβολιασμού θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η γευστικότητα της τροφής (ώστε να μην απωθεί τα ψάρια). Η ονομαστική συγκέντρωση εμβολιασμού της υπό δοκιμή ουσίας πρέπει να τεκμηριώνεται στην έκθεση. Με βάση την αποκτηθείσα πείρα, οι συγκεντρώσεις εμβολιασμού στο φάσμα 1-1 000 μg/g παρέχουν ένα πρακτικό εύρος εργασίας για τις υπό δοκιμή ουσίες που δεν εμφανίζουν ειδικό τοξικό μηχανισμό. Για ουσίες που δρουν μέσω μη ειδικού μηχανισμού, τα επίπεδα των υπολειμμάτων στους ιστούς δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν τα 5 μmol/g λιπιδίων, διότι σε ανώτερα επίπεδα είναι πιθανό να έχουν χρόνιες επιδράσεις (19) (48) (50) ([1]). Για άλλες ουσίες θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μην επέρχονται δυσμενείς επιδράσεις από τη συσσωρευμένη έκθεση (βλ. παράγραφο 127). Αυτό ισχύει ιδίως εάν υποβάλλονται ταυτόχρονα σε δοκιμή περισσότερες από μία ουσίες (βλ. παράγραφο 112).

Η κατάλληλη ποσότητα της υπό δοκιμή ουσίας μπορεί να εμβολιαστεί στην ιχθυοτροφή με έναν από τους τρεις τρόπους που περιγράφονται στην παράγραφο 119 και στο προσάρτημα 7. Οι μέθοδοι και οι διαδικασίες εμβολιασμού της ιχθυοτροφής θα πρέπει να τεκμηριώνονται στην έκθεση. Στα ψάρια-μάρτυρες χορηγείται τροφή χωρίς κατεργασία, που περιέχει ισοδύναμη ποσότητα μη εμβολιασμένου ελαίου, εάν αυτό χρησιμοποιήθηκε ως φορέας στην εμβολιασμένη ιχθυοτροφή για τη φάση πρόσληψης, ή που έχει υποστεί κατεργασία με «καθαρό» διαλύτη, εάν χρησιμοποιήθηκε διαλύτης ως φορέας για την παρασκευή του σιτηρεσίου της ομάδας δοκιμής. Τα σιτηρέσια, κατεργασμένα και μη, θα πρέπει να υποβάλλονται σε αναλυτική μέτρηση, τουλάχιστον εις τριπλούν, για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας, πριν από την έναρξη και στο τέλος της φάσης πρόσληψης. Μετά την έκθεση στην κατεργασμένη ιχθυοτροφή (φάση πρόσληψης), τα ψάρια (και των δύο ομάδων) σιτίζονται με τροφή χωρίς κατεργασία (φάση αποβολής).

Χορηγούνται στα ψάρια σταθερές μερίδες (ανάλογα με το είδος τους· π.χ. περίπου 1-2 % του νωπού σωματικού βάρους ημερησίως στην περίπτωση της ιριδίζουσας πέστροφας). Ο ρυθμός σίτισης θα πρέπει να επιλέγεται κατά τρόπο ώστε

([1]) Δεδομένου ότι οι πραγματικές εσωτερικές συγκεντρώσεις μπορούν να προσδιοριστούν μόνο μετά τη διεξαγωγή της δοκιμής, απαιτείται εκτίμηση της αναμενόμενης εσωτερικής συγκέντρωσης (π.χ. με βάση τον αναμενόμενο BMF και τη συγκέντρωση στην τροφή· βλ. εξίσωση A5.8 στο προσάρτημα 5).

▼M7

να αποφεύγονται η ταχεία ανάπτυξη και η μεγάλη αύξηση της περιεκτικότητας σε λιπίδια. Ο ακριβής ρυθμός σίτισης που καθορίζεται κατά τη διάρκεια του πειράματος θα πρέπει να καταγράφεται. Η αρχική σίτιση θα πρέπει να βασίζεται στις προγραμματισμένες μετρήσεις του βάρους του πληθυσμού του αποθέματος αμέσως πριν από την έναρξη της δοκιμής. Η ποσότητα της ιχθυοτροφής θα πρέπει να αναπροσαρμόζεται με βάση το νωπό βάρος των ψαριών των δειγμάτων σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας για να λαμβάνεται υπόψη η ανάπτυξη κατά τη διάρκεια του πειράματος. Το βάρος και μήκος των ψαριών στις δεξαμενές των ομάδων δοκιμής και μαρτύρων μπορούν να υπολογίζονται κατ' εκτίμηση από το βάρος και το ολικό μήκος των ψαριών που χρησιμοποιούνται σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας· τα ψάρια που παραμένουν στις δεξαμενές των ομάδων δοκιμής και μαρτύρων δεν ζυγίζονται ούτε μετράται το μήκος τους. Είναι σημαντικό να διατηρείται ο ίδιος καθορισμένος ρυθμός σίτισης σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Η σίτιση θα πρέπει να παρακολουθείται προσεκτικά για να είναι βέβαιο ότι τα ψάρια καταναλώνουν εμφανώς το σύνολο της χορηγούμενης τροφής, έτσι ώστε να διασφαλίζεται η χρήση των κατάλληλων ρυθμών λήψης τροφής για τους υπολογισμούς. Κατά την επιλογή του ρυθμού σίτισης που θα εξασφαλίζει την κατανάλωση του συνόλου της χορηγούμενης μία φορά ημερησίως τροφής, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα προκαταρκτικά πειράματα διατροφής ή η προηγούμενη εμπειρία. Σε περίπτωση που απομένει συστηματικά άθικτη ποσότητα τροφής, ενδέχεται να είναι σκόπιμο να μοιραστεί η δόση σε μια επιπλέον περίοδο σίτισης κάθε πειραματική ημέρα (π.χ. αντί της χορήγησης τροφής μία φορά ημερησίως, χορήγηση της μισής ποσότητας τροφής δύο φορές ημερησίως). Εάν αυτό καταστεί αναγκαίο, ο χρόνος της δεύτερης σίτισης θα πρέπει να είναι ορισμένος και προγραμματισμένος κατά τρόπο ώστε να μεσολαβεί το μεγαλύτερο δυνατό χρονικό διάστημα μέχρι τη δειγματοληψία ψαριών (π.χ. δεύτερη σίτιση σε ορισμένο χρόνο εντός του πρώτου μισού της πειραματικής ημέρας).

Αν και γενικά τα ψάρια καταναλώνουν με ταχύτητα την τροφή, είναι σημαντικό να εξασφαλίζεται ότι η ουσία παραμένει προσροφημένη στην τροφή. Θα πρέπει να καταβάλλεται προσπάθεια ώστε να αποφεύγεται η διασπορά της ουσίας από την τροφή στο νερό, η οποία θα εξέθετε τα ψάρια σε υδατικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας πέραν της έκθεσης μέσω της διατροφικής οδού. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την απομάκρυνση της μη καταναλωθείσας τροφής (και των περιττωμάτων) από τις δεξαμενές των ομάδων δοκιμής και μαρτύρων εντός μίας ώρας από τη σίτιση, αλλά κατά προτίμηση εντός 30 λεπτών. Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα σύστημα συνεχούς καθαρισμού του νερού μέσω φίλτρου ενεργού άνθρακα για την απορρόφηση τυχόν «διαλυμένων» μολυντών. Τα συστήματα συνεχούς ροής μπορεί να διευκολύνουν την ταχεία απομάκρυνση των σωματιδίων τροφής και των διαλυμένων ουσιών ([1]). Σε ορισμένες περιπτώσεις, μια ελαφρώς τροποποιημένη τεχνική παρασκευής εμβολιασμένης τροφής μπορεί να συμβάλει στην άμβλυνση αυτού του προβλήματος (βλ. παράγραφο 119).

Φως και θερμοκρασία

Όπως και στη μέθοδο υδατικής έκθεσης (βλ. παράγραφο 48), συνιστάται φωτοπερίοδος 12 έως 16 ωρών και κατάλληλη θερμοκρασία (± 2 °C) για το χρησιμοποιούμενο είδος ψαριών (βλ. προσάρτημα 3). Ο τύπος και τα χαρακτηριστικά του φωτισμού θα πρέπει να είναι γνωστά και τεκμηριωμένα.

Μάρτυρες

Θα πρέπει να χρησιμοποιείται μία ομάδα μαρτύρων, αποτελούμενη από ψάρια στα οποία χορηγείται η ίδια μερίδα όπως στην ομάδα δοκιμής, χωρίς όμως την υπό δοκιμή ουσία. Εάν χρησιμοποιείται έλαιο ή διαλύτης ως φορέας για τον εμβολιασμό της ιχθυοτροφής που χορηγείται στην ομάδα δοκιμής, η τροφή της ομάδας μαρτύρων θα πρέπει να υποβάλλεται στην ίδια ακριβώς κατεργασία, αλλά χωρίς την υπό δοκιμή ουσία, κατά τρόπο ώστε τα σιτηρέσια των ομάδων δοκιμής και μαρτύρων να είναι ισοδύναμα (βλ. παραγράφους 121 και 139).

([1]) Η παρουσία της υπό δοκιμή ουσίας στο μέσο δοκιμής ως αποτέλεσμα απέκκρισης από τα ψάρια ή έκπλυσης από την τροφή ίσως είναι αδύνατο να αποφευχθεί πλήρως. Ως εκ τούτου, μια επιλογή είναι να μετράται η συγκέντρωση της ουσίας στο νερό στο τέλος της περιόδου πρόσληψης, ιδίως εάν χρησιμοποιείται ημιστατική διάταξη, για να διαπιστώνεται κατά πόσον έχει σημειωθεί υδατική έκθεση.

▼M7

Συχνότητα μετρήσεων της ποιότητας του νερού

Οι συνθήκες που περιγράφονται στη μέθοδο υδατικής έκθεσης ισχύουν και στην προκειμένη περίπτωση, με τη διαφορά ότι ο TOC πρέπει να μετράται μόνο πριν από τη δοκιμή, στο πλαίσιο του χαρακτηρισμού του νερού δοκιμής (βλ. παράγραφο 53).

Δειγματοληψία και ανάλυση ψαριών και σιτηρεσίου

Ανάλυση δειγμάτων σιτηρεσίου

Δείγματα των σιτηρεσίων των ομάδων δοκιμής και μαρτύρων θα πρέπει να αναλύονται τουλάχιστον εις τριπλούν για τον προσδιορισμό της υπό δοκιμή ουσίας και της περιεκτικότητας σε λιπίδια, τουλάχιστον πριν από την έναρξη και στο τέλος της φάσης πρόσληψης. Οι μέθοδοι ανάλυσης και οι διαδικασίες με τις οποίες εξασφαλίζεται η ομοιογένεια του σιτηρεσίου θα πρέπει να περιλαμβάνονται στην έκθεση.

Τα δείγματα θα πρέπει να αναλύονται για τον προσδιορισμό της υπό δοκιμή ουσίας με την καθιερωμένη και επικυρωμένη μέθοδο. Θα πρέπει να διεξάγονται εργασίες πριν από τη μελέτη για να διαπιστώνονται το όριο ποσοτικοποίησης, η εκατοστιαία ανάκτηση, τυχόν παρεμβολές και η αναλυτική μεταβλητότητα στη σκοπούμενη μήτρα δείγματος. Εάν υποβάλλεται στη δοκιμή ραδιοσημασμένο υλικό, θα πρέπει να εξετάζονται παρόμοια ζητήματα με εκείνα της μεθόδου υδατικής έκθεσης, με αντικατάσταση της ανάλυσης του νερού από ανάλυση της ιχθυοτροφής (βλ. παράγραφο 65).

Ανάλυση των ψαριών

Σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας ψαριών, λαμβάνονται ως δείγμα 5-10 άτομα από τις μεταχειρίσεις έκθεσης και μαρτύρων (σε ορισμένες περιπτώσεις οι αριθμοί των ψαριών-μαρτύρων μπορούν να μειωθούν· βλ. παράγραφο 134).

Η δειγματοληψία θα πρέπει να διενεργείται την ίδια ώρα κάθε πειραματικής ημέρας (σε σχέση με τον χρόνο σίτισης) και να προγραμματίζεται κατά τρόπο που να ελαχιστοποιεί την πιθανότητα παραμονής τροφής στο πεπτικό σύστημα κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης και στις αρχές της φάσης αποβολής, ώστε να αποφεύγονται οι λανθασμένες προσθήκες στις συνολικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας (δηλ. τα ψάρια των δειγμάτων θα πρέπει να απομακρύνονται από τις δεξαμενές στο τέλος της πειραματικής ημέρας, ενώ υπενθυμίζεται ότι μια πειραματική ημέρα αρχίζει την ώρα σίτισης και λήγει την ώρα της επόμενης σίτισης, περίπου μετά από 24 ώρες.. Η αποβολή αρχίζει με την πρώτη χορήγηση μη εμβολιασμένης τροφής· βλ. παράγραφο 128). Το πρώτο δείγμα της φάσης αποβολής (που λαμβάνεται λίγο πριν από τη δεύτερη σίτιση με μη εμβολιασμένη τροφή) είναι σημαντικό, διότι η παρέκταση κατά μία ημέρα πριν από τη μέτρηση αυτή χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της συγκέντρωσης σε χρόνο 0 ($C_{0,d}$, η συγκέντρωση στα ψάρια στο τέλος της πρόσληψης/στην αρχή της αποβολής). Προαιρετικά, μπορεί να αφαιρεθεί ο γαστρεντερικός σωλήνας των ψαριών και να αναλυθεί χωριστά στο τέλος της πρόσληψης, καθώς και τις ημέρες 1 και 3 της αποβολής.

Σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας θα πρέπει να λαμβάνονται ψάρια και από τα δύο δοκιμαστικά δοχεία και να υποβάλλονται στην ίδια μεταχείριση με αυτήν που περιγράφεται στη μέθοδο υδατικής έκθεσης (βλ. παραγράφους 61-63).

Οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας σε ολόκληρα ψάρια (νωπό βάρος) μετρώνται τουλάχιστον στο τέλος της φάσης πρόσληψης και κατά τη διάρκεια της φάσης αποβολής, τόσο στην ομάδα μαρτύρων όσο και στην ομάδα δοκιμής. Κατά τη φάση αποβολής, συνιστώνται τέσσερα έως έξι χρονικά σημεία δειγματοληψίας (π.χ. 1, 3, 7, 14 και 28 ημέρες). Προαιρετικά, μπορεί να περιληφθεί ένα πρόσθετο σημείο δειγματοληψίας μετά από πρόσληψη 1-3 ημερών για να εκτιμηθεί η απόδοση της αφομοίωσης από τη γραμμική φάση πρόσληψης για τα ψάρια όταν ακόμη είναι κοντά η αρχή της περιόδου έκθεσης. Υπάρχουν δύο βασικές αποκλίσεις από το πρόγραμμα: i) εάν εφαρμοστεί παράταση της φάσης πρόσληψης με σκοπό τη διερεύνηση της κινητικής της πρόσληψης, θα απαιτηθούν πρόσθετα χρονικά σημεία δειγματοληψίας κατά τη φάση πρόσληψης και, συνεπώς, θα πρέπει να περιληφθούν επιπλέον ψάρια (βλ. παράγραφο 126)· ii) εάν η μελέτη τερματιστεί στο τέλος της φάσης πρόσληψης λόγω μη μετρήσιμης πρόσληψης (βλ. παράγραφο 131). Κάθε ψάρι που λαμβάνεται ως δείγμα θα πρέπει να ζυγίζεται (και να μετράται το συνολικό του μήκος), για να είναι

▼M7

δυνατός ο προσδιορισμός σταθερών ρυθμού ανάπτυξης. Μπορούν επίσης να μετρώνται οι συγκεντρώσεις της ουσίας σε συγκεκριμένους ιστούς των ψαριών (βρώσιμα και μη βρώσιμα μέρη) στο τέλος της πρόσληψης και σε επιλεγμένους χρόνους της φάσης αποβολής. Εάν υποβάλλεται στη δοκιμή ραδιοσημασμένο υλικό, θα πρέπει να εξετάζονται παρόμοια ζητήματα με εκείνα της μεθόδου υδατικής έκθεσης, με αντικατάσταση της ανάλυσης του νερού από ανάλυση της τροφής (βλ. παράγραφο 65).

Όσον αφορά την περιοδική χρήση ουσίας αναφοράς (βλ. παράγραφο 25), είναι προτιμότερο να μετρώνται οι συγκεντρώσεις στην ομάδα δοκιμής στο τέλος της πρόσληψης και σε όλους τους χρόνους της φάσης αποβολής που καθορίζονται για την υπό δοκιμή ουσία (σε ολόκληρα ψάρια)· για την ομάδα μάρτυρα, αρκεί η ανάλυση των συγκεντρώσεων στο τέλος της φάσης πρόσληψης (σε ολόκληρα ψάρια). Σε ορισμένες περιπτώσεις (για παράδειγμα, εάν οι τεχνικές ανάλυσης της υπό δοκιμή ουσίας και της ουσίας αναφοράς είναι ασύμβατες, με αποτέλεσμα να χρειάζονται επιπλέον ψάρια για να τηρηθεί το πρόγραμμα δειγματοληψίας), μπορεί να υιοθετηθεί άλλη προσέγγιση για την ελαχιστοποίηση του αριθμού των απαιτούμενων επιπλέον ψαριών, ως εξής: οι συγκεντρώσεις της ουσίας αναφοράς μετρώνται κατά τη διάρκεια αποβολής μόνο τις ημέρες 1, 3 και σε δύο ακόμη χρονικά σημεία δειγματοληψίας, τα οποία επιλέγονται κατά τρόπο που να επιτρέπει αξιόπιστες εκτιμήσεις της συγκέντρωσης σε χρόνο 0 ($C_{0,d}$) και σταθεράς k_2 για την ουσία αναφοράς.

Εάν είναι δυνατόν, η περιεκτικότητα κάθε ψαριού σε λιπίδια θα πρέπει να προσδιορίζεται σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας ή τουλάχιστον στην αρχή και στο τέλος της φάσης πρόσληψης και στο τέλος της φάσης αποβολής (βλ. παραγράφους 56 και 67). Ανάλογα με την αναλυτική μέθοδο (βλ. παράγραφο 67 και προσάρτημα 4), μπορεί να είναι εφικτή η χρησιμοποίηση των ίδιων ψαριών για τον προσδιορισμό τόσο της περιεκτικότητας σε λιπίδια όσο και της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας. Αυτό προτιμάται για να περιορίζεται ο αριθμός των ψαριών στον ελάχιστο δυνατό. Εάν, ωστόσο, δεν είναι εφικτό, μπορεί να υιοθετηθεί η προσέγγιση που περιγράφεται στη μέθοδο υδατικής έκθεσης (βλ. εναλλακτικές επιλογές για τη μέτρηση των λιπιδίων στην παράγραφο 56 για αυτές τις εναλλακτικές επιλογές μέτρησης των λιπιδίων). Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση της περιεκτικότητας σε λιπίδια θα πρέπει να τεκμηριώνεται στην έκθεση.

Ποιότητα της αναλυτικής μεθόδου

Θα πρέπει να διενεργούνται πειραματικοί έλεγχοι για να εξασφαλίζονται η ειδικότητα, η ορθότητα, η ακρίβεια και η αναπαραγωγιμότητα της ειδικής για την εκάστοτε ουσία αναλυτικής μεθόδου, καθώς και η ανάκτηση της υπό δοκιμή ουσίας, τόσο από την τροφή όσο και από τα ψάρια.

Μέτρηση της ανάπτυξης των ψαριών

Κατά την έναρξη της δοκιμής, πρέπει να ζυγίζεται ένα δείγμα ψαριών από τον πληθυσμό του αποθέματος (και να μετράται το ολικό μήκος των ψαριών). Αυτά τα δείγματα ψαριών θα πρέπει να λαμβάνονται λίγο πριν από την πρώτη χορήγηση εμβολιασμένης τροφής (π.χ. μία ώρα) και να αντιστοιχίζονται στην πειραματική ημέρα 0. Ο αριθμός των ψαριών για το εν λόγω δείγμα θα πρέπει να είναι τουλάχιστον ο ίδιος με εκείνον των δειγμάτων κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Ορισμένα από αυτά τα ψάρια μπορεί να είναι εκείνα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των λιπιδίων πριν από την έναρξη της φάσης πρόσληψης (βλ. παράγραφο 153). Σε κάθε διάστημα δειγματοληψίας, πρώτα ζυγίζονται τα ψάρια και ύστερα μετράται το μήκος τους. Το μετρούμενο βάρος (και μήκος) κάθε ψαριού θα πρέπει να αντιστοιχίζεται με τη συγκέντρωση της υπό ανάλυση χημικής ουσίας (και την περιεκτικότητα σε λιπίδια, κατά περίπτωση), για παράδειγμα με τη χρήση αποκλειστικού αναγνωριστικού κωδικού για κάθε ψάρι του δείγματος. Οι μετρήσεις των ψαριών αυτών των δειγμάτων μπορούν να χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση του βάρους (και του μήκους) των ψαριών που παραμένουν στις δεξαμενές δοκιμής και μαρτύρων.

Πειραματική αξιολόγηση

Θα πρέπει να ελέγχεται καθημερινά η θνησιμότητα και να καταγράφονται οι σχετικές παρατηρήσεις. Θα πρέπει να διενεργούνται και να καταγράφονται επιπλέον παρατηρήσεις για τον εντοπισμό δυσμενών επιδράσεων, για παράδειγμα αφύσικης συμπεριφοράς ή μελάγχρωσης. Τα ψάρια θεωρούνται νεκρά εάν δεν παρατηρείται αναπνευστική κίνηση και δεν διαπιστώνεται καμία αντίδραση σε ελαφρό μηχανικό ερέθισμα. Τα νεκρά ή εμφανώς ετοιμοθάνατα ψάρια θα πρέπει να απομακρύνονται.

▼M7

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα των δοκιμών χρησιμοποιούνται για να προσδιοριστεί η σταθερά ρυθμού αποβολής (k_2) ως συνάρτηση του συνολικού νωπού βάρους των ψαριών. Η σταθερά ρυθμού ανάπτυξης, k_g, που βασίζεται σε μέση αύξηση του βάρους των ψαριών, υπολογίζεται και χρησιμοποιείται για την παραγωγή της διορθωμένης ως προς την ανάπτυξη σταθεράς ρυθμού αποβολής, k_{2g}, κατά περίπτωση. Επιπλέον, θα πρέπει να αναφέρονται η απόδοση της αφομοίωσης (a· απορρόφηση στο πεπτικό σύστημα), ο κινητικός συντελεστής βιομεγέθυνσης (BMF_K) (εάν είναι απαραίτητο διορθωμένος ως προς την ανάπτυξη, BMF_{Kg}), η διορθωμένη ως προς τα λιπίδια τιμή του (BMF_{KL} ή BMF_{KgL}, εάν είναι διορθωμένη ως προς την αναπτυξιακή αραίωση) και ο ρυθμός σίτισης. Επίσης, εάν είναι εφικτή μια εκτίμηση του χρόνου μέχρι να επιτευχθεί σταθερή κατάσταση (π.χ. σταθερή κατάσταση 95 % ή $t_{95} = 3{,}0/k_2$), μπορεί να συναχθεί ο BMF σταθερής κατάστασης (BMF_{SS}) (βλ. παραγράφους 105 και 106 και προσάρτημα 5) εάν η τιμή t_{95} υποδηλώνει ότι μπορεί να έχουν επιτευχθεί συνθήκες σταθερής κατάστασης. Στον εν λόγω BMF_{SS} θα πρέπει να εφαρμόζεται η ίδια διόρθωση ως προς τα λιπίδια όπως και στον κινητικό BMF (BMF_K), ώστε να προκύψει μια τιμή διορθωμένη ως προς τα λιπίδια, ο BMF_{SSL} (επισημαίνεται ότι δεν έχει συμφωνηθεί διαδικασία για τη διόρθωση ως προς την αναπτυξιακή αραίωση για τον BMF σε σταθερή κατάσταση). Μαθηματικοί τύποι και παράδειγμα υπολογισμών παρουσιάζονται στο προσάρτημα 7. Υπάρχουν προσεγγίσεις που καθιστούν εφικτή την εκτίμηση κινητικού συντελεστή βιοσυγκέντρωσης (BCF_K) με βάση τα δεδομένα που προκύπτουν από τη μελέτη διατροφικής έκθεσης. Το θέμα αυτό εξετάζεται στο προσάρτημα 8.

Δεδομένα για το βάρος/μήκος των ψαριών

Οι τιμές νωπού βάρους και μήκους κάθε ψαριού για όλες τις χρονικές περιόδους παρουσιάζονται χωριστά σε πίνακα για τις ομάδες δοκιμής και μαρτύρων για όλες τις ημέρες δειγματοληψίας κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης [πληθυσμός του αποθέματος κατά την έναρξη της πρόσληψης· ομάδα μαρτύρων και ομάδα δοκιμής κατά τη λήξη της πρόσληψης και, εάν εκτελείται μέτρηση, κατά την αρχική φάση (π.χ. τις ημέρες 1-3 της πρόσληψης) και τη φάση αποβολής (π.χ. τις ημέρες 1, 2, 4, 7, 14, 28, για την ομάδα μαρτύρων και την ομάδα δοκιμής)]. Το βάρος είναι η προτιμώμενη παράμετρος ανάπτυξης για τους σκοπούς της διόρθωσης ως προς την αναπτυξιακή αραίωση. Βλ. κατωτέρω (παράγραφοι 162 και 163) και προσάρτημα 5 για τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για τη διόρθωση των δεδομένων ως προς την αναπτυξιακή αραίωση.

Δεδομένα για τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στα ψάρια

Οι μετρήσεις υπολειμμάτων της υπό δοκιμή ουσίας σε κάθε ψάρι χωριστά (ή σε συγχωνευμένα δείγματα ψαριών, εάν δεν είναι εφικτές οι ατομικές μετρήσεις), εκφραζόμενες σε συγκέντρωση κατά νωπό βάρος (κ.β.), καταγράφονται σε πίνακα για τις ομάδες ψαριών δοκιμής και μαρτύρων ανά χρόνο δειγματοληψίας. Εάν έχει διενεργηθεί ανάλυση λιπιδίων σε κάθε ψάρι των δειγμάτων, μπορούν στη συνέχεια να συναχθούν και να παρουσιαστούν σε πίνακα οι ατομικές συγκεντρώσεις, διορθωμένες ως προς τα λιπίδια (κ.β. λιπιδίων).

— Οι μετρήσεις υπολειμμάτων της υπό δοκιμή ουσίας σε κάθε ψάρι χωριστά (ή σε συγχωνευμένα δείγματα ψαριών, εάν δεν είναι εφικτές οι ατομικές μετρήσεις, βλ. παράγραφο 66) για την περίοδο αποβολής μετατρέπονται στους φυσικούς τους λογαρίθμους και απεικονίζονται σε διάγραμμα σε συνάρτηση με τον χρόνο (ημέρα). Εάν από οπτική εξέταση του διαγράμματος προκύπτουν προφανείς έκτοπες τιμές, μπορεί να εφαρμοστεί στατιστικά έγκυρος έλεγχος έκτοπων τιμών για την εξάλειψη των σημείων λανθασμένων δεδομένων, με τεκμηριωμένη αιτιολόγηση της απάλειψής τους.

— Υπολογίζεται γραμμική συσχέτιση ελαχίστων τετραγώνων για τα δεδομένα ln(συγκέντρωση) σε συνάρτηση με την αποβολή (ημέρα). Η κλίση και η τεταγμένη της καμπύλης αναφέρονται ως η συνολική σταθερά ρυθμού αποβολής (k_2) και ο φυσικός λογάριθμος της παράγωγης συγκέντρωσης σε χρόνο 0 ($C_{0,d}$) (βλ. προσάρτημα 5 και προσάρτημα 7 για περισσότερες πληροφορίες). Εάν αυτό δεν είναι δυνατό, διότι οι συγκεντρώσεις είναι χαμηλότερες από το όριο ποσοτικοποίησης στο δεύτερο δείγμα αποβολής, μπορεί να γίνει συντηρητική εκτίμηση της σταθεράς k_2 (βλ. προσάρτημα 7).

— Οι διακυμάνσεις της κλίσης και της τεταγμένης της καμπύλης υπολογίζονται με τη χρήση τυποποιημένων στατιστικών διαδικασιών και τα διαστήματα εμπιστοσύνης 90 % (ή 95 %) για τα αποτελέσματα αυτά αξιολογούνται και καταγράφονται.

▼M7

— Υπολογίζεται επίσης η μέση μετρηθείσα συγκέντρωση στα ψάρια την τελευταία ημέρα πρόσληψης (μετρηθείσα συγκέντρωση χρόνου 0, $C_{0,m}$) και συγκρίνεται με την παράγωγη τιμή $C_{0,d}$. Σε περίπτωση που η παράγωγη τιμή είναι χαμηλότερη από τη μετρηθείσα, η διαφορά μπορεί να υποδηλώνει την παρουσία άπεπτης εμβολιασμένης τροφής στο πεπτικό σύστημα. Εάν η παράγωγη τιμή είναι πολύ υψηλότερη από τη μετρηθείσα, αυτό μπορεί να αποτελεί ένδειξη ότι η τιμή που προκύπτει από τη γραμμική παλινδρόμηση των δεδομένων αποβολής είναι εσφαλμένη και θα πρέπει να επαναξιολογηθεί (βλ. προσάρτημα 7).

Ρυθμός αποβολής και συντελεστής βιομεγέθυνσης

Για τον υπολογισμό του συντελεστή βιομεγέθυνσης από τα δεδομένα, θα πρέπει να υπολογίζεται πρώτα η απόδοση αφομοίωσης (απορρόφηση της υπό δοκιμή ουσίας στο πεπτικό σύστημα, *α*). Για τον σκοπό αυτό, θα πρέπει να χρησιμοποιείται η εξίσωση Α7.1 του προσαρτήματος 7, που απαιτεί να είναι γνωστές η παράγωγη συγκέντρωση στα ψάρια κατά τον χρόνο 0 της φάσης αποβολής ($C_{0,d}$), η (συνολική) σταθερά ρυθμού αποβολής (k_2), η συγκέντρωση στην τροφή (C_{food}), η σταθερά ρυθμού λήψης τροφής (*I*) και η περίοδος πρόσληψης (*t*). Η κλίση και η τεταγμένη της καμπύλης της γραμμικής σχέσης μεταξύ ln(συγκέντρωση) και χρόνου αποβολής αναφέρονται ως συνολική σταθερά ρυθμού αποβολής (k_2 = κλίση) και συγκέντρωση χρόνου 0 ($C_{0,d} = e^{\text{τεταγμένη}}$), όπως ανωτέρω. Θα πρέπει να ελέγχεται η βιολογική ευλογοφάνεια των παράγωγων τιμών (π.χ. η απόδοση αφομοίωσης, ως κλάσμα, δεν μπορεί να είναι μεγαλύτερη από 1). Η *(I)* υπολογίζεται με διαίρεση της μάζας της τροφής δια της μάζας των ψαριών που σιτίζονται κάθε ημέρα (εάν τους χορηγείται ποσότητα τροφής ίση με το 2 % του σωματικού τους βάρους, η (*I)* θα είναι 0,02). Ωστόσο, ο ρυθμός σίτισης που χρησιμοποιείται στον υπολογισμό μπορεί να χρειάζεται προσαρμογή για να ληφθεί υπόψη η ανάπτυξη των ψαριών (για την προσαρμογή αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί η γνωστή σταθερά ρυθμού ανάπτυξης για να εκτιμηθεί το βάρος των ψαριών σε κάθε χρονικό σημείο κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης· βλ. προσάρτημα 7). Όταν δεν είναι δυνατό να ληφθούν οι τιμές k_2 και $C_{0,d}$ επειδή, για παράδειγμα, οι συγκεντρώσεις είναι κατώτερες από το όριο ανίχνευσης στο δεύτερο δείγμα αποβολής, μπορεί να γίνει συντηρητική εκτίμηση της k_2, και να υπολογιστεί ένας «φραγμένος προς τα άνω» BMF_k (βλ. προσάρτημα 7).

Όταν ληφθεί η απόδοση αφομοίωσης (*α*), μπορεί να υπολογιστεί ο συντελεστής βιομεγέθυνσης με πολλαπλασιασμό της *α* επί τη σταθερά ρυθμού λήψης τροφής (*I*) και διαίρεση του γινομένου δια της (συνολικής) σταθεράς ρυθμού αποβολής (k_2). Ο διορθωμένος ως προς την ανάπτυξη συντελεστής βιομεγέθυνσης υπολογίζεται κατά τον ίδιο τρόπο, αλλά με τη χρήση της διορθωμένης ως προς την ανάπτυξη σταθεράς ρυθμού αποβολής (k_{2g}· βλ. παραγράφους 162 και 163. Μια εναλλακτική εκτίμηση της απόδοσης της αφομοίωσης μπορεί να προκύψει αν πραγματοποιήθηκε ιστολογική ανάλυση σε ψάρια που ελήφθησαν ως δείγματα κατά το αρχικό, γραμμικό στάδιο της φάσης πρόσληψης· βλ. παράγραφο 151 και προσάρτημα 7. Αυτή η τιμή αποτελεί μια ανεξάρτητη εκτίμηση της απόδοσης αφομοίωσης από έναν οργανισμό με ουσιαστικά μηδενική έκθεση (δηλαδή ένα ψάρι κοντά στην έναρξη της φάσης πρόσληψης). Η απόδοση της αφομοίωσης που εκτιμάται από τα δεδομένα αποβολής χρησιμοποιείται συνήθως για τον προσδιορισμό του BMF.

Διόρθωση ως προς τα λιπίδια και την αναπτυξιακή αραίωση

Η ανάπτυξη των ψαριών κατά τη φάση αποβολής μπορεί να μειώσει τις μετρούμενες συγκεντρώσεις χημικών ουσιών στα ψάρια, με αποτέλεσμα η συνολική σταθερά ρυθμού αποβολής, k_2, να είναι μεγαλύτερη από αυτήν που θα προέκυπτε μόνο από διεργασίες απομάκρυνσης (π.χ. μεταβολισμός, απεκκρίσεις) (βλ. παράγραφο 72). Η περιεκτικότητα των ψαριών δοκιμής σε λιπίδια (που είναι στενά συνδεδεμένη με τη βιοσυσσώρευση υδρόφοβων ουσιών) και η περιεκτικότητα των τροφών σε λιπίδια μπορεί να ποικίλλουν αρκετά στην πράξη, σε βαθμό που η διόρθωσή τους να είναι απαραίτητη για την παρουσίαση χρήσιμων συντελεστών βιομεγέθυνσης. Ο συντελεστής βιομεγέθυνσης θα πρέπει να διορθώνεται ως προς την αναπτυξιακή αραίωση (όπως και ο κινητικός BCF στη μέθοδο υδατικής έκθεσης) και ως προς την περιεκτικότητα της τροφής σε λιπίδια σε σχέση με την αντίστοιχη των ψαριών (συντελεστής διόρθωσης ως προς τα λιπίδια). Οι εξισώσεις και παραδείγματα των υπολογισμών αυτών παρατίθενται στα προσαρτήματα 5 και 7 αντίστοιχα.

Για να γίνει διόρθωση ως προς την αναπτυξιακή αραίωση, θα πρέπει να υπολογιστεί η σταθερά ρυθμού αποβολής διορθωμένη ως προς την ανάπτυξη (k_{2g}) (βλ.

▼M7

προσάρτημα 5 για εξισώσεις). Η σταθερά ρυθμού αποβολής διορθωμένη ως προς την ανάπτυξη (k_{2g}) χρησιμοποιείται κατόπιν για τον υπολογισμό του συντελεστή βιομεγέθυνσης, διορθωμένο ως προς την ανάπτυξη, σύμφωνα με την παράγραφο 73. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η προσέγγιση αυτή δεν είναι εφικτή. Μια εναλλακτική προσέγγιση, με την οποία παρακάμπτεται η ανάγκη διόρθωσης ως προς την αναπτυξιακή αραίωση, συνίσταται στη χρήση δεδομένων αποβολής που εκφράζονται σε μάζα της υπό δοκιμή ουσίας ανά ψάρι (για ολόκληρα ψάρια) αντί των συνήθων δεδομένων που εκφράζονται σε μάζα της υπό δοκιμή ουσίας ανά μονάδα μάζας ψαριού (συγκέντρωση). Αυτό μπορεί να επιτευχθεί εύκολα, καθώς οι δοκιμές σύμφωνα με την παρούσα μέθοδο θα πρέπει να συνδέουν τις καταγραφόμενες συγκεντρώσεις ιστών με το βάρος του κάθε ψαριού. Η απλή διαδικασία που εφαρμόζεται για τον σκοπό αυτό περιγράφεται συνοπτικά στο προσάρτημα 5. Επισημαίνεται ότι η k_2 θα πρέπει να υπολογίζεται και να αναφέρεται, ακόμη κι αν χρησιμοποιείται αυτή η εναλλακτική προσέγγιση.

Για να γίνει διόρθωση ως προς την περιεκτικότητα της τροφής και των ψαριών σε λιπίδια, όταν δεν έχει γίνει ανάλυση των λιπιδίων σε όλα τα ψάρια του δείγματος, λαμβάνονται τα μέσα λιπιδικά κλάσματα (κ.β.) στα ψάρια και στην τροφή ([1]). Στη συνέχεια, υπολογίζεται ο συντελεστής διόρθωσης ως προς τα λιπίδια (L_c) με διαίρεση του μέσου λιπιδικού κλάσματος στα ψάρια διά του μέσου λιπιδικού κλάσματος στην τροφή. Ο συντελεστής βιομεγέθυνσης –είτε διορθωμένος ως προς την ανάπτυξη είτε όχι– διαιρείται διά του συντελεστή διόρθωσης ως προς τα λιπίδια για να υπολογιστεί ο διορθωμένος ως προς τα λιπίδια συντελεστής βιομεγέθυνσης.

Εάν διεξάγονται αναλύσεις της χημικής ουσίας και των λιπιδίων στα ίδια ψάρια σε κάθε χρονικό σημείο δειγματοληψίας, τα διορθωμένα ως προς τα λιπίδια δεδομένα ιστών για μεμονωμένα ψάρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον απευθείας υπολογισμό του διορθωμένου ως προς τα λιπίδια BMF [βλ. (37)]. Η γραφική παράσταση των διορθωμένων ως προς τα λιπίδια δεδομένων συγκέντρωσης παρέχει τις τιμές $C_{0,d}$ βάσει των λιπιδίων και k_2. Στη συνέχεια μπορεί να γίνει μαθηματική ανάλυση με τη χρήση των εξισώσεων του προσαρτήματος 7, αλλά η απόδοση αφομοίωσης (a) υπολογίζεται με τη χρήση της κανονικοποιημένης ως προς τα λιπίδια σταθεράς ρυθμού λήψης τροφής (I_{lipid}) και της συγκέντρωσης των λιπιδίων στην τροφή ($C_{food\text{-}lipid}$). Οι διορθωμένες ως προς τα λιπίδια παράμετροι χρησιμοποιούνται στη συνέχεια με παρόμοιο τρόπο για τον υπολογισμό του BMF (σημειωτέον ότι η σταθερά ρυθμού ανάπτυξης θα πρέπει επίσης να εφαρμόζεται στο λιπιδικό κλάσμα και όχι στο νωπό βάρος των ψαριών για τον υπολογισμό του διορθωμένου ως προς τα λιπίδια και την ανάπτυξη BMF_{KgL}).

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Η μέση ανάπτυξη στις ομάδες δοκιμής και στις ομάδες μαρτύρων θα πρέπει, κατ' αρχήν, να μην παρουσιάζει σημαντικές διαφορές, ώστε να αποκλείεται το ενδεχόμενο τοξικών επιδράσεων. Οι σταθερές ρυθμού ανάπτυξης ή οι καμπύλες ανάπτυξης των δύο ομάδων θα πρέπει να συγκρίνονται με κατάλληλη διαδικασία ([2]).

Έκθεση δοκιμής

Μετά τον τερματισμό της μελέτης, συντάσσεται τελική έκθεση που περιέχει τις πληροφορίες σχετικά με την υπό δοκιμή ουσία, το είδος και τις συνθήκες δοκιμής, όπως παρατίθενται στην παράγραφο 81 (όπως και για τη μέθοδο υδατικής έκθεσης). Επιπλέον, απαιτούνται τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή ουσία:

— Κάθε πληροφορία για τη σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας σε παρασκευάσματα τροφής.

([1]) Η προσέγγιση αυτή εφαρμόζεται ειδικά στη διατροφική μελέτη και διαφέρει από τη διαδικασία που ακολουθείται στη μέθοδο της υδατικής έκθεσης και, για τον λόγο αυτόν, χρησιμοποιείται η λέξη «διόρθωση» αντί της «κανονικοποίησης» για να αποφεύγεται η σύγχυση — βλ. επίσης υποσημείωση (34).

([2]) Μπορεί να διενεργηθεί έλεγχος t των σταθερών ρυθμού αύξησης, για να εξακριβωθεί αν υπάρχει διαφορά στην ανάπτυξη μεταξύ των ομάδων δοκιμής και των ομάδων μαρτύρων, ή έλεγχος F σε περίπτωση ανάλυσης διασποράς. Εάν χρειάζεται, μπορεί να διενεργηθεί έλεγχος F ή έλεγχος λόγου πιθανοφανειών για να υποβοηθήσει την επιλογή του κατάλληλου αναπτυξιακού μοντέλου [μονογραφία αριθ. 54 του ΟΟΣΑ (32)].

▼M7

Συνθήκες δοκιμής:

— Ονομαστική συγκέντρωση της ουσίας στην τροφή, τεχνική εμβολιασμού, ποσότητα (λιπιδικού) φορέα που χρησιμοποιείται στη διεργασία εμβολιασμού τροφών (εάν χρησιμοποιείται), μετρήσεις της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στην εμβολιασμένη τροφή για κάθε ανάλυση (τουλάχιστον εις τριπλούν πριν από την έναρξη της μελέτης και στο τέλος της φάσης πρόσληψης) και μέσες τιμές.

— Τύπος και ποιότητα του ελαιώδους φορέα ή διαλύτη (καθαρότητα, προμηθευτής κ.λπ.) που χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό της τροφής, εάν υπάρχει.

— Είδος χρησιμοποιούμενης τροφής (αδρή ανάλυση [1]), βαθμός καθαρότητας ή ποιότητα, προμηθευτής κ.λπ.), ρυθμός σίτισης κατά τη φάση πρόσληψης, ποσότητα χορηγούμενης τροφής και συχνότητα (με τυχόν προσαρμογές με βάση το βάρος των ψαριών του δείγματος).

— Ώρα συλλογής των ψαριών και ευθανασίας για χημική ανάλυση σε κάθε χρονικό σημείο δειγματοληψίας (π.χ. μία ώρα πριν από τη σίτιση της επόμενης ημέρας).

Αποτελέσματα:

— Αποτελέσματα από τυχόν πραγματοποιηθείσα προκαταρκτική μελέτη.

— Πληροφορίες σχετικά με τυχόν παρατηρούμενες δυσμενείς επιδράσεις.

— Πλήρης περιγραφή όλων των χρησιμοποιούμενων διαδικασιών χημικής ανάλυσης, συμπεριλαμβανομένων των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, της μεταβλητότητας και της ανάκτησης.

— Μετρούμενες συγκεντρώσεις λιπιδίων στην τροφή (εμβολιασμένο σιτηρέσιο και σιτηρέσιο μαρτύρων), ατομικές τιμές, μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις.

— Δεδομένα για το βάρος (και το μήκος) κάθε ψαριού σε μορφή πίνακα, τόσο για τις ομάδες μαρτύρων όσο και τις ομάδες έκθεσης (για παράδειγμα, με τη χρήση αποκλειστικών αναγνωριστικών για κάθε ψάρι) και υπολογισμοί, παράγωγη/-ες σταθερά/-ές ρυθμού ανάπτυξης και διάστημα(-τα) εμπιστοσύνης 95 %.

— Δεδομένα σε μορφή πίνακα για τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στα ψάρια, μέση μετρηθείσα συγκέντρωση στο τέλος της φάσης πρόσληψης ($C_{0,m}$) και παράγωγη (συνολική) σταθερά ρυθμού αποβολής (k_2) και συγκέντρωση στα ψάρια κατά την έναρξη της φάσης αποβολής ($C_{0,d}$) με τις διακυμάνσεις αυτών των τιμών (κλίση και τεταγμένη).

— Δεδομένα σε μορφή πίνακα για την περιεκτικότητα των ψαριών σε λιπίδια (αντιστοιχισμένη προς συγκεκριμένες συγκεντρώσεις της ουσίας, όπου χρειάζεται), μέσες τιμές για την ομάδα δοκιμής και την ομάδα μαρτύρων κατά την έναρξη της δοκιμής, στο τέλος της φάσης πρόσληψης και στο τέλος της αποβολής.

— Καμπύλες (με όλα τα μετρηθέντα δεδομένα), που παρουσιάζουν τα ακόλουθα στοιχεία (κατά περίπτωση, οι συγκεντρώσεις μπορεί να εκφράζονται σε σχέση με ολόκληρο το σώμα του ζώου ή με προσδιοριζόμενους ιστούς του):

  — ανάπτυξη [δηλ. βάρος (και μήκος) σε συνάρτηση με τον χρόνο] ή λογαριθμικά μετασχηματισμένο βάρος σε συνάρτηση με τον χρόνο·

[1] Τεχνική ανάλυσης της περιεκτικότητας των τροφών σε πρωτεΐνες, λιπίδια, ολικές διαιτητικές ίνες και τέφρα· οι πληροφορίες αυτές παρέχονται συνήθως από τον προμηθευτή των ζωοτροφών.

▼M7

— αποβολή της υπό δοκιμή ουσίας στα ψάρια· και

— λογαριθμικά μετασχηματισμένη συγκέντρωση [ln(συγκέντρωση)] σε συνάρτηση με τον χρόνο αποβολής (συμπεριλαμβανομένης της παράγωγης σταθεράς ρυθμού αποβολής k_2, και του φυσικού λογαρίθμου της παράγωγης συγκέντρωσης στα ψάρια κατά την έναρξη της φάσης αποβολής, $C_{0,d}$).

— Εάν με οπτική εξέταση ενός διαγράμματος διαπιστωθούν προφανείς έκτοπες τιμές, είναι δυνατό να εφαρμοστεί στατιστικά έγκυρος έλεγχος έκτοπων τιμών για την εξάλειψη των σημείων εσφαλμένων δεδομένων, καθώς και τεκμηριωμένη αιτιολόγηση της απάλειψής τους.

— Υπολογισθείσα σταθερά ρυθμού αποβολής, διορθωμένη ως προς την ανάπτυξη, και χρόνος υποδιπλασιασμού διορθωμένος ως προς την ανάπτυξη.

— Υπολογισθείσα απόδοση αφομοίωσης (α).

— «Ανεπεξέργαστος» διατροφικός συντελεστής βιομεγέθυνσης BMF, κινητικός BMF, διορθωμένος ως προς τα λιπίδια και την ανάπτυξη («ανεπεξέργαστος» και διορθωμένος ως προς τα λιπίδια με βάση το νωπό βάρος ολόκληρων ψαριών), ειδικός για συγκεκριμένους ιστούς BMF, κατά περίπτωση.

— Κάθε πληροφορία σχετικά με μεταβολίτες ραδιοσημασμένων υπό δοκιμή ουσιών και τη συσσώρευσή τους.

— Κάθε ασύνηθες στοιχείο σχετικά με τη δοκιμή, οποιαδήποτε απόκλιση από τις διαδικασίες αυτές και κάθε άλλη σχετική πληροφορία.

— Συνοπτικός πίνακας των μετρούμενων και υπολογιζόμενων δεδομένων, ως ακολούθως:

Σταθερές ρυθμού αποβολής και συντελεστές βιομεγέθυνσης (BMF_K) της ουσίας	
k_g (σταθερά ρυθμού ανάπτυξης· ημέρα^{-1}):	Εγγράφεται η τιμή (95 % CI) [1]
k_2 (συνολική σταθερά ρυθμού αποβολής, ημέρα^{-1}):	Εγγράφεται η τιμή (95 % CI)
k_{2g} (σταθερά ρυθμού αποβολής διορθωμένη ως προς την ανάπτυξη· ημέρα^{-1}):	Εγγράφεται η τιμή (95 % CI) [1]
$C_{0,m}$ (μετρηθείσα συγκέντρωση χρόνου 0, η συγκέντρωση στα ψάρια στο τέλος της πρόσληψης) (μg/g):	Εγγράφεται η τιμή ± SD [2]
$C_{0,d}$ (παράγωγη συγκέντρωση μηδενικού χρόνου της φάσης αποβολής· μg/g):	Εγγράφεται η τιμή ± SD [2]
I (καθορισμένος ρυθμός λήψης τροφής· g τροφής/g ψαριού/ημέρα):	Εγγράφεται η τιμή
I_g (πραγματικός ρυθμός σίτισης, προσαρμοσμένος ως προς την ανάπτυξη· g τροφής/g ψαριών/ημέρα) [2]:	Εγγράφεται η τιμή ± SD [2]
C_{food} (συγκέντρωση της χημικής ουσίας στην τροφή· μg/g):	Εγγράφεται η τιμή ± SD [2]
α (απόδοση αφομοίωσης ουσίας):	Εγγράφεται η τιμή ± SD [2]
BMF_K (κινητικός διατροφικός BMF):	Εγγράφεται η τιμή (95 % CI) [1]
BMF_K (διορθωμένος ως προς την ανάπτυξη κινητικός διατροφικός BMF):	Εγγράφεται η τιμή (95 % CI) [1]

▼**M7**

Σταθερές ρυθμού αποβολής και συντελεστές βιομεγέθυνσης (BMF_K) της ουσίας	
$t_{1/2g}$ (διορθωμένος ως προς την ανάπτυξη χρόνος υποδιπλασιασμού σε ημέρες):	Εγγράφεται η τιμή ± SD ([2])
Lc (συντελεστής λιπιδικής διόρθωσης):	Εγγράφεται η τιμή
BMF_{KgL} (διορθωμένος ως προς τα λιπίδια και την ανάπτυξη κινητικός BMF):	Εγγράφεται η τιμή
$BMF_{SS\text{-}L}$ (ενδεικτικός διορθωμένος ως προς τα λιπίδια BMF σε σταθερή κατάσταση) ([2]):	Εγγράφεται η τιμή ± SD ([2])

([1]) CI: διάστημα εμπιστοσύνης (όταν είναι δυνατός ο υπολογισμός)
([2]) SD: τυπική απόκλιση (όταν είναι δυνατός ο υπολογισμός)

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Κεφάλαιο Γ.13 του παρόντος παραρτήματος: Βιοσυγκέντρωση: Δοκιμή σε ψάρια με συνεχή ροή νερού.

(2) Κεφάλαιο Α.6 του παρόντος παραρτήματος: Υδατοδιαλυτότητα

(3) Li A, Doucette W.J. (1993), The effect of cosolutes on the aqueous solubilities and octanol/water partition coefficients of selected polychlorinated biphenyl congeners. Environ Toxicol Chem 12: 2031-2035

(4) Κεφάλαιο Α.8 του παρόντος παραρτήματος: Συντελεστής κατανομής (n-οκτανόλη/νερό), μέθοδος ανακινούμενης φιάλης.

(5) Κεφάλαιο Α.24 του παρόντος παραρτήματος: *Συντελεστής κατανομής (n-οκτανόλη/νερό), μέθοδος HPLC.*

(6) Κεφάλαιο Α.23 του παρόντος παραρτήματος: *Συντελεστής κατανομής (οκτανόλη-1/νερό), μέθοδος της αργής ανάδευσης.*

(7) Κεφάλαιο Γ.7 του παρόντος παραρτήματος: *Υδρόλυση ως συνάρτηση του pH.*

(8) (OECD (1997), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Number 7: Guidance Document on Direct Phototransformation of Chemicals in Water OCDE/GD(97)21. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

(9) Κεφάλαιο Α.5 του παρόντος παραρτήματος: *Επιφανειακή τάση υδατικών διαλυμάτων.*

(10) Κεφάλαιο Α.4 του παρόντος παραρτήματος: Τάση ατμών.

(11) Κεφάλαιο Γ.4 του παρόντος παραρτήματος: *Άμεση βιοαποικοδομησιμότητα.*

(12) Κεφάλαιο Γ.29 του παρόντος παραρτήματος: *Άμεση βιοαποικοδομησιμότητα — CO_2 σε σφραγισμένα δοχεία*

(13) Connell D.W. (1988), Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102: 117-156.

(14) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. SAR QSAR Environ. Res. 1: 29-39.

(15) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

▼M7

(16) Brown R.S., Akhtar P., Åkerman J., Hampel L., Kozin I.S., Villerius L.A. and Klamer H.J.C. (2001), Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. Environ. Sci. Technol. 35: 4097-4102.

(17) Fernandez J.D., Denny J.S. and Tietge J.E. (1998), A simple apparatus for administering 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to commercially available pelletized fish food. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2058-2062.

(18) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N., Whiteman F.W. and Dawson T.D. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: I. Feeding studies with 2,2′, 5,5′-tetrachlorobiphenyl. Toxicol. Sci. 77: 206-218.

(19) Parkerton T.F., Arnot J.A., Weisbrod A.V., Russom C., Hoke R.A., Woodburn K., Traas T., Bonnell M., Burkhard L.P. and Lampi M.A. (2008), Guidance for evaluating *in vivo* fish bioaccumulation data. Integr. Environ. Assess. Manag. 4: 139-155.

(20) Verbruggen E.M.J., Beek M., Pijnenburg J. and Traas T.P. (2008). Ecotoxicological environmental risk limits for total petroleum hydrocarbons on the basis of internal lipid concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2436-2448.

(21) Schlechtriem C., Fliedner A. and Schäfers C. (2012), Determination of lipid content in fish samples from bioaccumulation studies: Contributions to the revision of OECD Test Guideline 305. Environmental Sciences Europe 2012, 24:13. published: 3 April 2012.

(22) Κεφάλαιο Γ.47 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμή τοξικότητας στα αρχικά στάδια ζωής των ψαριών.

(23) Κεφάλαιο Γ.15 του παρόντος παραρτήματος: *Ψάρια, δοκιμασία βραχυπρόθεσμης τοξικότητας στα έμβρυα και τα λεκιθοφόρα ιχθύδια*

(24) Κεφάλαιο Γ.14 του παρόντος παραρτήματος: *Δοκιμή νεανικής ανάπτυξης ψαριών.*

(25) OECD (2000), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 23: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures ENV/JM/MONO(2000)6. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

(26) US-EPA (1994), Great Lake water quality initiative technical support document for the procedure to determine bioaccumulation factors 822-R-94-002. US EPA, Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC, USA.

(27) US-FDA (1999), Pesticide analytical manual (PAM). Vol.1. US Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA.

(28) US-EPA (1974), Section 5, A (1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson, J.F., Editor. US-EPA, Research Triangle Park, NC, USA

(29) Bligh E.G. and Dyer W.J. (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917.

(30) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A. and Parrish C.C. (1985), Micromethod for lipids in aquatic invertebrates. Limnol. Oceanogr. 30: 1099-1105.

(31) Smedes F. (1999), Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. Analyst. 124: 1711-1718.

(32) OECD (2006), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54: Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. ENV/JM/MONO(2006)18. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

▼**M7**

(33) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271-2280.

(34) Springer T.A. (2009), Statistical Research Related to Update of OECD Guideline 305. Wildlife International, Ltd, Easton, MD, USA.

(35) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1168-1177.

(36) Parkerton T., Letinski D., Febbo E., Davi R., Dzambia C., Connelly M., Christensen K. and Peterson D. (2001), A practical testing approach for assessing bioaccumulation potential of poorly water soluble organic chemicals (presentation). in SETAC Europe 12th Annual Meeting: Madrid, Spain.

(37) Fisk A.T., Cymbalisty C.D., Bergman Ã. and Muir D.C.G. (1996), Dietary accumulation of C_{12}- and C_{16}-chlorinated alkanes by juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environ. Toxicol. Chem. 15: 1775-1782.

(38) Anonymous (2004), Fish, dietary bioaccumulation study — Basic protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

(39) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

(40) Bruggeman W.A., Opperhuizen A., Wijbenga A. and Hutzinger O. (1984), Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish, Toxicol. Environ. Chem. 7: 173-189.

(41) Muir D.C.G., Marshall W.K. and Webster G.R.B. (1985), Bioconcentration of PCDDs by fish: effects of molecular structure and water chemistry. Chemosphere. 14: 829-833.

(42) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environ. Sci. Technol. 23: 699-707.

(43) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N. and Whiteman F.W. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: II. Stimulation of chronic exposure scenarios. Toxicol. Sci. 77: 219-229.

(44) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.

(45) Sijm D.T.H.M. and van der Linde A. (1995), Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffusive mass transfer and allometric relationships. Environ. Sci. Technol. 29: 2769-2777.

(46) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

(47) Fisk A.T., Norstrom R.J., Cymbalisty C.D. and Muir D.G.G. (1998), Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. Environ. Toxicol. Chem. 17: 951-961.

(48) McGrath J.A., Parkerton T.F. and Di Toro D.M. (2004), Application of the narcosis target lipid model to algal toxicity and deriving predicted-no-effect concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 23: 2503-2517.

(49) Poppendieck D.G. (2002), Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Desorption Mechanisms from Manufactured Gas Plant Site Samples. Dissertation. Department of Civil, Architectural and Environmental Engineering, University of Texas, Austin, TX, USA.

▼**M7**

(50) McCarty L.S. and Mackay D. (1993), Enhancing ecotoxicological modelling and assessment: body residues and modes of toxic action. Environ. Sci. Technol. 27: 1718-1728.

(51) OECD (2012), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 175: Part I — Validation Report of a ring test for the OECD TG 305 dietary exposure bioaccumulation fish test. Part II — Additional Report including comparative analysis of trout and carp results ENV/JM/MONO(2012)20. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

▼M7

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Η απόδοση αφομοίωσης (*α*) είναι μέτρο της σχετικής ποσότητας της ουσίας που απορροφάται μέσω του πεπτικού συστήματος από τον οργανισμό (η *α* είναι αδιάστατο μέγεθος, αλλά συχνά εκφράζεται ως ποσοστό αντί κλάσματος).

Η βιοσυσσώρευση αναφέρεται γενικά ως διεργασία στο πλαίσιο της οποίας η συγκέντρωση της ουσίας σε έναν οργανισμό φθάνει σε επίπεδο που υπερβαίνει το επίπεδο στο αναπνευστικό μέσο (π.χ. νερό για ψάρια ή αέρας για θηλαστικά), στην τροφή, ή και στα δύο (1).

Η βιοσυγκέντρωση είναι η αύξηση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας επάνω ή μέσα σε έναν οργανισμό (ή συγκεκριμένους ιστούς του) σε σχέση με τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο περιβάλλον μέσο.

Ο συντελεστής βιοσυγκέντρωσης (BCF ή K_B) σε οποιαδήποτε στιγμή κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης αυτής της δοκιμής συσσώρευσης είναι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας εντός/επί των ψαριών ή σε συγκεκριμένους ιστούς τους (C_f ως mg/kg) διαιρούμενος δια της συγκέντρωσης της χημικής ουσίας στο περιβάλλον μέσο (C_w ως mg/l). Ο BCF εκφράζεται σε $l \cdot kg^{-1}$. Επισημαίνεται ότι οι διορθώσεις ως προς την ανάπτυξη και/ή την περιεκτικότητα σε λιπίδια δεν λαμβάνονται υπόψη.

Η βιομεγέθυνση είναι η αύξηση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας εντός ή επί ενός οργανισμού (ή σε συγκεκριμένους ιστούς του) σε σχέση με τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στην τροφή.

Ο συντελεστής βιομεγέθυνσης (BMF) είναι η συγκέντρωση μιας ουσίας σε έναν θηρευτή σε σχέση με τη συγκέντρωση στη λεία του θηρευτή (ή την τροφή) σε σταθερή κατάσταση. Στη μέθοδο που περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, η έκθεση μέσω της υδατικής φάσης αποφεύγεται προσεκτικά και, συνεπώς, μια τιμή BMF από την παρούσα μέθοδο δοκιμών δεν μπορεί να συγκριθεί ευθέως με μια τιμή BMF από επιτόπια μελέτη (στην οποία μπορούν να συνδυάζονται η υδατική με τη διατροφική έκθεση).

Ο συντελεστής διατροφικής βιομεγέθυνσης (διατροφικός BMF) είναι ο όρος που χρησιμοποιείται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών για να περιγράψει το αποτέλεσμα της δοκιμής διατροφικής έκθεσης, στην οποία αποφεύγεται επιμελώς η έκθεση μέσω της υδατικής φάσης και, συνεπώς, ο διατροφικός BMF από την παρούσα μέθοδο δοκιμών δεν μπορεί να συγκριθεί ευθέως με μια τιμή BMF από επιτόπια μελέτη (στην οποία μπορούν να συνδυάζονται η υδατική με τη διατροφική έκθεση).

Η φάση αποβολής ή μετά την έκθεση (απώλειας) είναι το χρονικό διάστημα κατά το οποίο, έπειτα από τη μεταφορά των υπό δοκιμή ψαριών από ένα μέσο που περιέχει την υπό δοκιμή ουσία σε μέσο απαλλαγμένο από την ουσία αυτή, μελετάται η αποβολή (ή η καθαρή απώλεια) της ουσίας από τα υπό δοκιμή ψάρια (ή τους συγκεκριμένους ιστούς τους).

Η σταθερά ρυθμού αποβολής (απώλειας) (k_2) είναι η αριθμητική τιμή που ορίζει τον ρυθμό της μείωσης της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στα υπό δοκιμή ψάρια (ή σε συγκεκριμένους ιστούς τους) μετά τη μεταφορά των υπό δοκιμή ψαριών από μέσο που περιέχει την υπό δοκιμή ουσία σε μέσο απαλλαγμένο από την ουσία αυτή (η (k_2 εκφράζεται σε τιμές ανά ημέρα).

Ο διαλυμένος οργανικός άνθρακας (DOC) είναι ένα μέτρο της συγκέντρωσης άνθρακα που προέρχεται από πηγές διαλυμένου οργανικού άνθρακα στα θρεπτικά μέσα δοκιμής.

Η φάση έκθεσης ή πρόσληψης είναι ο χρόνος κατά τη διάρκεια του οποίου τα ψάρια εκτίθενται στην υπό δοκιμή ουσία.

Ο ρυθμός λήψης τροφής (*I*) είναι η μέση ποσότητα τροφής που καταναλώνει το κάθε ψάρι κάθε ημέρα, σε σχέση με το εκτιμώμενο μέσο βάρος ολόκληρων ψαριών (εκφραζόμενη σε g τροφής/g ψαριών/ημέρα).

▼M7

Ο κινητικός συντελεστής βιοσυγκέντρωσης (BCF_K) είναι ο λόγος της σταθεράς ρυθμού πρόσληψης, k_1, προς τη σταθερά ρυθμού αποβολής, k_2 (δηλ. k_1/k_2 — βλ. αντίστοιχους ορισμούς στο παρόν προσάρτημα). Κατ' αρχήν, η τιμή θα πρέπει να είναι συγκρίσιμη με τον BCF_{SS} (βλ. ορισμό ανωτέρω), αλλά ενδέχεται να παρατηρηθούν αποκλίσεις εάν η σταθερή κατάσταση ήταν αβέβαιη ή εάν διορθώσεις ως προς την ανάπτυξη έχουν εφαρμοστεί στον κινητικό BCF.

Ο κανονικοποιημένος ως προς τα λιπίδια κινητικός συντελεστής βιοσυγκέντρωσης (BCF_{KL}) είναι κανονικοποιημένος σε ψάρια με 5 % περιεκτικότητα σε λιπίδια.

Ο κανονικοποιημένος ως προς τα λιπίδια, διορθωμένος ως προς την ανάπτυξη κινητικός συντελεστής βιοσυγκέντρωσης (BCF_{KgL}) κανονικοποιείται σε ψάρια με περιεκτικότητα σε λιπίδια 5 % και διορθώνεται ως προς την ανάπτυξη κατά τη διάρκεια της μελέτης, όπως περιγράφεται στο προσάρτημα 5.

Ο κανονικοποιημένος ως προς τα λιπίδια συντελεστής βιοσυγκέντρωσης σε σταθερή κατάσταση (BCF_{SSL}) κανονικοποιείται σε ψάρια με περιεκτικότητα σε λιπίδια 5 %.

Μια πολυσυστατική ουσία ορίζεται για τους σκοπούς του κανονισμού REACH ως ουσία που έχει περισσότερα από ένα κύρια συστατικά σε συγκέντρωση μεταξύ 10 % και 80 % (κ.β.).

Ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης- νερού (K_{OW}) είναι ο λόγος της διαλυτότητας μίας χημικής ουσίας σε *n*-οκτανόλη και σε νερό σε κατάσταση ισορροπίας [μέθοδοι A.8 (2), A.24 (3), A.23 (4)]· συμβολίζεται επίσης ως P_{OW}. Ο λογάριθμος του K_{OW} χρησιμοποιείται ως ένδειξη του δυναμικού βιοσυγκέντρωσης μίας ουσίας σε υδρόβιους οργανισμούς.

Ο οργανικός άνθρακας σε σωματίδια (POC) είναι μέτρο της συγκέντρωσης άνθρακα που προέρχεται από πηγές αιωρούμενης οργανικής ύλης στα θρεπτικά μέσα δοκιμής.

Η μικροεκχύλιση σε στερεή φάση (SPME) είναι αναλυτική τεχνική χωρίς διαλύτες που αναπτύχθηκε για συστήματα αραίωσης. Στην παρούσα μέθοδο, μια ίνα με επικάλυψη πολυμερούς εκτίθεται στην αέρια ή την υγρή φάση που περιέχει την αναλυτέα ουσία προς προσδιορισμό. Γενικά, επιβάλλεται ελάχιστος χρόνος ανάλυσης, έτσι ώστε να δημιουργούνται συνθήκες ισορροπίας μεταξύ της στερεάς και υγρής φάσης, σε σχέση με τη μετρούμενη ουσία. Στη συνέχεια, η συγκέντρωση της υπό εξέταση αναλυτέας ουσίας μπορεί να προσδιοριστεί απευθείας από την ίνα ή μετά την εκχύλισή της από την ίνα σε διαλύτη, ανάλογα με την τεχνική προσδιορισμού.

Σταθερή κατάσταση στο διάγραμμα της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στα ψάρια (C_f) σε συνάρτηση με τον χρόνο επιτυγχάνεται όταν η καμπύλη καθίσταται παράλληλη με τον άξονα του χρόνου και τρεις διαδοχικές αναλύσεις της C_f σε δείγματα που λαμβάνονται ανά διαστήματα τουλάχιστον δύο ημερών περικλείονται εντός εύρους ± 20 % και δεν υπάρχει σημαντική αύξηση της C_f στον χρόνο μεταξύ της πρώτης και της τελευταίας διαδοχικής ανάλυσης. Όταν αναλύονται συγκεντρωτικά δείγματα, απαιτούνται τουλάχιστον τέσσερις διαδοχικές αναλύσεις. Όταν οι υπό δοκιμή ουσίες προσλαμβάνονται με αργό ρυθμό, ενδείκνυνται περισσότερο τα μεσοδιαστήματα επτά ημερών.

Ο συντελεστής βιοσυγκέντρωσης σε σταθερή κατάσταση (BCF_{SS}) δεν αλλάζει σημαντικά για μία παρατεταμένη περίοδο, ενώ ταυτόχρονα η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο περιβάλλον μέσον είναι σταθερή κατά τη διάρκεια αυτής της χρονικής περιόδου (βλ. ορισμό της σταθερής κατάστασης).

Ο ολικός οργανικός άνθρακας (TOC) είναι ένα μέτρο της συγκέντρωσης άνθρακα που προέρχεται από όλες τις πηγές οργανικών υλών στα θρεπτικά μέσα δοκιμής, περιλαμβανομένων των πηγών σε σωματιδιακή και σε διαλυμένη μορφή.

Η σταθερά ρυθμού πρόσληψης (k_1) είναι η αριθμητική τιμή που ορίζει τον ρυθμό αύξησης της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας εντός/επί των υπό δοκιμή ψαριών (ή σε συγκεκριμένους ιστούς τους), όταν τα ψάρια εκτίθενται στην εν λόγω ουσία (η k_1 εκφράζεται σε $l\ kg^{-1}$ ημέρα^{-1}).

Ουσίες άγνωστης ή μεταβλητής σύνθεσης, πολύπλοκα προϊόντα αντιδράσεων και βιολογικά υλικά είναι γνωστά ως UVCB.

▼**M7**

Ένα χημικό προϊόν είναι μια ουσία ή ένα μείγμα.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.

(2) Κεφάλαιο Α.8 του παρόντος παραρτήματος, *Συντελεστής κατανομής (n-οκτανόλη/νερό): Μέθοδος ανακινούμενης φιάλης*

(3) Κεφάλαιο Α.24 του παρόντος παραρτήματος, *Συντελεστής κατανομής (n-οκτανόλη/νερό), Μέθοδος HPLC*.

(4) Κεφάλαιο Α.23 του παρόντος παραρτήματος, *Συντελεστής κατανομής (1-οκτανόλη/νερό): μέθοδος της αργής ανάδευσης*.

▼M7

Προσάρτημα 2

ΟΡΙΣΜΕΝΑ ΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΟΣ ΑΠΟΔΕΚΤΟΥ ΝΕΡΟΥ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

Συστατικό	Οριακή συγκέντρωση
Σωματίδια	5 mg/l
Ολικός οργανικός άνθρακας	2 mg/l
Μη ιοντισμένη αμμωνία	1 μg/l
Υπολείμματα χλωρίου	10 μg/l
Ολικά οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα	50 ng/l
Ολικά οργανοχλωριούχα γεωργικά φάρμακα συν πολυχλωριωμένα διφαινύλια	50 ng/l
Ολικό οργανικό χλώριο	25 ng/l
Αργίλιο	1 μg/l
Αρσενικό	1 μg/l
Χρώμιο	1 μg/l
Κοβάλτιο	1 μg/l
Χαλκός	1 μg/l
Σίδηρος	1 μg/l
Μόλυβδος	1 μg/l
Νικέλιο	1 μg/l
Ψευδάργυρος	1 μg/l
Κάδμιο	100 ng/l
Υδράργυρος	100 ng/l
Άργυρος	100 ng/l

▼M7

Προσάρτημα 3

ΕΙΔΗ ΨΑΡΙΩΝ ΠΟΥ ΣΥΝΙΣΤΩΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗ ΔΟΚΙΜΗ

Συνιστώμενο είδος	Συνιστώμενη περιοχή θερμοκρασίας δοκιμής (°C)	Συνιστώμενο ολικό μήκος των υπό δοκιμή ψαριών (cm) [2]
Danio rerio [1] (Teleostei, Cyprinidae) Ζεβρόψαρο (Hamilton-Buchanan)	20 - 25	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Χοντροκέφαλος φοξίνος	20 - 25	5,0 ± 2,0
Carassius carassius (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Κυπρίνος	20 - 25	8,0 ± 4,0 [3]
Oryzias latipes (Teleostei, Poecilliidae) (Temminck and Schlegel) Ρυζόψαρο	20 - 25	4,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Λεβιστής	20 - 25	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei Centrarchidae) (Rafinesque) Γαλαζολιόψαρο	20 - 25	5,0 ± 2,0
Oncorhynchus mykiss (Teleostei Salmonidae) (Walbaum) Ιριδίζουσα πέστροφα	13 - 17	8,0 ± 4,0
Gasterosteus aculeatus (Teleostei, (Gasterosteidae) (Linnaeus) Τριάκανθος γαστερόστεος	18 - 20	3,0 ± 1,0

[1] Meyer *et al.* (1)

[2] Πρέπει να επισημανθεί ότι σε αυτή τη δοκιμή καθαυτή, το βάρος είναι το προτιμώμενο μέτρο για τον υπολογισμό του μεγέθους και της σταθεράς ρυθμού ανάπτυξης. Αναγνωρίζεται, ωστόσο, ότι το μήκος αποτελεί πιο πρακτικό μέτρο, εάν τα ψάρια πρέπει να επιλέγονται μακροσκοπικά κατά την έναρξη του πειράματος (δηλ. από τον αρχικό πληθυσμό).

[3] Αυτό το εύρος τιμών μήκους αναφέρεται στις μεθόδους δοκιμών για νέες χημικές ουσίες με βάση τον ιαπωνικό νόμο για τον έλεγχο των χημικών ουσιών (CSCL).

Διάφορα είδη που διαβιούν στις εκβολές ποταμών ή θαλάσσια είδη χρησιμοποιούνται λιγότερο, για παράδειγμα:

Κηλιδόψαρο (λειόστομος) (*Leiostomus xanthurus*)

Πολύχρωμη τοίμα (*Cyprinodon variegatus*)

Πλευρασημόψαρο (*Menidia beryllina*)

Πέρκα (*Cymatogaster aggregata*)

Αγγλική γλώσσα (*Parophrys vetulus*)

Ελαφόκερος καλλιώνυμος (*Leptocottus armatus*)

Τριάκανθος γαστερόστεος (*Gasterosteus aculeatus*)

Λαυράκι (*Dicentracus labrax*)

Σίρκο (*Alburnus alburnus*)

▼**M7**

Τα ψάρια των γλυκών νερών που παρατίθενται στον παραπάνω πίνακα είναι εύκολο να εκτραφούν ή/και βρίσκονται εύκολα καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου, ενώ τα θαλασσινά είδη και τα είδη που διαβιούν στις εκβολές ποταμών περιορίζονται εν μέρει στις αντίστοιχες χώρες. Μπορούν να εκτραφούν και να καλλιεργηθούν είτε σε ιχθυοτροφεία είτε στο εργαστήριο, υπό ελεγχόμενες από πλευράς ασθενειών και παρασίτων συνθήκες, έτσι ώστε τα υπό δοκιμή ζώα να είναι υγιή και γνωστής καταγωγής. Τα ψάρια αυτά βρίσκονται σε πολλά μέρη του κόσμου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Meyer A., Biermann C.H. and Orti G. (1993), The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: An invitation to the comparative method Proc. R. Soc. Lond. B. 252: 231-236.

▼M7

Προσάρτημα 4

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΓΙΑ ΤΙΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΥΔΑΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗΣ ΕΚΘΕΣΗΣ

1. **Θεωρητικό παράδειγμα προγράμματος δειγματοληψίας για μια πλήρη δοκιμή βιοσυγκέντρωσης με υδατική έκθεση μιας ουσίας με log K_{OW} = 4.**

Δειγματοληψία ψαριών	Πρόγραμμα δειγματοληψιών		Αριθμός δειγμάτων νερού ([1])	Αριθμός ψαριών ανά δείγμα ([1])
	Ελάχιστη απαιτούμενη συχνότητα (ημέρες) ([2])	Πρόσθετη δειγματοληψία (ημέρες) ([2])		
Φάση πρόσληψης				
1	-1		2 ([3])	4 ([4])
	0		(2)	(3 ([6]))
2	0,3		2	4
		0,4	(2)	(4)
3	0,6		2	4
		0,9	(2)	(4)
4	1,2		2	4
		1,7	(2)	(4)
5	2,4		2	4
		3,3	(2)	(4)
6	4,7		2	4 - 8 ([5])
				(3 ([6]))
Φάση αποβολής				Μεταφορά ψαριών σε νερό χωρίς την υπό δοκιμή ουσία
7	5,0		2	4
		5,3		(4)
8	5,9		2	4
		7,0		(4)
9	9,3		2	4
		11,2		(4)
10	14,0		2	4 - 8 ([5])
		17,5		(4+3 ([6]))
ΣΥΝΟΛΟ				40 - 72 (48 - 80) ([5])

([1]) Οι τιμές σε παρενθέσεις είναι αριθμοί δειγμάτων (νερού, ψαριών) που πρέπει να λαμβάνονται, εάν πρόκειται να διενεργηθεί πρόσθετη δειγματοληψία.

([2]) Η εκτίμηση πριν από τη δοκιμή της k_2 για log K_{OW} 4,0 είναι 0,652 ημέρες^{-1}. Η συνολική διάρκεια του πειράματος ορίζεται σε 3 × t_{SS} = 3 × 4,6 ημέρες, δηλ. 14 ημέρες. Για την εκτίμηση της t_{SS} βλ. προσάρτημα 5.

([3]) Δειγματοληψία νερού μετά από παροχή νερού όγκου τουλάχιστον τριών θαλάμων.

([4]) Τα ψάρια αυτά μπορούν να λαμβάνονται από τον αποθεματικό πληθυσμό.

([5]) Εάν πρέπει να διεξαχθούν ακριβέστερος προσδιορισμός ή μελέτες μεταβολισμού που απαιτούν περισσότερα ψάρια, αυτά θα πρέπει να υποβάλλονται σε δειγματοληψία, ιδίως στο τέλος των φάσεων πρόσληψης και αποβολής (βλ. παράγραφο 40).

([6]) Ενδέχεται να απαιτούνται τουλάχιστον 3 επιπλέον ψάρια για την ανάλυση της περιεκτικότητας σε λιπίδια, εάν δεν είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί το ίδιο δείγμα στο οποίο μετρούνται οι συγκεντρώσεις της ουσίας, κατά την έναρξη της δοκιμής, στο τέλος της φάσης πρόσληψης και στο τέλος της φάσης αποβολής. Σημείωση: σε πολλές περιπτώσεις, θα πρέπει να είναι εφικτή η χρήση τριών ψαριών-μαρτύρων μόνο (βλ. παράγραφο 56).

▼M7

2. **Θεωρητικό παράδειγμα προγράμματος δειγματοληψίας για δοκιμή βιοσυσσώρευσης με διατροφική έκθεση στην ουσία μετά από φάση πρόσληψης 10 ημερών και φάση αποβολής 42 ημερών.**

Δειγματοληψία	Πρόγραμμα δειγματοληψιών		Αριθ. δειγμάτων τροφίμων	Αριθμός ψαριών ανά δείγμα	
	Ημέρα της φάσης	Πρόσθετα δείγματα ψαριών;		Ομάδα δοκιμής	Ομάδα μαρτύρων
Φάση πρόσληψης					
1	0	Πιθανόν (1) (2)	3 — ομάδα δοκιμής	0	5 – 10
			3 — ομάδα μαρτύρων (1)		(8 - 13) (2)
1A (3)	1-3			5 - 10	5 - 10
2	10	Ναι (4)	3 — ομάδα δοκιμής	10 - 15 (4)	5 – 10
			3 — ομάδα μαρτύρων (1)	(13 - 18) (5)	(8 - 13) (5)
Φάση αποβολής					
3	1	Ναι (4)		10 - 15 (4)	5 - 10
4	2			5 - 10	5 - 10
5	4			5 - 10	5 - 10
6	7	Ναι (4)		10 - 15 (4)	5 - 10
7	14			5 - 10	5 - 10
8	28			5 - 10	5 - 10
9	42	Ναι (4)		10 - 15 (4) (13 - 18) (5)	5 - 10 (8 - 13) (5)
ΣΥΝΟΛΟ				59 - 120 (63 - 126) (4) (5)	50 - 110 (56 - 116) (4) (5)

(1) 3 δείγματα ιχθυοτροφής τόσο από την ομάδα μαρτύρων όσο και από την ομάδα δοκιμής αναλύονται για να μετρηθούν οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας και η περιεκτικότητα σε λιπίδια.

(2) Λαμβάνονται δείγματα ψαριών από τον αποθεματικό πληθυσμό σε όσο το δυνατόν πλησιέστερο χρόνο προς την έναρξη της μελέτης· τουλάχιστον 3 ψάρια από τον αποθεματικό πληθυσμό κατά την έναρξη της δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται στο δείγμα για την περιεκτικότητα σε λιπίδια.

(3) Μια (προαιρετική) δειγματοληψία κοντά στην έναρξη της φάσης πρόσληψης παρέχει στοιχεία για τον υπολογισμό της διατροφικής αφομοίωσης της υπό δοκιμή ουσίας που μπορεί να συγκριθεί με την απόδοση της αφομοίωσης που υπολογίζεται με βάση τα δεδομένα της φάσης αποβολής.

(4) Μπορούν να ληφθούν ως δείγματα 5 επιπλέον ψάρια για ειδική ιστολογική ανάλυση.

(5) Ενδέχεται να απαιτούνται τουλάχιστον 3 επιπλέον ψάρια για την ανάλυση της περιεκτικότητας σε λιπίδια, εάν δεν είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί το ίδιο δείγμα στο οποίο μετρούνται οι συγκεντρώσεις της ουσίας κατά την έναρξη της δοκιμής, στο τέλος της φάσης πρόσληψης και στο τέλος της φάσης αποβολής. Σημείωση: σε πολλές περιπτώσεις, θα πρέπει να είναι εφικτή η χρήση τριών ψαριών-μαρτύρων μόνο (βλ. παραγράφους 56 και 153).

Σημείωση σχετικά με τη φάση και τα χρονοδιαγράμματα δειγματοληψίας: Η φάση της πρόσληψης ξεκινά με την πρώτη χρήση της εμβολιασμένης τροφής. Μία πειραματική ημέρα διαρκεί από τη στιγμή της σίτισης μέχρι λίγο πριν την ώρα της επόμενης σίτισης, 24 ώρες αργότερα. Η πρώτη δειγματοληψία (1 στον πίνακα) θα πρέπει να λαμβάνεται λίγο πριν από την πρώτη (π.χ. μία ώρα). Η δειγματοληψία κατά τη διάρκεια μιας μελέτης θα πρέπει, στην ιδανική περίπτωση, να διεξάγεται λίγο πριν από τη σίτιση της επόμενης ημέρας (δηλ. περίπου 23 ώρες μετά από τη σίτιση την ημέρα της δειγματοληψίας). Η φάση της πρόσληψης λήγει λίγο πριν από την πρώτη σίτιση με μη εμβολιασμένη τροφή, όταν αρχίζει η φάση αποβολής (τα ψάρια της ομάδας δοκιμής πιθανότατα θα αφομοιώνουν ακόμη την εμβολιασμένη τροφή κατά το ενδιάμεσο διάστημα των 24 ωρών μετά την τελευταία σίτιση με την εμβολιασμένη τροφή). Αυτό σημαίνει ότι το δείγμα για το τέλος της πρόσληψης θα πρέπει να λαμβάνεται λίγο πριν από την πρώτη σίτιση με μη εμβολιασμένη τροφή και το πρώτο δείγμα της φάσης αποβολής θα πρέπει να λαμβάνεται περίπου 23 ώρες μετά την πρώτη σίτιση με μη εμβολιασμένη τροφή.

▼M7

Προσάρτημα 5

ΓΕΝΙΚΟΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

1. Εισαγωγή

2. Πρόβλεψη της διάρκειας της φάσης πρόσληψης

3. Πρόβλεψη της διάρκειας της φάσης αποβολής

4. Μέθοδος διαδοχικών δοκιμών: προσδιορισμός της σταθεράς ρυθμού αποβολής (απώλειας) k_2

5. Μέθοδος διαδοχικών δοκιμών: προσδιορισμός *της* σταθεράς ρυθμού πρόσληψης k1 (μέθοδος υδατικής έκθεσης μόνο)

6. Ταυτόχρονη μέθοδος για τον υπολογισμό των σταθερών ρυθμού πρόσληψης και αποβολής (απώλειας) (μέθοδος υδατικής έκθεσης μόνο)

7. Διόρθωση της αναπτυξιακής αραίωσης για τον κινητικό BCF και τον BMF

8. Κανονικοποίηση των λιπιδίων σε περιεκτικότητα 5 % σε λιπίδια (μέθοδος υδατικής έκθεσης μόνο)

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το γενικό μοντέλο υδατικής βιοσυσσώρευσης σε ιχθύες μπορεί να περιγραφεί από την άποψη των διεργασιών πρόσληψης και απώλειας, αγνοώντας την πρόσληψη με την τροφή. Η διαφορική εξίσωση (dC_f/dt) που περιγράφει τον ρυθμό μεταβολής της συγκέντρωσης στα ψάρια ($mg \cdot kg^{-1} \cdot ημέρα^{-1}$) δίδεται από την εξίσωση (1):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \times C_w - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \qquad \text{[Εξίσωση 5.1]}$$

όπου:

k_1 = Σταθερά ρυθμού πρώτης τάξης για την πρόσληψη στα ψάρια ($l \cdot kg^{-1} \cdot ημέρα^{-1}$).

k_2 = ταθερά ρυθμού πρώτης τάξης για αποβολή από τα ψάρια ($ημέρα^{-1}$).

k_g = Σταθερά ρυθμού πρώτης τάξης για την ανάπτυξη των ψαριών («αναπτυξιακή αραίωση») ($ημέρα^{-1}$).

k_m = Σταθερά ρυθμού πρώτης τάξης για τον μεταβολικό μετασχηματισμό ($ημέρα^{-1}$).

k_e = Σταθερά ρυθμού πρώτης τάξης για αποβολή απεκκριμάτων ($ημέρα^{-1}$).

C_w = Συγκέντρωση στο νερό ($mg \cdot l^{-1}$).

C_f = Συγκέντρωση στα ψάρια ($mg \cdot kg^{-1}$ καθαρού βάρους)

Για βιοσυσσωρεύσιμες ουσίες, μπορεί να αναμένεται ότι η χρονικά σταθμισμένη μέση τιμή (TWA) είναι η καταλληλότερη συγκέντρωση έκθεσης στο νερό (C_w) εντός των επιτρεπόμενων ορίων διακύμανσης (βλ. παράγραφο 24). Συνιστάται να υπολογίζεται μια TWA συγκέντρωσης στο νερό σύμφωνα με τη διαδικασία που ορίζεται στο προσάρτημα 6 της μεθόδου δοκιμών Γ.20 (2). Θα πρέπει να επισημανθεί ότι ο λογαριθμικός μετασχηματισμός της συγκέντρωσης στο νερό είναι κατάλληλος όταν αναμένεται εκθετική πορεία μείωσης μεταξύ των περιόδων ανανέωσης, π.χ. σχεδιασμός ημιστατικής δοκιμής. Σε ένα σύστημα συνεχούς ροής, μπορεί να μην είναι αναγκαίος ο λογαριθμικός μετασχηματισμός των συγκεντρώσεων έκθεσης. Εάν παράγονται τιμές TWA συγκεντρώσεων νερού, αυτές θα πρέπει να αναφέρονται και να χρησιμοποιούνται σε μετέπειτα υπολογισμούς.

Σε μια τυποποιημένη δοκιμή BCF σε ψάρια, η πρόσληψη και αποβολή μπορεί να περιγραφούν σε σχέση με δύο κινητικές διεργασίες πρώτης τάξης.

▼M7

Ρυθμός πρόσληψης = $k_1 \times C_w$ [Εξίσωση A5.2]

Ολικός ρυθμός απώλειας = $(k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f$ [Εξίσωση A5.3]

Σε σταθερή κατάσταση, με την παραδοχή ότι η ανάπτυξη και ο μεταβολισμός είναι αμελητέα (δηλ. οι τιμές της k_g και της k_m δεν μπορούν να διακριθούν από το μηδέν), ο ρυθμός πρόσληψης ισοδυναμεί με τον ρυθμό αποβολής και, συνεπώς, ο συνδυασμός της εξίσωσης A5.2 με την εξίσωση A5.3 παράγει την ακόλουθη σχέση:

$$BCF = \frac{C_{f-SS}}{C_{w-SS}} = \frac{k_1}{k_2} \quad \text{[Εξίσωση A5.4]}$$

όπου:

$C_{f\text{-}SS}$ = Συγκέντρωση στα ψάρια σε σταθερή κατάσταση (mg kg^{-1} νωπού βάρους).

$C_{w\text{-}SS}$ = Συγκέντρωση στο νερό σε σταθερή κατάσταση (mg l^{-1}).

Ο λόγος k_1/k_2 είναι γνωστός ως κινητικός BCF (BCF_K) και θα πρέπει να ισούται με τον BCF σε σταθερή κατάσταση (BCF_{SS}) που λαμβάνεται από τον λόγο της συγκέντρωσης σε σταθερή κατάσταση στα ψάρια προς τη συγκέντρωση στο νερό, αλλά ενδέχεται να υπάρξουν αποκλίσεις, εάν η σταθερή κατάσταση ήταν αβέβαιη ή εάν οι διορθώσεις για την ανάπτυξη έχουν εφαρμοστεί στον κινητικό BCF. Επειδή, ωστόσο, η k_1 και η k_2 είναι σταθερές, δεν είναι απαραίτητο να επιτευχθεί σταθερή κατάσταση για να ληφθεί ένας BCF_K.

Με βάση αυτές τις εξισώσεις πρώτης τάξης, το παρόν προσάρτημα 5 περιλαμβάνει τους γενικούς υπολογισμούς που είναι αναγκαίοι για τις μεθόδους βιοσυσσώρευσης τόσο με υδατική και όσο και με διατροφική έκθεση. Ωστόσο, τα τμήματα 5, 6 και 8 αφορούν μόνο τη μέθοδο της υδατικής έκθεσης, αλλά περιλαμβάνονται εδώ, διότι αποτελούν «γενικές» τεχνικές. Οι μέθοδοι διαδοχικών (τμήματα 4 και 5) και ταυτόχρονων (τμήμα 6) δοκιμών επιτρέπουν τον υπολογισμό των σταθερών πρόσληψης και αποβολής που χρησιμοποιούνται για τη λήψη του κινητικού BCF. Η μέθοδος διαδοχικών δοκιμών για τον προσδιορισμό της k_2 (τμήμα 4) είναι σημαντική για τη μέθοδο της διατροφικής έκθεσης, διότι είναι αναγκαία για τον υπολογισμό τόσο της απόδοσης αφομοίωσης όσο και του BMF. Το προσάρτημα 7 περιγράφει τους υπολογισμούς που αφορούν ειδικά τη διατροφική μέθοδο.

2. ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΤΗΣ ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ ΤΗΣ ΦΑΣΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ

Πριν από την εκτέλεση της δοκιμής, μπορεί να εκτιμηθεί η k_2 και, ως εκ τούτου, κάποιο ποσοστό του χρόνου που απαιτείται για την επίτευξη σταθερής κατάστασης από την εμπειρική σχέση μεταξύ της k_2 και του συντελεστή κατανομής *n*-οκτανόλη/νερό (K_{OW}) ή της k_1 και του BCF. Πρέπει, ωστόσο, να γίνει κατανοητό ότι οι εξισώσεις του παρόντος τμήματος εφαρμόζονται μόνο όταν η πρόσληψη και η αποβολή ακολουθούν κινητική πρώτης τάξης. Εάν είναι σαφές ότι αυτό δεν συμβαίνει, συνιστάται να ζητηθεί η γνώμη ειδικού βιοστατιστικολόγου και/ή ειδικού στη φαρμακοκινητική, εάν ζητούνται προβλέψεις της φάσης πρόσληψης.

Μία εκτίμηση της k_2 (ημέρα^{-1}) μπορεί να ληφθεί με διάφορες μεθόδους. Για παράδειγμα, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε πρώτο στάδιο οι ακόλουθες εμπειρικές σχέσεις ([1]):

$\log k_2 = 1{,}47 - 0{,}414 \log K_{OW}$ ($r^2 = 0{,}95$) [(3); Εξίσωση A5.5]

ή

$$k_2 = \frac{k_1}{BCF} \quad \text{[Εξίσωση A5.6]}$$

Όπου $k_1 = 520 \times W^{-0{,}32}$ (για ουσίες με $\log K_{OW} > 3$) ($r^2 = 0{,}85$) [(4)· [Εξίσωση A5.7]

([1]) Όπως συμβαίνει με κάθε εμπειρική σχέση, θα πρέπει να εξακριβώνεται ότι η υπό δοκιμή ουσία εμπίπτει στο πεδίο εφαρμογής της σχέσης.

▼M7

Και $BCF = 10^{(0,910 \cdot logK_{OW} - 1,975 \cdot \log(6,8 \cdot 10^{-7} K_{OW} + 1) - 0,786)}$ ($r^2 = 0,90$) [(5)· [Εξίσωση A5.8]

W = μέσο βάρος ψαριών της δοκιμής (γραμμάρια νωπού βάρους) στο τέλος της πρόσληψης/έναρξη της αποβολής ([1])

Για άλλες συναφείς σχέσεις βλ. (6). Είναι ενδεχομένως χρήσιμο να χρησιμοποιούνται πιο σύνθετα μοντέλα για την εκτίμηση της k_2 εάν, για παράδειγμα, είναι πιθανό να υπάρξει σημαντικός μεταβολισμός (7) (8). Όσο, όμως, το μοντέλο γίνεται πιο σύνθετο, χρειάζεται μεγαλύτερη προσοχή κατά την ερμηνεία των προβλέψεων. Για παράδειγμα, η παρουσία νιτροομάδων θα μπορούσε να υποδηλώνει ταχύ μεταβολισμό, αλλά αυτό δεν συμβαίνει πάντοτε. Ως εκ τούτου, ο χρήστης θα πρέπει να συνεκτιμά τα αποτελέσματα της μεθόδου πρόβλεψης με τη χημική δομή και κάθε άλλη σχετική πληροφορία (π.χ. από προκαταρκτικές μελέτες) κατά τον προγραμματισμό μιας μελέτης.

Ο χρόνος για την επίτευξη ενός ποσοστού σταθερής κατάστασης μπορεί να υπολογιστεί με χρήση της εκτιμώμενης τιμής της k_2, από τη γενική κινητική εξίσωση που περιγράφει την πρόσληψη και αποβολή (κινητική πρώτης τάξης), με την παραδοχή ότι η ανάπτυξη και ο μεταβολισμός είναι αμελητέα. Εάν κατά τη διάρκεια της μελέτης σημειωθεί σημαντική ανάπτυξη, οι εκτιμήσεις που περιγράφονται κατωτέρω δεν θα είναι αξιόπιστες. Στις περιπτώσεις αυτές, είναι καλύτερο να χρησιμοποιηθεί η k_{2g} διορθωμένη ως προς την ανάπτυξη, όπως περιγράφεται κατωτέρω (βλ. τμήμα 7 του παρόντος προσαρτήματος):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_W - k_2 C_f \qquad \text{[Εξίσωση A5.9]}$$

ή, εάν η C_w είναι σταθερά:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W (1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[Εξίσωση A5.10]}$$

Όταν προσεγγίζεται η σταθερή κατάσταση ($t \to \infty$), η εξίσωση A5.10 μπορεί να αναχθεί (βλ. (9) (10)) σε:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W \qquad \text{[Εξίσωση 5.11]}$$

ή

$$\frac{C_f}{C_w} = \frac{k_1}{k_2} = BCF \qquad \text{[Εξίσωση A5.12]}$$

Ο όρος BCF × C_w είναι τότε μια κατά προσέγγιση τιμή της συγκέντρωσης στα ψάρια σε σταθερή κατάσταση ($C_{f\text{-}SS}$). [Σημείωση: η ίδια προσέγγιση μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατά την εκτίμηση του BMF σε σταθερή κατάσταση με τη μέθοδο της διατροφικής έκθεσης. Στην περίπτωση αυτή, ο BCF αντικαθίσταται από τον BMF και η C_w από τη C_{food}, συγκέντρωση στην τροφή, στις εξισώσεις ανωτέρω]

Η εξίσωση A5.10 μπορεί να γραφεί ως:

$$C_f = C_{f-SS}(1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[Εξίσωση A5.13]}$$

ή

$$\frac{C_f}{C_{f-SS}} = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[Εξίσωση A5.14]}$$

Με την εφαρμογή της εξίσωσης A5.14, ο χρόνος για την επίτευξη ενός ποσοστού σταθερής κατάστασης μπορεί να προβλεφθεί όταν έχει υπολογιστεί εκ των προτέρων η k_2 με τη χρήση της εξίσωσης A5.5 ή της εξίσωσης A5.6.

Κατά κανόνα, η στατιστικώς άριστη διάρκεια της φάσης πρόσληψης για να συναχθούν στατιστικώς αποδεκτά δεδομένα (BCF_K) είναι το διάστημα που απαιτείται ώστε η καμπύλη του λογαρίθμου της συγκέντρωσης της υπό

([1]) Το βάρος του ψαριού στο τέλος της φάσης πρόσληψης μπορεί να εκτιμηθεί βάσει δεδομένων προηγούμενης μελέτης ή τη γνώση ότι το μέγεθος του υπό δοκιμή είδους είναι πιθανό να αυξηθεί από το σύνηθες αρχικό βάρος κατά την έναρξη σε μια συνήθη διάρκεια πρόσληψης (π.χ. 28 ημερών).

▼M7

δοκιμή ουσίας στα ψάρια, που χαράσσεται σε συνάρτηση με τον γραμμικό χρόνο, να φθάσει τουλάχιστον στο 50 % της σταθερής κατάστασης (δηλ. $0{,}69/k_2$) αλλά όχι περισσότερο από το 95 % (δηλ. $3{,}0/k_2$) της σταθερής κατάστασης (11). Σε περίπτωση που η συσσώρευση υπερβαίνει το 95 % της σταθερής κατάστασης. ο υπολογισμός ενός BCF_{SS} καθίσταται εφικτός.

Ο χρόνος για την επίτευξη ποσοστού 80 % της σταθερής κατάστασης είναι (με τη χρήση της εξίσωσης Α5.14):

$$0{,}80 = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[Εξίσωση Α5.15]}$$

ή

$$t_{80} = \frac{-\ln(0{,}20)}{k_2} = \frac{1{,}6}{k_2} \qquad \text{[Εξίσωση Α5.16]}$$

Παρομοίως, ο χρόνος για την επίτευξη ποσοστού σταθερής κατάστασης 95 % είναι:

$$t_{95} = \frac{-ln\ (0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2} \qquad \text{[Εξίσωση Α5.17]}$$

Για παράδειγμα, η διάρκεια της φάσης πρόσληψης (δηλ. ο χρόνος για την επίτευξη ενός συγκεκριμένου ποσοστού σταθερής κατάστασης, π.χ. t_{80} ή t_{95}) για μια υπό δοκιμή ουσία με log K_{OW} = 4 θα ήταν (με τη χρήση της εξίσωσης Α5.5, της εξίσωσης Α5.16 και της εξίσωσης Α.5.17):

$$\log k_2 = 1{,}47 - 0{,}414 \cdot 4$$

$$k_2 = 0{,}652 \text{ ημέρα}^{-1}$$

$$t_{80} = \frac{1{,}6}{0{,}652} = 2{,}45 \text{ ημέρες}(59 \text{ ώρες})$$

ή $t_{95} = \frac{3{,}0}{0{,}652} = 4{,}60$ ημέρες(110 ώρες)

Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η έκφραση:

$$t_{eSS} = 6{,}54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{OW} + 55{,}31 \text{ (ώρες)} \qquad \text{[Εξίσωση Α5.18]}$$

για τον υπολογισμό του χρόνου για την επίτευξη πραγματικής σταθερής κατάστασης (t_{eSS}) (12). Για μία υπό δοκιμή ουσία με log K_{OW} = 4, αυτό δίνει:

$$t_{eSS} = 6{,}54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^4 + 55{,}31 = 121 \text{ ώρες}$$

3. ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΤΗΣ ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ ΤΗΣ ΦΑΣΗΣ ΑΠΟΒΟΛΗΣ

Μία πρόβλεψη του χρόνου που απαιτείται για να μειωθεί ο φόρτος στο σώμα σε ένα ορισμένο ποσοστό της αρχικής συγκέντρωσης μπορεί επίσης να ληφθεί και από τη γενική εξίσωση που περιγράφει την πρόσληψη και την αποβολή [με την παραδοχή κινητικής πρώτης τάξεως, βλ. εξίσωση Α 5.9 (1) (13)].

Για τη φάση αποβολής, ο C_w (ή C_{food} για τη δοκιμή διατροφικής έκθεσης) θεωρείται μηδενικός. Η εξίσωση μπορεί να αναχθεί σε:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_2 C_f \qquad \text{[Εξίσωση Α5.19]}$$

ή

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t} \qquad \text{[Εξίσωση Α5.20]}$$

όπου $C_{f,0}$ είναι η συγκέντρωση στην αρχή της περιόδου αποβολής.

Ποσοστό αποβολής 50 % επιτυγχάνεται κατά τη χρονική στιγμή (t_{50}):

▼M7

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

ή

$$t_{50} = \frac{-\ln(0{,}50)}{k_2} = \frac{0{,}693}{k_2}$$

Ομοίως, ποσοστό αποβολής 95 % επιτυγχάνεται:

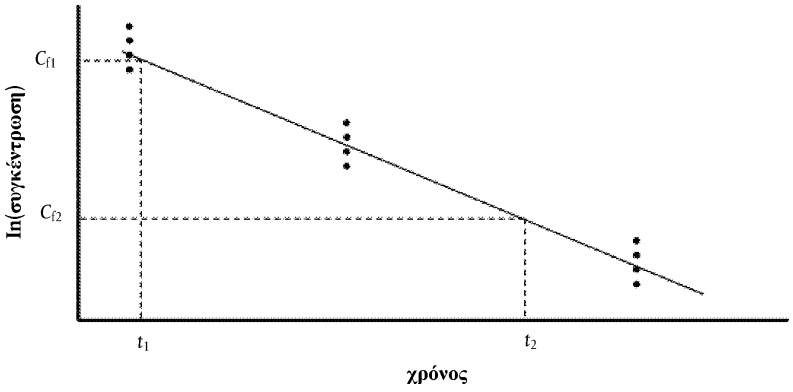
$$t_{95} = \frac{-\ln(0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2}$$

Εάν για την πρώτη περίοδο εφαρμόζεται ποσοστό πρόσληψης 80 % ($1{,}6/k_2$) και 95 % απώλεια κατά τη φάση αποβολής ($3{,}0/k_2$), τότε η διάρκεια της φάσης αποβολής είναι περίπου διπλάσια από τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης.

Επισημαίνεται ότι οι εκτιμήσεις βασίζονται στην παραδοχή ότι οι τάσεις πρόσληψης και αποβολής θα ακολουθούν κινητική πρώτης τάξεως. Εάν είναι προφανές ότι δεν τηρείται κινητική πρώτης τάξεως, οι εκτιμήσεις αυτές δεν είναι έγκυρες.

4. ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΔΟΧΙΚΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΑΣ ΡΥΘΜΟΥ ΑΠΟΒΟΛΗΣ (ΑΠΩΛΕΙΑΣ) K_2

Τα περισσότερα δεδομένα βιοσυγκέντρωσης βασίζονται στην παραδοχή ότι περιγράφονται «εύλογα» με ένα απλό μοντέλο δύο διαμερισμάτων/δύο παραμέτρων, όπως φαίνεται από την ευθύγραμμη καμπύλη που προσεγγίζει τα σημεία των συγκεντρώσεων στα ψάρια (σε κλίμακα ln) κατά τη διάρκεια της φάσης αποβολής.



Επισημαίνεται ότι οι αποκλίσεις από την ευθεία γραμμή ενδέχεται να υποδηλώνουν πολυπλοκότερο σχήμα αποβολής από την κινητική πρώτης τάξεως. Για την επίλυση μορφών αποβολής που αποκλίνουν από την κινητική πρώτης τάξεως μπορεί να εφαρμοστεί η γραφική μέθοδος.

Για τον υπολογισμό της k_2 για πολλαπλά χρονικά σημεία (δειγματοληψίας), εκτελείται γραμμική παλινδρόμηση της ln(συγκέντρωση) σε συνάρτηση με τον χρόνο. Η κλίση της γραμμής παλινδρόμησης είναι μια εκτίμηση της σταθεράς ρυθμού αποβολής k_2 ([1]). Από την τεταγμένη μπορεί να υπολογιστεί εύκολα η μέση συγκέντρωση στα ψάρια κατά την έναρξη της φάσης αποβολής ($C_{0,d}$, που ισοδυναμεί με τη μέση συγκέντρωση στα ψάρια στο τέλος της φάσης πρόσληψης) (συμπεριλαμβανομένων των περιθωρίων σφάλματος) ([1]):

([1]) Στα περισσότερα προγράμματα που επιτρέπουν τη γραμμική παλινδρόμηση, παρέχονται επίσης τυπικά σφάλματα και διάστημα εμπιστοσύνης (CI) των εκτιμήσεων, π.χ. στο Microsoft Excel με τη χρήση της εργαλειοθήκης ανάλυσης δεδομένων.

▼M7

$$C_{0,d} = e^{\tau\varepsilon\tau\alpha\gamma\mu\acute{\varepsilon}\nu\eta} \qquad \text{[Εξίσωση 5.21]}$$

Για τον υπολογισμό της k_2 όταν είναι διαθέσιμα δύο μόνον σημεία (δειγματοληψίας) (όπως στον ελαχιστοποιημένο σχεδιασμό), υποκαθίστανται οι δύο μέσες συγκεντρώσεις στην ακόλουθη εξίσωση

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}) - \ln(C_{f2})}{t_2 - t_1} \qquad \text{[Εξίσωση A5.22]}$$

όπου $\ln(C_{f1})$ και $\ln(C_{f2})$ είναι οι φυσικοί λογάριθμοι των συγκεντρώσεων στους χρόνους t_1 και t_2, αντίστοιχα, και t_2 και t_1 είναι οι χρόνοι συλλογής των δύο δειγμάτων σε σχέση με την έναρξη της αποβολής ([1]).

5. ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΔΟΧΙΚΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΑΣ ΡΥΘΜΟΥ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ K_1 (ΜΕΘΟΔΟΣ ΥΔΑΤΙΚΗΣ ΕΚΘΕΣΗΣ ΜΟΝΟ)

Για να ληφθεί μια τιμή για την k_1 εφόσον υπάρχει μία σειρά διαδοχικών χρονικών δεδομένων συγκέντρωσης για τη φάση πρόσληψης, γίνεται χρήση προγράμματος ηλεκτρονικού υπολογιστή για την προσαρμογή στο ακόλουθο μοντέλο:

$$C_f(t) = C_w(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[Εξίσωση A5.23]}$$

Όταν η k_2 λαμβάνεται με τον προηγούμενο υπολογισμό, οι $C_f(t)$ και $C_w(t)$ είναι οι συγκεντρώσεις στα ψάρια και το νερό, αντίστοιχα, σε χρόνο t.

Για τον υπολογισμό της k_1, όταν είναι διαθέσιμα δύο μόνον σημεία (δειγματοληψίας) (όπως στον ελαχιστοποιημένο σχεδιασμό), χρησιμοποιείται ο ακόλουθος τύπος:

$$k_1 = \frac{C_f \cdot k_2}{C_w(1 - e^{-k_2 t})} \qquad \text{[Εξίσωση A5.24]}$$

Όταν η k_2 λαμβάνεται με τον προηγούμενο υπολογισμό, η C_f είναι η συγκέντρωση στα ψάρια στην έναρξη της φάσης αποβολής και η C_w είναι η μέση συγκέντρωση στο νερό κατά τη φάση πρόσληψης ([2]).

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οπτική εξέταση των κλίσεων της k_1 και της k_2 όταν παρίστανται γραφικά σε συνάρτηση με τα μετρούμενα δεδομένα της δειγματοληψίας για την αξιολόγηση της καταλληλότητας της προσαρμογής. Εάν διαπιστωθεί ότι η μέθοδος διαδοχικών δοκιμών παρέσχε μη αξιόπιστη εκτίμηση της k_1, τότε θα πρέπει να εφαρμόζεται η ταυτόχρονη προσέγγιση για τον υπολογισμό της k_1 και της k_2 (βλ. επόμενο τμήμα 6). Και σε αυτή την περίπτωση, οι συναγόμενες κλίσεις θα πρέπει να συγκριθούν με τα μετρούμενα δεδομένα της γραφικής παράστασης για οπτική εξέταση της καταλληλότητας της προσαρμογής. Εάν η ορθότητα της προσαρμογής εξακολουθεί να είναι αμφίβολη, αυτό θα μπορούσε να είναι ένδειξη ότι δεν ισχύει κινητική πρώτης τάξεως και ότι θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν άλλα πιο περίπλοκα μοντέλα.

6. ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟ ΤΩΝ ΣΤΑΘΕΡΩΝ ΡΥΘΜΟΥ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΒΟΛΗΣ (ΑΠΩΛΕΙΑΣ) (ΜΕΘΟΔΟΣ ΥΔΑΤΙΚΗΣ ΕΚΘΕΣΗΣ ΜΟΝΟ)

Προγράμματα ηλεκτρονικών υπολογιστών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό των τιμών k_1 και k_2 εφόσον υπάρχει ένα σύνολο διαδοχικών δεδομένων χρονικής συγκέντρωσης και το μοντέλο:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[Εξίσωση A5.25]}$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (e^{-k_2(t - t_c)} - e^{-k_2 t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[Εξίσωση A5.26]}$$

όπου

t_c = χρόνος στο τέλος της φάσης πρόσληψης.

Η προσέγγιση αυτή παρέχει απευθείας τυπικά σφάλματα για τις εκτιμήσεις της k_1 και της k_2. Όταν το k_1/k_2 υποκαθίσταται από τον BCF (βλ. εξίσωση

([1]) Σε αντίθεση με τη μέθοδο γραμμικής παλινδρόμησης, η χρησιμοποίηση αυτού του μαθηματικού τύπου δεν θα αποδώσει τυπικό σφάλμα για την k^2.

([2]) Σε αντίθεση με μια γραμμική διαδικασία προσαρμογής, η παρούσα μέθοδος συνήθως δεν παρέχει τυπικό σφάλμα ή διάστημα εμπιστοσύνης για τις εκτιμήσεις της k1.

▼M7

A5.4) στην εξίσωση A5.25 και στην εξίσωση A5.26, μπορούν επίσης να υπολογιστούν το τυπικό σφάλμα και η τιμή 95 % CI του BCF. Αυτό είναι ιδιαίτερα χρήσιμο κατά τη σύγκριση διαφορετικών εκτιμήσεων, λόγω μετασχηματισμού των δεδομένων. Η εξαρτημένη μεταβλητή (συγκέντρωση στα ψάρια) μπορεί να προσαρμοστεί με ή χωρίς λογαριθμικό μετασχηματισμό και η συνακόλουθη αβεβαιότητα για τον BCF μπορεί να αξιολογηθεί.

Δεδομένου ότι υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των δύο παραμέτρων k_1 και k_2 εάν υπολογιστούν ταυτόχρονα, θα ήταν σκόπιμο να υπολογίζεται πρώτα η k_2 μόνο βάσει των δεδομένων αποβολής (βλ. ανωτέρω)·η k_2 στις περισσότερες περιπτώσεις μπορεί να εκτιμηθεί από την καμπύλη αποβολής με σχετικά μεγάλη ακρίβεια. Η k_1 μπορεί στη συνέχεια να υπολογιστεί από τα δεδομένα πρόσληψης με τη χρήση μη γραμμικής παλινδρόμησης ([1]). Συνιστάται η χρήση του ίδιου μετασχηματισμό των δεδομένων σε περίπτωση διαδοχικής προσαρμογής.

Για την αξιολόγηση της ορθότητας της προσαρμογής μπορεί να χρησιμοποιηθεί η οπτική εξέταση των κλίσεων που λαμβάνονται όταν παρίστανται γραφικώς σε συνάρτηση με τα μετρούμενα σημεία δεδομένων δειγματοληψίας. Εάν διαπιστωθεί ότι αυτή η μέθοδος παρέσχε μη αξιόπιστη εκτίμηση της k_1, τότε για τον υπολογισμό της k_1 και της k_2 μπορεί να εφαρμοστεί η ταυτόχρονη προσέγγιση. Και σε αυτή την περίπτωση, το προσαρμοσμένο μοντέλο θα πρέπει να συγκρίνεται με τα μετρούμενα δεδομένα της γραφικής παράστασης για οπτική εξέταση της ορθότητας της προσαρμογής και των συνακόλουθων εκτιμήσεων των παραμέτρων για τις k_1, k_2 και τον συναγόμενο BCF, και τα τυπικά τους σφάλματα και/ή τα διαστήματα εμπιστοσύνης θα πρέπει να συγκρίνονται μεταξύ των διαφόρων τύπων προσαρμογής.

Εάν η ορθότητα της προσαρμογής είναι αμφίβολη, αυτό θα μπορούσε να είναι ένδειξη ότι δεν ισχύει κινητική πρώτης τάξης και ότι θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν άλλα πιο σύνθετα μοντέλα. Μία από τις συνηθέστερες δυσκολίες είναι η ανάπτυξη των ψαριών κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

7. ΔΙΟΡΘΩΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΗΣ ΑΡΑΙΩΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΙΝΗΤΙΚΟ BCF ΚΑΙ ΤΟΝ BMF

Η παρούσα ενότητα περιγράφει μια τυποποιημένη μέθοδο για διόρθωση λόγω της ανάπτυξης των ψαριών κατά τη διάρκεια της δοκιμής (με την ονομασία «αναπτυξιακή αραίωση»), η οποία είναι έγκυρη μόνο όταν εφαρμόζεται κινητική πρώτης τάξης. Εάν υπάρχουν ενδείξεις ότι δεν ισχύει κινητική πρώτης τάξης, συνιστάται να ζητείται η γνώμη βιοστατιστικολόγου για την ορθή διόρθωση της αραίωσης ανάπτυξης ή να χρησιμοποιείται η προσέγγιση βάσει μάζας που περιγράφεται κατωτέρω.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, η μέθοδος αυτή για τη διόρθωση της αναπτυξιακής αραίωσης χαρακτηρίζεται από έλλειψη ακρίβειας ή, ενίοτε, δεν αποδίδει (για παράδειγμα, σε ουσίες εξαιρετικά βραδείας αποβολής που υποβάλλονται σε δοκιμή σε ψάρια ταχείας ανάπτυξης, η παράγωγη σταθερά ρυθμού αποβολής διορθωμένη ως προς την αναπτυξιακή αραίωση, k_{2g}, μπορεί να είναι πολύ μικρή και, ως εκ τούτου, το σφάλμα στις σταθερές των δύο ρυθμών που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της καθίσταται κρίσιμο και οι εκτιμώμενες k_{201g} μπορεί, σε ορισμένες περιπτώσεις, να είναι μεγαλύτερες από την k_2). Σε αυτές τις περιπτώσεις, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια εναλλακτική προσέγγιση (δηλ. η προσέγγιση της μάζας), η οποία είναι επίσης αποτελεσματική όταν δεν τηρείται κινητική ανάπτυξης πρώτης τάξης, ώστε να αποφεύγεται η ανάγκη διόρθωσης. Η προσέγγιση αυτή περιγράφεται στο τέλος του παρόντος τμήματος.

Μέθοδος αφαίρεσης σταθεράς ρυθμού ανάπτυξης για τη διόρθωση ως προς την ανάπτυξη

Για την τυποποιημένη μέθοδο, όλα τα δεδομένα ατομικού βάρους και μήκους μετατρέπονται σε φυσικούς λογάριθμους και η ln(βάρος) ή ln(1/βάρος) αναπαριστάται γραφικά σε συνάρτηση με τον χρόνο (ημέρες), χωριστά για τις ομάδες μεταχείρισης και τις ομάδες μαρτύρων. Η ίδια διεργασία εφαρμόζεται για τα δεδομένα των φάσεων πρόσληψης και αποβολής χωριστά. Γενικά, για τη διόρθωση της αναπτυξιακής αραίωσης, είναι ορθότερο να χρησιμοποιούνται τα δεδομένα βάρους από ολόκληρη τη μελέτη για τον προσδιορισμό

([1]) Πρέπει να γίνει αντιληπτό ότι η αβεβαιότητα όσον αφορά την εκτίμηση της K2 δεν χρησιμοποιείται ορθά στο μοντέλο βιοσυσσώρευσης, όταν αυτό στην ουσία εκλαμβάνεται ως σταθερά κατά την προσαρμογή της K1 στη μέθοδο διαδοχικής προσαρμογής. Η συνακόλουθη αβεβαιότητα ως προς τον BCF θα είναι, συνεπώς, διαφορετική ανάμεσα στις μεθόδους ταυτόχρονης και διαδοχικής προσαρμογής.

▼M7

της σταθεράς ρυθμού ανάπτυξης (k_g), αλλά στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των σταθερών ρυθμού ανάπτυξης που συνάγονται για τη φάση πρόσληψης και τη φάση αποβολής μπορεί να αποτελούν ένδειξη ότι θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί η σταθερά ρυθμού αποβολής. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν ολικοί ρυθμοί ανάπτυξης από μελέτες υδατικής έκθεσης για ομάδες δοκιμής και μαρτύρων για τον έλεγχο των επιδράσεων που σχετίζονται με τη μεταχείριση.

Υπολογίζεται μια γραμμική συσχέτιση ελαχίστων τετραγώνων για τα δεδομένα ln(βάρος ψαριών) σε συνάρτηση με την ημέρα [και για ln(1/βάρος) σε συνάρτηση με την ημέρα] για κάθε ομάδα (ομάδες δοκιμής και ομάδες μαρτύρων, ατομικά δεδομένα, όχι ημερήσιες μέσες τιμές), για το σύνολο της μελέτης και τις φάσεις πρόσληψης και αποβολής, με τη χρήση τυποποιημένων στατιστικών διαδικασιών. Υπολογίζονται οι διακυμάνσεις των κλίσεων των καμπυλών και χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της στατιστικής σημαντικότητας (p = 0,05) της διαφοράς των κλίσεων (σταθερές ρυθμού ανάπτυξης) με τη χρήση του ελέγχου t του Student (ή ANOVA, εάν υποβάλλονται σε δοκιμή περισσότερες από μία συγκεντρώσεις). Τα δεδομένα για το βάρος, κατά κανόνα, προτιμώνται για τη διόρθωση ως προς την ανάπτυξη. Τα δεδομένα για το μήκος, με τους ίδιους χειρισμούς, μπορεί να είναι χρήσιμα για τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων μαρτύρων και δοκιμής ως προς τις επιδράσεις που σχετίζονται με τη μεταχείριση. Εάν δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην ανάλυση των δεδομένων για το βάρος, τα δεδομένα για τις ομάδες δοκιμής και μαρτύρων μπορούν να ομαδοποιηθούν και να υπολογιστεί μια συνολική σταθερά ρυθμού ανάπτυξης των ψαριών (k_g) ως η συνολική κλίση της γραμμικής συσχέτισης. Εάν παρατηρηθούν στατιστικά σημαντικές διαφορές, οι σταθερές ρυθμού ανάπτυξης για κάθε ομάδα ψαριών, και/ή φάση μελέτης, αναφέρονται χωριστά. Η σταθερά ρυθμού από κάθε ομάδα που υποβάλλεται σε μεταχείριση θα πρέπει στη συνέχεια να χρησιμοποιείται για τη διόρθωση της αναπτυξιακής αραίωσης της εν λόγω ομάδας. Εάν παρατηρηθούν στατιστικές διαφορές μεταξύ των σταθερών ρυθμού πρόσληψης και αποβολής, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οι παράγωγες σταθερές ρυθμού της φάσης αποβολής.

Η υπολογισθείσα σταθερά ρυθμού ανάπτυξης (k_g εκφρασμένη σε ημέρες^{-1}) μπορεί να αφαιρεθεί από τη συνολική σταθερά ρυθμού αποβολής (k_2) για να ληφθεί η σταθερά ρυθμού αποβολής k_{2g}.

$$k_{2g} = k_2 - k_g \qquad \text{[Εξίσωση A5.27]}$$

Η σταθερά ρυθμού πρόσληψης διαιρείται δια της διορθωμένης ως προς την ανάπτυξη σταθεράς ρυθμού αποβολής για να ληφθεί ο διορθωμένος ως προς την ανάπτυξη κινητικός BCF, που συμβολίζεται BCF_{Kg} (ή BMF_{Kg}).

$$BCF_{Kg} = \frac{k_1}{k_{2g}} \qquad \text{[Εξίσωση A5.28]}$$

Η σταθερά ρυθμού ανάπτυξης που λαμβάνεται για μια διατροφική μελέτη χρησιμοποιείται στην εξίσωση A7.5 για τον υπολογισμό του διορθωμένου ως προς την ανάπτυξη BMF_{Kg} (βλ. προσάρτημα 7).

Μέθοδος που βασίζεται στη μάζα για τη διόρθωση ως προς την ανάπτυξη

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ακόλουθη εναλλακτική επιλογή αντί της ανωτέρω «μεθόδου αφαίρεσης της σταθεράς ρυθμού ανάπτυξης» που αποφεύγει την ανάγκη διόρθωσης ως προς την ανάπτυξη. Βασίζεται στην αρχή της χρησιμοποίησης δεδομένων αποβολής βάσει της μάζας ανά ολόκληρο ψάρι και όχι βάσει συγκέντρωσης.

Οι συγκεντρώσεις στους ιστούς στη φάση αποβολής (μάζα της υπό δοκιμή ουσίας/μοναδιαία μάζα ψαριού) μετατρέπονται σε μάζα της υπό δοκιμή ουσίας/ψάρι: γίνεται αντιστοίχιση των συγκεντρώσεων και του βάρους του κάθε ψαριού σε μορφή πίνακα (π.χ. με τη χρήση ηλεκτρονικού λογιστικού φύλλου) και πολλαπλασιάζεται κάθε συγκέντρωση επί το συνολικό βάρος των ψαριών για την εν λόγω μέτρηση με σκοπό να ληφθεί ένα σύνολο τιμών μάζας της υπό δοκιμή ουσίας ανά ψάρι για όλα τα δείγματα της φάσης αποβολής.

Απεικονίζεται σε γραφική παράσταση ο φυσικός λογάριθμος των δεδομένων της μάζας της ουσίας σε συνάρτηση με τον χρόνο για το πείραμα (φάση αποβολής), όπως θα γινόταν κανονικά.

▼M7

Για τη μέθοδο της υδατικής έκθεσης, συνάγεται συνήθως η σταθερά ρυθμού πρόσληψης (βλ. ενότητες 4 και 6 — σημειωτέον ότι η «κανονική» τιμή k_2 θα πρέπει να χρησιμοποιείται στις εξισώσεις προσαρμογής της καμπύλης για την k_1), και συνάγεται η σταθερά ρυθμού αποβολής από τα ανωτέρω στοιχεία. Επειδή η τιμή που προκύπτει για τη σταθερά ρυθμού αποβολής είναι ανεξάρτητη από την ανάπτυξη όπως έχει υπολογιστεί βάσει της μάζας ανά ολόκληρο ψάρι, θα πρέπει να συμβολίζεται k_{2g} και όχι k_2.

8. ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΣΕ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ 5 % ΣΕ ΛΙΠΙΔΙΑ (ΜΕΘΟΔΟΣ ΥΔΑΤΙΚΗΣ ΕΚΘΕΣΗΣ ΜΟΝΟ)

Τα αποτελέσματα για τον BCF (κινητικό και σε σταθερή κατάσταση) από τις δοκιμές υδατικής έκθεσης θα πρέπει επίσης να αναφέρονται σε σχέση με την προκαθορισμένη περιεκτικότητα 5 % σε λιπίδια επί νωπού βάρους, εκτός εάν μπορεί να υποστηριχθεί ότι η υπό δοκιμή ουσία δεν συσσωρεύεται κατά κύριο λόγο στα λιπίδια (π.χ. ορισμένες υπερφθοριωμένες ουσίες μπορεί να δεσμεύονται από πρωτεΐνες). Τα δεδομένα για τη συγκέντρωση στα ψάρια, ή ο BCF, πρέπει να μετατρέπονται σε περιεκτικότητα 5 % σε λιπίδια επί νωπού βάρους. Εάν τα ίδια ψάρια χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση των συγκεντρώσεων της ουσίας και της περιεκτικότητας σε λιπίδια σε όλα τα χρονικά σημεία δειγματοληψίας, απαιτείται διόρθωση της μετρούμενης συγκέντρωσης σε κάθε ψάρι ως προς την περιεκτικότητά του σε λιπίδια.

$$C_{f,L} = \frac{0{,}05}{L} \cdot C_f \qquad \text{[Εξίσωση A5.29]}$$

όπου

$C_{f,L}$ = κανονικοποιημένη ως προς τα λιπίδια συγκέντρωση στα ψάρια (mg kg^{-1} νωπού βάρους)

L = λιπιδικό κλάσμα (βάσει του νωπού βάρους)

C_f = συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στα ψάρια (mg kg^{-1} νωπού βάρους)

Εάν δεν πραγματοποιήθηκε ανάλυση των λιπιδίων σε όλα τα ψάρια του δείγματος, χρησιμοποιείται μια μέση τιμή λιπιδίων για την κανονικοποίηση του BCF. Για τον BCF σε σταθερή κατάσταση, θα πρέπει να χρησιμοποιείται η μέση τιμή που καταγράφηκε στο τέλος της φάσης πρόσληψης στην ομάδα μεταχείρισης. Για την κανονικοποίηση του κινητικού BCF, ενδέχεται να υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες δικαιολογείται διαφορετική προσέγγιση, π.χ. σε περίπτωση σημαντικής μεταβολής της περιεκτικότητας σε λιπίδια κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης ή αποβολής. Ούτως ή άλλως, θα πρέπει να χρησιμοποιείται συστηματικά ένας ρυθμός σίτισης που ελαχιστοποιεί τις σημαντικές μεταβολές του λιπιδικού περιεχομένου.

$$BCF_{KL} = \frac{0.05}{L_n} \cdot BCF_K \qquad \text{[Εξίσωση A5.30]}$$

όπου

BCF_{KL} = κανονικοποιημένος ως προς τα λιπίδια BCF (L kg^{-1})

L_n = μέσο λιπιδικό κλάσμα (βάσει του νωπού βάρους)

BCF_K = κινητικός BCF (L kg^{-1})

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems, Environ. Toxicol. Chem. 23: 2343-2355.

(2) Κεφάλαιο Γ.20 του παρόντος παραρτήματος, Δοκιμή αναπαραγωγής σε *Daphnia magna*.

(3) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982), Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1: 309-320.

▼**M7**

(4) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

(5) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. SAR QSAR Environ. Res. 1: 29-39.

(6) Kristensen P. (1991), Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute, Hørsholm, Denmark.

(7) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1168-1177.

(8) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. Φεβρουάριος 2011. Διατίθεται στη διεύθυνση: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

(9) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975). Bioconcentration of 2,2',4,4' tetrachlorobiphenyl in rainbow trout as measured by an accelerated test. T. Am. Fish. Soc. 104: 785-792.

(10) Ernst W. (1985), Accumulation in aquatic organisms, in Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals, Sheeman, P., *et al*., Editors. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, USA: 243-255.

(11) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977), Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models. Can. J. Chem. Eng. 55: 614-622.

(12) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988), Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701-707.

(13) Konemann H. and van Leeuwen K. (1980), Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. Chemosphere. 9: 3-19.

▼M7

Προσάρτημα 6

ΕΝΟΤΗΤΑ ΕΞΙΣΩΣΕΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΔΟΚΙΜΗ ΥΔΑΤΙΚΗΣ ΕΚΘΕΣΗΣ: ΕΛΑΧΙΣΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η λογική αυτής της προσέγγισης έγκειται στο ότι ο συντελεστής βιοσυγκέντρωσης σε μια πλήρη δοκιμή μπορεί να προσδιοριστεί είτε ως συντελεστής βιοσυγκέντρωσης σε σταθερή κατάσταση (BCF_{SS}), με υπολογισμό του λόγου της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στον ιστό των ψαριών προς τη συγκέντρωσή της στο νερό, είτε μέσω του υπολογισμού του κινητικού συντελεστή βιοσυγκέντρωσης (BCF_K), ως ο λόγος της σταθεράς ρυθμού πρόσληψης k_1 προς τη σταθερά ρυθμού αποβολής k_2. Ο BCF_K είναι έγκυρος ακόμη και αν δεν επιτυγχάνεται σε σταθερή κατάσταση συγκέντρωση μιας ουσίας κατά την πρόσληψη, υπό την προϋπόθεση ότι οι φάσεις πρόσληψης και αποβολής ακολουθούν κατά προσέγγιση κινητικές διαδικασίες πρώτης τάξεως.

Εάν γίνει μέτρηση της συγκέντρωσης της ουσίας σε ιστούς (C_{f1}) κατά τον χρόνο λήξης της έκθεσης (t_1) και η συγκέντρωση στους ιστούς (C_{f2}) μετρηθεί εκ νέου μετά από την παρέλευση ενός χρονικού διαστήματος (t_2), η σταθερά ρυθμού αποβολής (k_2) μπορεί να υπολογιστεί με τη χρήση της εξίσωσης A5.22 από το προσάρτημα 5.

Η σταθερά ρυθμού πρόσληψης, k_1, μπορεί στη συνέχεια να καθοριστεί αλγεβρικά με την εφαρμογή της εξίσωσης A5.23 από το προσάρτημα 5 (όπου ο C_f ισούται με τον C_{f1} και ο t ισούται με τον t_1) (1). Ο κινητικός συντελεστής βιοσυγκέντρωσης για τον ελαχιστοποιημένο σχεδιασμό (που συμβολίζεται BCF_{Km} για να διακρίνεται από τους κινητικούς συντελεστές βιοσυγκέντρωσης που προσδιορίζονται με τη χρήση άλλων μεθόδων) έχει ως εξής:

$$BCF_{Km} = \frac{k_1}{k_2} \qquad \text{[Εξίσωση A6.1]}$$

Οι συγκεντρώσεις ή τα αποτελέσματα θα πρέπει να διορθώνονται ως προς την αναπτυξιακή αραίωση και να κανονικοποιούνται σε μια λιπιδική περιεκτικότητα ίση με 5 % στα ψάρια, όπως περιγράφεται στο προσάρτημα 5.

Ο ελαχιστοποιημένος BCF_{SS} είναι ο BCF που υπολογίζεται στο τέλος της φάσης πρόσληψης, με την παραδοχή ότι έχει επιτευχθεί σταθερή κατάσταση. Αυτό μπορεί να ληφθεί μόνο ως υπόθεση, διότι ο αριθμός των σημείων δειγματοληψίας δεν αρκεί για να αποδειχθεί αυτό.

$$\text{ελαχιστοποιημένος } BCF_{SS} = \frac{C_{f-minSS}}{C_{w-minSS}} \qquad \text{[Εξίσωση A6.2]}$$

όπου:

$C_{f\text{-}minSS}$ = συγκέντρωση στα ψάρια με την παραδοχή σταθερής κατάστασης στο τέλος της πρόσληψης (mg kg^{-1} νωπού βάρους).

$C_{w\text{-}minSS}$ = συγκέντρωση στο νερό με την παραδοχή σταθερής κατάστασης στο τέλος της πρόσληψης (mg l^{-1}).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271-2280.

▼M7

Προσάρτημα 7

ΕΝΟΤΗΤΑ ΕΞΙΣΩΣΕΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΔΟΚΙΜΗ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗΣ ΕΚΘΕΣΗΣ

1. Παράδειγμα ποσοτήτων των συστατικών κατάλληλης ιχθυτροφής του εμπορίου

2. Παραδείγματα τεχνικής εμβολιασμού τροφίμων

3. Υπολογισμός της απόδοσης της αφομοίωσης και του συντελεστή βιομεγέθυνσης

4. Διόρθωση ως προς τα λιπίδια

5. Αξιολόγηση των διαφορών μεταξύ της μετρούμενης συγκέντρωσης χρόνου μηδέν (C0,m) και της παράγωγης *συγκέντρωσης* χρόνου μηδέν ($C_{0,d}$)

6. Καθοδήγηση για τις υπό δοκιμή ουσίες με ταχύτατο ρυθμό αποβολής

1. ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΚΑΤΑΛΛΗΛΗΣ ΙΧΘΥΟΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΕΜΠΟΡΙΟΥ

Βασικό συστατικό	ιχθυάλευρο
Ολικές πρωτεΐνες	≤ 55,0 %
Ολικές λιπαρές ουσίες	≤ 15,0 % ([1])
Ολικές ινώδεις ουσίες	≥ 2,0 %
Υγρασία	≥ 12 %
Τέφρα	≥ 8 %

([1]) Σε ορισμένες περιοχές, μπορεί να είναι δυνατή μόνον η προμήθεια ιχθυοτροφής με συγκέντρωση λιπιδίων που υπολείπεται κατά πολύ του εν λόγω ανωτάτου ορίου. Στις περιπτώσεις αυτές, οι μελέτες θα πρέπει να διεξάγονται με τη χαμηλότερη συγκέντρωση λιπιδίων στις τροφές, ανάλογα με την προμήθεια, και ο ρυθμός σίτισης να προσαρμόζεται κατάλληλα για τη διατήρηση της υγείας των ψαριών. Τα λιπίδια των σιτηρεσίων δεν θα πρέπει να αυξάνονται τεχνητά με την προσθήκη περίσσειας ελαίου.

2. ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΥ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Γενικές παρατηρήσεις

Το σιτηρέσιο των μαρτύρων θα πρέπει να παρασκευάζεται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο όπως η εμβολιασμένη τροφή, αλλά χωρίς την υπό δοκιμή ουσία.

Για να ελέγχεται η συγκέντρωση του κατεργασμένου σιτηρεσίου, θα πρέπει να εκχυλίζονται τριπλά δείγματα χορηγούμενης τροφής με κατάλληλη μέθοδο εκχύλισης και να μετράται η συγκέντρωση ή η ραδιενέργεια της υπό δοκιμή ουσίας στα εκχυλίσματα. Θα πρέπει να καταδεικνύονται υψηλά ποσοστά αναλυτικής ανάκτησης (> 85 %) με χαμηλή μεταβλητότητα μεταξύ των δειγμάτων (τρεις συγκεντρώσεις της ουσίας σε δείγματα που λαμβάνονται κατά την έναρξη της δοκιμής δεν θα πρέπει να διαφέρουν κατά περισσότερο από ± 15 % από τη μέση τιμή).

Κατά τη διάρκεια της διατροφικής δοκιμής, θα πρέπει να συλλέγονται τρία δείγματα σιτηρεσίου για ανάλυση κατά την ημέρα 0 και στο τέλος της φάσης πρόσληψης για τον προσδιορισμό της υπό δοκιμή ουσίας στο σιτηρέσιο.

Παρασκευάσματα ιχθυοτροφής με υγρό υλικό δοκιμής (αμιγές)

Ορίζεται στοχευόμενη, ονομαστική συγκέντρωση δοκιμής στην κατεργασμένη ιχθυοτροφή, για παράδειγμα 500 μg/g της υπό δοκιμή ουσίας/g τροφής. Η κατάλληλη ποσότητα (βάσει γραμμομοριακής μάζας ή ειδικής ραδιενέργειας) αμιγούς υπό δοκιμή ουσίας προστίθεται σε γνωστή μάζα ιχθυοτροφής σε γυάλινο δοχείο ή στη φιάλη περιστροφικού εξατμιστήρα. Η μάζα της ιχθυοτροφής θα πρέπει να είναι επαρκής για τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης (λαμβανομένης υπόψη της ανάγκης αύξησης των ποσοτήτων σε κάθε ιχθυοτροφή λόγω ανάπτυξης των ψαριών). Το σύνολο ιχθυοτροφής/υπό δοκιμή

▼M7

ουσίας θα πρέπει να αναμειγνύεται κατά τη διάρκεια της νύχτας με αργή ανατροπή (π.χ. με τη βοήθεια αναμικτήρα roto-rack ή με περιστροφή εάν χρησιμοποιείται φιάλη περιστροφικού εξατμιστήρα). Η εμβολιασμένη τροφή πρέπει να αποθηκεύεται υπό συνθήκες που διατηρούν τη σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας στο μείγμα ζωοτροφής (π.χ. ψύξη).

Παρασκευάσματα ιχθυοτροφής με αραβοσιτέλαιο ή ιχθυέλαιο ως φορέα

Οι στερεές υπό δοκιμή ουσίες θα πρέπει να λειοτριβούνται σε ιγδίο σε λεπτή σκόνη. Οι υγρές ουσίες μπορούν να προστίθενται απευθείας στο αραβοσιτέλαιο ή το ιχθυέλαιο. Η υπό δοκιμή ουσία διαλύεται σε δεδομένη ποσότητα αραβοσιτελαίου ή ιχθυελαίου (π.χ. 5-15 ml). Το χορηγούμενο έλαιο μεταφέρεται ποσοτικώς σε περιστροφικό εξατμιστήρα κατάλληλου μεγέθους. Η φιάλη που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του χορηγούμενου ελαίου θα πρέπει να ξεπλένεται με δύο μικρές ποσότητες ελαίου και αυτές να προστίθενται στη συσκευή για να εξασφαλιστεί η μεταφορά του συνόλου της διαλυμένης υπό δοκιμή ουσίας. Για να εξασφαλιστεί πλήρης διάλυση/διασπορά στο έλαιο (ή εάν χρησιμοποιούνται στη μελέτη περισσότερες από μία υπό δοκιμή ουσίες), προστίθεται ένας μικροαναδευτήρας, η φιάλη πωματίζεται και το μείγμα αναδεύεται σε υψηλή ταχύτητα κατά τη διάρκεια της νύχτας. Κατάλληλη για τη δοκιμή ποσότητα ιχθυοτροφής (συνήθως σε μορφή εξωθημένων κόκκων) προστίθεται στο εσωτερικό της βολβοειδούς φιάλης, και το περιεχόμενο της φιάλης αναμειγνύεται ομοιογενώς με διαρκή περιστροφή της γυάλινης φιάλης για τουλάχιστον 30 λεπτά, αλλά κατά προτίμηση κατά τη διάρκεια της νύχτας. Ύστερα, η εμβολιασμένη τροφή αποθηκεύεται κατάλληλα (π.χ. σε ψύξη) για να εξασφαλιστεί η σταθερότητα της ελεγχόμενης ουσίας στην τροφή μέχρι να καταναλωθεί.

Παρασκευάσματα ιχθυοτροφής με οργανικό διαλύτη

Κατάλληλη ποσότητα της υπό δοκιμή ουσίας (βάσει γραμμομοριακής μάζας ή ειδικής ραδιενέργειας), επαρκής για την επίτευξη της επιθυμητής δόσης, διαλύεται σε κατάλληλο οργανικό διαλύτη (π.χ. κυκλοεξάνιο ή ακετόνη, 10-40 ml ή μεγαλύτερο όγκο, εάν είναι αναγκαίο, ανάλογα με την ποσότητα της τροφής προς εμβολιασμό). Είτε ένα κλάσμα είτε ολόκληρη η ποσότητα (προστιθέμενη τμηματικά) αυτού του διαλύματος αναμειγνύεται με την κατάλληλη μάζα ιχθυοτροφής, επαρκή για να επιτευχθεί το απαιτούμενο επίπεδο ονομαστικής δόσης της δοκιμής. Το σύνολο τροφής/υπό δοκιμή ουσίας μπορεί να αναμιχθεί σε λεκάνη από ανοξείδωτο χάλυβα και η ιχθυοτροφή με την πρόσφατα προστεθείσα δόση να αφεθεί σε ηρεμία, μέσα στη λεκάνη, σε απαγωγό του εργαστηρίου για δύο ημέρες (αναδευόμενη κατά διαστήματα), ώστε να εξατμιστεί η περίσσεια διαλύτη, ή μπορεί να αναμιχθεί σε φιάλη περιστροφικού εξατμιστήρα με συνεχή περιστροφή. Η περίσσεια του διαλύτη μπορεί να «εκδιωχθεί» με ρεύμα αέρα ή αζώτου, εάν αυτό είναι αναγκαίο. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να εξασφαλίζεται ότι η υπό δοκιμή ουσία δεν κρυσταλλώνεται κατά την απομάκρυνση του διαλύτη. Η εμβολιασμένη τροφή πρέπει να αποθηκεύεται υπό συνθήκες (π.χ. σε ψύξη) που διατηρούν τη σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας στο μείγμα ζωοτροφής μέχρι να καταναλωθεί.

3. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΤΗΣ ΑΦΟΜΟΙΩΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΒΙΟΜΕΓΕΘΥΝΣΗΣ

Για τον υπολογισμό της απόδοσης της αφομοίωσης, η συνολική σταθερά ρυθμού αποβολής θα πρέπει πρώτα να υπολογίζεται σύμφωνα με το τμήμα 4 του προσαρτήματος 5 (με τη χρήση της «μεθόδου διαδοχικών δοκιμών», δηλ. τυπικής γραμμικής παλινδρόμησης) χρησιμοποιώντας τις μέσες συγκεντρώσεις δείγματος από τη φάση αποβολής. Η σταθερά ρυθμού σίτισης, I, και η διάρκεια πρόσληψης, t, είναι γνωστές παράμετροι της μελέτης. Η C_{food}, η μέση μετρούμενη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στην τροφή, είναι μετρούμενη μεταβλητή στη μελέτη. Η $C_{0,\text{d}}$, η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στα ψάρια στο τέλος της φάσης πρόσληψης, συνάγεται συνήθως από την τεταγμένη της γραφικής παράστασης του ln(συγκέντρωση) σε συνάρτηση με την ημέρα αποβολής.

Η απόδοση της αφομοίωσης της ουσίας (a, απορρόφηση της υπό δοκιμή ουσίας στο πεπτικό σύστημα) υπολογίζεται ως:

$$\alpha = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{τροφή}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \qquad \text{[Εξίσωση A7.1]}$$

όπου:

$C_{0,d}$ = παράγωγη συγκέντρωση στα ψάρια στον χρόνο 0 της φάσης αποβολής (mg kg^{-1})·

▼M7

k_2 = συνολική (χωρίς διόρθωση ως προς την ανάπτυξη) σταθερά ρυθμού αποβολής (ημέρα^{-1}), υπολογιζόμενη σύμφωνα με τις εξισώσεις στο προσάρτημα 5, τμήμα 3·

I = σταθερά ρυθμού λήψης τροφής (g τροφής g^{-1} ψαριών ημέρα^{-1})·

C_{food} = συγκέντρωση στην τροφή (mg kg^{-1} τροφής)·

t = διάρκεια της περιόδου σίτισης (ημέρες)

Ο ρυθμός σίτισης, ωστόσο, I, που χρησιμοποιείται στον υπολογισμό ενδέχεται να χρειαστεί να προσαρμοστεί για να ληφθεί υπόψη η ανάπτυξη των ψαριών, ώστε να υπολογιστεί ορθά η απόδοση της αφομοίωσης, a. Σε μια δοκιμή κατά την οποία τα ψάρια αναπτύσσονται σημαντικά κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης (στην οποία δεν γίνεται καμία διόρθωση των ποσοτήτων ζωοτροφών για τη διατήρηση του καθορισμένου ρυθμού σίτισης), ο πραγματικός ρυθμός σίτισης κατά την εξέλιξη της φάσης πρόσληψης θα είναι χαμηλότερος από αυτόν που έχει καθοριστεί, με αποτέλεσμα η «πραγματική» απόδοση της αφομοίωσης να είναι υψηλότερη. Επισημαίνεται ότι αυτό δεν είναι σημαντικό για τον συνολικό υπολογισμό του BMF, αφού οι όροι της I αλληλοεξουδετερώνονται μεταξύ της εξίσωσης A7.1 και της εξίσωσης A7.4. Ο μέσος ρυθμός σίτισης διορθωμένος ως προς την αναπτυξιακή αραίωση, I_g, μπορεί να ληφθεί με διάφορους τρόπους, αλλά ένας πρακτικός και αξιόπιστος τρόπος είναι να χρησιμοποιηθεί η γνωστή σταθερά ρυθμού ανάπτυξης (k_g) για την εκτίμηση του βάρους των υπό δοκιμή ψαριών σε χρονικά σημεία κατά τη φάση πρόσληψης, δηλ.:

$$W_f(t) = W_{f,0} \times e^{k_g \cdot t} \qquad \text{[Εξίσωση A7.2]}$$

όπου

$W_f(t)$ = το μέσο βάρος ψαριών την ημέρα πρόσληψης t

$W_{f,0}$ = το μέσο βάρος ψαριών στην έναρξη του πειράματος

Με αυτό τον τρόπο, μπορεί να εκτιμηθεί (τουλάχιστον) το μέσο βάρος των ψαριών την τελευταία ημέρα έκθεσης ($W_{f,\text{end-of-uptake}}$). Δεδομένου ότι ο ρυθμός σίτισης καθορίστηκε με βάση την τιμή $W_{f,0}$, ο πραγματικός ρυθμός σίτισης για κάθε ημέρα πρόσληψης μπορεί να υπολογιστεί με τη χρήση αυτών των δύο τιμών βάρους. Ακολούθως, μπορεί να υπολογιστεί ο διορθωμένος ως προς την ανάπτυξη ρυθμός σίτισης, I_g (g τροφής g^{-1} ψαριών ημέρα^{-1}), για να χρησιμοποιηθεί αντί της I σε περιπτώσεις ταχείας ανάπτυξης κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης, ως

$$I_g = \frac{I \times W_{f,0}}{W_{f,end\text{-}of\text{-}uptake}} \qquad \text{[Εξίσωση A7.3]}$$

Όταν έχει συναχθεί η απόδοση της αφομοίωσης, ο BMF μπορεί να υπολογιστεί πολλαπλασιαζόμενος επί τη σταθερά ρυθμού σίτισης I (ή I_g, εάν χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του α) και διαιρώντας το αποτέλεσμα διά της συνολικής σταθεράς ρυθμού αποβολής k_2:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_2} \qquad \text{[Εξίσωση A7.4]}$$

Ο διορθωμένος κατά την ανάπτυξη συντελεστής βιομεγέθυνσης θα πρέπει επίσης να υπολογίζεται κατά τον ίδιο τρόπο, χρησιμοποιώντας τη διορθωμένη ως προς την ανάπτυξη σταθερά ρυθμού αποβολής (όπως συνάγεται σύμφωνα με το τμήμα 7 στο προσάρτημα 5). Και σε αυτή την περίπτωση, εάν η I_g έχει χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της α, θα πρέπει επίσης να χρησιμοποιηθεί εδώ αντί της I:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_{2g}} \qquad \text{[Εξίσωση A7.5]}$$

όπου:

α = απόδοση της αφομοίωσης (απορρόφηση της υπό δοκιμή ουσίας στο πεπτικό σύστημα)·

k_2 = συνολική (χωρίς διόρθωση ως προς την ανάπτυξη) σταθερά ρυθμού αποβολής (ημέρα^{-1}), υπολογιζόμενη σύμφωνα με τις εξισώσεις στο προσάρτημα 5, τμήμα 3·

▼M7

k_{2g} = διορθωμένη ως προς την ανάπτυξη σταθερά ρυθμού αποβολής (ημέρα^{-1})·

I = σταθερά ρυθμού λήψης τροφής (g τροφής g^{-1} ψαριών ημέρα^{-1})·

Ο διορθωμένος ως προς την ανάπτυξη χρόνος υποδιπλασιασμού ($(t_{1/2})$ υπολογίζεται ως εξής.

$$t_{1/2} = \frac{0{,}693}{k_{2g}} \qquad \text{[Εξίσωση A7.6]}$$

Η απόδοση της αφομοίωσης της ουσίας από την τροφή μπορεί επίσης να εκτιμηθεί εάν προσδιοριστούν τα υπολείμματα στους ιστούς κατά το γραμμικό στάδιο της φάσης πρόσληψης (μεταξύ των ημερών 1 και 3). Στην περίπτωση αυτή, η απόδοση της αφομοίωσης της ουσίας (α) μπορεί να προσδιοριστεί ως εξής

$$\alpha = \frac{C_{fish}(t)}{I \times C_{food} \times t} \qquad \text{[Εξίσωση A7.7]}$$

όπου:

$C_{\text{fish}}(t)$ = η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στα ψάρια στον χρόνο t (mg kg^{-1} νωπού βάρους).

4. ΔΙΟΡΘΩΣΗ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΑ ΛΙΠΙΔΙΑ

Εάν το λιπιδικό περιεχόμενο μετρηθεί στα ίδια ψάρια στα οποία γίνεται χημική ανάλυση, για όλα τα διαστήματα δειγματοληψίας, οι ατομικές συγκεντρώσεις θα πρέπει να διορθώνονται με βάση την περιεκτικότητα σε λιπίδια και να χαράσσεται η καμπύλη του ln(συγκέντρωση διορθωμένη ως προς τα λιπίδια) σε συνάρτηση με την αποβολή (ημέρα) για να συναχθούν οι $C_{0,\text{d}}$ και k_2. Τότε μπορεί να υπολογιστεί η απόδοση της αφομοίωσης (εξίσωση A7.1) βάσει των λιπιδίων, με τη χρήση της C_{food} βάσει των λιπιδίων (δηλ. η C_{food} πολλαπλασιάζεται επί το μέσο λιπιδικό κλάσμα της τροφής). Ο συνακόλουθος υπολογισμός με τη χρήση των εξισώσεων A7.4 και A 7.5 θα δώσει απευθείας τον διορθωμένο ως προς τα λιπίδια (και διορθωμένο ως προς την αναπτυξιακή αραίωση) BMF.

Διαφορετικά, το μέσο λιπιδικό κλάσμα (κ.β.) στα ψάρια και στην τροφή συνάγονται και για τις ομάδες μεταχείρισης και τις ομάδες μαρτύρων (για την τροφή και τα ψάρια της ομάδας μαρτύρων συνάγονται, συνήθως, από τα στοιχεία που μετρώνται στην έναρξη και τη λήξη της έκθεσης· για τα ψάρια της ομάδας μεταχείρισης, συνάγονται συνήθως από τα δεδομένα που μετρώνται μόνο στο τέλος της έκθεσης). Σε ορισμένες μελέτες, η περιεκτικότητα σε λιπίδια των ψαριών μπορεί να αυξηθεί αισθητά· στις περιπτώσεις αυτές, είναι ορθότερο να χρησιμοποιείται μια μέση συγκέντρωση λιπιδίων στα ψάρια, που υπολογίζεται από τις τιμές που μετρήθηκαν στο τέλος της έκθεσης και στο τέλος της αποβολής. Σε γενικές γραμμές, μόνο τα δεδομένα από την ομάδα μεταχείρισης θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό και των δύο λιπιδικών κλασμάτων.

Ο συντελεστής διόρθωσης ως προς τα λιπίδια (L_c) υπολογίζεται ως εξής:

$$L_C = \frac{L_{fish}}{L_{food}} \qquad \text{[Εξίσωση A7.8]}$$

όπου οι L_{fish} και L_{food} είναι ο μέσος όρος των λιπιδικών κλασμάτων στα ψάρια και την τροφή, αντίστοιχα.

Ο συντελεστής λιπιδικής διόρθωσης χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του συντελεστή βιομεγέθυνσης διορθωμένου ως προς τα λιπίδια (BMF_{L}):

$$BMF_L = \frac{BMF}{L_C} \qquad \text{[Εξίσωση A7.9]}$$

5. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΗΣ ΜΕΤΡΟΥΜΕΝΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΣΕ ΧΡΟΝΟ ΜΗΔΕΝ ($C_{0,\text{M}}$) ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΣΕ ΧΡΟΝΟ ΜΗΔΕΝ ($C_{0,\text{D}}$)

Η μετρούμενη συγκέντρωση σε χρόνο 0 ($C_{0,\text{m}}$) και η παράγωγη συγκέντρωση σε χρόνο 0 ($C_{0,\text{d}}$) θα πρέπει να συγκρίνονται. Εάν είναι πολύ παρόμοιες, αυτό συνηγορεί υπέρ του μοντέλου πρώτης τάξης που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των παραμέτρων της αποβολής.

▼M7

Σε ορισμένες μελέτες ενδέχεται να υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ της παράγωγης τιμής σε χρόνο 0, $C_{0,d}$, και της μέσης μετρηθείσας συγκέντρωσης σε χρόνο 0. $C_{0,m}$ (βλ. τελευταίο σημείο της παραγράφου 159 της παρούσας μεθόδου δοκιμών). Εάν η $C_{0,d}$ είναι υπερβολικά χαμηλότερη από τη $C_{0,m}$ ($C_{0,d} << C_{0,m}$), η διαφορά μπορεί να υποδηλώνει την παρουσία άπεπτης εμβολιασμένης τροφής στο πεπτικό σύστημα. Αυτό μπορεί να ελεγχθεί πειραματικά με τη διενέργεια χωριστής ανάλυσης στον εκτμηθέντα γαστρεντερικό σωλήνα, εάν ελήφθησαν και φυλάχθηκαν πρόσθετα δείγματα (ολόκληρα ψάρια) στο τέλος της φάσης πρόσληψης. Διαφορετικά, εάν η εφαρμογή στατιστικά έγκυρου ελέγχου έκτοπων τιμών στη γραμμική παλινδρόμηση της φάσης αποβολής δείχνει ότι το πρώτο δειγματικό σημείο της αποβολής είναι εσφαλμένα υψηλό, μπορεί να ενδείκνυται η συναγωγή της k_2 από τη γραμμική παλινδρόμηση, εξαιρουμένου όμως του πρώτου σημείου συγκέντρωσης αποβολής. Σε τέτοιες περιπτώσεις, εάν η αβεβαιότητα της γραμμικής παλινδρόμησης μειώνεται σημαντικά και είναι σαφές ότι η αποβολή ακολουθεί κατά προσέγγιση κινητική πρώτης τάξης, μπορεί να είναι σκόπιμο να χρησιμοποιηθούν οι προκύπτουσες τιμές $C_{0,d}$ και k_2 για τον υπολογισμό της απόδοσης αφομοίωσης. Αυτό θα πρέπει να αιτιολογείται διεξοδικά στην έκθεση. Είναι επίσης δυνατόν να μην ακολουθείται κινητική πρώτης τάξης κατά τη φάση αποβολής. Εάν υπάρχει τέτοια πιθανότητα (δηλ. το διάγραμμα των λογαριθμικά μετασχηματισμένων δεδομένων φαίνεται να είναι κυρτό σε σύγκριση με το ευθύγραμμο διάγραμμα της γραμμικής παλινδρόμησης), οι υπολογισμοί των τιμών κατά πάσα πιθανότητα δεν είναι έγκυροι και θα πρέπει να ζητείται η γνώμη βιοστατιστικολόγου.

Εάν η $C_{0,d}$ είναι πολύ μεγαλύτερη από τη μετρηθείσα τιμή ($C_{0,d} >> C_{0,m}$), αυτό μπορεί να δείχνει ότι η ουσία αποβλήθηκε με ταχύτατο ρυθμό (δηλ. τα χρονικά σημεία δειγματοληψίας προσέγγισαν το όριο ποσοτικοποίησης της αναλυτικής μεθόδου πολύ νωρίς κατά τη φάση αποβολής, βλ. τμήμα 6 κατωτέρω)· η αποβολή αποκλίνει από την κινητική πρώτης τάξης· η γραμμική παλινδρόμηση για τον υπολογισμό της k_2 και της $C_{0,d}$ είναι εσφαλμένη· ή υπήρξε πρόβλημα με τις μετρήσεις των συγκεντρώσεων στη μελέτη σε ορισμένα χρονικά σημεία δειγματοληψίας. Στις περιπτώσεις αυτές, το διάγραμμα της γραμμικής παλινδρόμησης θα πρέπει να ελέγχεται σχολαστικά για τον εντοπισμό δειγμάτων που φθάνουν ή προσεγγίζουν το όριο ποσοτικοποίησης, έκτοπων τιμών και εμφανούς κυρτότητας (ενδεικτική κινητικής που δεν είναι πρώτης τάξης) και αυτό να επισημαίνεται στην έκθεση. Κάθε μεταγενέστερη επαναξιολόγηση της γραμμικής παλινδρόμησης για τη βελτίωση των εκτιμώμενων τιμών θα πρέπει να περιγράφεται και να αιτιολογείται. Εάν παρατηρείται σημαντική απόκλιση από την κινητική πρώτης τάξης, οι υπολογισμοί των τιμών k_2 και $C_{0,d}$ κατά πάσα πιθανότητα δεν είναι έγκυροι και θα πρέπει να ζητείται η γνώμη βιοστατιστικολόγου.

6. ΚΑΘΟΔΗΓΗΣΗ ΓΙΑ ΤΙΣ ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΟΥΣΙΕΣ ΜΕ ΤΑΧΥΤΑΤΟ ΡΥΘΜΟ ΑΠΟΒΟΛΗΣ

Όπως εξηγείται στην παράγραφο 129 της μεθόδου δοκιμών, ορισμένες ουσίες ενδέχεται να αποβάλλονται με τόσο ταχύ ρυθμό, ώστε να μην μπορούν να υπολογιστούν αξιόπιστες τιμές συγκέντρωσης σε χρόνο 0, $C_{0,d}$, και σταθεράς k_2, επειδή η ουσία δεν μετράται πλέον αποτελεσματικά (αναφέρονται συγκεντρώσεις στο όριο ποσοτικοποίησης) στα δείγματα που λαμβάνονται πολύ νωρίς κατά τη φάση αποβολής (δηλ. από το δεύτερο δείγμα αποβολής και τα επόμενα). Η περίπτωση αυτή παρατηρήθηκε στη διεργαστηριακή δοκιμή τεχνικής ικανότητας, που διεξήχθη με βενζο[a]πυρένιο για την υποστήριξη της παρούσας μεθόδου δοκιμών, και έχει καταγραφεί στην έκθεση επικύρωσης της μεθόδου. Στις περιπτώσεις αυτές δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί αξιόπιστη γραμμική παλινδρόμηση και είναι πιθανό να προκύψει εξωπραγματικά υψηλή εκτίμηση της $C_{0,d}$, με αποτέλεσμα απόδοση αφομοίωσης πολύ μεγαλύτερη από 1. Είναι δυνατόν να γίνει συντηρητική εκτίμηση της k_2 και να υπολογιστεί BMF φραγμένος προς τα άνω στις περιπτώσεις αυτές.

Με την εφαρμογή γραμμικής παλινδρόμησης (λογαριθμικά μετασχηματισμένη συγκέντρωση σε συνάρτηση με το χρόνο) στα σημεία δεδομένων από τη φάση αποβολής στα οποία μετρήθηκε η συγκέντρωση, μέχρι και την πρώτη συγκέντρωση στην οποία δεν ανιχνεύεται η ουσία (συγκέντρωση στο όριο ποσοτικού προσδιορισμού), λαμβάνεται εκτίμηση της k_2. Στις συγκεκριμένες περιπτώσεις θα πρόκειται πιθανότατα για δύο μόνο σημεία δεδομένων (π.χ. ημέρες 1 και 2 της φάσης αποβολής), οπότε η k_2 μπορεί να εκτιμηθεί σύμφωνα με την εξίσωση A 5.22 του προσαρτήματος 5. Η εν λόγω εκτίμηση της k_2 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εκτιμηθεί η απόδοση αφομοίωσης σύμφωνα με την εξίσωση A7.1, με αντικατάσταση της τιμής $C_{0,d}$ στην εξίσωση με τη μετρηθείσα συγκέντρωση σε χρόνο 0 ($C_{0,m}$), όταν

▼**M7**

εκτιμάται με βεβαιότητα ότι η $C_{0,d}$ είναι πολύ υψηλότερη από εκείνη που θα μπορούσε να έχει επιτευχθεί στη δοκιμή. Εάν η $C_{0,m}$ δεν είναι μετρήσιμη, θα πρέπει να χρησιμοποιείται το όριο ανίχνευσης στους ιστούς των ψαριών. Εάν, σε ορισμένες περιπτώσεις, αυτό συνεπάγεται τιμή α > 1, τεκμαίρεται απόδοση αφομοίωσης ίση με 1 ως «χειρότερη περίπτωση».

Μπορεί κατόπιν να εκτιμηθεί ο μέγιστος BMF_K με τη χρήση της εξίσωσης Α7.4, ο οποίος θα πρέπει να αναφέρεται ως τιμή «πολύ μικρότερη από» (<<). Για παράδειγμα, σε μελέτη με ρυθμό σίτισης 3 %, χρόνο υποδιπλασιασμού κατά την αποβολή μικρότερο από 3 ημέρες και α «χειρότερης περίπτωσης» ίση με 1, ο BMF_K θα είναι πιθανότατα χαμηλότερος από 0,13 περίπου. Λαμβανομένων υπόψη του στόχου της εκτίμησης και του γεγονότος ότι οι τιμές θα είναι συντηρητικές, δεν είναι απαραίτητο να διορθώνονται ως προς την αναπτυξιακή αραίωση ή την περιεκτικότητα των ψαριών και της τροφής σε λιπίδια.

▼M7

Προσάρτημα 8

ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΠΡΟΣΩΡΙΝΩΝ BCF ΑΠΟ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΠΟΥ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΝΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗΣ ΕΚΘΕΣΗΣ

Η μέθοδος διατροφικής έκθεσης περιλαμβάνεται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών με σκοπό τον έλεγχο της βιοσυσσώρευσης ουσιών που δεν μπορούν, στην πράξη, να υποβληθούν σε δοκιμές με χρήση της μεθόδου υδατικής έκθεσης. Η μέθοδος υδατικής έκθεσης παρέχει συντελεστή βιοσυγκέντρωσης, ενώ η μέθοδος διατροφικής έκθεσης δίνει άμεσα πληροφορίες σχετικά με το δυναμικό βιομεγέθυνσης της διατροφής. Σε πολλά συστήματα ασφάλειας χημικών προϊόντων απαιτούνται πληροφορίες σχετικά με τη βιοσυγκέντρωση στο υδάτινο περιβάλλον (π.χ. για την εκτίμηση κινδύνου, καθώς και στο Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης GHS). Ως εκ τούτου, είναι αναγκαίο να χρησιμοποιούνται τα δεδομένα που προκύπτουν από μελέτες διατροφικής έκθεσης για την εκτίμηση συντελεστή βιοσυγκέντρωσης που να είναι συγκρίσιμος με εκείνον που προκύπτει από δοκιμές με τη μέθοδο της υδατικής έκθεσης ([1]). Στο παρόν τμήμα εξετάζονται προσεγγίσεις που μπορούν να εφαρμοστούν για τον σκοπό αυτό, μολονότι αναγνωρίζονται οι εγγενείς αδυναμίες των εκτιμήσεων.

Στη μελέτη διατροφικής έκθεσης μετράται η αποβολή για να ληφθεί η σταθερά ρυθμού αποβολής k_2. Εάν η σταθερά ρυθμού πρόσληψης μπορεί να εκτιμηθεί με τα διαθέσιμα δεδομένα για την περίπτωση κατά την οποία τα ψάρια έχουν εκτεθεί στην υπό δοκιμή ουσία μέσω του νερού, είναι δυνατόν να εκτιμηθεί κινητικός BCF.

Η εκτίμηση της σταθεράς ρυθμού πρόσληψης μιας υπό δοκιμή ουσίας μέσω υδατικής έκθεσης εξαρτάται από πολλές παραδοχές, οι οποίες συνολικά συντελούν στην αβεβαιότητα της εκτίμησης. Επιπλέον, αυτή η προσέγγιση για την εκτίμηση του BCF υποθέτει ότι ο συνολικός ρυθμός αποβολής (συμπεριλαμβανομένων συντελεστικών παραγόντων όπως η κατανομή στο σώμα και οι ατομικές διεργασίες αποβολής) είναι ανεξάρτητος από την τεχνική έκθεσης που χρησιμοποιείται για την παραγωγή φόρτου της υπό δοκιμή ουσίας στο σώμα.

Οι βασικές εγγενείς παραδοχές της εκτιμητικής προσέγγισης μπορούν να συνοψιστούν ως εξής.

Η αποβολή κατόπιν διατροφικής πρόσληψης είναι η ίδια με την αποβολή κατόπιν υδατικής έκθεσης για δεδομένη ουσία

Η πρόσληψη από το νερό ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης

Ανάλογα με τη μέθοδο που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της πρόσληψης:

— η πρόσληψη μπορεί να συσχετιστεί μόνο με το βάρος των ψαριών

— η πρόσληψη μπορεί να συσχετιστεί μόνο με τον συντελεστή κατανομής της ουσίας σε μείγμα οκτανόλης-νερού

— η πρόσληψη μπορεί να συσχετιστεί με συνδυασμό του βάρους των ψαριών και του συντελεστή κατανομής της ουσίας σε μείγμα οκτανόλης-νερού

— οι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν στην πράξη την πρόσληψη σε μελέτες υδατικής έκθεσης, όπως η βιοδιαθεσιμότητα της ουσίας, η προσρόφηση στις συσκευές, το μοριακό μέγεθος κ.λπ., έχουν ελάχιστη επίδραση

— και, το κυριότερο:

Η βάση δεδομένων («εκπαιδευτικό σύνολο δεδομένων») που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη της μεθόδου εκτίμησης της πρόσληψης είναι αντιπροσωπευτική της εξεταζόμενης ουσίας

Σε διάφορες δημοσιεύσεις στη βιβλιογραφία ελεύθερης πρόσβασης έχουν διατυπωθεί εξισώσεις που συνδέουν την πρόσληψη από το νερό στα ψάρια μέσω των βραγχίων με τον συντελεστή κατανομής των ουσιών σε οκτανόλη-νερό, το βάρος των ψαριών (1) (2) (3) (4), τον όγκο και/ή την περιεκτικότητα σε λιπίδια, τη διαπερατότητα/διάχυση διαμέσου μεμβρανών (5) (6), τον αναπνευστικό όγκο των

([1]) Στη φύση, η οδός που οδηγεί στη μεγαλύτερη έκθεση σε πολύ υδρόφοβες ουσίες στο υδάτινο περιβάλλον είναι πιθανότατα η πρόσληψη τροφής και, επομένως, οι κατ' εκτίμηση BCF δεν είναι απόλυτα αντιπροσωπευτικοί του δυναμικού βιοσυσσώρευσης των εν λόγω ουσιών.

▼M7

ψαριών (7), καθώς και με προσέγγιση τάσης διαφυγής/ισοζυγίου μάζας (8) (9) (10). Λεπτομερής αξιολόγηση των σχετικών μεθόδων στο πλαίσιο αυτό παρέχεται στην εργασία των Crookes & Brooke (11). Μια δημοσίευση του Barber (12), εστιασμένη στη μοντελοποίηση της βιοσυσσώρευσης μέσω διατροφικής πρόσληψης, είναι επίσης χρήσιμη εν προκειμένω, καθώς περιλαμβάνει συνεισφορές από μοντέλα ρυθμού πρόσληψης μέσω των βραγχίων. Στο ίδιο θέμα ήταν επίσης αφιερωμένο ένα τμήμα του εγγράφου τεκμηρίωσης που συνόδευε το πρωτόκολλο του 2004 για τη διατροφική έκθεση.

Τα περισσότερα από τα μοντέλα αυτά φαίνεται να έχουν προκύψει από περιορισμένες βάσεις δεδομένων. Όσον αφορά τα μοντέλα, στην περίπτωση των οποίων είναι διαθέσιμα τα στοιχεία της βάσης δεδομένων που χρησιμοποιήθηκε για τον σχεδιασμό τους, φαίνεται ότι τα είδη ουσιών που χρησιμοποιούνται είναι συχνά ανάλογης δομής ή χημικής τάξης (από την άποψη της λειτουργίας, π.χ. οργανοχλωριούχες ενώσεις). Αυτό επαυξάνει την αβεβαιότητα της χρήσης ενός μοντέλου για την πρόβλεψη σταθεράς ρυθμού πρόσληψης για διαφορετικό είδος ουσιών, επιπλέον ζητημάτων που αφορούν ειδικά στη δοκιμή, όπως το ζωικό είδος, η θερμοκρασία κ.λπ.

Σε επισκόπηση των διαθέσιμων τεχνικών (11) τονίζεται ότι καμία μέθοδος δεν είναι «ορθότερη» από τις υπόλοιπες. Ως εκ τούτου, θα πρέπει να αιτιολογείται με σαφήνεια η επιλογή του χρησιμοποιούμενου μοντέλου. Εάν είναι διαθέσιμες περισσότερες της μίας μέθοδοι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν δικαιολογημένα, θα ήταν συνετό να παρουσιάζονται περισσότερες της μίας εκτιμήσεις της k_1 (και, κατ' επέκταση, του BCF) ή ένα εύρος τιμών k_1 (και BCF), σύμφωνα με διάφορες μεθόδους εκτίμησης της πρόσληψης. Ωστόσο, δεδομένων των διαφορών ανάμεσα στους τύπους μοντέλων και στα σύνολα δεδομένων που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξή τους, η λήψη μέσης τιμής από εκτιμήσεις που έχουν προκύψει με διαφορετικούς τρόπους δεν θα ήταν ενδεδειγμένη.

Ορισμένοι ερευνητές κρίνουν ότι αυτού του είδους οι εκτιμήσεις BCF χρειάζονται διόρθωση ως προς τη βιοδιαθεσιμότητα για να λαμβάνεται υπόψη η προσρόφηση των ουσιών σε διαλυμένο οργανικό άνθρακα (DOC) σε συνθήκες υδατικής έκθεσης, ώστε να συμφωνεί η εκτίμηση με τα αποτελέσματα των μελετών υδατικής έκθεσης [π.χ. (13) (14)]. Ωστόσο, η διόρθωση αυτή μπορεί να μην είναι κατάλληλη, δεδομένων των χαμηλών επιπέδων DOC που απαιτούνται στις μελέτες υδατικής έκθεσης για την εκτίμηση «χειρότερης περίπτωσης» (δηλ. λόγος της βιοδιαθέσιμης ουσίας προς την ουσία που μετριέται στο διάλυμα). Για εξαιρετικά υδρόφοβες ουσίες, η πρόσληψη από τα βράγχια μπορεί να περιορίζεται από τον ρυθμό παθητικής διάχυσης κοντά στην επιφάνεια των βραγχίων· στην περίπτωση αυτή, η διόρθωση ενδέχεται να αντισταθμίζει αυτό το φαινόμενο, αντί για το επιθυμητό.

Συνιστάται να επικεντρωθεί το ενδιαφέρον σε μεθόδους που απαιτούν παραμέτρους για τις οποίες υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα για ουσίες που δοκιμάζονται με τη μελέτη διατροφικής έκθεσης η οποία περιγράφεται στο παρόν κεφάλαιο (δηλ. log K_{OW}, βάρος ψαριών). Άλλες μέθοδοι που προϋποθέτουν πιο πολύπλοκα δεδομένα εισαγωγής μπορούν να εφαρμόζονται, αλλά ενδέχεται να απαιτούν πρόσθετες μετρήσεις κατά τη διάρκεια της δοκιμής ή λεπτομερείς γνώσεις σχετικά με τις υπό δοκιμή ουσίες ή τα είδη ψαριών, που μπορεί να μην είναι ευρέως διαθέσιμες. Επιπλέον, η επιλογή του μοντέλου μπορεί να επηρεαστεί από το επίπεδο της επικύρωσης και το πεδίο εφαρμογής [βλ. (11) για επισκόπηση και σύγκριση των διαφόρων μεθόδων].

Υπενθυμίζεται ότι η προκύπτουσα εκτίμηση της k_1 και ο κατ' εκτίμηση BCF είναι αβέβαιες τιμές και μπορεί να χρειάζονται επεξεργασία με προσέγγιση ανάλυσης του βάρους της απόδειξης, παράλληλα με τον παράγωγο BMF και τις παραμέτρους της ουσίας (π.χ. μοριακό μέγεθος) για να διαμορφωθεί συνολική εικόνα του δυναμικού βιοσυσσώρευσης της ουσίας. Η ερμηνεία και η χρήση των παραμέτρων αυτών μπορεί να εξαρτάται από το ρυθμιστικό πλαίσιο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Sijm D.T.H.M., Pärt P. and Opperhuizen A. (1993), The influence of temperature on the uptake rate constants of hydrophobic compounds determined by the isolated perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 25: 1-14.

(2) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., Part P. and Opperhuizen A. (1994), Experimentally determined blood and water flow limitations for uptake of hydrophobic compounds using perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Allometric applications. Aquat. Toxicol. 30: 325-341.

(3) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

▼M7

(4) Barber M.C. (2003), A review and comparison of models for predicting dynamic chemical bioconcentration in fish. Environ. Toxicol. Chem. 22: 1963-1992.

(5) Opperhuizen A. (1986), Bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish, in Aquatic Toxicology and Environmental Fate, STP 921, Poston, T.M. and Purdy, R., Editors. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA: 304-315.

(6) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems. Environ. Toxicol. Chem. 23: 2343-2355.

(7) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environ. Sci. Technol. 23: 699-707.

(8) Hendriks A.J., van der Linde A., Cornelissen G. and Sijm D.T.H.M. (2001). The power of size. 1. Rate constants and equilibrium ratios for accumulation of organic substances related to octanol-water partition ratio and species weight. Environ. Toxicol. Chem. 20: 1399-1420.

(9) Campfens J. and Mackay D. (1997), Fugacity-based model of PCB bioaccumulation in complex aquatic food webs. Environ. Sci. Technol. 31: 577-583.

(10) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2003), A generic QSAR for assessing the bioaccumulation potential of organic chemicals in aquatic food webs. QSAR Comb. Sci. 22: 337-345.

(11) Crookes M. and Brooke D. (2010), Estimation of fish bioconcentration factor (BCF) from depuration data. Draft Report. Environmental Agency, Bristol, UK.

(12) Barber M.C. (2008), Dietary uptake models used for modelling the bioaccumulation of organic contaminants in fish. Environ. Toxicol. Chem. 27: 755-777

(13) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

(14) Gobas F. and Morrison H. (2000), Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment, in Handbook of property estimation methods for chemicals, Boethling, R.S. and Mackay, D., Editors. Lewis Publishers, Boca Racton, FL, USA: 189-231.

▼B

Γ.14. ΔΟΚΙΜΗ ΝΕΑΝΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΨΑΡΙΩΝ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η δοκιμή αυτή τοξικότητας κατά την ανάπτυξη αποτελεί αντιγραφή της OECD TG 215 (2000).

1.1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα δοκιμή αποσκοπεί στην εκτίμηση των επιπτώσεων της παρατεταμένης έκθεσης σε χημικές ουσίες επί της ανάπτυξης νεαρών ψαριών. Βασίζεται σε μέθοδο, η οποία αναπτύχθηκε και δοκιμάστηκε διεργαστηριακά (1) (3) στην Ευρωπαϊκή Ένωση, για την εκτίμηση της επίδρασης χημικών ουσιών στην ανάπτυξη νεαρών ατόμων ιριδίζουσας πέστροφας *(Oncorynchus mykiss)* υπό συνθήκες συνεχούς ροής. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα καλώς τεκμηριωμένα είδη. Για παράδειγμα, υπάρχουν εμπειρίες από παρόμοιες δοκιμές με ζεβρόψαρα (*Danio rerio*) (2) (4) (5) και ρυζόψαρα (medaka, *Oryzias Wipes)* (6) (7) (8).

Βλέπε επίσης γενική εισαγωγή μέρος Γ.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Κατώτατη συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται επίδραση (LOEC): είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση υπό δοκιμή ουσίας στην οποία παρατηρείται σημαντική επίδραση της ουσίας (με $\rho < 0,05$) όταν συγκρίνεται με τον μάρτυρα. Όλες όμως οι χρησιμοποιούμενες στη δοκιμή πάνω από την LOEC συγκεντρώσεις πρέπει να έχουν επιβλαβή επίδραση ίση ή μεγαλύτερη από εκείνη που παρατηρείται στη LOEC.

Συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρείται επίδραση (NOEC): είναι η αμέσως κάτω από την LOEC συγκέντρωση δοκιμής.

EC_x: στην παρούσα μέθοδο δοκιμής, είναι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας η οποία προκαλεί × % απόκλιση στο βαθμό ανάπτυξης του ψαριού σε σύγκριση με τους μάρτυρες.

Πληθυσμιακός φόρτος: είναι το υγρό βάρος των ψαριών κατ' όγκο νερού.

Πυκνότητα πληθυσμού: είναι ο αριθμός των ψαριών κατ' όγκο νερού.

Ιδιαίτερος βαθμός ανάπτυξης μεμονωμένου ψαριού: εκφράζει το βαθμό ανάπτυξης ενός μεμονωμένου ατόμου με βάση το αρχικό του βάρος.

Μέσος ιδιαίτερος βαθμός ανάπτυξης δεξαμενής: εκφράζει το μέσο βαθμό ανάπτυξης του πληθυσμού μιας δεξαμενής σε μια ορισμένη συγκέντρωση.

«Ψευδο» ιδιαίτερος βαθμός ανάπτυξης: εκφράζει το βαθμό ανάπτυξης μεμονωμένου ατόμου σε σύγκριση με το μέσο αρχικό βάρος του πληθυσμού μιας δεξαμενής.

▼B

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Νεαρά ψάρια στη φάση της εκθετικής ανάπτυξης φέρονται, αφού ζυγιστούν, σε θαλάμους δοκιμής και εκτίθενται σε μια σειρά υποθανατηφόρων συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή ουσίας διαλελυμένης σε νερό, κατά προτίμηση υπό συνθήκες συνεχούς ροής ή, αν δεν είναι δυνατό, υπό κατάλληλες ημιστατικές (στατική ανανέωση) συνθήκες. Η διάρκεια της δοκιμής είναι 28 ημέρες. Τα ψάρια τρέφονται καθημερινά. Το σιτηρέσιο βασίζεται στα αρχικά βάρη των ψαριών και μπορεί να αναπροσαρμοστεί μετά από 14 ημέρες. Στο τέλος της δοκιμής, τα ψάρια ξαναζυγίζονται. Οι επιπτώσεις στο βαθμό ανάπτυξης αναλύονται χρησιμοποιώντας μοντέλο αναγωγής για να εκτιμηθεί η συγκέντρωση που μπορεί να προκαλέσει *χ %* απόκλιση στο βαθμό ανάπτυξης, δηλαδή EC_X (π.χ.. EC_{10}, EC_{20}, ή EC_{30}). Εναλλακτικά, τα δεδομένα μπορούν να συγκριθούν με τιμές μαρτύρων για να προσδιοριστεί η κατώτατη συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται επίδραση (LOEC) και, κατά συνέπεια, η συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρείται επίδραση (NOEC).

1.4. ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΟΥΣΙΑ

Θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμα τα αποτελέσματα δοκιμής οξείας τοξικότητας (βλέπε μέθοδο δοκιμής Γ.1) πραγματοποιηθείσας, κατά προτίμηση, με το είδος που επιλέχθηκε για τη δοκιμή αυτή. Αυτό σημαίνει ότι η υδατοδιαλυτότητα και η τάση ατμών της υπό δοκιμή ουσίας είναι γνωστές και υπάρχει διαθέσιμη αξιόπιστη αναλυτική μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ουσίας στα διαλύματα δοκιμής με γνωστή και δημοσιευμένη ορθότητα (accuracy) και όριο ανίχνευσης.

Στις χρήσιμες πληροφορίες περιλαμβάνονται ο συντακτικός τύπος, η καθαρότητα της ουσίας, η σταθερότητα στο νερό και το φως, η pK_a η P_{ow} και αποτελέσματα δοκιμής ως προς την άμεση βιοαποικοδομησιμότητα (βλέπε μέθοδο δοκιμής Γ.4).

1.5. ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Για να είναι έγκυρη η δοκιμή, επιβάλλονται οι ακόλουθες συνθήκες:

— η θνησιμότητα στον ή στους μάρτυρες να μην υπερβαίνει το 10 % στο τέλος της δοκιμής,

— το μέσο βάρος των ψαριών στον ή στους μάρτυρες να έχει αυξηθεί αρκετά ώστε να είναι δυνατός ο εντοπισμός της ελάχιστης απόκλισης του βαθμού ανάπτυξης που θεωρείται ως στατιστικώς σημαντική. Διεργαστηριακές δοκιμές (3) έχουν δείξει ότι για την ιριδίζουσα πέστροφα, το μέσο βάρος των ψαριών στους μάρτυρες πρέπει να έχει αυξηθεί τουλάχιστον κατά το ήμισυ (δηλαδή κατά 50 %) του μέσου αρχικού τους βάρους μέσα σε 28 ημέρες, π.χ., αρχικό βάρος 1 g/ψάρι (= 100 %), τελικό βάρος μετά 28 ημέρες: > 1,5 g/ψάρι (> 150 %),

— η συγκέντρωση του διαλελυμένου οξυγόνου να είναι τουλάχιστον το 60 % της τιμής κορεσμού σε αέρα (ΤΚΑ) σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής,

— η θερμοκρασία του νερού μεταξύ των θαλάμων δοκιμής να μη διαφέρει περισσότερο του ± 1 °C σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή κατά τη διάρκεια της δοκιμής και να διατηρείται με δυνατότητα απόκλισης 2 °C στην περιοχή των θερμοκρασιών που ορίζεται για το υπό δοκιμή είδος (προσάρτημα 1).

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.6.1. **Εξοπλισμός**

Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός και, ειδικότερα, τα ακόλουθα:

α) οξυγονόμετρο και pHμετρο·

▼B

β) εξοπλισμός για τον προσδιορισμό της σκληρότητας και αλκαλικότητας του νερού·

γ) κατάλληλη συσκευή για τον έλεγχο της θερμοκρασίας με δυνατότητα συνεχούς, κατά προτίμηση, παρακολούθησης·

δ) δεξαμενές κατασκευασμένες από χημικώς αδρανές υλικό και κατάλληλης χωρητικότητας ανάλογα με τη συνιστώμενη φόρτιση και την πυκνότητα πληθυσμού (βλέπε σημείο 1.8.5 και παράρτημα 1)·

ε) ζυγός κατάλληλης ορθότητας (δηλαδή ορθότητα έως ± 0,5 %).

1.6.2. **Νερό**

Ως νερό δοκιμής μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε νερό στο οποίο το υπό δοκιμή είδος εμφανίζει την ενδεδειγμένη μακροπρόθεσμη επιβίωση και ανάπτυξη. Θα πρέπει να είναι σταθερής ποιότητας κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Το pH του νερού θα πρέπει να είναι της τάξεως του 6,5 έως 8,5, κατά τη διάρκεια όμως μιας δεδομένης δοκιμής δεν θα πρέπει να κυμαίνεται πέραν των ± 0,5 μονάδων pH. Η σκληρότητα συνιστάται να είναι πάνω από 140 mg/l (ως $CaC0_3$). Για να εξασφαλίζεται ότι το νερό αραίωσης δεν θα επηρεάσει το αποτέλεσμα της δοκιμής (π.χ. με τη δημιουργία συμπλόκων με την υπό δοκιμή ουσία), θα πρέπει κατά διαστήματα να λαμβάνονται δείγματα για ανάλυση. Όταν το νερό αραίωσης είναι γνωστό ως σχετικώς σταθερό από ποιοτικής πλευράς, θα πρέπει, π.χ. κάθε τρεις μήνες, να γίνονται μετρήσεις βαρέων μετάλλων (π.χ. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd και Ni), βασικών ανιόντων και κατιόντων (π.χ. Ca, Mg, Na, K, C1 και $S0_4$), γεωργικών φαρμάκων (π.χ. συνολικών οργανοφωσφορικών και συνολικών οργανοχλωριούχων φαρμάκων), ολικού οργανικού άνθρακα και αιωρούμενων στερεών σωματιδίων. Εάν η ποιότητα του νερού έχει αποδειχθεί ότι μένει σταθερή για ένα, τουλάχιστον, χρόνο, τότε οι μετρήσεις μπορούν να γίνονται σε αραιότερα χρονικά διαστήματα (π.χ. κάθε έξι μήνες). Μερικά χημικά χαρακτηριστικά ενός αποδεκτού νερού αραίωσης καταγράφονται στο παράρτημα 2.

1.6.3. **Διαλύματα δοκιμής**

Τα διαλύματα δοκιμής των επιλεγόμενων συγκεντρώσεων παρασκευάζονται με αραίωση αρχικού διαλύματος.

Το αρχικό διάλυμα θα πρέπει, κατά προτίμηση, να παρασκευάζεται με απλή ανάμειξη ή ανακίνηση της υπό δοκιμή ουσίας στο νερό του διαλύματος, χρησιμοποιώντας μηχανικά μέσα (π.χ. ανάδευση ή υπερήχους). Για την επίτευξη κατάλληλου πυκνού αρχικού διαλύματος, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στήλες κορεσμού (στήλες διαλυτότητας).

Σε ορισμένες περιπτώσεις, για την παρασκευή κατάλληλου πυκνοί[1] αρχικού διαλύματος, απορεί να απαιτείται η χρήση διαλυτών η διασπαρτικών μέσων (μέσων διαλυτοποίησης. Παραδείγματα κατάλληλων διαλυτών αποτελούν η ακετόνη, η αιθανόλη, η μεθανόλη, το διμεθυλοσουλφοξείδιο, το διμεθυλοφορμαμίδιο και η τριαιθυλενογλυκόλη. Παραδείγματα κατάλληλων διασπαρτικών μέσων είναι τα Cremophor RH40, Tween 80, Methylcellulose 0,01 % και HCO-40. Όταν χρησιμοποιούνται ευκόλως βιοαποικοδομήσιμα μέσα (π.χ. ακετόνη) ή/και λίαν πτητικές ενώσεις, θα πρέπει να δίδεται ιδιαίτερη προσοχή καθώς είναι ενδεχόμενο, σε δοκιμές συνεχούς ροής, να προκληθούν προβλήματα με ανάπτυξη βακτηρίων. Όταν χρησιμοποιείται μέσο διαλυτοποίησης, αυτό δεν πρέπει να εμφανίζει σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη των ψαριών ούτε ορατά δυσμενή αποτελέσματα στα νεαρά ψάρια που να μπορούν να γίνουν αντιληπτά με απλό και μόνο έλεγχο του διαλύτη.

▼B

Στην περίπτωση δοκιμών συνεχούς ροής, για την επίτευξη των διαφόρων συγκεντρώσεων στους θαλάμους δοκιμών, απαιτείται σύστημα το οποίο να προσάγει συνεχώς και να αραιώνει αρχικό διάλυμα της υπό δοκιμή ουσίας (π.χ. μετρητική αντλία, αναλογικό αραιωτή, σύστημα κορεσμού). Οι ταχύτητες ροής των αρχικών διαλυμάτων και του νερού αραίωσης θα πρέπει να ελέγχονται κατά διαστήματα, κατά προτίμηση κάθε μέρα, κατά τη διάρκεια της δοκιμής και δεν θα πρέπει να κυμαίνονται περισσότερο από 10 % σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Διεργαστηριακή δοκιμή (3) έδειξε ότι, όσον αφορά την ιριδίζουσα πέστροφα, συχνότητα απομάκρυνσης νερού κατά τη διάρκεια της δοκιμής της τάξης των 6 λίτρων/g ψαριού/ημέρα είναι αποδεκτή (βλέπε σημείο 1.8.2.2).

Σε ημιστατικές (ανανέωσης) δοκιμές, η συχνότητα μέσης ανανέωσης εξαρτάται από τη σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας, συνιστάται όμως η καθημερινή ανανέωση του νερού. Εάν, από προκαταρκτικές δοκιμές σταθερότητας (βλέπε σημείο 1.4), η συγκέντρωση της υπό δοκιμής ουσίας δεν είναι σταθερή (δηλαδή είναι εκτός της περιοχής του 80-120 % της ονομαστικής ή πέφτει κάτω από το 80 % της μετρηθείσας αρχικής συγκέντρωσης) κατά την περίοδο ανανέωσης, θα πρέπει να εξετάζεται η περίπτωση χρήσης της δοκιμής συνεχούς ροής.

1.6.4. **Επιλογή του είδους**

Για την παρούσα δοκιμή, το συνιστώμενο είδος είναι η ιριδίζουσα πέστροφα *(Oncorhynchus mykiss),* επειδή υπάρχουν μεγαλύτερες εμπειρίες για το είδος αυτό από διεργαστηριακές δοκιμές (1) (3). Ωστόσο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα καλώς τεκμηριωμένα είδη, η διαδικασία όμως δοκιμής μπορεί να πρέπει να προσαρμοστεί για να ληφθούν οι κατάλληλες συνθήκες δοκιμής. Για παράδειγμα, εμπειρίες υπάρχουν και από τα ζεβρόψαρα *(Danio rerio*) (4) (5) και από τα ρυζόψαρα (medaka, *Oryzias latipes*) (6) (7) (8). Στην περίπτωση αυτή, θα πρέπει να αναφέρεται η αιτιολογία της επιλογής του είδους και η πειραματική μέθοδος.

1.6.5. **Διατήρηση των ψαριών**

Τα προς δοκιμή ψάρια επιλέγονται από μεμονωμένο αρχικό πληθυσμό, κατά προτίμηση της αυτής ωοτοκίας, που έχει διατηρηθεί για δύο εβδομάδες τουλάχιστον πριν από τη δοκιμή, υπό συνθήκες ποιότητας νερού και φωτισμού παρόμοιες με εκείνες που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή. Θα πρέπει να διατρέφονται με σιτηρέσιο αντιστοιχούν κατ' ελάχιστο στο 2 % βάρους σώματος ανά ημέρα και, κατά προτίμηση, στο 4 % βάρους σώματος ανά ημέρα, καθ' όλη την περίοδο διατήρησης και κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

Αφού περάσει ένα προκαταρκτικό 48ωρο διάστημα, καταγράφονται τα ποσοστά θνησιμότητας και εφαρμόζονται τα ακόλουθα κριτήρια:

— ποσοστά θνησιμότητας άνω του 10 % του πληθυσμού σε επτά ημέρες: απορρίπτεται ολόκληρη η παρτίδα,

— ποσοστά θνησιμότητας μεταξύ 5 % και 10 % του πληθυσμού: εγκλιματισμός για επτά ακόμη ημέρες. Εάν, κατά τη διάρκεια των επτά επόμενων ημερών, καταγραφεί ποσοστό θνησιμότητας άνω του 5 %, ολόκληρη η παρτίδα απορρίπτεται,

— ποσοστά θνησιμότητας λιγότερο από το 5 % του πληθυσμού σε επτά ημέρες: η παρτίδα γίνεται αποδεκτή.

Τις δύο εβδομάδες που προηγούνται ή κατά τη διάρκεια της δοκιμής, τα ψάρια δεν θα πρέπει να υποβάλλονται σε αγωγή για ασθένεια.

▼B

1.7. ΣΧΕΔΙΟ ΔΟΚΙΜΗΣ

Ο όρος «σχέδιο δοκιμής» αναφέρεται στην επιλογή του αριθμού και της κλιμάκωσης των συγκεντρώσεων δοκιμής, στον αριθμό των δεξαμενών για κάθε συγκέντρωση και στον αριθμό των ψαριών ανά δεξαμενή. Θεωρητικά, το σχέδιο δοκιμής θα πρέπει να επιλέγεται ανάλογα με:

α) το στόχο της μελέτης·

β) τη μέθοδο στατιστικής ανάλυσης που θα χρησιμοποιηθεί·

γ) τη διαθεσιμότητα και το κόστος των πόρων του πειράματος.

Στη δήλωση του στόχου θα πρέπει, αν είναι δυνατόν, να προσδιορίζεται η στατιστική ισχύς με την οποία απαιτείται να ανιχνευθεί ένα δεδομένο εύρος διαφοράς (π.χ. στο βαθμό ανάπτυξης) ή, εναλλακτικά, η ακρίβεια με την οποία απαιτείται να εκτιμηθεί η EC_X (π.χ. με χ = 10, 20 ή 30 και, κατά προτίμηση, όχι λιγότερο από 10). Χωρίς αυτό, δεν μπορεί να δοθεί σταθερή προδιαγραφή του μεγέθους της μελέτης.

Είναι σημαντικό να γίνει αντιληπτό ότι ένα σχέδιο που είναι άριστο (επιτυγχάνει τη βέλτιστη χρήση πόρων) για χρήση με μια μέθοδο στατιστικής ανάλυσης δεν είναι, κατ' ανάγκη, άριστο και για μιαν άλλη. Το συνιστώμενο σχέδιο για την εκτίμηση μιας τιμής LOEC/NOEC μπορεί, συνεπώς, να μην είναι ίδιο με εκείνο που συνιστάται για τη μέθοδο της ανάλυσης με αναγωγή (analysis by regression).

Στις περισσότερες περιπτώσεις, η ανάλυση με αναγωγή είναι προτιμότερη από την ανάλυση μεταβλητότητας (analysis of variance), για λόγους που αναφέρονται από τους Stephan και Rogers (9). Εντούτοις, όταν δεν βρίσκεται κατάλληλο μοντέλο αναγωγής ($r^2 < 0,9$), θα πρέπει να χρησιμοποιείται η τιμή NOEC/LOEC.

1.7.1. **Σχέδιο για ανάλυση με αναγωγή**

Τα σημεία που πρέπει να λαμβάνονται ιδιαίτερα υπόψη στο σχέδιο δοκιμής στην οποία θα εφαρμοστεί ανάλυση με αναγωγή είναι:

α) η συγκέντρωση επίδρασης (π.χ. $EC_{10,\ 20,\ 30}$) και η περιοχή των συγκεντρώσεων η οποία ενδιαφέρει σε σχέση με την επίδραση της υπό δοκιμή ουσίας, θα πρέπει, κατ' ανάγκη, να καλύπτεται από τις συγκεντρώσεις οι οποίες χρησιμοποιούνται στη δοκιμή. Άριστη ακρίβεια στις εκτιμήσεις των συγκεντρώσεων επίδρασης επιτυγχάνεται αν η συγκέντρωση επίδρασης βρίσκεται στο μέσον της περιοχής συγκεντρώσεων της δοκιμής. Για την επιλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων δοκιμής, ιδιαίτερα χρήσιμη μπορεί να αποδειχθεί η πραγματοποίηση μιας προκαταρκτικής δοκιμής προσανατολισμού·

β) για την επίτευξη ικανοποιητικής στατιστικής εικόνας, η δοκιμή θα πρέπει να περιλαμβάνει μία τουλάχιστον δεξαμενή-μάρτυρα και πέντε επιπλέον δεξαμενές με διαφορετικές συγκεντρώσεις. Όπου χρειάζεται, όταν χρησιμοποιείται μέσο διαλυτοποίησης, εκτός από τη σειρά δοκιμών, θα πρέπει να χρησιμοποιείται και μάρτυρας που να περιέχει το μέσο διαλυτοποίησης στην υψηλότερη υπό δοκιμή συγκέντρωση (βλέπε σημεία 1.8.3 και 1.8.4)·

γ) μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατάλληλη γεωμετρική ή λογαριθμική σειρά (10) (βλέπε προσάρτημα 3). Προτιμάται η χρησιμοποίηση λογαριθμικής κλιμάκωσης των συγκεντρώσεων δοκιμής·

▼B

δ) εάν υπάρχουν διαθέσιμες περισσότερες από έξι δεξαμενές, οι επιπλέον δεξαμενές θα πρέπει ή να χρησιμοποιούνται για επανάληψη, ή να κατανέμονται στην περιοχή συγκεντρώσεων για να επιτυγχάνεται πυκνότερη κλιμάκωση των επιπέδων συγκέντρωσης Οποιοδήποτε από τα δύο είναι εξίσου επιθυμητό.

1.7.2. **Σχέδιο υπολογισμού τιμής NOEC/LOEC με τη μέθοδο της ανάλυσεως μεταβλητότητας (ANOVA)**

Για κάθε συγκέντρωση θα πρέπει, κατά προτίμηση, να υπάρχουν δεξαμενές επανάληψης, η δε στατιστική ανάλυση θα πρέπει να γίνεται σε επίπεδο δεξαμενής (11). Χωρίς δεξαμενές επανάληψης, δεν μπορεί να γίνει δεκτή καμία μεταβλητότητα μεταξύ δεξαμενών πέραν εκείνης που οφείλεται σε μεμονωμένα ψάρια. Εντούτοις, η εμπειρία έχει δείξει (12) ότι η μεταξύ δεξαμενών μεταβλητότητα είναι πολύ μικρή σε σύγκριση με την εντός δεξαμενής (δηλαδή μεταξύ ψαριών) μεταβλητότητα στην εξεταζόμενη περίπτωση. Συνεπώς, μια σχετικώς αποδεκτή εναλλακτική λύση είναι η εκτέλεση στατιστικής αναλύσεως σε επίπεδο μεμονωμένων ψαριών.

Συμβατικά, χρησιμοποιούνται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις δοκιμής σε γεωμετρική σειρά με λόγο, κατά προτίμηση, μη υπερβαίνοντα το 3,2.

Γενικά, όταν εκτελούνται δοκιμές με δεξαμενές επανάληψης, ο αριθμός των δεξαμενών-μαρτύρων επανάληψης και, κατά συνέπεια, ο αριθμός των ψαριών θα πρέπει να είναι διπλάσιος από τον αριθμό που υπάρχει σε κάθε μία από τις συγκεντρώσεις δοκιμής, που θα πρέπει να είναι του αυτού μεγέθους (13) (14) (15). Αντίθετα, εφόσον δεν υπάρχουν δεξαμενές επανάληψης, ο αριθμός των ψαριών στην ομάδα των μαρτύρων θα πρέπει να είναι ίδιος με τον αριθμό σε κάθε συγκέντρωση δοκιμής.

Εάν η ANOVA πρόκειται να βασιστεί σε δεξαμενές και όχι σε μεμονωμένα ψάρια [πράγμα που σημαίνει είτε την κατ' άτομο σήμανση των ψαριών είτε τη χρήση «ψευδό» ιδιαίτερων βαθμών ανάπτυξης (βλέπε σημείο 2.1.2)], είναι ανάγκη να υπάρχουν αρκετές δεξαμενές επανάληψης για να μπορεί να προσδιοριστεί η τυπική απόκλιση των «εντός δεξαμενής συγκεντρώσεων». Αυτό σημαίνει ότι οι βαθμοί ελευθερίας σφάλματος στην ανάλυση αποκλίσεων θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 5 (11). Εάν μόνο για τους μάρτυρες υπάρχουν δεξαμενές επανάληψης, υπάρχει κίνδυνος αποκλίσεων στη μεταβλητότητα σφάλματος, επειδή αυτή μπορεί να αυξάνεται με τη μέση τιμή του υπό εξέταση βαθμού ανάπτυξης. Εφόσον ο βαθμός ανάπτυξης είναι πιθανόν να μειωθεί με την αύξηση της συγκεντρώσεως, αυτό θα τείνει να οδηγήσει σε υπερεκτίμηση της μεταβλητότητας.

1.8. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.8.1. **Επιλογή και ζύγιση των υπό δοκιμή ψαριών**

Είναι σημαντικό να ελαχιστοποιείται η διακύμανση του βάρους των ψαριών στην αρχή της δοκιμής. Κατάλληλες περιοχές μεγεθών για τα διάφορα είδη που συνιστώνται για χρήση στη δοκιμή αυτή, δίνονται στο προσάρτημα 1. Για το σύνολο της παρτίδας ψαριών που χρησιμοποιείται στη δοκιμή, το εύρος των ατομικών βαρών στην έναρξη της δοκιμής θα πρέπει, θεωρητικά, να κρατιέται στα όρια του ± 10 % του αριθμητικού μέσου βάρους, σε κάθε δε περίπτωση, δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 25 %. Πριν από τη δοκιμή συνιστάται να ζυγίζεται ένα μερικό δείγμα ψαριών, για να εκτιμάται το μέσο βάρος.

▼B

Για 24 ώρες πριν από την έναρξη της δοκιμής, θα πρέπει να μην δίνεται τροφή στον αρχικό πληθυσμό. Τα ψάρια θα πρέπει κατόπιν να επιλέγονται στην τύχη. Χρησιμοποιώντας ένα γενικό αναισθητικό [π.χ. υδατικό διάλυμα 100 mg/l μεθανοσουλφονικής τρικαΐνης (MS 222) εξουδετερωμένο με προσθήκη δύο μερών διτανθρακικού νατρίου ανά μέρος MS 222], τα ψάρια θα πρέπει να ζυγίζονται κατ' άτομο για την εύρεση του υγρού βάρους (στέγνωμα με στυπόχαρτο) με την ακρίβεια που προβλέπεται στο προσάρτημα 1. Όσα ψάρια έχουν βάρος εντός της προβλεπόμενης περιοχής θα πρέπει να κρατούνται και κατόπιν να κατανέμονται τυχαία μεταξύ των δοχείων δοκιμής. Το συνολικό υγρό βάρος των ψαριών σε κάθε δοχείο δοκιμής θα πρέπει να καταγράφεται. Η χρήση του αναισθητικού, όπως και η μεταχείριση των ψαριών (συμπεριλαμβανομένης της στύπωσης και της ζύγισης), μπορεί να προκαλέσει άγχος και τραυματισμούς στα νεαρά ψάρια, ιδιαίτερα στα είδη εκείνα που είναι μικρού μεγέθους. Συνεπώς, ο χειρισμός των νεαρών ψαριών πρέπει να γίνεται με ύψιστη προσοχή, ώστε να αποφεύγονται άγχη και τραυματισμοί για τα υπό δοκιμή ζώα.

Τα ψάρια ζυγίζονται πάλι την 28η ημέρα της δοκιμής (βλέπε σημείο 1.8.6). Εντούτοις, εάν κριθεί αναγκαίο να επανυπολογιστεί το σιτηρέσιο, τα ψάρια μπορούν να ζυγιστούν πάλι τη 14η ημέρα της δοκιμής (βλέπε σημείο 1.8.2.3). Για τον προσδιορισμό των μεταβολών στο μέγεθος των ψαριών μπορεί να χρησιμοποιηθεί και άλλη μέθοδος, όπως η φωτογραφική μέθοδος, μέσω της οποίας μπορεί να προσαρμοστεί το σιτηρέσιο.

1.8.2. **Συνθήκες έκθεσης**

1.8.2.1. *Διάρκεια*

Η διάρκεια της δοκιμής είναι > 28 ημέρες.

1.8.2.2. *Πληθυσμιακός φόρτος και πυκνότητα πληθυσμού*

Είναι σημαντικό, ο πληθυσμιακός φόρτος και η πυκνότητα πληθυσμού να είναι κατάλληλα για το χρησιμοποιούμενο είδος ψαριών (βλέπε προσάρτημα 1). Εάν η πυκνότητα πληθυσμού είναι πολύ υψηλή, τότε δημιουργείται συμφορητικό άγχος που οδηγεί σε μείωση του βαθμού ανάπτυξης και, ενδεχομένως, στην εμφάνιση ασθενειών. Εάν είναι πολύ χαμηλή, μπορεί να προκληθεί χωροκατακτητική συμπεριφορά που μπορεί, επίσης, να επιδράσει στην ανάπτυξη. Σε κάθε περίπτωση, ο πληθυσμιακός φόρτος θα πρέπει να είναι αρκετά χαμηλός για να μπορεί να διατηρείται, χωρίς αερισμό, συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου τουλάχιστον 60 % ΤΚΑ. Διεργαστηριακή δοκιμή (3) έχει δείξει ότι, για την ιριδίζουσα πέστροφα, πληθυσμιακός φόρτος της τάξης των 16 ατόμων των 3-5 g σε όγκο 40 λίτρων, είναι αποδεκτός. Η συνιστώμενη συχνότητα απομάκρυνσης νερού κατά τη διάρκεια της δοκιμής είναι 6 λίτρα/g ψαριών/ημέρα.

1.8.2.3. *Διατροφή*

Τα ψάρια θα πρέπει να διατρέφονται με κατάλληλη τροφή (προσάρτημα 1) και σε επίπεδα επαρκή για την επίτευξη αποδεκτού βαθμού ανάπτυξης. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγεται η ανάπτυξη μικροβίων και η εμφάνιση θολότητας στο νερό. Στην περίπτωση της ιριδίζουσας πέστροφας, επίπεδα της τάξης του 4 % του σωματικού τους βάρους ανά ημέρα ικανοποιεί πιθανόν αυτές τις συνθήκες (3) (16) (17) (18). Το ημερήσιο σιτηρέσιο μπορεί να διαιρείται σε δύο ίσα μέρη και να δίνεται στα ψάρια σε δύο δόσεις την ημέρα, διαχωριζόμενες από χρονικό διάστημα 5 τουλάχιστον ωρών. Το σιτηρέσιο βασίζεται στο αρχικό συνολικό βάρος των ψαριών για κάθε δοχείο δοκιμής. Εάν τα ψάρια ζυγιστούν πάλι τη 14η ημέρα, το σιτηρέσιο επανυπολογίζεται. Για 24 ώρες πριν από τη ζύγιση, δεν θα πρέπει να δίνεται τροφή στα ψάρια.

▼B

Τα υπολείμματα των τροφών και τα περιττώματα θα πρέπει να απομακρύνονται από τα δοχεία δοκιμής κάθε μέρα με προσεκτικό καθαρισμό του πυθμένα κάθε δεξαμενής με ρόφηση.

1.8.2.4. *Φως και θερμοκρασία*

Η φωτοπερίοδος και η θερμοκρασία του νερού θα πρέπει να είναι κατάλληλες νια το υπό δοκιμή είδος (προσάρτημα 1).

1.8.3. **Συγκεντρώσεις δοκιμής**

Κανονικά, ανεξάρτητα από το σχέδιο δοκιμής, απαιτούνται πέντε συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας (βλέπε σημείο 1.7.2. Εάν η τοξικότητα της υπό δοκιμή ουσίας είναι γνωστή εκ των προτέρων (π.χ. από μελέτες οξείας τοξικότητας ή/και προσανατολισμού ως προς την περιοχή), αυτό απορεί να βοηθήσει στην επιλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων δοκιμής. Εφόσον χρησιμοποιούνται λιγότερες από πέντε συγκεντρώσεις. αυτό θα πρέπει να αιτιολογείται. Η ανώτατη συγκέντρωση δοκιμής δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το όριο διαλυτότητας της ουσίας στο νερό.

Όταν, για την παρασκευή του αρχικού διαλύματος, χρησιμοποιείται μέσο διαλυτοποίησης, η τελική του συγκέντρωση δεν θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 0,1 ml/l ενώ, κατά προτίμηση, θα πρέπει να είναι η ίδια σε όλα τα δοχεία δοκιμής (βλέπε σημείο 1.6.3). Εντούτοις, θα πρέπει να καταβάλλεται κάθε δυνατή προσπάθεια αποφυγής χρήσης παρόμοιων υλικών.

1.8.4. **Μάρτυρες**

Ο αριθμός των χρησιμοποιουμένων ως μαρτύρων υδατικών αραιώσεων εξαρτάται από το σχέδιο δοκιμής (βλέπε σημεία 1.7-1.7.2). Εάν χρησιμοποιείται μέσο διαλυτοποίησης, τότε θα πρέπει να χρησιμοποιείται και ίδιος αριθμός μαρτύρων με μέσο διαλυτοποίησης με εκείνο των υδατικών αραιώσεων-μαρτύρων.

1.8.5. **Συχνότητα αναλυτικών προσδιορισμών και μετρήσεων**

Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, προσδιορίζονται σε τακτικά διαστήματα οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας (βλέπε κατωτέρω}.

Στις δοκιμές συνεχούς ροής, θα πρέπει, κατά διαστήματα, να ελέγχονται οι ταχύτητες ροής του αραιωτικού και του τοξικού αρχικού διαλύματος, κατά προτίμηση ημερησίως, και δεν θα πρέπει να παρουσιάζουν διακύμανση άνω του 10 % καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Όταν οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας προβλέπεται να παραμείνουν στα όρια του ± 20 % των ονομαστικών τιμών (δηλαδή στην περιοχή του 80-120 %, βλέπε σημεία 1.6.2 και 1.6.3), συνιστάται, στην έναρξη της δοκιμής και, στη συνέχεια, κάθε εβδομάδα, να ελέγχονται τουλάχιστον η υψηλότερη και η χαμηλότερη συγκέντρωση δοκιμής. Σε δοκιμές όπου η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας προβλέπεται να μην παραμείνει στα όρια του ± 20 % της ονομαστικής (με βάση τα δεδομένα σταθερότητας της υπό δοκιμή ουσίας), είναι αναγκαίο να ελέγχονται όλες οι συγκεντρώσεις δοκιμής, με το ίδιο πάντα καθεστώς.

Στις ημιστατικές (ανανέωσης) δοκιμές όπου η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας προβλέπεται να παραμείνει στα όρια του ± 20 % των ονομαστικών τιμών, συνιστάται, κατ' ελάχιστο, να ελέγχονται η υψηλότερη και η χαμηλότερη συγκέντρωση δοκιμής αμέσως μετά την παρασκευή και αμέσως πριν από την ανανέωση στην έναρξη της μελέτης και, στη συνέχεια, κάθε βδομάδα. Σε δοκιμές όπου η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας προβλέπεται να μην παραμείνει στα όρια του ± 20 % της ονομαστικής, είναι αναγκαίο να ελέγχονται όλες οι συγκεντρώσεις δοκιμής, με το ίδιο καθεστώς όπως και για τις σταθερότερες σταθερές ουσίες.

▼B

Συνιστάται τα αποτελέσματα να βασίζονται σε μετρηθείσες συγκεντρώσεις. Εντούτοις, εάν υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο διάλυμα διατηρείται ικανοποιητικά στα όρια του ± 20 % της ονομαστικής ή μετρηθείσας αρχικής συγκέντρωσης καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής, τότε τα αποτελέσματα μπορούν να βασίζονται στις ονομαστικές ή στις μετρηθείσες τιμές.

Ορισμένα δείγματα μπορεί να χρειάζεται να διηθηθούν (π.χ. χρησιμοποιώντας διηθητικό μέσο με πόρους διαμέτρου 0,45 μm) ή να φυγοκεντρηθούν. Η μέθοδος που συνιστάται είναι η φυγοκέντρηση. Πάντως, εφόσον η υπό δοκιμή ουσία δεν απορροφάται στο φίλτρο, μπορεί να γίνει δεκτή και η διήθηση.

Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, σε όλα τα δοχεία δοκιμής 3α πρέπει να μετρώνται το διαλελυμένο οξυγόνο, το pH και η θερμοκρασία. Στους μάρτυρες και σε ένα δοχείο με τη υψηλότερη συγκέντρωση, θα πρέπει να μετράται η ολική σκληρότητα, η αλκαλικότητα και η αλατότητα (εφόσον συντρέχει περίπτωση). Το διαλελυμένο οξυγόνο και η αλατότητα (εάν συντρέχει περίπτωση) θα πρέπει να μετρώνται κατ' ελάχιστο τρεις φορές (στην αρχή, στο μέσον και στο τέλος της δοκιμής). Στις ημιστατικές δοκιμές, συνιστάται το διαλελυμένο οξυγόνο να μετριέται συχνότερα, κατά προτίμηση πριν και μετά από κάθε ανανέωση του νερού ή, τουλάχιστον, μία φορά την εβδομάδα. Το pH θα πρέπει να μετριέται στην αρχή και στο τέλος κάθε ανανέωσης νερού σε στατικές δοκιμές ανανέωσης και μια φορά τουλάχιστον τη βδομάδα σε δοκιμές συνεχούς ροής. Η σκληρότητα και η αλκαλικότητα θα πρέπει να μετρώνται μια φορά σε κάθε δοκιμή. Η θερμοκρασία θα πρέπει, κατά προτίμηση, να παρακολουθείται συνεχώς σε ένα, τουλάχιστον, δοχείο δοκιμής.

1.8.6. **Παρατηρήσεις**

Βάρος: Στο τέλος της δοκιμής όλα τα επιζώντα ψάρια πρέπει να ζυγίζονται σε υγρή κατάσταση (στέγνωμα με στυπόχαρτο) είτε σε ομάδες κατά δοχείο δοκιμής, είτε μεμονωμένα. Η ζύγιση των ζώων κατά δοχείο δοκιμής προτιμάται από την κατ' άτομο ζύγιση που απαιτεί τη σήμανση κάθε ψαριού. Στην περίπτωση της κατ' άτομο μέτρησης του βάρους για τον προσδιορισμό του ιδιαίτερου βαθμού ανάπτυξης μεμονωμένων ψαριών, η τεχνική σήμανσης θα πρέπει να επιλέγεται έτσι ώστε να αποφεύγεται η δημιουργία άγχους στα ζώα (αντί της ψυχρής σήμανσης, μπορεί να είναι κατάλληλος κάποιος εναλλακτικός τρόπος, π.χ. η χρήση χρωματισμένης λεπτής τριχιάς).

Τα ψάρια θα πρέπει να εξετάζονται καθημερινά κατά τη διάρκεια της περιόδου της δοκιμής και να σημειώνεται οποιαδήποτε εξωτερική ανωμαλία (όπως, π.χ. αιμορραγία, αποχρωματισμός) και μη φυσιολογική συμπεριφορά. Θα πρέπει να σημειώνεται κάθε τυχόν περίπτωση θανάτου και τα νεκρά ψάρια να απομακρύνονται το ταχύτερο δυνατό. Τα νεκρά ψάρια δεν αντικαθίστανται, αφού ο πληθυσμιακός φόρτος και η πυκνότητα πληθυσμού επαρκούν για την αποφυγή επιδράσεων στην ανάπτυξη λόγω μεταβολής του αριθμού των ψαριών ανά δεξαμενή. Τα επίπεδα, όμως, του συντηρεσίου θα πρέπει να προσαρμόζονται.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΧΕΤΙΚΗ ΕΚΘΕΣΗ**

2.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Συνιστάται τόσο στο σχέδιο, όσο και στην ανάλυση της δοκιμής να συμμετέχει και ένας στατιστικολόγος, δεδομένου ότι η μέθοδος αυτή δοκιμής προσφέρει τη δυνατότητα σημαντικών μεταβολών στο σχεδιασμό του πειράματος όπως, π.χ., στον αριθμό των θαλάμων δοκιμής, στον αριθμό των συγκεντρώσεων δοκιμής, στον αριθμό των ψαριών, κ.λπ. Δεδομένου ότι στο σχέδιο δοκιμής υπάρχει δυνατότητα διαφόρων επιλογών, εδώ δεν δίνονται ειδικές οδηγίες για τη στατιστική διαδικασία.

▼B

Σε δοχεία δοκιμής στα οποία η θνησιμότητα υπερβαίνει το 10 %, δεν θα πρέπει να υπολογίζονται βαθμοί ανάπτυξης. Εντούτοις, σε όλες τις συγκεντρώσεις δοκιμής, θα πρέπει να αναφέρεται το ποσοστό θνησιμότητας.

Όποια μέθοδος κι να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση των δεδομένων, η κεντρική ιδέα είναι ο ιδιαίτερος βαθμός ανάπτυξης r μεταξύ χρόνου t_1 και χρόνου t_2. Αυτός μπορεί να οριστεί με διάφορους τρόπους, ανάλογα με το εάν τα ψάρια είναι επισημασμένα ή όχι κατ' άτομο ή με το εάν απαιτείται μέσος όρος δεξαμενής.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

όπου,

r_1 = ιδιαίτερος βαθμός ανάπτυξης μεμονωμένων ψαριών

r_2 = μέσος ιδιαίτερος βαθμός ανάπτυξης δεξαμενής

r_3 = «ψευδό-» ιδιαίτερος βαθμός ανάπτυξης

w_1, w_2 = βάρη ενός συγκεκριμένου ψαριού κατά τις χρονικές στιγμές t_1 και t_2, αντίστοιχα

$\log_e w_1$ = λογάριθμος του βάρους ενός μεμονωμένου ψαριού στην αρχή της μελέτης

$\log_e w_2$ = λογάριθμος του βάρους ενός μεμονωμένου ψαριού στο τέλος της μελέτης

$\log_e W_1$ = μέση τιμή των λογαρίθμων των τιμών v_1, για τα ψάρια στη δεξαμενή στην αρχή της μελέτης

$\log_e W_2$ = μέση τιμή των λογαρίθμων των τιμών W_2 για τα ψάρια στη δεξαμενή στο τέλος της μελέτης

t_1, t_2 = χρονική στιγμή (ημέρες) έναρξης και τέλους της μελέτης

r_1, r_2, r_3 μπορούν να υπολογιστούν για την περίοδο 0-28η ημέρα και, όπου χρειάζεται (δηλαδή, όταν έχει πραγματοποιηθεί μέτρηση κατά την 14η ημέρα) για τις περιόδους 0-14η και 14-28η ημέρα.

2.1.1. **Ανάλυση αποτελεσμάτων με αναγωγή (μοντέλο συγκέντρωσης-απόκρισης)**

Η μέθοδος αυτή ανάλυσης διαμορφώνει μια κατάλληλη μαθηματική σχέση μεταξύ του ιδιαίτερου βαθμού ανάπτυξης και της συγκέντρωσης, παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα εκτίμησης της «EC_x» δηλαδή οποιασδήποτε απαιτούμενης τιμής EC. Με τη χρήση αυτής της μεθόδου, δεν είναι αναγκαίος ο υπολογισμός του r για τα μεμονωμένα ψάρια (η) και η ανάλυση, α\τ' αυτού, μπορεί να βασιστεί στη μέση ανά δεξαμενή τιμή του r (r_2). Η τελευταία αυτή μέθοδος προτιμάται. Είναι επίσης καταλληλότερη στην περίπτωση χρήσης πολύ μικρών ειδών.

Ο μέσος ιδιαίτερος βαθμός ανάπτυξης δεξαμενής (r_2) θα πρέπει να παρίσταται γραφικά συναρτήσει της συγκεντρώσεως, για να ελέγχεται η σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης.

▼B

Για την έκφραση της σχέσης μεταξύ r_2 και συγκεντρώσεως, 3α πρέπει να επιλέγεται ένα κατάλληλο μοντέλο, η επιλογή του οποίου πρέπει να στηρίζεται σε κατάλληλη αιτιολόγηση.

Εάν οι αριθμοί των ψαριών που επέζησαν σε κάθε δεξαμενή είναι άνισοι, τότε η διεργασία της διαμόρφωσης του μοντέλου, απλό ή μη γραμμικά, θα πρέπει να σταθμίζεται έτσι ώστε να λαμβάνονται υπόψη τα άνισα μεγέθη των ομάδων.

Η μέθοδος της διαμόρφωσης του μοντέλου πρέπει να καθιστά δυνατή την επίτευξη εκτίμησης της, π.χ., EC_{20} και της διασποράς της (τυπικό σφάλμα ή εύρος εμπιστοσύνης). Το γράφημα του διαμορφωμένου μοντέλου θα πρέπει να παρουσιάζεται σε σχέση με τα δεδομένα έτσι ώστε να μπορεί να αποδειχθεί η καταλληλότητα της διαμόρφωσης του μοντέλου (9) (19) (20) (21).

2.1.2. **Ανάλυση των αποτελεσμάτων για τον υπολογισμό της LOEC**

Εάν η δοκιμή περιέλαβε δοκιμές επανάληψης σε όλα τα επίπεδα συγκέντρωσης, ο υπολογισμός της LOEC μπορεί να βασιστεί σε ανάλυση μεταβλητότητας (ANOVA) του μέσου ιδιαίτερου βαθμού ανάπτυξης δεξαμενής (βλέπε σημείο 2.1), ακολουθούμενη από κατάλληλη μέθοδο [π.χ. δοκιμή Dunnett ή Williams (13) (14) (15) (22)] σύγκρισης του μέσου r για κάθε συγκέντρωση με το μέσο r για τους μάρτυρες για τον προσδιορισμό της κατώτατης συγκέντρωσης για την οποία η διαφορά αυτή είναι στατιστικώς σημαντική με στάθμη πιθανότητας 0,05. Εάν δεν πληρούνται οι υποθέσεις που απαιτούνται για παραμετρικές μεθόδους — μη κανονική κατανομή (π.χ. δοκιμή Shapiro-Wilk) ή ετερογενής μεταβλητότητα (variance) (δοκιμή Bartlett), θα πρέπει να εξεταστεί η μετατροπή των δεδομένων για την ομοιογενοποίηση των βαθμών μεταβλητότητας (variance) πριν από την εκτέλεση της ANOVA ή η εκτέλεση σταθμισμένης ANOVA.

Εάν η δοκιμή δεν περιλάμβανε δεξαμενές επανάληψης σε κάθε συγκέντρωση, η προσφυγή σε ANOVA με βάση τις δεξαμενές είναι χωρίς νόημα ή αδύνατη. Στην περίπτωση αυτή, ένας αποδεκτός συμβιβασμός είναι να στηρίξουμε την ANOVA στον «ψευδο» ιδιαίτερο βαθμό ανάπτυξης r_3 για μεμονωμένα ψάρια.

Ο μέσος r_3 για κάθε συγκέντρωση δοκιμής μπορεί στη συνέχεια να συγκριθεί με τον μέσο r_3 για τους μάρτυρες. Κατόπιν η LOEC μπορεί να προσδιοριστεί όπως προηγουμένως. Πρέπει να αναγνωριστεί ότι η μέθοδος αυτή δεν προσφέρει καμία ανοχή ούτε προστασία για περίπτωση μεταβλητότητας μεταξύ δεξαμενών, πέραν εκείνης που προβλέπεται για περιπτώσεις μεταβλητότητας μεταξύ επιμέρους ψαριών. Εντούτοις, η εμπειρία έχει δείξει (9) ότι η μεταξύ δεξαμενών μεταβλητότητα είναι πολύ μικρή σε σύγκριση με τη μεταβλητότητα εντός δεξαμενής (δηλαδή μεταξύ ψαριών). Εάν δεν περιλαμβάνονται μεμονωμένα ψάρια στην ανάλυση, πρέπει να παρέχεται μέθοδος μεμονωμένου προσδιορισμού και αιτιολόγηση για τη χρήση του.

2.2. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα θα πρέπει να ερμηνεύονται με ιδιαίτερη προσοχή όταν οι μετρούμενες τοξικές συγκεντρώσεις στα διαλύματα δοκιμής βρίσκονται σε επίπεδα κοντά στο όριο ανίχνευσης της αναλυτικής μεθόδου ή, στις ημιστατικές δοκιμές, όταν η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας μειώνεται στο διάστημα που μεσολαβεί από την παρασκευή του διαλύματος μέχρι πριν από την ανανέωση.

2.3. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Στην έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνονται τα ακόλουθα στοιχεία:

▼B

2.3.1. **Ουσία δοκιμής:**

— φυσική μορφή και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

— στοιχεία χημικής αναγνώρισης, συμπεριλαμβανομένης της καθαρότητας και της αναλυτικής μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό της υπό δοκιμή ουσίας, όταν χρειάζεται.

2.3.2. **Είδος υπό δοκιμή:**

— επιστημονική ονομασία, πιθανόν,

— ποικιλία, μέγεθος, προμηθευτής, κάθε προηγούμενη αγωγή, κ.λπ.

2.3.3. **Συνθήκες δοκιμής:**

— χρησιμοποιηθείσα διαδικασία δοκιμής (π.χ. ημιστατική/ανανέωση, συνεχής ροή, φόρτος, πυκνότητα πληθυσμού, κ.λπ.),

— σχέδιο δοκιμής (π.χ. αριθμός δοχείων δοκιμής, συγκεντρώσεις δοκιμής και επαναλήψεις, αριθμός ψαριών ανά δοχείο),

— μέθοδος παρασκευής αρχικών διαλυμάτων και συχνότητα ανανέωσης (πρέπει να δίδεται το μέσο διαλυτοποίησης και η συγκέντρωση του, όταν χρησιμοποιείται),

— οι ονομαστικές συγκεντρώσεις δοκιμής, ο μέσος όρος των μετρηθεισών τιμών και οι τυπικές τους αποκλίσεις στα δοχεία δοκιμής και η μέθοδος με την οποία επιτεύχθηκαν, καθώς και αποδεικτικά στοιχεία ότι οι μετρήσεις αναφέρονται στις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας σε αληθές διάλυμα,

— τα χαρακτηριστικά του νερού αραιώσεως: pH, σκληρότητα, αλκαλικότητα, θερμοκρασία, συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου, επίπεδα υπολειμματικού χλωρίου (αν ανιχνεύεται), συνολικός οργανικός άνθρακας, αιωρούμενα στερεά, αλατότητα του μέσου δοκιμής (αν μετριέται) και κάθε άλλη πραγματοποιηθείσα μέτρηση,

— η ποιότητα μέσα στα δοχεία δοκιμής: pH, σκληρότητα, θερμοκρασία και συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου,

— λεπτομερής ενημέρωση για τη διατροφή, [π.χ. τύπος τροφής(-ών), πηγή, ποσότητα και συχνότητα].

2.3.4. **Αποτελέσματα:**

— στοιχεία ότι οι μάρτυρες πληρούσαν το κριτήριο εγκυρότητας ως προς την επιβίωση, καθώς και στοιχεία για τις θνησιμότητες που εμφανίστηκαν σε κάθε συγκέντρωση δοκιμής,

— χρησιμοποιηθείσες στατιστικές αναλυτικές τεχνικές, στατιστικά βασιζόμενα σε επαναλήψεις ή σε ψάρια, επεξεργασία των δεδομένων και αιτιολόγηση των χρησιμοποιηθεισών τεχνικών,

— στοιχεία με μορφή πινάκων για τα ατομικά και τα μέσα βάρη των ψαριών κατά τις ημέρες 0, 14 (εφόσον έγινε μέτρηση) και 28 και τις τιμές του μέσου ανά δεξαμενή ή ψευδο- ιδιαίτερου βαθμού ανάπτυξης (αναλόγως) για την περίοδο 0-28 ή, ενδεχομένως, 0-14 και 14-28,

— αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης (δηλαδή ανάλυση με αναγωγή ή ANOVA) κατά προτίμηση σε μορφή πίνακα και γραφική μορφή και η LOEC ($\rho = 0,05$) καθώς και η NOEC ή η EC_X μαζί, όταν είναι δυνατόν, με τα τυπικά σφάλματα, αναλόγως,

▼B

— στοιχεία για οποιαδήποτε ασυνήθη αντίδραση των ψαριών και κάθε ορατή επίδραση που προκλήθηκε από την υπό δοκιμή ουσία.

3. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Solbe J. F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. WRc Report No PRD 1388-M/2.

(2) Meyer, A., Bierman, C. H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, pp. 231-236.

(3) Ashley S., Mallett M. J. and Grandy N. J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.

(4) Crossland N. O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, pp. 1855-1870.

(5) Nagel R.. Bresh H., Caspers N., Hansen P. D., Market M., Munk R., Scholz N. and Höfte B. B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish *(Brachydanio rerio)*: results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety, 21, pp. 157-164.

(6) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.

(7) Holcombe, G. \V., Benoit D. A., Hammermeister, D. E., Leonard, E. N. and Johnson, R. D. (199 5). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka *(Oryzias latipes)*. Arch. Environ. Coma. Toxicol. 28, pp. 287-297.

(8) Benoit, D. A., Holcombe, G. W. and Spehar, R. L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (*Oryzias latipes)*. Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. US Environmental Protection Agency, Duluth, Minnesota.

(9) Stephan C. E. and Rogers J. W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891, R. C. Bahner and D. J. Hansen, eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 328-338.

(10) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS l/RM/28, 81 pp.

(11) Cox D. R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.

(12) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10-12 December 1991.

(13) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096-1121.

▼B

(14) Dunnett C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(15) Williams D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, pp. 103-117.

(16) Johnston, W. L., Atkinson, J. L., Glanville K. T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss:* effect of feeding level. Aquaculture 120, pp. 123-133.

(17) Quinton,]. C. and Blake, R. W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory-growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus* mykiss. Journal of Fish Biology, 37, pp. 33-41.

(18) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 pp.

(19) Bruce, R. D. and Versteeg D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 11, pp. 1485-1494.

(20) DeGraeve, G. M., Cooney, J. M., Pollock, T. L., Reichenbach, J. H., Dean, Marcus, M. D. and Mclntyre, D. O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. Report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, No 4468). Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA.

(21) Norbert-King T. J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minnesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. 12 pp.

(22) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, pp. 510-531.

▼B

Προσαρτημα 1

ΣΥΝΙΣΤΩΜΕΝΑ ΠΑ ΤΙΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΕΙΔΗ ΨΑΡΙΩΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑΛΛΗΛΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Είδος	Συνιστώμενη περίοχή θερμο-κρασιών δοκιμής (T)	Φωτοπε ρίοδος (ώρες)	Συνισιώμενη περιοχή αρχικού βάρους ψαριών (8)	Απαιτούμενη ακρίβεια μέτρησης	Πληδυομιακός φόρτος (g/l)	Πυκνότητα πληθυ-σμού (ανά λίτρο)	Τροφή	Διάρκεια δοκιμής (ημέρες)
Συνιστώμενο είδος:								
Oncorhynchus mykiss πέστροφα	12,5-16,0	12-16	1-5	Στα πλησιέ-στερα 100 mg	1,2-2,0	4	Ξηρά σολομονοαδή ιχθύδια	≥ 28
Άλλα καλώς τεκμηριωμένα είδη:								
Danio rerio *Ζεβρόψαρα*	21-25	12-16	0,050-0,100	Στο πλησιέστερο 1 ing	0,2-1,0	5-10	Ζώοα τροφή *(Brachionus Artemia)*	> 28
Oryzias latipes Ρυξόψαρα (Medaka)	21-25	12-16	0,050-0,100	Στο πλησιέστερο 1 mg	0,2-1,0	5-20	Ζώσα τροφή (*Brachionus Anemia)*	> 28

▼B

Προσαρτημα 2

ΜΕΡΙΚΑ ΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΕΚΤΟΥ ΝΕΡΟΥ ΑΡΑΙΩΣΕΩΣ

Ουσία	Συγκεντρώσεις
Διαμερισμένη ύλη	< 20 mg/l
Συνολικός οργανικός άνθρακας	< 2 mg/1
Μη ιοντισμένη αμμωνία	< 1 mg/1
Υπολειμματικό χλώριο	< 10 mg/1
Σύνολο οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων	< 50 ng/l
Σύνολο οργανοχλωριούχων γεωργικών φαρμάκων μαζί με πολυχλωριωμένα διφαινύλια	< 50 ng/1
Συνολικό οργανικό χλώριο	< 25 ng/1

▼B

Προσαρτημα 3

Λογαριθμική Σειρά Συγκεντρώσεων Κατάλληλων Για Δοκιμή Τοξικότητας (9)

Στήλη (αριθμός συγκεντρώσεων μεταξύ 100 και 10 ή μεταξύ 10 και 1) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Από μια στήλη μπορεί να επιλεγεί μια σειρά πέντε (ή περισσότερων) διαδοχικών συγκεντρώσεων. Ενδιάμεσα σημεία μεταξύ συγκεντρώσεων στη στήλη (χ) βρίσκονται στη στήλη (2χ + 1). Οι καταγραφόμενες τιμές μπορεί να αντιπροσωπεύουν συγκεντρώσεις εκφραζόμενες ως % κατ όγκο ή κατά βάρος (mg/l μg/l). Οι τιμές μπορούν να πολλαπλασιαστούν ή να διαιρεθούν με οποιαδήποτε δύναμη του 10, αναλόγως, Η στήλη 1 μπορεί να χρησιμοποιηθεί αν υφίσταται σημαντική αβεβαιότητα ως προς τα επίπεδα τοξικότητας.

▼B

Γ.15. **ΨΑΡΙΑ, ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΒΡΑΧΥΠΡΟΘΕΣΜΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΑ ΕΜΒΡΥΑ ΚΑΙ ΤΑ ΛΕΚΙΘΟΦΟΡΑ ΙΧΘΥΔΙΑ** (sac-fry stages)

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

Η εν λόγω μέθοδος μελέτης βραχυπρόθεσμης τοξικότητας αποτελεί επανάληψη της μεθόδου TG 212 (1998) του ΟΟΣΑ.

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μέθοδος μελέτης της βραχυπρόθεσμης τοξικότητας στα έμβρυα ψαριών και στα λεκιθοφόρα ιχθύδια (sac-fry stages) αποτελεί βραχυπρόθεσμη δοκιμασία στην οποία εκτίθενται τα ψάρια από το στάδιο του αβγού που μόλις έχει γονιμοποιηθεί έως το τέλος του σταδίου των λεκιθοφόρων ιχθυδίων (sac-fry stage). Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας δεν παρέχεται τροφή στα έμβρυα και στα λεκιθοφόρα ιχθύδια (sac-fry), επομένως η δοκιμασία πρέπει να ολοκληρώνεται όσο τα λεκιθοφόρα ιχθύδια (sac-fry) τρέφονται ακόμη από το λεκιθικό σάκο.

Σκοπός της δοκιμασίας είναι να οριστούν οι θανατηφόρες και, σε περιορισμένο βαθμό, οι σχεδόν θανατηφόρες επίπτώσης των χημικών ουσιών στα συγκεκριμένα στάδια εξέλιξης και στα συγκεκριμένα είδη. Από τη δοκιμασία μπορούν να ληφθούν χρήσιμες πληροφορίες καθώς α) μπορεί να αποτελέσει σύνδεσμο μεταξύ θανατηφόρων και σχεδόν θανατηφόρων δοκιμασιών β) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δοκιμασία επιλογής ενόψει είτε μιας (πλήρους) δοκιμασίας αρχικών σταδίων ζωής είτε μιας δοκιμασίας χρόνιας τοξικότητας και γ) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διεξαγωγή δοκιμασίας σε είδη όπου οι τεχνικές εκτροφής δεν είναι τόσο προηγμένες ώστε να καλύπτουν την περίοδο μετάβασης από την ενδογενή στην εξωγενή διατροφή.

Δεν πρέπει να λησμονείται το γεγονός ότι μόνο οι δοκιμασίες που περιλαμβάνουν όλα τα στάδια του κύκλου ζωής του ψαριού είναι σε θέση να παρέχουν ακριβή εκτίμηση της χρόνιας τοξικότητας των χημικών ουσιών στα ψάρια και ότι κάθε μειωμένης διάρκειας έκθεση όσον αφορά τα στάδια ζωής μπορεί να μειώσει την ευαισθησία και επομένως να οδηγήσει σε υποτίμηση της χρόνιας τοξικότητας. Επομένως αναμένεται ότι η δοκιμασία εμβρύου και λεκιθοφόρου ιχθυδίου (sac-fry) θα είναι λιγότερο ευαίσθητη από την πλήρη δοκιμασία αρχικών σταδίων ζωής, ιδίως όσον αφορά τις εξαιρετικά λιπόφιλες ουσίες (log P_{ow} > 4) και τις χημικές ουσίες ειδικής τοξικής δράσης. Για τις χημικές ουσίες μη ειδικής ναρκωτικής δράσης, ωστόσο, μπορεί να αναμένονται μικρότερες διαφορές ευαισθησίας μεταξύ των δύο δοκιμών (Γ).

Πριν τη δημοσίευση της παρούσας δοκιμασίας, σχεδόν όλα τα πειράματα στα έμβρυα και στα λεκιθοφόρα ιχθύδια (sac fry) πραγματοποιού\ταν με τους ιχθύς γλυκών υδάτων *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae — κοινή ονομασία ζεβρόψαρο). Για το λόγο αυτό, στο προσάρτημα Ι δίνονται λεπτομερείς οδηγίες για τη διεξαγωγή των δοκιμών στο εν λόγω είδος. Το γεγονός αυτό δεν αποκλείει τη χρήση άλλων ειδών με τα οποία έχουν ήδη πραγματοποιηθεί πειράματα (πίνακες 1Α και 1Β).

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Ελάχιστη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης: (Lowest Observed Effect Concentration, LOEC): είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται ότι μια ουσία έχει επίδραση στατιστικώς σημαντική ($\rho < 0,05$), συγκριτικά με τους μάρτυρες. Εντούτοις, όλες οι συγκεντρώσεις οι μεγαλύτερες από τη LOEC πρέπει να ασκούν βλαβερή επίδραση ισοδύναμη ή μεγαλύτερη από την παρατηρούμενη με τη LOEC.

Συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC): είναι η συγκέντρωση η αμέσως χαμηλότερη της LOEC

▼B

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Τα έμβρυα και λεκιθοφόρα ιχθύδια (sac-fry) εκτίθενται σε μια σειρά υδατικών διαλυμάτων της δοκιμαστικής ουσίας σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Το πρωτόκολλο επιτρέπει επιλογή μεταξύ μιας ημιστατικής διαδικασίας και μιας διαδικασίας συνεχούς ροής, ανάλογα με τη φύση της δοκιμαστικής ουσίας. Η δοκιμασία ξεκινάει με την τοποθέτηση γονιμοποιημένων αβγών στους δοκιμαστικούς θαλάμους και τελειώνει αμέσως πριν απορροφηθεί πλήρως ο λεκιθικός σάκος οποιασδήποτε προνύμφης (larvae) σε οποιονδήποτε από τους δοκιμαστικούς θαλάμους ή πριν σημειωθούν θάνατοι από ασιτία στους μάρτυρες. Οι θανατηφόρες και σχεδόν θανατηφόρες επιπτώσεις αξιολογούνται και συγκρί-νο\ται με τις τιμές των μαρτύρων για να καθοριστεί η ελάχιστη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης και επομένως η συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης. Εναλλακτικά, μπορούν να αναλυθούν με βάση ένα αναγωγικό μοντέλο για να υπολογιστεί κατ εκτίμηση η συγκέντρωση που προκαλεί ένα δεδομένο ποσοστό επίδρασης (π.χ. LC; EC_X, όπου χ είναι καθορισμένη % επίπτωση).

1.4. ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΠΑ ΤΗ ΔΟΚΙΜΑΖΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ

Πρέπει να είναι γνωστά τα αποτελέσματα μιας μελέτης οξείας τοξικότητας (βλέπε μέθοδο Γ.1) που πραγματοποιήθηκε κατά προτίμηση στα ίδια είδη με αυτά που έχουν επιλεγεί για την παρούσα δοκιμασία. Τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να αποδειχτούν χρήσιμα για τη σωστή επιλογή μιας σειράς συγκεντρώσεων για τις δοκιμασίες αρχικών σταδίων ζωής. Η υδατοδιαλυτότητα (περιλαμβανομένης της διαλυτότητας στο νερό της δοκιμασίας) και η τάση ατμών της δοκιμαστικής ουσίας πρέπει να είναι γνωστά. Πρεπει επίσης να υπάρχει αξιόπιστη αναλυτική μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της ουσίας στα διαλύματα, της οποίας η ακρίβεια και το όρια ανίχνευσης να είναι γνωστά και δημοσιευμένα.

Πληροφορίες σχετικές με την ουσία οι οποίες να είναι χρήσιμες για τον καθορισμό των συνθηκών της δοκιμασίας είναι ο συντακτικός τύπος, η καθαρότητα, η σταθερότητα στο φως, η σταθερότητα στις συνθήκες της δοκιμασίας, οι συντελεστές pKa, P_{ow} και τα αποτελέομματα μιας δοκιμασίας μελέτης της ευχέρειας βιοαποικοδόμησης (βλέπε μέθοδο Γ.4).

1.5. ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Προϋποθέσεις εγκυρότητας της δοκιμασίας είναι οι ακόλουθες:

— η συνολική επιβίωση των γονιμοποιημένων αβγών στους μάρτυρες και, κατά περίπτωση, στα δοχεία που περιέχουν μόνο διαλύτη, πρέπει να είναι ανώτερη ή ίση με τις τιμές που καθορίζονται στα προσαρτήματα 2 και 3,

— η συγκέντρωση του διαλελυμένου οξυγόνου πρέπει να κυμαίνεται από 60 έως 100 % της τιμής κορεσμού με αέρα (air saturation value -ASV) σε όλη τη δοκιμασία,

— η θερμοκρασία του ύδατος δεν πρέπει να διαφέρει περισσότερο από ± 1,5°C μεταξύ δοκιμαστικών θαλάμων και μεταξύ διαδοχικών ημερών σε οποιαδήποτε στιγμή της δοκιμασίας και πρέπει να βρίσκεται εντός των ορίων θερμοκρασίας που έχουν προσδιοριστεί για κάθε είδος ψαριού (προσαρτήματα 2 και 3).

▼B

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.6.1. **Δοκιμαστικοί θάλαμοι**

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν οποιαδήποτε δοχεία από γυαλί ή άλλο χημικά αδρανές υλικό. Οι διαστάσεις των δοχείων πρέπει να είναι αρκετά μεγάλες ώστε να ανταποκρίνονται στο ρυθμό πλήρωσης (βλέπε 1.7.1.2). Συνιστάται να τοποθετούνται οι δοκιμαστικοί θάλαμοι με τυχαίο τρόπο οτο χώρο εκτέλεσης των δοκιμών. Εάν υπάρχουν στο εργαστήριο συστηματικές επιδράσεις που μπορούν να ελεγχθούν με ομαδοποίηση των δοκιμαστικών θαλάμων, τότε είναι προτιμότερη μια σχετικά τυχαία ομαδοποίηση των θαλάμων όπου κάθε ομάδα περιλαμβάνει καθεμιά από τις αγωγές, παρά μια τελείως τυχαία κατανομή. Όταν ο σχεδιασμός του πειράματος προβλέπει ομαδοποίηση, το δεδομένο αυτό πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά την επακόλουθη ανάλυση των δεδομένων. Οι δοκιμαστικοί θάλαμοι προστατεύονται από ανεπιθύμητες οχλήσεις.

1.6.2. **Επιλογή είδους ψαριού**

Τα διάφορα είδη ψαριών που συνιστώνται για τη δοκιμασία περιλαμβάνονται στον πίνακα 1Α. Το γεγονός αυτό δεν αποκλείει τη χρήση άλλων ειδών (παραδείγματα δίνονται στον πίνακα 1Β), αρκεί η διαδικασία να προσαρμοστεί με τρόπο ώστε να επιτευχθούν οι κατάλληλες συνθήκες δοκιμασίας. Στην περίπτωση αυτή θα πρέπει να αναφέρεται η αιτιολογία της επιλογής του είδους και της πειραματικής μεθόδου.

1.6.3. **Συντήρηση των γεννητόρων**

Λεπτομέρειες σχετικά με τη συντήρηση των γεννητόρων υπό ικανοποιητικές συνθήκες μπορούν να αναζητηθούν στο TG 210 του ΟΟΣΑ ([1]) και στις αναφορές (2), (3), (4), (5) και (6) της βιβλιογραφίας.

1.6.4. **Προετοιμασία των εμβρύων και των προνυμφών (larvae)**

Στο εσωτερικό του βασικού δοχείου, τα έμβρυα και οι προνύμφες (larvae) μπορούν να τοποθετηθούν σε μικρότερα δοχεία υε πλευρές ή απολήξεις από πλέγμα ώστε να επιτρέπεται η ροή του δοκιμαστικού διαλύματος μέσω του δοχείου. Για να μη είναι τυρβώδης η ροή, τα μικρά δοχεία αναρτώνται από βραχίονα ο οποίος τα ανεβοκατεβάζει, με τους οργανισμούς όμως σταθερά μέσα στο νερό μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί σύστημα εκροής με σιφώνιο. Τα γονιμοποιημένα αβγά σολωμονοειδών μπορούν να τοποθετηθούν σε σχάρες ή σε πλέγματα με ανοίγματα αρκετά μεγάλα ώστε, μετά την εκκόλαψη, οι προνύιιφες να μπορούν να βγουν. Για την απομάκρυνση των εμβρύων και των προνυμφών (larvae) στις ηυιστατικές δοκιμασίες με πλήρη ημερήσια ανανέωση του νερού συνιστάται να χρησιμοποιούνται σιφώνια παστέρ.

Τα δοχεία, οι σχάρες και τα πλέγματα που χρησιμοποιούνται για τη συγκράτηση των αβγών εντός του βασικού δοχείου πρέπει να αφαιρούνται μετά την εκκόλαψη των προνυμφών ([1]), (larvae), εκτός από τα πλέγματα που χρειάζονται για να ιιη φύγουν τα ψάρια. Εάν οι προνύμφες (larvae) χρειαστεί να μεταφερθούν, δεν θα πρέπει να εκτεθούν στον αέρα και δεν 8α πρέπει να χρησιμοποιηθούν δίχτυα για την ελευθέρωση των ψαριών από τα δοχεία που περιέχουν τα αβγά (αυτές οι προφυλάξεις δεν είναι απαραίτητες για λιγότερα ευαισθητα είδη, όπως ο κυπρίνος). Η μεταφορά, η χρονική στιγμή της οποίας εξαρτάται από το είδος, δεν ειναι πάντοτε απαραίτητη. Για την ημιστατική τεχνική, απορούν να χρησιμοποιηθούν κύπελλα ή αβαθή δοχεία και, εάν χρειάζεται, να εξοπλιστούν με δικτυωτό προπέτασμα ελαφρώς υπερυψωμένο ως προς τον πυθμένα. Εάν ο όνκος των δοχείων ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις φορτωσης (βλέπε 1.7.1.2), τότε μπορεί να μην χρειαστεί η υεταφορά των εμβρύων ή των προνυυφών (larvae).

([1]) OECD. Paris. 1992, Test Guideline 210, «Fish. Early-life Stage Toxicity Test».

▼B

1.6.5. **Νερό**

Κάθε νερό που διαθέτει τα χημικά χαρακτηριστικά ενός αποδεκτού νερού αραίωσης τα οποία απαριθμούνται στο προσάρτημα 4 και στο οποίο τα δοκιμαζόμενα είδη σημειώνουν επιβίωση μαρτύρων τουλάχιστον ίση με την περιγραφόμενη στα προσαρτήματα 2 και 3, είναι κατάλληλο για τη δοκιμασία. Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας το νερό θα πρέπει να είναι σταθερής ποιότητας. Το ρΗ πρέπει να κυμαίνεται κατά ± 0,5 ρΗ. Για να είναι βέβαιο ότι το νερό της αραίωσης δεν θα επηρεάσει κατά τρόπο ανεπιθύμητο το αποτέλεσμα της δοκιμασίας (π.χ., δημιουργώντας σύμπλοκα με την υπό δοκιμή ουσία) και τη συμπεριφορά των γεννητόρων, θα πρέπει κατά διαστήματα να λαμβάνονται δείγματα για ανάλυση. Όταν ένα νερό είναι γνωστό ότι είναι σχετικά σταθερό από πλευράς ποιότητας θα πρέπει, π.χ., κάθε τρεις μήνες, να γίνεται μέτρηση βαρέων μετάλλων (π.χ. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd και Νί), βασικών ανιόντων και κατιόντων (π.χ. Ca, Mg, Na, K, C1 και $S0_4$), φυτοφαρμάκων (π.χ. συνολικά οργανοφωσφορικά και συνολικά οργανοχλωριούχα φυτοφάρμακα), συνολικού οργανικού άνθρακα και αιωρούμενων στερεών. Εάν η ποιότητα του νερού έχει αποδειχθεί ότι είναι σταθερή για ένα τουλάχιστον χρόνο, η συχνότητα των προσδιορισμών μπορεί να περιοριστεί και τα διαστήματα να αυξηθούν (π.χ. κάθε έξι μήνες).

1.6.6. **Διαλύματα δοκιμής**

Τα διαλύματα με τις επιθυμητές συγκεντρώσεις παρασκευάζονται συνήθως με αραίωση αρχικού πυκνού διαλύματος.

Το αρχικό διάλυμα θα πρέπει κατά προτίμηση να παρασκευάζεται με απλή ανάμειξη ή ανάδευση της υπό δοκιμή ουσίας στο νερό αραίωσης με μηχανικά μέσα (π.χ. με μηχανική ανάδευση ή με υπερήχους). Για να επιτευχθεί η κατάλληλη συγκέντρωση του αρχικού πυκνού διαλύματος είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν στήλες κορεσμού (στήλες διαλυτότητας). Πρέπει να αποφεύγεται, κατά το δυνατόν, η χρησιμοποίηση διαλυτών ή προσθέτων διασποράς (παραγόντων διαλυτοποίησης) εντούτοις, αυτές οι ουσίες είναι μερικές φορές απαραίτητες για την παρασκευή αρχικού πυκνού διαλύματος κατάλληλης συγκέντρωσης. Παραδείγματα κατάλληλων διαλυτών είναι η ακετόνη, η αιθανόλη, η μεθανόλη, το *διμεθυλοφορμαμίδιο* και η τριαιθυλενογλυκόλη, ενώ κατάλληλα πρόσθετα διασποράς είναι το Cremop-hor RH40, το Tween 80, η μεθυλοκυτταρίνη 0,01 % και το HCO-40. Όταν χρησιμοποιούνται παράγοντες που βιοαποικοδομούνται εύκολα (π.χ. ακετόνη) ή/και παράγοντες υψηλής πτητικότητας, η χρήση τους θα πρέπει να γίνεται με προσοχή γιατί μπορεί να προκαλέσουν την ανάπτυξη βακτηρίων στις δοκιμασίες συνεχούς ροής. Όταν χρησιμοποιείται παράγοντας διαλυτοποίησης, αυτός δεν πρέπει να έχει σημαντικές επιπτώσεις στην επιβίωση ούτε ορατές δυσμενείς επίπτώσης στα αρχικά στάδια της ζωής οπότε πρέπει να εκτελείται δοκιμασία ελέγχου με διαλύτη μόνο. Θα πρέπει πάντως να καταβάλλεται κάθε δυνατή προσπάθεια ώστε να αποφεύγεται η χρήση τέτοιων υλικών.

Για την ημιστατική τεχνική, είναι δυνατόν να ακολουθηθούν δύο διαφορετικές διαδικασίες ανανέωσης: είτε α) ετοιμάζονται νέα δοκιμαστικά διαλύματα σε καθαρά δοχεία και τα αβγά και οι προνύμφες (larvae) που έχουν επιβιώσει μεταφέρονται με ήπιο τρόπο στα νέα δοχεία εντός μικρού όγκου του παλαιού διαλύματος, χωρίς να εκτίθενται στον αέρα ή β) οι δοκιμαζόμενοι οργανισμοί διατηρούνται στα δοχεία ενώ αντικαθίσταται μέρος μόνο (τουλάχιστον τρία τέταρτα) του νερού. Η συχνότητα ανανέωσης του μέσου εξαρτάται από τη σταθερότητα της δοκιμαστικής ουσίας, συνιστάται πάντως καθημερινή ανανέωση του νερού. Εάν από προκαταρκτικές δοκιμασίες μελέτης της σταθερότητας (βλέπε 1.4) είναι γνωστό ότι η συγκέντρωση της δοκιμαστικής ουσίας δεν είναι σταθερή (βρίσκεται δηλαδή εκτός των ορίων 80-120 % της ονομαστικής συγκέντρωσης ή κάτω από το 80 % της μετρηθείσας αρχικής συγκέντρωσης), σε όλη τη διάρκεια της ανανέωσης, πρέπει να εξεταστεί το ενδεχόμενο να χρησιμοποιηθεί δοκιμασία συνεχούς ροής. Σε κάθε περίπτωση, πρέπει να καταβληθεί προσπάθεια να αποφευχθεί το στρες στις προνύμφες κατά την διαδικασία ανανέωσης του νερού.

▼B

Στις δοκιμασίες συνεχούς ροής, για την προσαγωγή των διαλυμάτων στους δοκιμαστικούς θαλάμους απαιτείται σύστημα το οποίο να παρέχει συνεχώς και να αραιώνει ένα αρχικό διάλυμα της δοκιμαστικής ουσίας (π.χ. αντλία μετρήσεως, αναλογικός αραιωτής, σύστημα κορεσμού). Ο ρυθμός ροής των αρχικών διαλυμάτων και του νερού αραίωσης ελέγχεται κατά διαστήματα, κατά προτίμηση καθημερινά, και δεν διαφέρει περισσότερο από 10 % καθ όλη τη διάρκεια της δοκιμασίας. Θεωρείται κατάλληλη μια ταχύτητα ροής ισοδύναμη με τον όγκο τουλάχιστον πέντε δοκιμαστικών θαλάμων ανά 24 ώρες (2).

1.7. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Στην υπάρχουσα βιβλιογραφία περιέχονται χρήσιμες πληροφορίες για την εκτέλεση των δοκιμασιών τοξικότητας στα έμβρυα ιχθύων και στα λεκιθοφόρα ιχθύδια (sac-fry). Σχετικές παραπομπές υπάρχουν στις αναφορές (7) (8) (9) στη βιβλιογραφία του παρόντος.

1.7.1. **Συνθήκες έκθεσης**

1.7.1.1. *Διάρκεια*

Η δοκιμασία αρχίζει κατά προτίμηση εντός 30 λεπτών αφότου γονιμοποιηθούν τα αβγά. Τα έμβρυα ιχθύων εμβυθί-ζονται οτο δοκιμαστικό διάλυμα πριν αρχίσει το στάδιο της κυτταρικής διαίρεσης των βλαστοδίσκων ή αμέσως μετά, και πάντως προτού αρχίσει το στάδιο του γαστριδίου. Εάν τα αβγά προέρχονται από εξωτερικό προμηθευτή, είναι πιθανό να μην είνα δυνατό να ξεκινήσει η δοκιμασία αμέσως μετά τη γονιμοποίηση. Δεδομένου ότι η ευαισθησία της δοκιμασίας μπορεί να επηρεαστεί αισθητά από την καθυστέρηση έναρξης, η δοκιμασία πρέπει να ξεκινήσει εντός δώρου αφότου γίνει η γονιμοποίηση. Καθώς οι προνύμφες (larvae) δεν λαμβάνουν τροφή κατά την περίοδο έκθεσης, η δοκιμασία πρέπει να τελειώνει αμέσως πριν απορροφηθεί πλήρως ο λεκιθικός σάκος οποιασδήποτε προνύμφης (larvae) σε οποιοδήποτε από τους δοκιμαστικούς θαλάμους ή πριν σημειωθούν θάνατοι από ασιτία στους μάρτυρες. Η διάρκεια εξαρτάται από το χρησιμοποιούμενο είδος. Στα προσαρτήματα 2 και 3 προτείνονται χρόνοι για τη διάρκεια.

1.7.1.2. *Φορτίο*

Ο αριθμός γονιμοποιημένων αβγών στην αρχή της δοκιμασίας πρέπει να είναι στατιστικώς επαρκής. Τα αβγά κατανέμονται στις διάφορες ομάδες αγωγής με τυχαίο τρόπο, και χρησιμοποιούνται ανά συγκέντρωση τουλάχιστον 30 γονιμοποιημένα αβγά ισοκατανεμημένα (όσο είναι δυνατόν δεδομένου ότι για ορισμένα είδη είναι δύσκολο να ληφθούν ίσες παρτίδες) σε τρις τουλάχιστον όμοιους δοκιμαστικούς θαλάμους. Ο ρυθμός πλήρωσης (βιομάζα ανά όγκο δοκιμαστικού διαλύματος) πρέπει να είναι επαρκώς χαμηλός ώστε να διατηρείται η συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου σε ποσοστό μεγαλύτερο του 60 % της τιμής κορεσμού με αέρα (ASV) χωρίς αερισμό. Για τις δοκιμασίες συνεχούς ροής συνιστάται ο ρυθμός πλήρωσης να μην υπερβαίνει το 0,5 g/l ανά 24ωρο και να μην υπερβαίνει τα 5 g/l διαλύματος οποιαδήποτε στιγμή (2).

1.7.1.3. *Φως και θερμοκρασία*

Η φωτοπερίοδος και η θερμοκρασία του νερού της δοκιμής θα πρέπει να ανταποκρίνονται στις ανάγκες του χρησιμοποιούμενου είδους ψαριών (προσαρτήματα 2 και 3). Για την παρακολούθηση της θερμοκρασίας, ενδείκνυται ίσως η χρήση ενός επιπλέον δοκιμαστικού δοχείου.

▼B

1.7.2. **Συγκεντρώσεις**

Κανονικά απαιτούνται 5 συγκεντρώσεις της δοκιμαστικής ουσίας οι οποίες να απέχουν μεταξύ τους κατά ένα σταθερό παράγοντα που δεν υπερβαίνει το 3,2. Η καμπύλη που συνδέει την LC_{50} με την περίοδο έκθεσης στη μελέτη οξείας τοξικότητας πρέπει να ληφθεί υπόψη κατά την επιλογή της σειράς συγκεντρώσεων που θα χρησιμοποιηθούν στη δοκιμασία. Υπό ορισμένες συνθήκες, π.χ. στις οριακές δοκιμασίες, μπορεί να ενδείκνυται η χρήση λιγότερων από πέντε συγκεντρώσεων που θα απέχουν μάλιστα και λιγότερο μεταξύ τους. Εάν η δοκιμασία γίνει σε λιγότερες από πέντε συγκεντρώσεις, θα πρέπει να δοθούν εξηγήσεις. Δεν χρειάζεται να δοκιμάζονται συγκεντρώσεις της ουσίας ανώτερες από την LC_{50} 96 ωρών ή από 100 mg/l όποια είναι χαμηλότερη Οι ουσίες δεν πρέπει να υποβάλλονται στη δοκηια- σία σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από το όριο διαλυτότητα τους στο νερό της δοκιμασίας.

Όταν χρησιμοποιείται παράγοντας διαλυτοποίησης για την παρασκευή των διαλυμάτων (βλέπε 1.6.6), η τελική του συγκέντρωση στα δοχεία δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 0,1 ml/1, η ίδια σε όλα τα δοχεία.

1.7.3. **Μάρτυρες**

Επιπλέον της κανονικής σειράς δοκιμασιών, πρέπει να γίνουν δοκιμασίες με σειρά μαρτύρων του νερού της δοκιμασίας (σε ικανοποιητικό αρι9μό επαναλήψεων) και, εφόσον έχει νόημα, με σειρά μαρτύρων που περιέχουν τον παράγοντα διαλυτοποίησης (σε ικανοποιητικό αριθμό επαναλήψεων).

1.7.4. **Συχνότητα αναλυτικών προσδιορισμών και μετρήσεων**

Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, οι συγκεντρώσεις της δοκιμαστικής ουσίας προσδιορίζονται σε τακτά διαστήματα.

Στις ημιστατικές δοκιμασίες όπου η συγκέντρωση της δοκιμαστικής ουσίας αναμένεται να παραμένει εντός του ± 20 % της ονομαστικής (δηλαδή εντός των ορίων 80-120 %- βλέπε 1.4 και 1.6.6), συνιστάται να αναλύονται οι ελάχιστες και οι μέγιστες συγκεντρώσεις δοκιμής τουλάχιστον αμέσως μετά την παρασκευή τους και αμέσως πριν την ανανέωση του νερού και τουλάχιστον τρεις φορές σε τακτά διαστήματα κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας (πρέπει δηλαδή να αναλύεται δείγμα του ίδιου διαλύματος αμέσως μετά την παρασκευή και αμέσως πριν την ανανέωσή του).

Όταν προβλέπεται ότι η συγκέντρωση της δοκιμαστικής ουσίας δεν θα παραμείνει εντός του ± 20 % της ονομαστικής τιμής (με βάση τα στοιχεία για τη σταθερότητα της ουσίας), είναι απαραίτητο να αναλυθούν όλες οι συγκεντρώσεις, αμέσως μετά την παρασκευή και κατά την ανανέωση, με εφαρμογή όμως του ίδιου προγράμματος (δηλαδή τουλάχιστον τρεις φορές σε τακτά διαστήματα κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας). Σε όλες τις περιπτώσεις, ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων της δοκιμαστικής ουσίας πριν την ανανέωση χρειάζεται να γίνεται σε ένα μόνο από τα όμοια δοχεία για κάθε συγκέντρωση. Το χρονικό διάστημα μεταξύ προσδιορισμών δεν πρέπει να υπερβαίνει τις επτά ημέρες. Συνιστάται να βασίζονται τα αποτελέσματα σε μετρηθείσες συγκεντρώσεις. Εάν μπορεί να αποδειχτεί ότι η συγκέντρωση της δοκιμαστικής ουσίας καθ όλη τη διάρκεια της δοκιμασίας διατηρήθηκε συνεχώς εντός του ± 20 % της ονομαστικής ή της αρχικώς μετρηθείσας συγκέντρωσης, τότε τα αποτελέσματα μπορούν να βασιστούν στις ονομαστικές ή τις αρχικώς μετρηθείσες τιμές.

Σε δοκιμασία συνεχούς ροής, ενδείκνυται καθεστώς δειγματοληψίας ανάλογο με το περιγραοόιιενο για ημιστατικές δοκιμασίες (στην περίπτωση όμως αυτή δεν ισχύουν οι μετρήσεις «παλαιών» διαλυμάτων). Εντούτοις, εάν η διάρκεια της δοκιμασίας υπερβαίνε; τις 7 ημέρες, καλό θα ήταν να αυξηθεί ο αριθμός των δειγματοληψιών στη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας (π.χ. τρεις σειρές μετρήσεων) ώστε να είναι βέβαιο ότι οι συγκεντρώσεις παραμένουν σταθερες,

▼B

Ίσως χρειάζεται να φυγοκεντρηθούν ή να διηθηθούν τα δείγματα (π.χ. με μέγεθος πόρου 0,45 μ). Ωστόσο, επειδή ούτε η διήθηση ούτε η φυγοκέντρηση φαίνεται να διαχωρίζουν πάντοτε το μη βιοδιαθέσιμο κλάσμα της δοκιμαστικής ουσίας από εκείνο που είναι βιοδιαθέσιμο, τα δείγματα μπορούν να μην υποβάλλονται σε αυτές τις κατεργασίες.

Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, σε όλα τα δοχεία θα πρέπει να διενεργούνται μετρήσεις της συγκέντρωσης του δια-λελυμένου οξυγόνου, του ρΗ και της θερμοκρασίας. Στους μάρτυρες και σε ένα δοχείο με την ανώτερη συγκέντρωση θα πρέπει να διενεργούνται μετρήσεις της ολικής σκληρότητας και αλατότητας (εάν χρειάζεται). Το διαλελυμένο οξυγόνο και η αλατότητα (εφόσον χρειάζεται) θα πρέπει να μετρούνται τουλάχιστον τρεις φορές (στην αρχή, στη μέση και στο τέλος της δοκιμασίας). Στις ημιστατικές δοκιμασίες, συνιστάται να εκτελούνται συχνότερες μετρήσεις του δια-λελυμένου οξυγόνου, κατά προτίμηση πριν και μετά από κάθε ανανέωση του νερού ή τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα. Το ρΗ πρέπει να μετρείται στην αρχή και στο τέλος κάθε ανανέωσης του νερού στην ημιστατική δοκιμασία και τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα στις δοκιμασίες συνεχούς ροής. Η σκληρότητα πρέπει να μετρείται μία φορά σε κάθε δοκιμασία. Η θερμοκρασία θα πρέπει να μετρείται ημερησίως και κατά προτίμηση να παρακολουθείται συνεχώς σε ένα τουλάχιστον δοχείο.

1.7.5. **Παρατηρήσεις**

1.7.5.1. *Στάδιο εμβρυϊκής ανάπτυξης*

Το εμβρυϊκό στάδιο (π.χ. στάδιο ναστριδίου) στο οποίο βρίσκεται το υλικό στην αρχική φάση έκθεσης στη δοκιμαστική ουσία πρέπει να επαληθεύεται όσο το δυνατόν ακριβέστερα. Η επαλήθευση μπορεί να γίνει σε αντιπροσωπευτικό δείγμα αβγών τα οποία έχουν διατηρηθεί και καθαριστεί καταλλήλως. Είναι επίσης δυνατό να χρησιμοποιηθούν περιγραφές και απεικονίσεις των εμβρυϊκών σταδίων από τη βιβλιογραφία (2) (5) (10) (11).

1.7.5.2. *Εκκόλαψη και επιβίωση*

Η εκκόλαψη και η επιβίωση πρέπει να παρατηρούνται τουλάχιστον μία φορά την ημέρα και να καταγράφονται τα αριθμητικά δεδομένα. Είναι ενδεχομένως σκόπιμο να γίνονται συχνότερες παρατηρήσεις στην αρχή της δοκιμασίας (π.χ. κάθε 30 λεπτά κατά τις πρώτες τρις ώρες), καθώς σε ορισμένες περίπτώσης, οι χρόνοι επιβίωσης μπορεί να είναι πιο χρήσιμοι από τον αριθμό των θανάτων (π.χ. όταν υπάρχουν οξείες τοξικές επιπτώσεις). Τα νεκρά έμβρυα και οι προνύμφες (larvae) πρέπει να απομακρύνονται αμέσως μόλις υποβληθούν σε παρατήρηση δεδομένου ότι αποσυντίθεν-ται γρήγορα. Πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή όταν απομακρύνονται τα νεκρά στοιχεία ώστε να μην χτυπηθούν ή υποστούν φυσική ζημιά τα γειτονικά αβγά/προνύμφες (larvae) καθώς είναι εξαιρετικά εύθραυστα και ευαίσθητα. Τα κριτήρια θανάτου είναι διαφορετικά αναλόγως του σταδίου ζωής:

— **για τα αβγά:** ιδιαίτερα στα αρχικά στάδια, αισθητή μείωση διαφάνειας και αλλαγή χρώματος, λόγω πήξης ή/και καταβύθισης των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα λευκή θαμπή όψη,

— **για τα έμβρυα:** απουσία κίνησης του σώματος ή/και απουσία καρδιακού ρυθμού ή/και αποχρωματισμός και απώλεια διαφάνειας στα είδη των οποίων τα έμβρυα είναι κανονικά διαπερατά στο φως,

— **για τις προνύμφες (larvae):** ακινησία ή/και απώλεια αναπνευστικής κίνησης ή/και απουσία καρδιακού ρυθμού ή/και λευκό θαμπό χρώμα του κεντρικού νευρικού συστήματος ή/και έλλειψη αντίδρασης στα μηχανικά ερεθίσματα.

▼B

1.7.5.3. *Αφύσικη όψη*

Ο αριθμός προνυμφών (larvae) που εμφανίζουν αφύσικο σχήμα σώματος ή/και χρωματισμό κατά το στάδιο απορρόφησης του λεκιθικού σάκου θα πρέπει να καταγράφονται σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα ανάλογα με τη διάρκεια της δοκιμασίας και το είδος της παρατηρούμενης ανωμαλίας. Πρέπει να σημειωθεί ότι ανώμαλα έμβρυα και προνύμφες (larvae) είναι φυσικό να εμφανίζονται και μπορεί να αντιπροσωπεύουν σημαντικό ποσοστό των μαρτύρων σε ορισμένα είδη. Τα ανώμαλα ζώα πρέπει να απομακρύνονται από τα δοκιμαστικά δοχεία μόνο όταν πεθάνουν.

1.7.5.4. *Αφύσικη συμπεριφορά*

Οι ανωμαλίες, π.χ. υπεραερισμός, ασυντόνιστη κολύμβηση και ατυπική αταραξία πρέπει να καταγράφονται σε κατάλληλα διαστήματα αναλόγως της διάρκειας της δοκιμασίας. Λυτές οι επιπτώσεις, παρόλο που είναι δύσκολο να εκφραστούν ποσοτικά, μπορούν, όταν έχουν παρατηρηθεί, να βοηθήσουν στην ερμηνεία των δεδομένων θνησιμότητας π.χ. να παράσχουν πληροφορίες νια τον τρόπο τοξικής δράσης της ουσίας.

1.7.5.5. *Μήκος*

Στο τέλος της δοκιμασίας συνιστάται η μέτρηση του μήκους κάθε ψαριού χωριστά μπορεί να χρησιμοποιηθεί το κανονικό μήκος, το μήκος έως τα πτερύγια ή το συνολικό μήκος. Εάν ωστόσο σημειωθεί αποσύνθεση του πτερυγίου της ουράς ή διάβρωση των πτερυγίων πρέπει να χρησιμοποιείται το κανονικό μήκος. Γενικά, όταν η δοκιμασία εκτελείται σωστά, ο συντελεστής απόκλισης του μήκους μεταξύ των επαναλήψεων των μαρτύρων πρέπει να είναι ≤ 20 %.

1.7.5.6. *Βάρος*

Στο τέλος της δοκιμασίας μπορεί να μετρηθεί το βάρος κάθε ψαριού χωριστά το ξηρό βάρος (24 ώρες σε 60 ^{o}C) προτιμάται από το υγρό βάρος (μετά από στέγνωμα) Γενικά, όταν η δοκιμασία εκτελείται σωστά, ο συντελεστής απόκλισης του βάρους μεταξύ των επαναλήψεων των μαρτύρων πρέπει να είναι < 20 %.

Αυτές οι παρατηρήσεις 3α έχουν ως αποτέλεσμα να υπάρχουν διαθέσιμα για στατιστική ανάλυση τα ακόλουθα δεδομένα:

— συνολική θνησιμότητα,

— ρυθμός υγιών προνυμφών (larvae) στο τέλος της δοκιμασίας,

— χρόνος μεταξύ έναρξης της εκκόλαψης και λήξης της εκκόλαψης (δηλαδή εκκόλαψη κατά 90 % σε κάθε επαναληπτική ομάδα),

— αριθμός προνυμφών (larvae) που εκκολάπτονται κάθε μέρα,

— μήκος (και βάρος) των επιζώντων ζώων στο τέλος της δοκιμασίας,

— αριθμός παραμορφωμένων προνυμφών (larvae) ή που εμφανίζουν αφύσικη όψη,

— αριθμός προνυμφών (larvae) που εμφανίζουν αφύσικη συμπεριφορά.

▼B

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΕΙΣ**

2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Συνιστάται η συμμετοχή στατιστικολόγου στην εκτέλεση τόσο του σχεδιασμού όσο και της ανάλυσης της δοκιμασίας, επειδή η μέθοδος επιτρέπει σημαντικές διαφορές στον πειραματικό σχεδιασμό, π.χ. στον αριθμό των δοκιμαστικών θαλάμων, στον αριθμό των συγκεντρώσεων, στον αρχικό αριθμό γονιμοποιημένων αβγών και στις μετρούμενες παραμέτρους. Επειδή υπάρχουν πολλές επιλογές για τον σχεδιασμό της δοκιμασίας, δεν δίνονται εδώ ειδικές οδηγίες για τη στατιστική επεξεργασία.

Εάν πρέπει να υπολογιστούν οι τιμές LOEC/NOEC, θα είναι απαραίτητο να αναλυθούν οι διαφορές σε κάθε επαναληπτική ομάδα με ανάλυση διασποράς (ANOVA) ή πίνακα συσχετισμού. Για την εκτέλεση πολλαπλών συγκρίσεων μεταξύ των αποτελεσμάτων των διαφορετικών συγκεντρώσεων και των αποτελεσμάτων των μαρτύρων, ενδείκνυται ενδεχομένως η μέθοδος Dunnett (12) (13). Αλλα χρήσιμα παραδείγματα είναι επίσης διαθέσιμα, αναφορές (14) (15). Πρέπει να υπολογίζεται και να καταγράφεται ο βαθμός επίδρασης που μπορεί να εντοπιστεί μέσω ANOVA ή με άλλη διαδικασία (ήτοι η ισχύς της δοκιμασίας). Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν είναι όλες οι παρατηρήσεις που αναφέρονται στο σημείο 1.7.5.6 κατάλληλες για στατιστική ανάλυση με ANOVA. Για παράδειγμα, η συνολική θνησιμότητα και ο αριθμός υγιών προνυμφών (larvae) στο τέλος της διαδικασίας α μπορούσαν να αναλυθούν με μεθόδους probit.

Εάν πρέπει να υπολογτστούν οι τιμές LC/EC_X, πρέπει να προσαρμόζονται τα δεδομένα που έχουν επιλεχθεί σε μία ή πολλές κατάλληλες καμπύλες, όπως η λογιστική καμπύλη, με στατιστική μέθοδο όπως των ελαχίστων τετραγώνων ή των μη γραμμικών ελαχίστων τετραγώνων. Η καμπύλη ή οι καμπύλες μπορούν να γίνουν παραμετρικές ώστε να είναι δυνατόν να προσδιοριστούν απευθείας η LC/EC_X και το τυπικό σφάλμα αυτής. Διευκολύνεται έτσι σε μεγάλο βαθμό ο υπολογισμός του ορίου εμπιστοσύνης της LC/EC_X. Καθορίζεται αμφίπλευρο επίπεδο εμπιστοσύνης 95 %, εκτός εάν υπάρχουν βάσιμοι λόγοι να καθοριστεί άλλο. Η διαδικασία προσαρμογής καλό είναι να παρέχει ένα μέσο ελέγχου της σημαντικότητας της έλλειψης προσαρμογής. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί γραφική μέθοδος για την προσαρμογή των καμπυλών. Η αναγωγακή ανάλυση είναι κατάλληλη για όλες τις παρατηρήσεις που αναφέρονται στο σημείο 1.7.5.6.

2.2. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή αν οι μετρούμενες τοξικές συγκεντρώσεις των δοκιιαστικών διαλυμάτων βρίσκονται σε επίπεδα κοντά στο όριο ανίχνευσης της αναλυτικής μεθόδου. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων για συγκεντρώσεις πάνω απο την υδατοδιαλυτότητα της ουσίας πρέπει επίσης να γίνεται με προσοχή.

2.3. ΕΚΘΕΣΗ

Η έκθεση με τα αποτελέσματα της δοκιμασίας πρέπει να περιέχει τις ακόλουθες πληροφορίες:

2.3.1. **Δοκιμαστική ουσία:**

— φυσικές ιδιότητες και φυσικοχημικές ιδιότητες που αφορούν τη δοκιμασία

— χημικά χαρακτηριστικά, μεταξύ των οποίων η καθαρότητα και αναλυτική μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της εξεταζόμενης ουσίας, όπου απαιτείται.

▼B

2.3.2. **Είδος ψαριού που χρησιμοποιείται στη δοκιμή:**

— επιστημονική ονομασία, στέλεχος, αριθμός γεννητόρων (ήτοι πόσα θηλυκά χρησιμοποιήθηκαν για να ληφθεί ο απαιτούμενος αριθμός αβγών στη δοκιμασία), πηγή και μέθοδος συλλογής των γονιμοποιημένων αβγών και επακόλουθος χειρισμός.

2.3.3. **Συνθήκες εκτέλεσης της δοκιμασίας:**

— χρησιμοποιηθείσα διαδικασία δοκιμασίας (π.χ. ημιστατική ή συνεχούς ροής, χρονικό διάστημα από τη γονιμοποίηση ως την έναρξη της δοκιμασίας, ρυθμός πλήρωσης, κ.λπ.),

— φωτοπερίοδος,

— σχεδιασμός της δοκιμασίας (π.χ. αριθμός δοκιμαστικών θαλάμων και αριθμός επαναλήψεων με την ίδια συγκέντρωση, αριθμός εμβρύων ανά επαναλαμβανόμενο δοχείο),

— μέθοδος παρασκευής των αρχικών διαλυμάτων και συχνότητα ανανέωσης (αναφέρονται, εφόσον χρησιμοποιούνται, ο παράγοντας διαλυτοποίησης και η συγκέντρωσή του),

— οι ονομαστικές συγκεντρώσεις των δοκιμών, οι μετρηθείσες τιμές, οι μέσες τιμές των μετρούμενων τιμών και οι τυπικές αποκλίσεις τους στα δοκιμαστικά δοχεία καθώς και η μέθοδος με την οποία επιτεύχθηκαν και εάν η υπό δοκιμή ουσία είναι διαλυτή στο νερό σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από τις χρησιμοποιούμενες στη δοκιμασία, πρέπει να παρέχονται αποδεικτικά στοιχεία σύμφωνα με τα οποία οι μέτρήσης αναφέρονται στις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας που είναι διαλελυμένη,

— χαρακτηριστικά του νερού διάλυσης: ήτοι: ρΗ, σκληρότητα, θερμοκρασία, συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου, επίπεδα υπολειμματικού χλωρίου (εφόσον μετρείται), ολικός οργανικός άνθρακας, αιωρούμενα στερεά, αλατότητα του δοκιμαστικού μέσου (εφόσον μετρείται) και τυχόν άλλες μετρήσεις,

— ποιότητα του νερού στα δοκιμαστικά δοχεία: πΗ, σκληρότητα, θερμοκρασία και συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου.

2.3.4. **Αποτελέσματα:**

— αποτελέσματα τυχόν προκαταρκτικών μελετών σχετικά με τη σταθερότητα της δοκιμαστικής ουσίας,

— στοιχεία ότι οι μάρτυρες πληρούν το πρότυπο αποδεκτής συνολικής επιβίωσης για το είδος ψαριού που χρησιμοποιείται στη δοκιμή (προσαρτήματα 2 και 3),

— στοιχεία για τη θνησιμότητα/επιβίωση στα στάδια του εμβρύου και της προνύμφης (larvae) και συνολική θνησιμότητα/επιβίωση,

— ημέρες εκκόλαψης και αριθμός εκκολαψθέντων αβγών,

— στοιχεία σχετικά με το μήκος (και το βάρος),

— συχνότητα εμφάνισης και περιγραφή μορφολογικών ανωμαλιών, εάν υπάρχουν,

— συχνότητα εμφάνισης και περιγραφή επιπτώσεων στη συμπεριφορά, εάν υπάρχουν,

— στατιστική ανάλυση και επεξεργασία των δεδομένω,

— για τις δοκιμασίες που αναλύονται με ANOVA, η ελάχιστη συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται επίπτωση (LOEC) σε p=0,05 και η συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρείται επίπτωση (NOEC) για κάθε απάντηση που αξιολογείται καθώς και περιγραφή των στατιστικών διαδικασιών που χρησιιιοποιήθηκαν και ενδεικτική αναφορά του ιιεγέθους των επιπτώσεων που μπορούν να ανιχνευθούν,

▼B

— λια τις δοκιμασίες που αναλύθηκαν με τεχνικές αναγωγής ο λόγος LC/EC_x και τα διαστήματα εμπιστοσύνης καθώς και γραφική παράσταση του μοντέλου προσέγγισης που χοησιμοποιήθηκε για τους σχετικούς υπολογισμούς,

— αιτολόγηση κάθε παρέκκλισης από τη μέθοδο της δοκιμασίας.

3. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) Kristensen P. (1990). Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, 60 pp. June 1990.

(2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 pp.

(3) Brauhn J. L. and Schoettger R. A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p. 54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

(4) Brungs W. A. and Jones B. R. (1977). Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures. p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

(5) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish *(Brachydanio rerio)* in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, pp. 121-173.

(6) Legault R. (1958). A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, pp. 328-330.

(7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J. E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish (*BrachyiiamO rerio*) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, pp. 61-71.

(8) Birge J. W., Black J. A. and Westerman A. G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, pp. 807-821.

(9) Van Leeuwen C. J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986). Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout *(Salmo gairdneri).* J. Aquatic Toxicology, 9, pp. 129-145.

(10) Kirchen R. V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.

(11) Kirchen R. V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 pp.

(12) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096-1121.

(13) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(14) Mc Clave J. T., Sullivan J. H. and Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼B

(15) Van Leeuwen C. J., Adema D. M. M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, pp. 321-334.

(16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS l/RM/28, December 1992, 81 pp.

(17) Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, 21, pp. 126-134.

(18) Meyer A.. Bierman C. H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish (*Dartio rerio*), a model system in developmental biology — an invitation to the comperative methods. Proc. Royal Society of London. Series B, 252: pp. 231-236.

(19) Ghillebaert F., Chaillou C. Deschamps F. and Roubaud P. (199 5). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicologv and Environmental Safetv 32, pp. 19-28.

(20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias* latipes. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, *(Oryzias* latipes). EPA report EPA/600/3-91/06 3, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(22) De Graeve G. M, Cooney J. D., Mclntyre D. 0., Poccocic T. L, Reichenbach N. G., Dean J. H. and Marcus M. D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (Pimephales promelas) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10, pp. 1189-1203.

(23) Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, Chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.

(24) Balon E. K. (198 5). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, 280 pp.

(25) Blaxter J. H. S. (1988). Pattern and variety in development, in: W. S. Hoar and D. J. Randall eds., Fish Physiology, Vol. XIA, Academic press, pp. 1-58.

Πίνακας 1Α

Είδη ψαριών συνιστώνται για τη δοκιμασία

ΓΛΥΚΟΥ ΝΕΡΟΥ
Oncorhynchus mykiss Γραβανή (αμερικάνικη) πέστροφα (9) (16)
Danio rerio Ζεβρόψαρο (7) (17) (18)
Cyprinus caprio Κοινός κυπρίνος (σαζάνι) (8) (19)
Oryzias latipes Γιαπωνέζικο ριζόψαρο/Medaka (20) (21)
Pimephaks promclas Χοντροκέφαλη τσίμα (8) (22)

▼B

Πίνακας 1Β

Παραδείγματα άλλων ειδών για τα οποία υπάρχει επαρκής βιβλιογραφία και τα οποία έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί

Γλυκού νερού	Αλμυρού νερού
Carassius auratus Χρυσόψαρο (8)	*Menidia peninsulae* Tidewater silverside (23) (24) (25)
Lepomis macrochirus Γαλαζόσπλαχνο λεοτί (8)	*Clupea harengus* Ρέγγα (24) (25)
	Gadus morhua Βακαλάος (24) (25)
	Cyprinodon vancgatus πολύχρωμη τσίμα (23) (24) (25)

▼B

Προσαρτημα 1

ΟΔΗΓΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΑ ΕΜΒΡΥΑ ΚΑΙ ΤΑ ΛΕΚΙΘΟΦΟΡΑ ΙΧΘΥΔΙΑ (SAC-FRY) ΤΟΥ ΖΕΡΒΟΨΑΡΟΥ *(Brachydanio rerio)*

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το ζεβρόψαρο προέρχεται από την ακτή Coromandel της Ινδίας όπου κατοικεί στα υδατορεύματα ταχείας ροής. Πρόκειται για κοινό ψάρι ενυδρείου της οικογένειας των κυπρίνων. Πληροφορίες για τη φροντίδα και την καλλιέργεια του υπάρχουν στη βασική βιβλιογραφία για τα τροπικά ψάρια. Επιοκόπηση των σχετικών με τη βιολογία και την χρήση του στην ιχθυοτροφία ερευνών έχει δημοσιευθεί από τον Laale (1).

Το μήκος του σπανίως υπερβαίνει τα 45 mm. Το σώμα του είναι κυλινδρικό με 7-9 οριζόντιες σκούρες μπλε στιλπνές ραβδώσεις. Οι ραβδώσεις καταλήγουν στα πτερύγια της ουράς και της έδρας. Η ράχη είναι φαιοπράσινη. Τα αρσενικά είναι πιο αδύνατα από τα θηλυκά. Τα θηλυκά είναι πιο στιλπνά και η γαστρική χώρα είναι διεσταλμένη, ιδίως πριν την ωοτοκία.

Τα ενήλικα ψάρια είναι ικανά να ανεχθούν μεγάλες διακυμάνσεις θερμοκρασίας, pH και σκληρότητας. Ωστόσο, για να είναι τα ψάρια υγιή και να παράγουν αβγά καλής ποιότητας, πρέπει να εξασφαλίζονται βέλτιστες συνθήκες.

Κατά την ωοτοκία το αρσενικό ακολουθεί το θηλυκό και εφορμά, με αποτέλεσμα να γονιμοποιούνται τα αβγά αμέσως μόλις αποβληθούν. Τα αβγά, τα οποία είναι διαφανή και δεν είναι κολλώδη, πέφτουν στο βυθό και ενδεχομένως τρώγονται από τους γεννήτορες. Η ωοτοκία επηρεάζεται από το φως. Εάν το πρωινό φως είναι κατάλληλο, το ψάρι αποβάλλει το γόνο τις πρώτες πρωινές ώρες.

Το θηλυκό μπορεί να γεννήσει παρτίδες εκατοντάδων αβγών ανά εβδομάδα.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΓΕΝΝΗΤΟΡΕΣ, ΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΤΑ ΑΡΧΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΖΩΗΣ

Επιλέγεται κατάλληλος αριθμός υγιών ψαριών και αυτά κρατούνται σε κατάλληλα ύδατα (βλέπε προσάρτημα 4) για 2 τουλάχιστον εβδομάδες πριν την προβλεπόμενη ωοτοκία. Τα ψάρια θα πρέπει να έχουν ζευγαρώσει προς αναπαραγωγή μία τουλάχιστον φορά πριν παραχθεί η παρτίδα αβγών που θα χρησιμοποιηθεί στη δοκιμασία. Η πυκνότητα των ψαριών κατά την περίοδο αυτή δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1 γραμμάριο ψαριών ανά λίτρο. Τακτικές αλλαγές του νερού ή χρήση συστημάτων καθαρισμού είναι προϋποθέσεις υψηλότερης πυκνότητας. Η θερμοκρασία στις δεξαμενές δοχεία συντήρησης πρέπει να διατηρείται στους (25 ± 2 °C. Η τροφή των ψαριών πρέπει να ποικίλλει και να αποτελείται π.χ. από αποξηραμένη τροφή του εμπορίου, ζωντανά νεοεκκολαφθέντα αρτέμια (Arthemia), χιρονομίδες, Daphnia, λευκοσκώληκες (Enchytraeids).

Στη συνέχεια περιγράφονται συνοπτικά δύο διαδικασίες, οι οποίες στην πράξη έχουν οδηγήσει σε επαρκή παρτίδα γονιμοποιημένων αβγών για την εκτέλεση μιας δοκιμασίας.

i) Οκτώ θηλυκά και 16 αρσενικά τοποθετούνται σε δεξαμενή που περιέχει 50 λίτρα νερό αραίωσης και, χωρίς να εκτίθενται σε άμεσο φως, αφήνονται κατά το δυνατόν ανενόχλητα για 48 τουλάχιστον ώρες. Το απόγευμα της προηγούμενης μέρας, τοποθετείται στο βυθό του ενυδρείου δίσκος εναπόθεσης γόνου. Ο δίσκος αποτελείται από πλαίσιο (από πλεξιγκλάς ή άλλο κατάλληλο υλικό), ύψους 5-7 cm καλυμμένο στο επάνω μέρος με χονδρό δίχτυ 2-5 mm και στο κάτω μέρος με λεπτό δίχτυ 10-30 μm. Στο χονδρό δίχτυ του πλαισίου προσδένονται πολυάριθμα κομμάτια νάιλον σκοινιού ξετυλιγμένου τα οποία αποτελούν σημεία η'απύθέσης αβγών. Αφού αφεθούν στο σκοτάδι για 12 ώρες, τα ψάρια φωτίζονται με απαλό φως που αποτελεί έναυσμα για την εναπόθεση των αβγών. Δύο έως τέσσερις ώρες μετά την εναπόθεση των αβγών, αφαιρείται ο δίσκος και συλλέγονται τα αβγά. Ο δίσκος εμποδίζει τα ψάρια να φάνε τα αβγά και ταυτοχρόνως διευκολύνει τη συλλογή τους. Τα ψάρια πρέπει να έχουν γεννήσει τουλάχιστον μία φορά πριν γεννήσουν τα αβγά που θα χρησιμοποιηθούν στη δοκιμασία.

▼B

ii) Πέντε έως 10 αρσενικά και θηλυκά ψάρια κρατούνται χωριστά τουλάχιστον 2 εβδομάδες πριν την προβλεπόμενη ωοτοκία. Μετά από 5-10 ημέρες, η γαστρική χώρα των θηλυκών διαστέλλεται και οι γπνητικές θηλές γίνονται ορατές. Τα αρσενικά δεν διαθέτουν θηλές. Η ωοτοκία γίνεται σε ειδικές δεξαμενές εξοπλισμένες με δικτυωτό ψευδοπάτο (όπως ανωτέρω). Η δεξαμενή γεμίζεται με νερό αραίωσης ώστε το βάθος του νερού πάνω από το δικτυωτό να είναι 5-10 cm. Ένα θηλυκό και δύο αρσενικά τοποθετούνται στη δεξαμενή την ημερα πριν την προβλεπόμενη ωοτοκία. Η θερμοκρασία του νερού αυξάνεται βαθμιαία ένα βαθμό πάνω από τη τη θερμοκρασία εγκλιματισμού. Η δεξαμενή αφήνεται στο σκοτάδι, κατά το δυνατόν χωρίς οχλήσεις. Το πρωί φωτίζεται με απαλό φως που αποτελεί έναυσμα για την εναπόθεση των αβγών. Μετά από 2-4 ώρες, αφαιρούνται τα ψάρια και συλλέγονται τα αβνά. Εάν χρειάζονται μεγαλύτερες παρτίδες αβγών από αυτές που μπορούν να παραχθούν από ένα θηλυκό, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ταυτόχρονα όσες δεξαμενές αναπαραγωγής χρειάζονται. Καταγράφοντας το αναπαραγωγικό αποτέλεσμα καθενός από τα θηλυκά πριν τη δοκιμασία (μέγεθος παρτίδας και ποιότητα), μπορούν να επιλεχθούν για αναπαραγωγή τα θηλυκά με τις υψηλότερες αναπαραγωγικές επιδόσεις.

Τα αβγά μεταφέρονται στα δοκιμαστικά δοχεία με γυάλινες πιπέττες (εσωτερικής διαμέτρου όχι μικρότερης από 4 mm) εφοδιασμένες με ελαστική φούσκα αναρρόφησης. Η ποσότητα νερού που συνοδεύει τα αβγά κατά τη μεταφορά πρέπει να είναι όσο γίνεται μικρότερη αφού τα αβγά βυθίζονται στο νερό, βαρύτερα κα9ώς είναι, και μένουν έξω από την πιπέττα. Χρειάζεται προσοχή ώστε τα αβγά (και οι προνύμφες) να μην έρθουν σε επαφή με τον αέρα. Δείγμα της παρτίδας (ή δείγματα των παρτίδων) υποβάλλονται σε μικροσκοπική εξέταση για να εξασφαλιστεί ότι δεν εμφανίζονται ανωμαλίες στα πρώτα στάδια ανάπτυξης. Δεν επιτρέπεται η απολύμανση των αβγών.

Το ποσοστό θνησιμότητας των αβγών είναι υψηλότερο τις πρώτες 24 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Συχνά σημειώνεται θνησιμότητα 5-40 % σ' αυτό το διάστημα. Τα αβγά εκφυλίζονται λόγω ανεπιτυχούς γονιμοποίησης ή ατυχούς ανάπτυξης. Η ποιότητα της παρτίδας των αβγών φαίνεται να εξαρτάται από τα θηλυκά ψάρια καθώς μερικά θηλυκά παράγουν πάντοτε αβγά καλής ποιότητας, ενώ άλλα δεν τα καταφέρνουν ποτέ. Αλλά και ο ρυθμός ανάπτυξης και ο ρυθμός εκκόλαψης ποικίλλουν από τη μία παρτίδα στην άλλη. Τα επιτυχώς γονιμοποιημένα αβγά και οι προνύμφες (yolk sac larvae) σημειώνουν καλό ποσοστό επιβίωσης, συνήθως άνω του 90 %. Στους 25 °C τα αβγά εκκολάπτονται 3-5 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση και ο λεκιθικός σάκος απορροφάται περίπου 13 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση.

Η εμβρυϊκή ανάπτυξη έχει οριστεί ικανοποιητικά από τους Hisaoka και Battle (2). Λόγω της διαφάνειας των αβγών και των προνυμφών (post-hatch larvae) μετά την εκκόλαψη, είναι δυνατόν να παρακολουθείται η ανάπτυξη των ψαριών και να παρατηρείται η παρουσία δυσπλασιών. Περίπου τέσσερις ώρες μετά την ωοτοκία, τα μη γονιμοποιημένα αβγά διακρίνονται από τα γονιμοποιημένα (3). Για την εν λόγω εξέταση, τα αβγά και οι προνύμφες (larvae) τοποθετούνται σε δοκιμαστικά δοχεία μικρού όγκου και μελετώνται κάτω από το μικροσκόπιο.

Οι συνθήκες της δοκιμασίας που εφαρμόζονται στα αρχικά στάδια ζωής απαριθμούνται στο προσάρτημα 2. Οι βέλτιστες τιμές ρΗ και σκληρότητας του ύδατος αραίωσης είναι 7,8 και 250 mg $CaCO_3$/l αντιστοίχως.

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΕΣ

Προτείνεται προσέγγιση δύο σταδίων. Αρχικά αναλύονται στατιστικά τα στοιχεία για τη θνησιμότητα, τις ανωμαλίες ανάπτυξης και το χρόνο εκκόλαψης. Κατόπιν, για τις συγκεντρώσεις στις οποίες δεν έχουν ανιχνευθεί δυσμενείς επιπτώσεις σε καμία από αυτές τις παραμέτρους, αξιολογείται στατιστικά το μήκος του σώματος. Αυτή η προσέγγιση συνιστάται καθώς η τοξική ουσία μπορεί να επιφέρει επιλεκτικό θάνατο των μικρότερων ψαριών, παράταση του χρόνου εκκόλαψης και σοβαρές δυσπλασίες, και να οδηγήσει επομένως σε μη πραγματικά αποτελέσματα όσον αφορά τις μετρήσεις μήκους. Επιπλέον, ο αριθμός ψαριών προς μέτρηση του μήκους θα είναι περίπου ο ίδιος για κάθε αγωγή, οπότε εξασφαλίζεται η εγκυρότητα των στατιστικών δεδομένων.

▼B

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ LC_{50} ΚΑΙ EC_{50}

Το ποσοστό επιβίωσης των αβγών και των προνυμφών (larvae) υπολογίζεται και διορθώνεται βάσει της θνησιμότητας των μαρτύρων σύμφωνα με τον τύπο του Abbott (4):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P'}{C} \times 100\right)$$

όπου:

P = διορθωμένο % επιβίωσης

P' = % παρατηρηθείσα επιβίωση στη συγκέντρωση δοκιμής

C = % επιβίωση στους μάρτυρες

Εάν είναι δυνατόν, η LC_{50} καθορίζεται με κατάλληλη μέθοδο στο τέλος της δοκιμασίας.

Για να συμπεριληφθούν στον στατιστικό υπολογισμό της EC_{50} και οι μορφολογικές ανωμαλίες, μπορεί να ανατρέξει κανείς στον Stephan (5).

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΤΙΜΩΝ LOEC ΚΑΙ NOEC

Ένας από τους στόχους της δοκιμασίας στα αβγά και τα λεκιθοψόρα ιχθύδια (sac-fry) είναι να συγκριθούν οι μη μηδενικές συγκεντρώσεις με τις τιμές των μαρτύρων, δηλαδή να προσδιοριστεί η LOEC. Επομένως πρέπει να χρησιμοποιηθούν διαδικασίες πολλαπλής σύγκρισης (6) (7) (8) (9) (10).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Laale H. W. (19"). The Biology and Use of the Zebrafish *(Bradndanio* rerio) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, pp. 121-173.

(2) Hisaoka K. K. and Battle H. I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102, 311 pp.

(3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beirn Zebrabarbling *(Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, pp. 173-181.

(4) Finney D. J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp. 1-333.

(5) Stephan C. E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766,). G. Pearson, R. B. Foster and W. E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, pp. 69-81.

(6) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096-1121.

(7) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(8) Williams D. A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, pp. 103-117.

(9) Williams D. A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, pp. 519-531.

(10) Sokal R. R. and Rohlf F. J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W. H. Freeman and Co., San Francisco.

▼B

Προσαρτημα 2

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΛΟΚΙΜΑΓΙΑΣ, ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΚΑΙ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΓΙΑ ΤΑ ΣΥΝΙΣΤΩΜΕΝΑ ΕΙΔΗ

Είοη	Θερμοκρυσία (T)	Λλατόυμα (0/00)	Φωτοπεριόδοσς (ώρες)	Διάρκεια των σταδίων (ημέρες)		Τυπική διάρκεια δοκιμασίας	Επιβίωση μαρτύρων (ελάχιστη %)	
				Έμβρυα	Δοκιμασία σε λεκιθοφόρα (sac-fry]		Επιτυχία εκκόλαψης	Μετά την εκκόλαψη
ΓΛΥΚΛ ΝΕΡΑ								
Brachydanio rerio Ζεβρόψαρο	25 ± 1	—	12-16	3-5	8-10	Το συντομότερο δυνατό μετά τη γονιμοποίηση (αρχικό στάδιο γαστριδίου) έως 5 ημέρες μετά την εκκόλαψη (8-10 ημέρες)	80	90
Oncorhynchus mykiss	10 ± 1 (1) 12 ± 1 (2)	—	0 (3)	30-35	25-30	Το συντομότερο δυνατό μετά τη γονιμοποίηση (αρχικό στάδιο γαστριδίου) έως 20 ημέρες μετά την εκκόλαψη (50-5 5 ημέρες)	66	70
Γραβανή (αμερικανική) πέστροφα	21-25	—	12-16	5	> 4	Το συντομότερο δυνατό μετά τη γονιμοποίηση (αρχικό στάδιο γαστριδίου) έως 4 ημέρες μετά την εκκόλαψη (8-9 ημέρες)	80	75
C*yprinus carpio* Κυπρίνος (σαξάνι)	24 + 1 (1) 23 ± 1 (2)	—	12-16	8-11	4-8	Το συντομότερο δυνατό μετά τη γονιμοποίηση (αρχικό στάδιο γαστριδίου) έως 5 ημέρες μετά την εκκόλαψη (13-16 ημέρες)	80	80
Oryzias latipes Γιαπωνέζικο piιξόψαρο/medaka *Pimephales promelas* Χοντροκεφαλη τσίμα	25 + 2		16	4-5	5	Το συντομότερο δυνατό μετά τη γονιμοποίηση (αρχικό στάδιο γαστριδίου) έως 4 ημέρες μετά την εκκόλαψη (8-9 ημέρες)	60	70

(1) Για έμβρυα.
(2) Για προνύμφες.
(3) Σκοτάδι για τα έμβρυα και τις προνύμφες έως μία εβδομάδα μειά την εκκόλαψη εκτός εάν επιθεωρούνται. Κατόπιν χαμηλό φως καθ όλη τη δοκιμασία.

▼B

Προσαρτημα 3

Συνθήκες Δοκιμής, Διάρκεια Και Κριτήρια Επιβιώσης Για Τα Είδη Για Τα Οποία Υπάρχει Επαρκής Βιβλιογραφία

Είδη	Θερμοκρασια (T)	Αλατότητα (0/00)	Φωτοπερίοδος (ώρες)	Διάρκεια των σταδίων (ημέρες)		Τυπική διάρκεια δοκιμασίας στα έμβρυα και τα λεκιθοφόρα ιχθύδια (sac-fry)	Επιβίωση των μαρτύρων (ελάχιστη %)	
				Έμβρυα	Δοκιμασία σε λεκιθοφόρα ιχθύδια (sac-fry)		Επιτυχία της εκκόλαψης	Μετά την εκκόλαψη
ΓΛΥΚΟΥ ΝΕΡΟΥ								
Carassius auratus Χρυσόψαρο	24 ± 1	—	—	3-4	> 4	Το συντομότερο δυνατό μετά τη γονιμοποίηση {αρχικό στάδιο γαστριδίοιι) έως 4 ημέρες μετά την εκκόλαψη (7 ημέρες)	—	80
l.eopomis macrochiru Blugill sunfish	21 ± 1	—	16	3	> 4	Το συντομότερο δυνατό μετά τη γονιμοποίηση (αρχικό στάδιο γαστριδίου) έως 4 ημέρες μετά την εκκόλαψη (7 ημέρες)	—	75
ΛΑΜΥΡΟΥ ΝΕΡΟΥ								
Menidia peninsulac Tidewater silveiside	22-25	15-22	12	1,5	10	Το συντομότερο δυνατό μετά τη γονιμοποίηση (αρχικό στάδιο γαστριδίου) έως 5 ημέρες μετά την εκκόλαψη (6-7 ημέρες)	80	60
Clupea harengu Ρέγγα	10 ± 1	8-15	12	20-25	3-5	Το συντομότερο δυνατό μετά τη γονιμοποίηση (αρχικό στάδιο γαστριδίου) έως 3 ημέρες μετά την εκκόλαψη (23-27 ημέρες)	60	80
Gadus morhua Βακαλάος	5 ± 1	5-30	12	14-16	3-5	Το συντομότερο δυνατό μετά τη γονιμοποίηση (αρχικό στάδιο γαστριδίου) έως 3 ημέρες μετά την εκκόλαψη (18 ημέρες)	60	80
Cyprinodon variegatus Πολύχρωμη τοίμα	25 ± 1	15-30	12	—	—	Το συντομότερο δυνατό μετά τη γονιμοποίηση (αρχικό στάδιο γασιμιδίου) έως 4/7 ημέρες μετά την εκκόλαψη (28 ημέρες)	> 75	80

▼B

ΠΡΟΣΑΡΤΗΜΑ 4

ΟΡΙΣΜΕΝΑ ΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΟΣ ΑΠΟΔΕΚΤΟΥ ΥΔΑΤΟΣ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

Ουσία	Συγκεντρώσεις
Αιωρούμενα σωματίδια	< 20 mg/l
Ολικός οργανικός άνθρακας	< 2 mg/l
Μη ιονισμένη αμμωνία	< 1 ug/l
Υπολειμματικό χλώριο	< 1μg/l
Ολικά οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα	< 50 mg/1
Ολικά οργανοχλωριούχα φυτοφάρμακα συν πολυχλωριούχα διφαινύλια	< 50 ng/1
Ολικό οργανικό χλώριο	< 25 ng/1

▼B

Γ.16. ΜΕΛΙΣΣΕΣ —ΜΕΛΕΤΗ ΟΞΕΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΥΣΙΩΝ— ΠΟΥ ΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η εν λόγω μέθοδος μελέτης οξείας τοξικότητας αποτελεί επανάληψη της μεθόδου TG 213 (1998) του ΟΟΣΑ.

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πρόκειται για μια εργαστηριακή μέθοδο προβλεπόμενη για τη μελέτη της οξείας τοξικότητας που παρατηρείται σε ενήλικα άτομα εργατριών μελισσών ως αποτέλεσμα της λήψεως φυτοπροστατευτικών προϊόντων και άλλων χημικών ουσιών από το στόμα.

Κατά την αξιολόγηση των τοξικών χαρακτηριστικών μιας ουσίας, ενδέχεται να χρειαστεί να προσδιοριστεί η οξεία τοξικότητα ως αποτέλεσμα της λήψεως από το στόμα σε περιπτώσεις π.χ. κατά τις οποίες θεωρείται πιθανή η έκθεση μελισσών σε συγκεκριμένη χημική ουσία. Η υπόψη μελέτη πραγματοποιείται για να προσδιοριστεί η εγγενής τοξικότητα φυτοφαρμάκων και άλλων χημικών ουσιών στις μέλισσες. Με βάση τα αποτελέσματα θα κριθεί κατά πόσον χρειάζεται να γίνει περαιτέρω αξιολόγηση. Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε κλιμακωτά προγράμματα αξιολόγησης των κινδύνων που διατρέχουν οι μέλισσες από τα φυτοφάρμακα, με βάση τη συνεχή εξέλιξη των εργαστηριακών δοκιμών τοξικότητας σε πειράματα ημιπεδίου και πεδίου (1). Τα φυτοφάρμακα μπορούν να δοκιμάζονται ως δραστικές ουσίες ή ως παρασκευάσματα.

Για τη διαπίστωση της ευαισθησίας των μελισσών και της ακρίβειας της διαδικασίας χρησιμοποιείται πρότυπη τοξική ουσία.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Οξεία τοξικότητα ως αποτέλεσμα λήψεως από το στόμα: είναι οι βλαβερές συνέπειες που εμφανίζονται το αργότερο μέσα σε 96 ώρες αφότου χορηγηθεί από το στόμα μία δόση της δοκιμαζόμενης ουσίας.

Δόση: είναι η αναλισκόμενη ποσότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας. Εκφράζεται σε μάζα (μg) δοκιμαζόμενης ουσίας ανά πειραματόζωο (μg/μέλισσα). Καθώς οι μέλισσες εκτρέφονται ομαδικά, δεν μπορεί να υπολογιστεί η πραγματική δόση ανά μέλισσα, αλλά υπολογίζεται κατ εκτίμηση μια μέση δόση (συνολική αναλωθείσα ποσότητα/αριθμός μελισσών ανά κλωβό).

LD_{50} (μέση θανατηφόρα δόση) από το στόμα: είναι η στατιστικώς προκύπτουσα δόση ουσίας, η οποία, χορηγούμενη από το στόμα, μπορεί να προκαλεσα το θάνατο σε ποσοστό 50 % των ζώων. Η τιμή LD_{50} εκφράζεται σε μg δοκιμαζόμενης ουσίας ανά μέλισσα. Προκειμένου για φυτοφάρμακα, η δοκιμαζόμενη ουσία μπορεί να είναι είτε δραστική ουσία είτε παρασκεύασμα περιέχον μία ή περισσότερες δραστικές ουσίες.

Θνησιμότητα: το ζώο καταγράφεται ως νεκρό όταν είναι εντελώς ακίνητο.

1.3. ΑΓΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τα ενήλικα άτομα εργατριών μελισσών (Apis *mellifera)* εκτίθενται σε μια σειρά δόσεων της δοκιμαζόμενης ουσίας μέσα σε διάλυμα σακχαρόζης. Στη συνέχεια, τους παρέχεται η ίδια τροφή, ελεύθερη όμως της δοκιμαζόμενης ουσίας. Καταγράφεται η θνησιμότητα σε καθημερινή βάση επί 48 τουλάχιστον ώρες, και γίνεται σύγκριση με τις τιμές που καταγράφονται στους μάρτυρες. Εάν το ποσοστό θνησιμότητας αυξάνεται ανάμεσα στις 24 και τις 48 ώρες ενώ η θνησιμότητα των μαρτύρων παραμένει σε αποδεκτά επίπεδα, δηλαδή ≤ 10 %, ενδείκνυται παράταση της δοκιμασίας μέχρι το πολύ 96 ώρες. Τα αποτελέσματα αναλύονται για να υπολογιστεί η LD_{50} μετά παρέλευση 24 ωρών και 48 ωρών και, σε περίπτωση παράτασης της δοκιμασίας, μετά παρέλευση 72 ωρών και 96 ωρών.

▼B

1.4. ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Προϋποθέσεις εγκυρότητας της δοκιμασίας είναι οι ακόλουθες:

— ο μέσος όρος θνησιμότητας επί του συνολικού αριθμού των μαρτύρων να μην υπερβαίνει ποσοστό 10 % στο τέλος της δοκιμασίας,

— η LD_{50} της πρότυπης τοξικής ουσίας να βρίσκεται μέσα στην καθορισμένη περιοχή τιμών.

1.5. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.5.1. **Πώς επιλέγονται οι μέλισσες**

Χρησιμοποιούντα; νεαρά ενήλικα άτομα ερνατριών μελισσών, δηλαδή μέλισσες της ίδιας ηλικίας διαιτητικής αγωγής, φυλής κ.λπ., προερχόμενες απο υνιείς αποικίες με βασίλισσα, επαρκώς τρεφόμενες, κατά το δυνατόν χωρίς ασθένειες, τέλος δε με φυσιολογία και ιστορικό γνωστά. Οι μέλισσες επιλέγονται το πρωί της ίδιας ημέρας κατά την οποία θα γίνει η δοκιμασία ή το βράδυ της προηγούμενης και φυλάσσονται στις συνθήκες της δοκιμασίας μέχρι την επομένη. Μέλισσες συλλεγόμενες από πλαίσια χωρίς μελισσόπουλα είναι κατάλληλες. Η συλλογή μελισσών νωρίς την άνοιξη ή αργά το φθινόπωρο πρέπει να αποφεύγεται γιατί, τότε η φυσιολογία τους παρουσιάζει μεταβολές. Εάν πρέπει να γίνουν δοκιμασίες νωρίς την άνοιξη ή αργά το φθινόπωρο, οι μέλισσες τοποθετούνται σε εκκολαπτήριο και ως τροφή τούς παρέχεται επί μία εβδομάδα «bee bread» (γύρη από την κηρήθρα) και διάλυμα σακχαρόζης. Μέλισσες που έχουν υποβληθεί σε αγωγή με χημικές ουσίες, όπως π.χ. αντιβιοτικά, προϊόντα anti-varroa κ.λπ., δεν χρησιμοποιούνται σε δοκιμασίες μελέτης τοξικότητας επί τέσσερεις εβδομάδες μετά τη λήξη της τελευταίας αγωγής.

1.5.2. **Στέγη και τροφή**

Οι χρησιμοποιούμενοι κλωβοί θα πρέπει να είναι ευάεροι και να καθαρίζονται εύκολα. Οι κλωβοί μπορεί να είναι π.χ. από ανοξείδωτο χάλυβα, συρματόπλεγμα ή πλαστικό ή ακόμη να είναι ξύλινοι κλωβοί μιας χρήσεως κ.λπ. Προτιμώνται ομάδες δέκα μελισσών ανά κλωβό. Το μέγεθος των κλωβών για τις δοκιμασίες θα πρέπει να είναι τέτοιο ώστε να υπάρχει αρκετός χώρος για όλες τις μέλισσες.

Οι μέλισσες φυλάσσονται στον χώρο του πειράματος, που θα πρέπει να είναι σκοτεινός και να έχει θερμοκρασία (25 ± 2 °C Καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμασίας καταγράφεται η σχετική υγρασία, που κανονικά πρέπει να κυμαίνεται από 50 έως 70 %. Οι διάφοροι χειρισμοί (συμπεριλαμβάνονται παροχή τροφής και παρατηρήσεις) μπορούν να γίνονται στο φως της ημέρας. Ως τροφή χρησιμοποιείται υδατικό διάλυμα σακχαρόζης με τελική συγκέντρωση 500 g/l (50 % κ.ό.). Μετά τη χορήγηση των δόσεων δοκιμασίας, παρέχεται τροφή κατά βούληση *(ad* libitum). Η ταΐστρα πρέπει να είναι τέτοια ώστε να είναι δυνατή η καταγραφή της προσλαμβανόμενης τροφής για κάθε κλωβό (βλέπε 1.6.3.1). Ως τέτοια μπορεί να χρησιμοποιηθεί γυάλινος σωλήνας μήκους 50 mm και πλάτους 10 mm, που θα στενεύει στο ανοιχτό άκρο και θα έχει διάμετρο 2 mm.

1.5.3. **Προετοιμασία των μελισσών**

Οι μέλισσες τοποθετούνται τυχαίως στους κλωβούς, οι οποίοι με τη σειρά τους τοποθετούνται επίσης τυχαίως στο δωμάτιο του πειράματος.

▼B

Δύο ώρες προτού αρχίσει η δοκιμασία, οι μέλισσες μπορούν να μείνουν χωρίς τροφή. Συνιστάται η μη χορήγηση τροφής πριν τη δοκιμασία, ώστε κατά την έναρξη όλες οι μέλισσες να βρίσκονται στην ίδια κατάσταση ως προς το περιεχόμενο του πεπτικού σωλήνα. Προτού αρχίσει η δοκιμασία, εκβάλλονται οι ετοιμοθάνατες μέλισσες και αντικαθίστανται από υγιείς.

1.5.4. **Παρασκευή των δοκιμαστικών διαλυμάτων**

Όταν η δοκιμαζόμενη ουσία είναι υδατοδιαλυτή, προστίθεται απευθείας σε διάλυμα σακχαρόζης 50 %. Για προϊόντα χαμηλής υδατοδιαλυτότητας, μπορούν να χρησιμοποιηθούν έκδοχα (π.χ. οργανικοί διαλύτες, γαλακτωματοποιητές ή πρόσθετα διασποράς) χαμηλής τοξικότητας για τις μέλισσες (π.χ. ακετόνη, διμεθυλοφορμαμίδιο, διμεθυλοσουλφοξεί-διο). Η συγκέντρωση του εκδόχου εξαρτάται από τη διαλυτότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας και πρέπει να είναι η ίδια για κάθε συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας. Εντούτοις, συγκέντρωση του εκδόχου ίση με 1 % είναι κατά κανόνα κατάλληλη και δεν χρειάζεται μεγαλύτερη.

Απαιτούνται κατάλληλα διαλύματα για τους μάρτυρες όταν δηλαδή χρησιμοποιείται διαλύτης ή πρόσθετο διασποράς για τη διαλυτοποίηση της δοκιμαζόμενης ουσίας, πρέπει να χρησιμοποιηθούν δύο χωριστές ομάδες μαρτύρων: η μία θα εκτεθεί σε υδατικό διάλυμα και η άλλη σε διάλυμα σακχαρόζης με το διαλύτη στη συγκέντρωση που χρησιμοποιείται στα διαλύματα με την εκάστοτε δόση της δοκιμαζόμενης ουσίας (δοκιμαστικά διαλύματα).

1.6. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.6.1. **Ομάδες υπό δοκιμασία και ομάδες μάρτυρες**

Ο αριθμός των δόσεων και των επαναλήψεων της δοκιμασίας για κάθε δόση θα πρέπει να ανταποκρίνονται στις στατιστικές απαιτήσεις για προσδιορισμό της τιμής LD_{50} με όριο εμπιστοσύνης 95 56. Απαιτούνται κανονικά για τη δοκιμασία πέντε συγκεντρώσεις που θα διαφέρουν η μία από την άλλη κατά συντελεστή όχι μεγαλύτερο από 2,2 και που θα καλύπτουν την περιοχή τιμών LD_{50}. Εντούτοις, ο συντελεστής αραίωσης και ο αριθμός δόσεων πρέπει να προσδιορίζονται σε σχέση με την κλίση της καμπύλης τοξικότητας (δόση/θνησιμότητα) και με συνεκτίμηση της στατιστικής μεθόδου βάσει της οποίας θα γίνει ανάλυση των αποτελεσμάτων. Μια δοκιμασία εντοπισυού εύρους τιμών εξυπηρετεί την επιλογή των κατάλληλων δόσεων.

Η δοκιμασία γίνεται με τρεις τουλάχιστον όμοιες ομάδες, δέκα μελισσών η καθεμιά, για την κάθε συγκέντρωση (δόση). Επιπλέον δοκιμάζονται τρεις τουλάχιστον ομάδες μαρτύρων, δέκα μελισσών η καθεμιά. Ομάδες μαρτύρων πρέπει επίσης να προβλεφθούν για τους χρησιμοποιούμενους διαλύτες/φορείς (βλέπε 1.5.4).

1.6.2. **Πρότυπη τοξική ουσία**

Στις δοκιμασίες πρέπει να συμπεριληφθεί μια πρότυπη τοξική ουσία και να επιλεγούν τρεις τουλάχιστον δόσεις ώστε να καλυφθούν οι αναμενόμενες τιμές LD_{50}. Για κάθε δόση χρησιμοποιούνται τρεις τουλάχιστον κλωβοί με δέκα μέλισσες ο καθένας. Ως πρότυπη τοξική ουσία προτιμάται ο διμεθοϊκός εστέρας, για τον οποίο καταγράφονται τιμές LD_{50}-24 h στην περιοχή τιμών 0,10-0,35 μg δραστικής ουσίας ανά μέλισσα (2). Μπορούν ωστόσο να χρησιμοποι-ηθούν κι άλλες πρότυπες τοξικές ουσίες (π.χ. παραθείο) όταν υπάρχουν επαρκή δεδομένα προς επαλήθευση της αναμενόμενης απόκρισης στην εκάστοτε δόση.

▼B

1.6.3. **Έκθεση**

1.6.3.1. *Χορήγηση των δόσεων*

Κάθε δοκιμαζόμενη ομάδα μελισσών εκτίθεται σε 100-200 μl υδατικού διαλύματος σακχαρόζης 50 %, το οποίο περιέχει τη δοκιμαζόμενη ουσία στην κατάλληλη συγκέντρωση. Για προϊόντα χαμηλής διαλυτότητας, χαμηλής τοξικότητας ή χαμηλής συγκέντρωσης μέσα στο παρασκεύασμα απαιτείται μεγαλύτερος όγκος, αφού θα χρησιμοποιηθούν μεγαλύτερες αναλογίες στο διάλυμα σακχαρόζης. Παρακολουθείται η ποσότητα τροφής (διαλύματος με τη δοκιμαζόμενη ουσία) που καταναλώνει η κάθε ομάδα. Μετά παρέλευση 3-4 ωρών (οπότε έχει κατά κανόνα καταναλωθεί η τροφή), αφαιρείται η ταΐστρα από τον κλωβό και αντικαθίσταται με άλλη που περιέχει σκέτο διάλυμα σακχαρόζης, το οποίο και προσφέρεται κατά βούληση (ad libitum). Η απόρριψη της τροφής σε περιπτώσεις μεγαλύτερων συγκεντρώσεων ορισμένων ουσιών ενδέχεται να έχει ως αποτέλεσμα μηδενική ή ελάχιστη απορρόφηση τροφής. Μετά παρέλευση 6 το πολύ ωρών, η μη καταναλωθείσα τροφή πρέπει να α\τικατασταθεί με σκέτο διάλυμα σακχαρόζης. Υπολογίζεται η καταναλωθείσα ποσότητα τροφής (π.χ. μετρείται ο όγκος ή το βάρος του εναπομένοντος διαλύματος με τη δοκιμαζόμενη ουσία).

1.6.3.2. *Διάρκεια*

Η δοκιμασία διαρκεί κατά προτίμηση 48 ώρες. Εάν μετά τις πρώτες 24 ώρες η θνησιμότητα εξακολουθεί να αυξάνει κατά περισσότερο από 10 %, η διάρκεια της δοκιμασίας παρατείνεται μέχρι το πολύ 96 ώρες υπό τον όρο ότι η θνησιμότητα των μαρτύρων δεν υπερβαίνει ποσοστό 10 %.

1.6.4. **Παρατηρήσεις**

Η θνησιμότητα καταγράφεται αφού περάσουν 4 ώρες μετά την έναρξη της δοκιμασίας και στη συνέχεια μετά παρέλευση 24 ώρες και 48 ώρες (εννοείται μετά τη χορήγηση της εκάστοτε δόσης). Εάν χρειαστεί να παραταθεί η διάρκεια των παρατηρήσεων, πρέπει να συνεχιστούν οι αξιολόγησης ανά 24 ώρες, μέχρι το πολύ 96 ώρες υπό τον όρο ότι η θνησιμότητα των μαρτύρων δεν υπερβαίνει ποσοστό 10 %.

Υπολογίζεται η ποσότητα τροφής που κατανάλωσε κάθε ομάδα. Από τη σύγκριση των ρυθμών πρόσληψης τροφής με ή χωρίς τη δοκιμαζόμενη ουσία μέσα σε χρόνο 6 ώρες, μπορούν να προκύψουν συμπεράσματα για το κατά πόσον προσλαμβάνεται ευχάριστα η τροφή που περιέχει τη δοκιμαζόμενη ουσία.

Καταγράφεται κάθε είδους αφύσικη συμπεριφορά κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας.

1.6.5. **Οριακή δοκιμασία**

Σε ορισμένες περιπτώσεις (όταν για παράδειγμα μια δοκιμαζόμενη ουσία αναμένεται να είναι χαμηλής τοξικότητας), ενδέχεται να πραγματοποιηθεί μια οριακή δοκιμασία, με τη χρησιμοποίηση 100 μg δραστικής ουσίας ανά μέλισσα για να αποδειχτεί ότι η τιμή της LD_{50} είναι μεγαλύτερη από την τιμή αυτή. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται σε τρεις όμοιες ομάδες για την εκάστοτε δόση, τους αντίστοιχους μάρτυρες, τον υπολογισμό της καταναλωθείσας ποσότητας διαλύματος με τη δοκιμαζόμενη ουσία, τέλος δε για την πρότυπη τοξική ουσία. Εάν σημειωθούν θάνατοι, θα πρέπει να γίνει πλήρης μελέτη. Εάν παρατηρηθούν επιπτώσεις σχεδόν θανατηφόρες (βλέπε 1.6.4), πρέπει να καταγραφούν.

▼B

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΕΙΣ**

2.1 ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα καταγράφονται συνοπτικά σε πίνακες, όπου εμφαίνονται, για κάθε ομάδα που εκτίθεται στη δοκιμαζόμενη ουσία, καθώς και για τις ομάδες των μαρτύρων και τις ομάδες που εκτίθενται στην πρότυπη τοξική ουσία, ο αριθμός των χρησιμοποιηθεισών μελισσών, η θνησιμότητα ανά χρονικό διάστημα παρατήρησης και ο αριθμός μελισσών με αφύσικη συμπεριφορά. Τα δεδομένα τα σχετικά με τη θνησιμότητα αναλύονται με κατάλληλες στατιστικές μεθόδους (π.χ. ανάλυση probit, κινητός μέσος, διωνυμική πιθανότητα) (3) (4). Χαράσσονται καμπύλες δόοης-απόκριοης για κάθε συνιστώμενη χρονική διάρκεια παρατήρησης και υπολογίζονται οι κλίσης των καμπυλών και οι μέσες θανατηφόρες δόσεις (LD_{50}) με όριο εμπιστοσύνης 95 %. Με τη βοήθεια της διόρθωσης Abbott (4) (5), μπορούν να γίνουν διορθώσεις της θνησιμότητας των μαρτύρων. Όταν δεν καταναλωθεί πλήρως το διάλυμα με τη δοκιμαζόμενη ουσία, πρέπει να προσδιοριστεί η δόση της ανά ομάδα καταναλωθείσας δοκιμαζόμενης ουσίας. Η $ΛΔ_{50}$ πρέπει να εκφράζεται σε μg δοκιμαζόμενης ουσίας ανά μέλισσα.

2.2. ΕΚΘΕΣΗ

Η έκθεση με τα αποτελέσματα της δοκιμασίας πρέπει να περιέχει τις ακόλουθες πληροφορίες:

2.2.1. **Δοκιμαζόμενη ουσία:**

— φυσικές ιδιότητες και φυσικοχημικές ιδιότητες που αφορούν τη δοκιμασία (π.χ. σταθερότητα στο νερό, τάση ατμών).

— χημικά χαρακτηριστικά, μεταξύ των οποίων συντακτικός τύπος, καθαρότητα (προκείμενου νια φυτοφαρμακα. ταυτότητα και συγκέντρωση των δραστικών ουσιών).

2.2.2. **Χρησιμοποιηθέν είδος:**

— επιστημονικό όνομα, φυλή. ηλικία κατά προσέγγιση (σε εβδομάδες), τρόπος και ημερομηνία συλλογής,

— πληροφορίες για τις αποικίες μελισσών από τις οποίες προέρχονται οι μέλισσες που χρησιμοποιήθηκαν για την υπόψη μελέτη (υγεία, τυχόν ασθένειες στα ενήλικα άτομα, τυχόν προηγούμενη αγωγή κ.λπ.).

2.2.3. **Συνθήκες της δοκιμασίας:**

— θερμοκρασία και σχετική υγρασία του πειραματικού χώρου,

— τύπος, μέγεθος και υλικό των κλωβών,

— μέθοδοι παρασκευής του πυκνού διαλύματος και των δοκιμαστικών διαλυμάτων (εάν χρησιμοποιηθεί διαλύτης αναφέρεται υποχρεωτικά, καθώς και η συγκέντρωση αυτού),

— περιγραφή της δοκιμασίας σε γενικές γραμμές (πόσες και ποιες συγκεντρώσεις χρησιμοποιήθηκαν, αριθμός μαρτύρων, αριθμός κλωβών και μελισσών ανά κλωβό για κάθε συγκέντρωση και ομάδα μαρτύρων),

— ημερομηνία της δοκιμασίας.

▼B

2.2.4. **Αποτελέσματα:**

— αποτελέσματα τυχόν προκαταρκτικής μελέτης ε\τοπισμού εύρους τιμών,

— ακατέργαστα δεδομένα: θνησιμότητα για κάθε δόση και χρονική διάρκεια παρατήρησης,

— γραφικές παράστασης δόσης-απόκρισης στο τέλος της δοκιμασίας,

— τιμές LD_{50} με όριο εμπιστοσύνης 95 % για κάθε χρονική διάρκεια παρατήρησης, ουσία και πρότυπη τοξική ουσία,

— στατιστικές μέθοδοι προσδιορισμού της LD_{50},

— θνησιμότητα κατά τους ελέγχους,

— άλλες παρατηρήσεις ή μετρήσεις βιολογικών επιπτώσεων όπως π.χ. αφύσικη συμπεριφορά των μελισσών (συμπεριλαμβάνεται η απόρριψη της δόσης), ρυθμός πρόσληψης τροφής αναλόγως εάν περιέχει ή όχι τη δοκιμαζόμενη ουσία,

— τυχόν παρέκκλιση από τις περιγραφόμενες εδώ διαδικασίες της δοκιμασίας και κάθε άλλη σχετική πληροφορία.

3. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO Bulletin, Vol. 23, N.l, pp. 151-165. March 1993.

(2) Gough, H. J., Mclndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (Apis *mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, pp. 119-125.

(3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon. F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol, and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.

(4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, pp. 265-267.

▼B

Γ.17. ΜΕΛΙΣΣΕΣ — ΜΕΛΕΤΗ ΟΞΕΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΕΙΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΕΠΑΦΗ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η εν λόγω μέθοδος μελέτης οξείας τοξικότητας αποτελεί επανάληψη της μεθόδου TG 214 (1998) του ΟΟΣΑ.

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πρόκειται για μια εργαστηριακή μέθοδο προβλεπόμενη για τη μελέτη της οξείας τοξικότητας που παρατηρείται σε ενήλικα άτομα εργατριών μελισσών ως αποτέλεσμα της επαφής με φυτοπροστατευτικά προϊόντα και άλλα χημικές ουσίες.

Κατά την αξιολόγηση των τοξικών χαρακτηριστικών μιας ουσίας, ενδέχεται να χρειαστεί να προσδιοριστεί η οξεία τοξικότητα που προκαλείται με την επαφή σε περιπτώσεις π.χ. κατά τις οποίες θεωρείται πιθανή η έκθεση μελισσών σε συγκεκριμένη χημική ουσία. Η υπόψη μελέτη πραγματοποιείται για να προσδιοριστεί η εγγενής τοξικότητα φυτοφαρμάκων και άλλων χημικών ουσιών στις μέλισσες. Με βάση τα αποτελέσματα θα κριθεί κατά πόσον χρειάζεται να γίνει περαιτέρω αξιολόγηση. Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε κλιμακωτά προγράμματα αξιολόγησης των κινδύνων που διατρέχουν οι μέλισσες από τα φυτοφάρμακα, με βάση τη συνεχή εξέλιξη των εργαστηριακών δοκιμών τοξικότητας σε πειράματα ημιπεδίου και πεδίου (1). Τα φυτοφάρμακα μπορούν να δοκιμάζονται ως δραστικές ουσίες ή ως παρασκευάσματα.

Για τη διαπίστωση της ευαισθησίας των μελισσών και της ακρίβειας της διαδικασίας χρησιμοποιείται πρότυπη τοξική ουσία.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Οξεία τοξικότητα που προκαλείται με την επαφή: είναι οι βλαβερές συνέπειες που εμφανίζονται το αργότερο μέσα σε 96 ώρες αφότου εφαρμοστεί τοπικά μία δόση της δοκιμαζόμενης ουσίας.

Δόση: είναι η εφαρμοζόμενη ποσότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας. Εκφράζεται σε μάζα (μg) δοκιμαζόμενης ουσίας ανά πειραματόζωο (μg/μέλισσα)

LD_{50} (μέση θανατηφόρα δόση) με την επαφή: είναι η στατιστικώς προκύπτουσα δόση ουσίας, η οποία μπορεί με την επαφή να προκαλέσει τον θάνατο σε ποσοστό 50 % των ζώων. Η τιμή LD_{50} εκφράζεται σε μg δοκιμαζόμενης ουσίας ανά μέλισσα. Προκειμένου για φυτοφάρμακα, η δοκιμαζόμενη ουσία μπορεί να είναι είτε δραστική ουσία είτε παρασκεύασμα περιέχον μία ή περισσότερες δραστικές ουσίες.

Θνησιμότητα: ζώο καταγράφεται ως νεκρό όταν είναι εντελώς ακίνητο.

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τα ενήλικα άτομα εργατριών μελισσών (Apis *mellifera)* εκτίθενται σε μια σειρά δόσεων της δοκιμαζόμενης ουσίας δια-λελυμένης σε κατάλληλο φορέα, με άμεση εφαρμογή σταγονιδίων στον θώρακα. Η διάρκεια της δοκιμασίας είναι 48 ώρες. Εάν το ποσοστό θνησιμότητας αυξάνεται ανάμεσα στις 24 και τις 48 ώρες ενώ η θνησιμότητα των μαρτύρων παραμένει σε αποδεκτά επίπεδα, δηλαδή < 10 %, ενδείκνυται παράταση της δοκιμασίας μέχρι το πολύ 96 ώρες. Τα αποτελέσματα αναλύονται για να υπολογιστεί η LD_{50} μετά παρέλευση 24 ώρών και 48 ώρών και, σε περίπτωση παράτασης της δοκιμασίας, μετά παρέλευση 72 ώρών και 96 ώρών.

▼B

1.4. ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Προϋποθέσεις εγκυρότητας της δοκιμασίας είναι οι ακόλουθες:

— ο μέσος όρος θνησιμότητας επί του συνόλου των μαρτύρων να μην υπερβαίνει ποσοστό 10 % στο τέλος της δοκιμασίας,

— η LD_{50} της πρότυπης τοξικής ουσίας να βρίσκεται μέσα στην καθορισμένη περιοχή τιμών.

1.5. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.5.1. **Πώς επιλέγονται οι μέλισσες**

Χρησιμοποιούται νεαρά ενήλικα άτομα εργατΰΐών μελισσών, δηλαδή μέλισσες της ίδιας ηλικίας, διαιτητικής αγωγής, φυλής κ.λπ., προερχόμενες από υγιείς αποικίες με βασίλισσα, επαρκώς τρεφόμενες, κατά το δυνατόν χωρίς ασθένειες. τέλος δε με φυσιολογία και ιστορικο γνωστα. Οι μέλισσες επιλενονται το πρωί της ίδιας ημέρας κατά την οποία θα γίνει η δοκιμασία ή το βράδυ της προηγούμενης και φυλάσσονται στις συνθήκες της δοκιμασίας μέχρι την επομένη. Μέλισσες συλλεγόμενες από πλαίσια χωρίς μελισσόπουλα είναι κατάλληλες. Η συλλογή μελισσών νωρίς την άνοιξη ή αργά το φθινόπωρο πρέπει να αποφεύγεται γιατί, τότε η φυσιολογία τους παρουσιάζει μεταβολές. Εάν πρέπει να γίνουν δοκιμασίες νωρίς την άνοιξη ή αργά το φθινόπωρο, οι μέλισσες τοποθετούνται σε εκκολαπτήριο και ως τροφή τούς παρέχεται επί μία εβδομάδα «bee bread» (γύρη από την κηρήθρα) και διάλυμα σακχαρόζης. Μέλισσες που έχουν υποβληθεί σε αγωγή με χημικές ουσίες, όπως π.χ. αντιβιοτικά, προϊόντα anti-varroa κ.λπ., δεν χρησιμοποιούνται σε δοκιμασίες μελέτης τοξικότητας επί τέσσερεις εβδομάδες μετά τη λήξη της τελευταίας αγωγής.

1.5.2. **Στέγη και τροφή**

Οι χρησιμοποιούμενοι κλωβοί 9α πρέπει να είναι ευάεροι και να καθαρίζονται εύκολα. Οι κλωβοί μπορεί να είναι π.χ. από ανοξείδωτο χάλυβα, συρματόπλεγμα ή πλαστικό ή ακόμη να είναι ξύλινοι κλωβοί μιας χρήσεως κ.λπ. Προτιμώνται ομάδες δέκα μελισσών ανά κλωβό. Το μέγεθος των κλωβών για τις δοκιμασίες θα πρέπει να είναι τέτοιο ώστε να υπάρχει αρκετός χώρος για όλες τις μέλισσες.

Οι μέλισσες φυλάσσονται στον χώρο του πειράματος, που θα πρέπει να είναι σκοτεινός και να έχει θερμοκρασία 25 ± 2 °C. Καθ όλη τη διάρκεια της δοκιμασίας καταγράφεται η σχετική υγρασία, που κανονικά πρέπει να κυμαίνεται από 50 έως 70 %. Οι διάφοροι χειρισμοί (συμπεριλαμβάνονται παροχή τροφής και παρατηρήσεις) μπορούν να γίνονται στο φως της ημέρας. Ως τροφή χρησιμοποιείται υδαπκό διάλυμα σακχαρόζης με τελική συγκέντρωση 500 g/l (50 % κ.ό) και παρέχεται κατά βούληση (ad libitum) κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας με τη βοήθεια ειδικής ταΐστρας μελισσών. Ως τέτοια μπορεί να χρησιμοποιηθεί γυάλινος σωλήνας μήκους 50 mm και πλάτους 10 mm, που θα στενεύει στο ανοιχτό άκρο και θα έχει διάμετρο 2 mm.

1.5.3. **Προετοιμασία των μελισσών**

Οι μέλισσες αναισθητοποιούνται με διοξείδιο του άνθρακα ή με άζωτο, ώστε να είναι δυνατή η τοπική εφαρμογή της δοκιμαζόμενης ουσίας. Η χρησιμοποιούμενη ποσότητα αναισθητικού και ο χρόνος έκθεσης πρέπει να είναι τα ελάχιστα δυνατά. Προτού άρχισα η δοκιμασία, εκβάλλονται οι ετοιμοθάνατες μέλισσες και αντικαθίστανται από υγιείς.

1.5.4. **Παρασκευή των δοκιμαστικών διαλυμάτων**

Η δοκιμαζόμενη ουσία εφαρμόζεται υπό μορφή διαλύματος μέσα σε κατάλληλο φορέα, δηλαδή σε οργανικό διαλύτη ή σε υδατικό διάλυμα με αντιδραστήριο διαβροχής. Ως οργανικός διαλύτης προτιμάται η ακετόνη, μπορούν όμως να χρησιμοποιηθούν κι άλλοι διαλύτες (π.χ. διμεθυλοφορμαμίδιο, διμεθυλοσουλφοξείδιο). Προκειμένου για υδατοδιαλυτά παρασκευάσματα και οργανικές ενώσεις αδιάλυτες σε οργανικούς διαλύτες, τα διαλύματα της δοκιμαζόμενης ουσίας καλό είναι, για ευκολότερη εφαρμογή τους, να ετοιμάζονται μέσα σε ασθενές διάλυμα ενός αντιδραστηρίου διαβροχής του εμπορίου (π.χ. Agral, Gttowett, Lubrol, Triton, Tween).

▼B

Απαιτούνται κατάλληλα διαλύματα για τους μάρτυρες όταν δηλαδή χρησιμοποιείται διαλύτης ή πρόσθετο διασποράς για τη διαλυτοποίηση της δοκιμαζόμενης ουσίας, πρέπει να χρησιμοποιηθούν δύο χωριστές ομάδες μαρτύρων η μία θα εκτεθεί σε υδατικό διάλυμα και η άλλη σε διάλυμα που θα περιέχει διαλύτη/πρόσθετο διασποράς.

1.6. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.6.1. **Ομάδες υπό δοκιμασία και ομάδες μάρτυρες**

Ο αριθμός των δόσεων και των επαναλήψεων της δοκιμασίας για κάθε δόση θα πρέπει να ανταποκρίνονται στις στατιστικές απαιτήσεις για προσδιορισμό της τιμής LD_{50} με όριο εμπιστοσύνης 95 %. Απαιτούνται κανονικά για τη δοκιμασία πέντε συγκεντρώσεις που θα διαφέρουν η μία από την άλλη κατά συντελεστή όχι μεγαλύτερο από 2,2 και που θα καλύπτουν την περιοχή τιμών LD_{50}. Εντούτοις, ο αριθμός των δόσεων πρέπει να προσδιορίζεται σε σχέση με την κλίση της καμπύλης τοξικότητας (δόση/θνησιμότητα) και με συνεκτίμηση της στατιστικής μεθόδου βάσει της οποίας θα γίνει ανάλυση των αποτελεσμάτων. Μια δοκιμασία εντοπισμού εύρους τιμών εξυπηρετεί την επιλογή των κατάλληλων δόσεων.

Η δοκιμασία γίνεται με τρεις τουλάχιστον όμοιες ομάδες, δέκα μελισσών η καθεμιά, για την κάθε συγκέντρωση (δόση).

Επιπλέον δοκιμάζο\ται τρεις τουλάχιστον ομάδες μαρτύρων, δέκα μελισσών η καθεμιά. Εάν χρησιμοποιηθεί οργανικός διαλύτης ή α\τιδραστήριο διαβροχής, πρέπει να προβλεφθούν τρεις επιπλέον ομάδες μαρτύρων δέκα μελισσών η καθεμιά για τον διαλύτη ή το αχτιδραστήριο διαβροχής.

1.6.2. **Πρότυπη τοξική ουσία**

Στις δοκιμασίες πρέπει να συμπεριληφθεί μια πρότυπη τοξική ουσία και να επιλεγούν τρεις τουλάχιστον δόσεις ώστε να καλυφθούν οι αναμενόμενες τιμές LD_{50}. Για κάθε δόση χρησιμοποιούνται τρεις τουλάχιστον κλωβοί με δέκα μέλισσες ο καθένας. Ως πρότυπη τοξική ουσία προτιμάται ο διμεθο'ικός εσπέρας, για τον οποίο καταγράφο\ται τιμές LD_{50}-24 ώρες στην περιοχή τιμών 0,10 - 0,35 μg δραστικής ουσίας ανά μέλισσα (2). Μπορούν ωστόσο να χρησιμοποιηθούν κι άλλες πρότυπες τοξικές ουσίες (π.χ. παραθείο) όταν υπάρχουν επαρκή δεδομένα προς επαλήθευση της αναμενόμενης απόκρισης στην εκάστοτε δόση.

1.6.3. **Έκθεση**

1.6.3.1. *Χορήδηση δόσεων*

Η τοπική εφαρμογή του διαλύματος γίνεται χωριστά σε καθεμιά από τις αναισθητοποιημένες μέλισσες. Η επιλογή των μελισσών για τις διάφορες δόσεις και ελέγχους γίνεται τυχαία. Στη ραχιαία πλευρά της θωρακικής χώρας εφαρμόζεται με τη βοήθεια ειδικής μικροδιάταξης 1 μl διαλύματος με τη δοκιμαζόμενη ουσία στην κατάλληλη συγκέντρωση. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν κι άλλοι όγκοι, αυτό όμως πρέπει να αιτιολογηθεί. Μετά την εφαρμογή, οι μέλισσες τοποθετούνται μέσα σε κλωβούς όπου υπάρχουν διαλύματα γλυκόζης.

1.6.3.2. *Διάρκεια*

Η δοκιμασία διαρκεί κατά προτίμηση 48 ώρες. Εάν στο χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από τις 24 μέχρι τις 48 ώρες η θνησιμότητα αυξηθεί κατά περισσότερο από 10 %, η διάρκεια της δοκιμασίας παρατείνεται μέχρι το πολύ.96 ώρες, υπό τον όρο ότι η θνησιμότητα ελέγχου δεν υπερβαίνει ποσοστό 10 %.

▼B

1.6.4. **Παρατηρήσεις**

Η θνησιμότητα καταγράφεται μετά παρέλευση 4, 24 και 48 ωρών από τη χορήγηση της εκάστοτε δόσης. Εάν χρειαστεί να παραταθεί η διάρκεια των παρατηρήσεων, πρέπει να συνεχιστούν οι αξιολογήσεις ανά 24 ώρες, μέχρι το πολύ 96 ώρες, υπό τον όρο ότι η θνησιμότητα των μαρτύρων δεν υπερβαίνει ποσοστό 10 %.

Καταγράφεται κάθε είδους αφύσικη συμπεριφορά κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας.

1.6.5. **Οριακή δοκιμασία**

Σε ορισμένες περιπτώσεις (όταν για παράδειγμα μια δοκιμαζόμενη ουσία αναμένεται να είναι χαμηλής τοξικότητας), ενδέχεται να πραγματοποιηθεί μια οριακή δοκιμασία, με τη χρησιμοποίηση 100 ug δραστικής ουσίας ανά μέλισσα για να αποδειχτεί ότι η τιμή της LD_{50} είναι μεγαλύτερη από την τιμή αυτή. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται σε τρεις όμοιες ομάδες για την εκάστοτε δόση, τους αντίστοιχους μάρτυρες και την πρότυπη τοξική ουσία. Εάν σημειωθούν θάνατοι, θα πρέπει να γίνει πλήρης μελέτη. Εάν παρατηρηθούν επιπτώσεις σχεδόν θανατηφόρες (βλέπε 1.6.4), πρέπει να καταγραφούν.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΕΙΣ**

2.1. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα καταγράφονται συνοπτικά σε πίνακες, όπου εμφαίνονται, για κάθε ομάδα που εκτίθεται στη δοκιμαζόμενη ουσία, καθώς και για τις ομάδες των μαρτύρων και τις ομάδες που εκτίθενται στην πρότυπη τοξική ουσία, ο αριθμός των χρησιμοποιηθεισών μελισσών, η θνησιμότητα ανά χρονικό διάστημα παρατήρησης και ο αριθμός μελισσών με αφύσικη συμπεριφορά. Τα δεδομένα τα σχετικά με τη θνησιμότητα αναλύονται με κατάλληλες στατιστικές μεθόδους (π.χ. ανάλυση probit, κινητός μέσος, διωνυμική πιθανότητα) (3) (4). Χαράσσονται καμπύλες δόσης-απόκρισης για κάθε συνιστώμενη χρονική διάρκεια παρατήρησης (24 και 48 ωρών, ενδεχομένως δε 72 και 96 ωρών) και υπολογίζονται οι κλίσεις των καμπυλών και οι μέσες θανατηφόρες δόσεις (LD_{50}) με όριο εμπιστοσύνης 95 %. Με τη βοήθεια της διόρθωσης Abbott (4) (5), μπορούν να γίνουν διορθώσεις της θνησιμότητας των μαρτύρων. Η LD_{50} πρέπει να εκφράζεται σε μg δοκιμαζόμενης ουσίας ανά μέλισσα.

2.2. ΕΚΘΕΣΗ

Η έκθεση με τα αποτελέσματα της δοκιμασίας πρέπει να περιέχει τις ακόλουθες πληροφορίες:

2.2.1. **Δοκιμαζόμενη ουσία:**

— φυσικές ιδιότητες και φυσικοχημικές ιδιότητες (π.χ. σταθερότητα στο νερό, τάση ατμών),

— χηιικά χαρακτηριστικά, αεταξύ των οποίων συντακτικός τύπος, καθαρότητα (προκειμένου για φυτοφάρμακα, ταυτότητα και συγκέντρωση των δραστικών ουσιών)

2.2.2. **Χρησιμοποιηθέν είδος:**

— επιστημονικό όνομα, φυλή, ηλικία κατά προσέγγιση (σε εβδομάδες), τρόπος και ημερομηνία συλλογής.

— πληροφορίες για τις αποικίες από τις οποίες προέρχονται οι μέλισσες που χρησιαοποιήθηκαν στην υπόψη μελέτη (υγεία, τυχόν ασθένειες στα ενήλικα άτομα, τυχόν προηγούμενη αγωγή. κλπ.).

▼B

2.2.3. **Συνθήκες της δοκιμασίας:**

— θερμοκρασία και σχετική υγραοία του πειραματικού χώρου,

— τύπος, μέγεθος και υλικό των κλωβών,

— πληροφορίες σχετικές με τη χορήγηση της δοκιμαζόμενης ουσίας (π.χ. διαλύτης/φορέας, όγκος διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε για τοπική εφαρμογή, αναισθητικό),

— περιγραφή της δοκιμασίας σε γενικές γραμμές (πόσες και ποιες δόσεις χρησιμοποιήθηκαν, αριθμός μαρτύρων, αριθμός κλωβών και μελισσών ανά κλωβό για κάθε δόση και ομάδα μαρτύρων),

— ημερομηνία της δοκιμασίας.

2.2.4. **Αποτελέσματα:**

— αποτελέσματα τυχόν προκαταρκτικής μελέτης εντοπισμού εύρους τιμών,

— ακατέργαστα δεδομένα: θνησιμότητα για κάθε δόση και χρονική διάρκεια παρατήρησης,

— γραφικές παραστάσεις δόσης-απόκρισης στο τέλος της δοκιμασίας,

— τιμές LD_{50} με όριο εμπιστοσύνης 95 % για κάθε χρονική διάρκεια παρατήρησης, ουσία και πρότυπη τοξική ουσία,

— στατιστικές μέθοδοι προσδιορισμού της LD_{50},

— θνησιμότητα κατά τους ελέγχους,

— άλλες παρατηρήσεις ή μετρήσεις βιολογικών επιπτώσεων και κάθε αφύσικη συμπεριφορά των μελισσών,

— τυχόν παρέκκλιση από τις περιγραφόμενες εδώ διαδικασίες της δοκιμασίας και κάθε άλλη σχετική πληροφορία.

3. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO bulletin, Vol. 23, N.l, pp. 151-165. March 1993.

(2) Gough, H. J., Mclndoe, E. C, Lewis, G. B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (Apis *mellifera* L.), 1981-1992. Journal of Apicultural Research 22, pp. 119-125.

(3) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol, and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.

(4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, pp. 265-267.

▼B

Γ.18. ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ/ΕΚΡΟΦΗΣΗ ΜΕ ΜΕΘΟΔΟ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑΣ ΚΑΤΑ ΠΑΡΤΙΔΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος αποτελεί αντιγραφή της OECD TG 106, για τον προσδιορισμό της προσρόφησης/'εκρόφησης εδαφών με μέθοδο ισορροπίας κατά παρτίδα (2000).

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στη μέθοδο ελήφθη υπόψη κυκλική δοκιμή και συνάντηση ανταλλαγής απόψεων σχετικά με την επιλογή εδαφών για την ανάπτυξη δοκιμής προσρόφησης (1) (2) (3) (4) καθώς επίσης και υφιστάμενες κατευθυντήριες γραμμές σε εθνικό επίπεδο (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

Οι μελέτες προσρόφησης/εκρόφησης είναι χρήσιμες για τη λήψη βασικών πληροφοριών για την κινητικότητα των χημικών ουσιών και την κατανομή τους στο έδαφος, το νερό και τα αέρια στρώματα της βιόσφαιρας (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21). Οι πληροφορίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην πρόβλεψη ή εκτίμηση, π.χ., της διαθεσιμότητας μιας χημικής ουσίας προς αποικοδόμηση (22) (23), μετασχηματισμό και πρόσληψη της από οργανισμούς (24), της απόπλυσής της διαμέσου των εδαφικών στρωμάτων (16) (18) (19) (21) (25) (26) (27) (28), της πτητικότητας της από το έδαφος (21) (29) (30) και της απορροής της από χερσαίες επιφάνειες σε φυσικά ύδατα (18) (31) (32). Τα δεδομένα προσρόφησης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για συγκριτικούς και προτυποποιητικούς σκοπούς (19) (3 3) (34) (35).

Η κατανομή μιας χημικής ουσίας μεταξύ εδάφους και υδατικών φάσεων αποτελεί μία πολύπλοκη διεργασία που εξαρτάται από διάφορους παράγοντες: τη χημική φύση της ουσίας (12) (36) (37) (38) (39) (40), τα χαρακτηριστικά του εδάφους (4) (12) (13) (14) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49) και κλιματικούς παράγοντες όπως οι βροχοπτώσεις, η θερμοκρασία, το φως του ήλιου και ο άνεμος. Έτσι, τα πολυάριθμα φαινόμενα και μηχανισμοί που εμπλέκονται στη διεργασία της προσρόφησης μιας χημικής ουσίας στο έδαφος δεν μπορούν vu οριστούν πλήρως από ένα απλοποιημένο εργαστηριακό μοντέλο όπως η παρούσα μέθοδος. Εντούτοις, έστω κι αν η παρούσα προσπάθεια δεν μπορεί να καλύψει όλες τις περιβαλλοντικώς πιθανές περιπτώσεις, προσφέρει επαρκείς πληροφορίες για τη σημασία σε σχέση με το περιβάλλον της προσρόφησης μιας χημικής ουσίας.

D/νεπε επίσης γενική εισαγωγή.

1.2. ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Η μέθοδος αποσκοπεί στην εκτίμηση της συμπεριφοράς μιας χημικής ουσίας από πλευράς προσρόφησης/εκρόφησης στο έδαφος. Στόχος είναι να ληφθεί μία τιμή ρόφησης που να μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην πρόβλεψη της κατανομής σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες. Για το σκοπό αυτό, προσδιορίζονται συντελεστές προσρόφησης σε ισορροπία για μια χημική ουσία σε διάφορα εδάφη σε συνάρτηση με τα εδαφικά χαρακτηριστικά (π.χ. περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, περιεκτικότητα σε άργιλο και υφή και το pH του εδάφους). Για να καλυφθούν όσο το δυνατό καλύτερα οι αλληλεπιδράσεις μιας δεδομένης ουσίας με φυσικώς απαντώμενα εδάφη, πρέπει να χρησιμοποιούνται διάφοροι τύποι εδαφών.

Στην παρούσα μέθοδο, η προσρόφηση αντιπροσωπεύει τη διεργασία της σύνδεσης μιας χημικής ουσίας με επιφάνειες εδαφών. Δεν γίνεται διάκριση μεταξύ διαφορετικών διεργασιών προσρόφησης (φυσική και χημική προσρόφηση) και διεργασιών όπως η επιφανειακώς καταλυόμενη αποικοδόμηση, η κατά μάζα προσρόφηση ή η χημική αντίδραση. Προσρόφηση η οποία απαντάται σε κολλοειδή σωματίδια (διάμετρος < 0,2 μm) δημιουργούμενα από το έδαφος δεν λαμβάνεται υπόψη.

▼B

Οι εδαφικές παράμετροι που πιστεύεται ότι παίζουν το σημαντικότερο ρόλο στην προσρόφηση είναι: η περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (3) (4) (12) (13) (14) (41) (43) (44) (45) (46) (47) (48), η περιεκτικότητα σε άργιλο και η υφή του εδάφους (3) (4) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) και το pH για τις ιονιξόμενες ενώσεις (3) (4) (42). Αλλες εδαφικές παράμετροι οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν την προσρόφηση/εκρόφηση μιας συγκεκριμένης ουσίας είναι η ενεργός κατιοανταλλακτική ικανότητα (ECEC), η περιεκτικότητα σε άμορφα οξείδια σιδήρου και αργύνλίου, ιδιαίτερα για ηφαιστειακά και τροπικά εδάφη (4), καθώς επίσης και η ειδική επιφάνεια (49).

Η δοκιμή έχει σχεδιαστεί για την εκτίμηση της προσρόφησης μιας χημικής ουσίας σε διάφορους τύπους εδαφών με ποικίλη περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, άργιλο και εδαφική υφή και pH. Περιλαμβάνει τρία μέρη:

Μέρος 1: Προκαταρκτική μελέτη για να προσδιοριστούν:

— ο λόγος εδάφους/διαλύιιατος,

— ο χρόνος ισορροπίας για την προσρόφηση και η προσροφημένη ουσία κατά την ισορροπία,

— η προσρόφηση της υπό δοκιμή ουσίας στην επιφάνεια των δοκιμαστικών δοχείων και η σταθερότητα της κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

Μέρος 2: Δοκιμή προσανατολισμού: μελετάται η προσρόφηση σε πότε διαφορετικούς τύπους εδαφών μέσω της κινητικής της προσροφήσεως σε μία μόνή συγκέντρωση και προσδιορισμού των συντελεστών κατανομής K_c και

Μέρος 3: Προσδιορισμός των ισόθέρμων προσρόφησης Freundlich για τον προσδιορισμό της επίδρασης της συγκέντρωσης στην έκταση της προσρόφησης στα εδάφη.

Μελέτη της εκρόφησης μέσω της κινητικής εκρόφησης/ισο3έρμων εκρόφησης Freundlich (προσάρτημα 1).

1.3. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Σύμβολο	Ορισμός	Μονάδες
A_{t_i}	ποσοστιαία προσρόφηση τη χρονική στιγμή t_i	%
A_{eq}	ποσοστιαία προσρόφηση στην κατάσταση ισορροπίας	%
$m_s^{ads}(t_i)$	μάζα της προσροφημένης στο έδαφος υπό δοκιμή ουσίας τη χρονική στιγμή t_i	μg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	μάζα της προσροφουμένης στο έδαφος υπό δοκιμή ουσίας κατά τη διάρκεια του χρονικού διαστήματος Δt_i	μg
$m_s^{ads}(eq)$	μάζα της προσροφημένης στο έδαφος υπό δοκιμή ουσίας στην κατάσταση ισορροπίας	μg
m_0	μάζα της υπό δοκιμή ουσίας στο δοκιμαστικό σωλήνα στην αρχή της δοκιμής προσρόφησης	μg
$m_m^{ads}(t_i)$	μάζα της υπό δοκίμή ουσίας ανευρισκόμενη σε ποσότητα (v_a^A) τη χρονική στιγμή t_i	μg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	μάζα της ουσίας στο διάλυμα σε κατάσταση ισορροπίας προσρόφησης	μg
m_{soil}	ποσότητα της εδαφικής φάσης, εκφραζόμενη σε ξηρή μάζα εδάφους	g

▼B

Σύμβολο	Ορισμός	Μονάδες
C_{st}	κ.ό. συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος της ουσίας	μg cm-^{3}
C_0	αρχική κ.ό. συγκέντρωση του υπό δοκιμή διαλύματος σε επαφή με το έδαφος	μg cm-^{3}
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	κ.ό. συγκέντρωση της ουσίας στην υδατική φάση τη χρονική στιγμή t_i της ανάλυσης	μg cm-^{3}
$C_s^{ads}(eq)$	συγκέντρωση της προσροφημένης ουσίας στο έδαφος στην κατάσταση ισορροπίας	μg g-^{1}
$C_{aq}^{ads}(eq)$	κ.ό. συγκέντρωση της ουσίας στην υδατική φάση σε κατάσταση ισορροπίας προσρόφησης	μg cm-^{3}
V_o	αρχικός όγκος της υδατικής φάσης σε επαφή με το έδαφος κατά τη διάρκεια της δοκιμής προσρόφησης	cm^3
v_a^A	όγκος της ποσότητας στην οποία μετράται η υπό δοκιμή ουσία	cm^3
K_d	συντελεστής κατανομής για την προσρόφηση	cm^3 g-^{1}
K_{oc}	τυποποιημένος συντελεστής προσρόφησης οργανικού άνθρακα	cm^3 g-^{1}
K_{om}	τυποποιημένος συντελεστής κατανομής οργανικής ύλης	cm^3 g-^{1}
K_F^{ads}	συντελεστής προσρόφησης Freundlich	μg $^{1-1/n}$ (cm^3) $^{1/n}$g-^{1}
1/n	εκθέτης Freundlich	
D_{t_i}	ποσοστιαία εκρόφηση τη χρονική στιγμή t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	ποσοστιαία εκρόφηση κατά το χρονικό διάστημα Δt_i	%
K_{des}	φαινομενικός συντελεστής εκρόφησης	cm^3 g-^{1}
K_F^{des}	συντελεστής εκρόφησης Freundlich	μg $^{1-1/n}$ (cm^3) $^{1/n}$g-^{1}
$m_{aq}^{des}(t_i)$	μαζα της εκροφημένης από το έδαφος υπό δοκιυη ουσίας κατά το χρόνο τ_i	μg
$m_m^{des}(\Delta t_i)$	μάζα της υπό δοκιμή ουσίας που εκροφάται από το έδαφος κατά τη διάρκεια του χρόνου Δ_{ti}	μg
$m_m^{des}(eq)$	μάζα της ουσίας που προσδιορίζεται αναλυτικώς στην υδατική φάση σε κατάσταση ισορροπίας εκρόφησης	μg
$m_{aq}^{des}(eq)$	συνολική μάζα της εκροφημένης υπό δοκιμή ουσίας σε κατάσταση ισορροπίας εκρόφησης	μg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	μάζα της ουσίας που παραμένει προσροφημένη στο έδαφος μετά τη χρονική περίοδο Δt_i	μg
m_{aq}^A	μάζα της ουσίας που περισσεύει μετά την αποκατάσταση ισορροπίας προσρόφησης λόγω μη πλήρους κατ' όγκο αντικατάστασης	μg
$C_s^{des}(eq)$	συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας που παραμένει προσροφημένη στο έδαφος στην κατάσταση ισορροπίας εκρόφησης	μg g-^{1}

▼B

Σύμβολο	Ορισμός	Μονάδες
$C_{aq}^{des}(eq)$	κ.ό. συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στην υδατική φάση σε κατάσταση ισορροπίας εκρόφησης	μg cm^{-3}
V_T	συνολικός όγκος της σε επαφή με το έδαφος υδατικής φάσης κατά τη διάρκεια του πειράματος κινητικής της εκρόφησης που εκτελείται με την εν σειρά μέθοδο	cm^3
V_R	όγκος του υπερκειμένου υγρού που απομακρύνεται από το σωλήνα μετά την αποκατάσταση ισορροπίας προσρόφησης και αντικαθίσταται από ίσο όγκο διαλύματος 0,01 M $CaCl_2$	cm^3
v_a^D	όγκος της ποσότητας που δειγματίζεται για αναλυτικούς σκοπούς από τη χρονική στιγμή (i), κατά τη διάρκεια του πειράματος κινητικής εκρόφησης που εκτελείται με την εν σειρά δοκιμή	cm^3
V_t^i	όγκος του διαλύματος που λαμβάνεται από το σωλήνα (i) για τη μέτρηση της υπό δοκιμή ουσίας σε πείραμα κινητικής εκρόφησης (παράλληλη μέθοδος)	cm^3
V_r^F	όγκος του διαλύματος που λαμβάνεται από το σωλήνα για τη μέτρηση της υπό δοκιμή ουσίας σε κατάσταση ισορροπίας εκρόφησης	cm^3
MB	υπόλοιπο μάζας	%
m_E	συνολική μάζα της υπό δοκιμή ουσίας που εκχυλίζεται από το έδαφος και τα τοιχώματα του δοχείου δοκιμής σε δύο στάδια	μg
V_{rec}	όγκος του υπερκειμένου υγρού που ανακτάται μετά την αποκατάσταση ισορροπίας προσρόφησης (cm^3)	cm^{-3}
P_{OW}	συντελεστής κατανομής σε οκτανόλη/νερό	
pKa	σταθερά διαστάσεως	
S_W	υδατοδιαλυτότητα	gl^{-1}

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Γνωστοί όγκοι διαλυμάτων της υπό δοκιμή ουσίας, ραδιοϊχνηθετημένης ή μη, σε γνωστές συγκεντρώσεις σε 0,01 M $CaCl_2$ προστίθενται σε δείγματα εδαφών γνωστού ζηρού βάρους που έχουν προηγουμένως σταθεροποιηθεί σε 0,01 M $CaCl_2$. Το μείγμα αναδεύεται για κατάλληλο χρονικό διάστημα. Τα εδαφικά εναιωρήματα διαχωρίζονται κατόπιν με φυγοκέντρηση και, εφόσον επιθυμείται, διήθηση και η υδατική φάση αναλύεται. Η ποσότητα της υπό δοκιμή ουσίας που προσροφάτα; στο εδαφικό δείγμα υπολογίζεται ως η διαφορά μεταξύ της ποσότητας της υπό δοκιμή ουσίας που υπήρχε αρχικά στο διάλυμα και της ποσότητας που παραμένει στο τέλος του πειράματος (έμμεση μέθοδος).

Εναλλακτικώς, η ποσότητα της προσροφουμενης υπό δοκιμή ουσίας μπορεί επίσης να προσδιοριστεί απευθείας με ανάλυση του εδάφους (άμεση μέθοδος). Η διαδικασία αυτή, η οποία συνίσταται σε σταδιακή εκχύλιση του εδάφους με κατάλληλο διαλύτη, συνιστάται σε περιπτώσεις όπου η διαφορά στη συγκέντρωση της ουσίας στο διάλυμα δεν μπορεί να προσδιοριστεί επακριβώς. Παραδείγματα τέτοιων περιπτώσεων είναι: προσρόφηση της υπό δοκιμή ουσίας στην επιφάνεια των δοκιμαστικών σωλήνων, αστάθεια της υπό δοκιμή ουσίας στη χρονική κλίμακα του πειράματος. ασθενής προσρόφηση που επιφέρει μικρές μονο μεταβολές συγκητρώσεως στο διάλυμα και ισχυρή προσρόφηση που απολήγει σε χαμηλή συγκέντρωση που δεν μπορεί να προσδιοριστεί επακριβώς. Εφόσον χρησιμοποιείται ραδιοίχνηθε-τημένη ουσία, η εκχύλιση του εδάφους μπορεί να αποφευχθεί με ανάλυση της εδαφικής φάσης μέσω καύσης και καταμέτρησης υγρού σπινθηρισμού. Εντούτοις, η καταμέτρηση υγρού σπινθηρισμού είναι μία μη εξειδικευμένη τεχνική που δεν μπορεί να διακρίνει μεταξύ αρχικών και προϊόντων μετασχηματισμού. Συνεπώς, 9α πρέπει να χρησιμοποιείται μόνον εφόσον η υπό δοκιμή ουσία είναι σταθερή κατά τη διάρκεια της μελέτης.

▼B

1.5. ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΟΥΣΙΑ

Τα χημικά αντιδραστήρια θα πρέπει να είναι αναλυτικής καθαρότητας. Συνιστάται η χρήση μη ιχνηθετημένων υπό δοκιμή ουσιών με γνωστή σύσταση και, κατά προτίμηση, 95 % τουλάχιστον βαθμό καθαρότητας ή ραδιοϊχνηθε-τημένων υπό δοκιμή ουσιών με γνωστή σύσταση και ραδιοκαθαρότητα. Στην περίπτωση ιχνηθετών βραχείας ημιζωής, θα πρέπει να γίνονται διορθώσεις σχετικά με τη διάσπαση.

Πριν από την εκτέλεση μιας δοκιμής προσρόφησης-εκρόφησης, θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμα τα ακόλουθα στοιχεία για την υπό δοκιμή ουσία:

α) υδατοδιαλυτότητα (A.6)·

β) τάση ατμών (A.4) ή/και σταθερά του νόμου του Henry

γ) αβιοτική αποικοδόμηση: υδρόλυση σε συνάρτηση με το pH (Γ. 7)·

δ) συντελεστής κατανομής (A.8)-

ε) άμεση βιοαποικοδομησιμότητα (C.4) ή αερόβιος και αναερόβιος μετασχηματισμός στο έδαφος·

στ) pKa ιοντίσιμων ουσιών·

ξ) άμεση φωτόλυση στο νερό (δηλαδή φάσμα απορρόφησης UV-ορατού στο νερό, κβαντοαπόδοση) και φωτοαποι-κοδόμηση στο έδαφος.

1.6. ΕΦΑΡΜΟΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η δοκιμή μπορεί να εφαρμοστεί σε χημικές ουσίες για τις οποίες υπάρχει αναλυτική μέθοδος με επαρκή ορθότητα (accuracy). Μία σημαντική παράμετρος που μπορεί να επηρεάσει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, ειδικά όταν ακολουθείται η έμμεση μέθοδος, είναι η σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας στη χρονοκλίμακα της δοκιμής. Έτσι, είναι απαραίτητος ο έλεγχος της σταθερότητας με μια προκαταρκτική δοκιμή. Εφόσον παρατηρηθεί μετασχηματισμός στη χρονοκλίματα της δοκιμής, συνιστάται η κύρια μελέτη να πραγματοποιείται με ανάλυση τόσο της εδαφικής όσο και των υδατικών φάσεων.

Κατά τη διεξαγωγή αυτής της δοκιμής, είναι δυνατόν να προκύψουν δυσκολίες για ουσίες με χαμηλή υδατοδιαλυτότητα ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}), καθώς επίσης και για ουσίες με υψηλό φορτίο, λόγω του ότι η συγκέντρωση στην υδατική φάση δεν μπορεί να μετρηθεί αναλυτικά με επαρκή ορθότητα. Στις περιπτώσεις αυτές, πρέπει να λαμβάνονται πρόσθετα μέτρα. Οδηγίες για την αντιμετώπιση των προβλημάτων αυτών παρέχονται στα σχετικά κεφάλαια της παρούσας μεθόδου.

Κατά τη δοκιμή πτητικών ουσιών, θα πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια για την αποφυγή απωλειών κατά τη διάρκεια της διαδικασίας δοκιμής.

1.7. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.7.1. **Όργανα και χημικά αντιδραστήρια**

Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός και ειδικότερα τα ακόλουθα:

α) Σωλήνες ή δοχεία για τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Είναι σημαντικό οι σωλήνες αυτοί ή δοχεία:

— να ταιριάξουν απόλυτα στη φυγοκεντρική συσκευή για την ελαχιστοποίηση σφαλμάτων χειρισμού ή μεταφοράς,

— να είναι από αδρανές υλικό, ώστε να ελαχιστοποιείται η προσρόφηση της υπό δοκιμή ουσίας στην επιφάνειά τους.

▼B

β) Συσκευή αναδευσεως: overhead ανάμεικτης η ισοδύναμος εξοπλισμός. Η συσκευή αναδεύσεως θα πρέπει να διατηρεί το έδαφος εν αιωρήσει κατά τη διάρκεια της ανακίνησης.

γ) Φυγόκεντρος: κατά προτίμηση υψηλής ταχύτητας, π.χ. ταχύτητα φυγοκέντρησης > 3 000 g, ελεγχόμενης θερμοκρασίας και δυνάμενη να απομακρύνει σωματίδια με διάμετρο μεγαλύτερη από 0,2 μm από υδατικό διάλυμα. Τα δοχεία 9α πρέπει να είναι καλυμμένα κατά τη διάρκεια της ανάδευσης και φυγοκέντρησης για να αποφεύγονται απώλειες πτητικών συστατικών και νερού. Για την ελαχιστοποίηση της προσρόφησης σε αυτά, 9α πρέπει να χρησιμοποιούνται απενεργοποιημένα καλύμματα όπως βιδωτά πώματα επενδεδυμένα με τεφλόν.

δ) Προαιρετικό: διάταξη διηθήσεως: φίλτρα με πορώδες 0,2 μm, αποστειρωμένα, μιας χρήσεως. Ιδιαίτερη προσοχή 9α πρέπει να δίδεται στην επιλογή του υλικού του φίλτρου για να αποφεύγονται τυχόν απώλειες της υπό δοκιμή ουσίας σε αυτό. Στην περίπτωση ουσιών χαμηλής διαλυτότητας, συνιστάται η χρήση φίλτρων από οργανικό υλικό.

ε) Αναλυτικά όργανα, κατάλληλα για τη μέτρηση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας.

στ) Εργαστηριακός κλίβανος με δυνατότητα διατήρησης της Θερμοκρασίας στην περιοχή των 103 Τ έως 110 °C.

1.7.2. **Χαρακτηρισμός και επιλογή εδαφών**

Τα εδάφη 9α πρέπει να χαρακτηρίζονται με βάση τρεις παραμέτρους που θεωρούνται ως οι βασικοί παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η προσροφητική ικανότητα: την περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, την περιεκτικότητα σε άργιλο και υφή του εδάφους και το pH. Όπως αναφέρθηκε ήδη (βλέπε πεδίο εφαρμογής), ρόλο στην προσρόφηση/εκρόφηση μιας συγκεκριμένης ουσίας μπορεί να παίζουν και άλλες φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους οι οποίες και 9α πρέπει να λαμβάνονται υπόψη στις περιπτώσεις αυτές.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για το χαρακτηρισμό των εδαφών παίζουν σπουδαίο ρόλο και μπορεί να έχουν σημαντική επίδραση στα αποτελέσματα. Συνιστάται λοιπόν το pH του εδάφους να μετριέται σε διάλυμα 0,01 M $CaCl_2$ (δηλαδή το διάλυμα που χρησιμοποιείται στη δοκιμή προσρόφησης/εκρόφησης) σύμφωνα με την αντίστοιχη μέθοδο ISO (1SO-10390-1). Συνιστάται επίσης και οι υπόλοιπες σχετικές εδαφικές ιδιότητες να προσδιορίζονται σύμφωνα με τυποποιημένες μεθόδους (εγχειρίδιο ανάλυσης εδαφών ISO). Με τον τρόπο αυτό η ανάλυση των δεδομένων ρόφησης βασίζεται σε διεθνώς τυποποιημένες εδαφικές παραμέτρους. Ορισμένες οδηγίες για τις υφιστάμενες τυποποιημένες μεθόδους ανάλυσης και χαρακτηρισμού εδαφών περιλαμβάνονται στις παραπομπές (50-52). Για τη διακρίβωση των μεθόδων δοκιμής εδαφών, συνιστάται η χρήση εδαφών αναφοράς.

Οδηγίες για την επιλογή εδαφών για δοκιμές προσρόφησης/εκρόφησης δίνονται στον πίνακα 1. Τα επτά επιλεγόμενα εδάφη καλύπτουν τύπους εδαφών που απαντώνται σε εύκρατες γεωγραφικές ζώνες. Στην περίπτωση ιονισίμων προς δοκιμή ουσιών, τα επιλεγόμενα εδάφη θα πρέπει να καλύπτουν μία μεγάλη περιοχή pH, για να μπορεί να εκτιμηθεί η προσρόφηση της ουσίας στην ιονισμένη και μη ιονισμένη μορφή της. Οδηγίες σχετικά με το πόσα διαφορετικά εδάφη πρέπει να χρησιμοποιούνται στα διάφορα στάδια της δοκιμής δίνονται στο 1.9 «Εκτέλεση της δοκιμής».

Εφόσον προτιμηθούν άλλοι τύποι εδαφών, αυτά 9α πρέπει να χαρακτηρίζονται με τις ίδιες παραμέτρους και οι ιδιότητές τους να εμπίπτουν στις ίδιες περιοχές με εκείνες που περιγράφονται στον πίνακα 1, έστω κι αν δεν πληρούν απολύτως τα κριτήρια.

▼B

Πίνακας 1:

Οδηγίες επιλογής εδαφικών δειγμάτων για δοκιμές προσρόφησης-εκρόφησης

Τύπος εδάφους	Περιοχή pH (σε 0,01 M $CaCl_2$)	Περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (%)	Περιεκτικότητα σε άργιλο (%)	Υφή εδάφους (1)
1	4,5 - 5,5	1,0 - 2,0	65-80	άργιλος
2	> 7,5	3,5 - 5,0	20-40	αργιλώδης πηλός
3	5,5 - 7,0	1,5 - 3,0	15-25	προσχωσιγενής άργιλος
4	4,0 - 5,5	3,0 - 4,0	15-30	πηλός
5	< 4,0 - 6,0 (2)	< 0,5 - 1,5 (2) (3)	< 10-15 (2)	αργιλώδης άμμος
6	> 7,0	< 0,5-1,0 (2) (3)	40-65	αργιλοπηλός/άργυλος
7	< 4,5	> 10	< 10	άμμος/αργιλώδης άμμος

(1) Σύμφωνά με το σύστημα FAO και το αμερικανικό σύστημα (85).
(2) Οι αντιστοιχές μιεταβλητές θα πρεπει, κατά προτίμηση, να έχουν τιμές μέσα στην προβλεπόμενη περιοχή. Εάν, εντούτοις. συναντώντα. δυσκολίες στην ανεύρεση κατάλληλων εδαφών, είναι αποδεκτές και τιμές κάτω της υποδεικνυόμενης ελάχιστης τιμής.
(3) Εδάφη με λιγότερο από 0,3 % οργανικό άνθρακα μπορεί να διαταρράξουν τη σχέση μεταξύ περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα και προσρόφησης. Συνιστάται λοιπόν η χρήση εδαφών με περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα τουλάχιστον 0,3 %.

1.7.3. **Συλλογή και αποθήκευση εδαφικών δειγμάτων**

1.7.3.1. *Συλλογή*

Δεν χρειάζονται εξειδικευμένες τεχνικές ή σύνεργα δειγματοληψίας. Η τεχνική δειγματοληψίας εξαρτάται από το σκοπό της μελέτης (53) (54) (55) (56) (57) (58).

Θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα ακόλουθα:

α) απαιτούνται λεπτομερείς πληροφορίες για το ιστορικό του εδαφικού πεδίου συμπεριλαμβανομένης της τοποθεσίας, της βλάστησης, των χρήσεων γεωργικών φαρμάκων ή/και λιπασμάτων, βιολογικών προσθηκών ή τυχαίας μόλυνσης. Για την περιγραφή του τόπου δειγματοληψίας θα πρέπει να ακολουθούνται οι συστάσεις του προτύπου του ISO για τη δειγματοληψία εδαφών (ISO 10381-6)·

β) ο τόπος δειγματοληψίας πρέπει να ορίζεται με UTM (Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum) ή γεωγραφικές συντεταγμένες. Αυτό δίνει τη δυνατότητα επανασυλλογής ενός συγκεκριμένου εδάφους στο μέλλον ή μπορεί να βοηθήσει στο ορισμό του εδάφους με βάση διάφορα συστήματα ταξινόμησης που χρησιμοποιούνται σε διάφορες χώρες. Επίσης, θα πρέπει να συλλέγεται μόνον ορίζοντας Α μέχρι μέγιστο βάθος 20 cm. Ειδικά στην περίπτωση του εδάφους αριθ. 7, εφόσον ως τμήμα του εδάφους υπάρχει ορίζοντας O_n, αυτός θα πρέπει να περιλαμβάνεται στη δειγματοληψία.

Τα δείγματα των εδαφών θα πρέπει να μεταφέρονται με περιέκτες και υπό συνθήκες θερμοκρασίας που να εγγυώνται ότι οι αρχικές ιδιότητες του εδάφους δεν πρόκειται να αλλοιωθούν σημαντικά.

▼B

1.7.3.2. *Αποθήκευση*

Προτιμάται η χρήση προσφάτως ληφθέντων εδαφών. Μόνον εφόσον αυτό δεν είναι δυνατό, τότε τα εδάφη θα πρέπει να αποθηκεύονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και να διατηρούνται ξηραινόμενα στον αέρα. Δεν προβλέπεται κάποιο χρονικό όριο στην αποθήκευση, τα εδάφη όμως που αποθηκεύονται για διάστημα μεγαλύτερο των τριών χρόνων θα πρέπει να επανυποβάλλονται, πριν χρησιμοποιηθούν, σε ανάλυση ως προς την περιεκτικότητά τους σε οργανικό άνθρακα, και για το pH και τη CEC.

1.7.3.3. *Χειρισμός και προετοιμασία εδαφικών δειγμάτων για τη δοκιμή*

Τα εδάφη ξηραίνονται στον αέρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (κατά προτίμηση μεταξύ 20-25 °C). Τυχόν αποσυσ-σωμάτωση θα πρέπει να πραγματοποιείται με την ελάχιστη δυνατή δύναμη, έτσι ώστε η αρχική υφή του εδάφους να παραμένει κατά το δυνατόν αναλλοίωτη. Τα εδάφη κοσκινίζονται μέχρι μεγέθους σωματιδίων < 2 mm. Για το κοσκίνι-σμα, θα πρέπει να ακολουθούνται οι συστάσεις του προτύπου ISO για τη δειγματοληψία εδαφών (ISO 10381-6). Συνιστάται προσεκτική ομοιογενοποίηση, καθώς έτσι ενισχύεται η αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων. Η υγρασία κάθε εδάφους προσδιορίζεται σε τρία δείγματα με θέρμανση στους 105 °C μέχρις ότου να μην υπάρχει καμία σημαντική μεταβολή στο βάρος (περίπου 12 ώρες). Για όλους τους υπολογισμούς η μάζα του εδάφους αναφέρεται σε ξηρά εκ κλιβάνου μάζα δηλαδή το βάρος του εδάφους διορθωμένο ως προς την υγρασία.

1.7.4. **Προετοιμασία της υπό δοκιμή ουσίας για προσθήκη στο έδαφος**

Η υπό δοκιμή ουσία διαλύεται σε διάλυμα 0,01 M $CaCl_2$ σε απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό. Το διάλυμα $CaCl_2$ χρησιμοποιείται ως η φάση υδατικού διαλύτη για τη βελτίωση της φυγοκέντρησης και την ελαχιστοποίηση της κατιο-νανταλλαγής. Η συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος θα πρέπει, κατά προτίμηση, να είναι τρεις τάξεις μεγέθους υψηλότερη από το όριο ανίχνευσης της χρησιμοποιούμενης αναλυτικής μεθόδου. Το ελάχιστο αυτό όριο διασφαλίζει την πραγματοποίηση επακριβών μετρήσεων σε σχέση με τη μεθοδολογία που ακολουθείται σε αυτή τη μέθοδο. Επιπλέον, η συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος θα πρέπει να είναι μικρότερη από την υδατοδιαλυτότητα της υπό δοκιμή ουσίας.

Το αρχικό διάλυμα θα πρέπει, κατά προτίμηση, να παρασκευάζεται λίγο πριν από την προσθήκη του σε εδαφικά δείγματα και να διατηρείται κλειστό στο σκότος στους 4 °C. Ο χρόνος αποθήκευσης εξαρτάται από τη σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας και τη συγκέντρωση της στο διάλυμα.

Αποκλειστικά στην περίπτωση ασθενώς διαλυτών ουσιών (S_w < 10^{-4} γ λ^{-1}), μπορεί να χρειάζεται ένας κατάλληλος διαλυτοποιητικός παράγοντας όταν η υπό δοκιμή ουσία είναι δύσκολο να διαλυθεί. Ο διαλυτοποιητικός αυτός παράγοντας: α) θα πρέπει να αναμειγνύεται με νερό όπως η μεθανόλη ή το ακετονιτρίλιο- β) η συγκέντρωση του δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 1 % του συνολικού όγκου του αρχικού διαλύματος, ενώ θα πρέπει να είναι μικρότερη από αυτή στο διάλυμα της υπό δοκιμή ουσίας που θα έλθει σε επαφή με το έδαφος (κατά προτίμηση, μικρότερη του 0,1 %) και γ) δεν θα πρέπει να είναι τασιενεργός ή να υφίσταται διαλυτολυτικές αντίδρασεις με την υπό δοκιμή χημική ουσία. Εφόσον χρησιμοποιείται διαλυτοποιητικός παράγοντας, αυτό θα πρέπει να προσδιορίζεται και να αιτιολογείται στην αναφορά των στοιχείων.

Μια άλλη εναλλακτική λύση για τις ασθενώς διαλυτές ουσίες είναι η προσθήκη της υπό δοκιμή ουσίας στο υπό δοκιμή σύστημα μέσω οργανικού διαλύτη: η υπό δοκιμή ουσία διαλύεται σε οργανικό διαλύτη και ποσότητα αυτού προστίθεται στο σύστημα εδάφους και διαλύματος 0,01 M $CaCl_2$ σε απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό. Η περιεκτικότητα του οργανικού διαλύτη στην υδατική φάση θα πρέπει να διατηρείται όσο το δυνατό χαμηλότερη, χωρίς να υπερβαίνει κανονικά το 0,1 %. Η προσθήκη μέσω οργανικού διαλύματος μπορεί να παρουσιάζει αδυναμία στο θέμα της ογκομετρικής επαναληψιμότητας. Έτσι, μπορεί να εισαχθεί ένα πρόσθετο σφάλμα καθώς η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας και του συνδιαλύτη μπορεί να μην είναι η ίδια σε όλες τις δοκιμές.

▼B

1.8. ΠΡΟΫΠΟΘΕΣΕΙΣ ΠΑ ΤΗ ΔΙΕΝΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ/ΕΚΡΟΦΗΣΗΣ

1.8.1. **Αναλυτική μέθοδος**

Στις βασικές παραμέτρους που μπορεί να επηρρεάσουν την ορθότητα των μετρήσεων ρόφησης περιλαμβάνονται η ορθότητα της αναλυτικής μεθόδου στην ανάλυση τόσο του διαλύματος όσο και των προσροφημένων φάσεων, η σταθερότητα και καθαρότητα της υπό δοκιμή ουσίας, η επίτευξη ισορροπίας ρόφησης, το μέγεθος της μεταβολής της συγκέντρωσης του διαλύματος, ο λόγος εδάφους/διάλυμα και οι μεταβολές στη δομή του εδάφους κατά τη διάρκεια της διεργασίας αποκατάστασης ισορροπίας (3 5) (59-62). Μερικά παραδείγματα σχετικά με θέματα ορθότητας δίδονται στο προσάρτημα 2.

Η αξιοπιστία της χρησιμοποιούμενης αναλυτικής μεθόδου πρέπει να ελέγχεται στην περιοχή συγκεντρώσεων που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Ο πειραματιζόμενος θα πρέπει να έχει την ελευθερία ανάπτυξης κατάλληλης μεθόδου με την κατάλληλη ορθότητα, ακρίβεια, αναπαραγωγιμότητα, όρια ανίχνευσης και ανάκτηση. Οδηγίες για την εκτέλεση της δοκιμής δίδονται στο πείραμα που περιγράφεται παρακάτω.

Κατάλληλος όγκος διαλύματος 0,01 M $CaCl_2$, π.χ. 100 cm^3, αναδεύεται για 4 ώρες με ποσότητα εδάφους, π.χ. 20 g, υψηλής προσροφησιμότητας, δηλαδή με υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικά άνθρακα και άργιλο. Οι τιμές αυτές βαρών και όγκων μπορούν να διαφοροποιούνται ανάλογα με τις αναλυτικές ανάγκες, ένα όμως πρόσφορο σημείο εκκίνησης είναι ένας λόγος εδάφους/διάλυμα 1:5. Το μείγμα φυγοκεντρείται και η υδατική φάση μπορεί να διηθηθεί. Στην τελευταία προστίθεται ορισμένος όγκος του αρχικού διαλύματος της υπό δοκιμή ουσίας ώστε να επιτευχθεί ονομαστική συγκέντρωση στα πλαίσια της περιοχής συγκεντρώσεων που έχουν τη μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Ο όγκος αυτός δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 10 % του τελικού όγκου της υδατικής φάσης έτσι ώστε η μεταβολή στη φύση του προ της αποκατάστασης ισορροπίας διαλύματος να είναι όσο το δυνατό μικρότερη. Το διάλυμα υποβάλλεται σε ανάλυση.

Στην όλη διαδικασία πρέπει να περιλαμβάνεται και η ανάλυση τυφλού δείγματος αποτελούμενου από σύστημα εδάφους + διαλύματος $CaCl_2$ (χωρίς υπό δοκιμή ουσία) για να ελέγχεται η τυχόν ύπαρξη τεχνικών σφαλμάτων στην αναλυτική μέθοδο ή παρενεργειών από το έδαφος.

Στις αναλυτικές μεθόδους που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μετρήσεις ροφήσεως περιλαμβάνονται η χρωματογραφία αερίου-υγρού (GLC), η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), η φασματομετρία (π.χ. φασματομε-τρία GC/μάζας, φασματομετρία HPLC/μάζας) και η καταμέτρηση σπινθηρισμού σε υγρό (για ραδιοεπισημασμένες ουσίες μόνο). Ανεξάρτητα από τη χρησιμοποιούμενη αναλυτική μέθοδο, ως κατάλληλα ποσοστά ανακτήσεως θεωρούνται ποσοστά μεταξύ 90 % και 110 % της ονομαστικής τιμής. Για να μπορεί να γίνει ανίχνευση και αξιολόγηση μετά την κατανομή, τα όρια ανίχνευσης της αναλυτικής μεθόδου θα πρέπει να είναι τουλάχιστον δύο τάξεις μεγέθους κάτω της ονομαστικής συγκεντρώσεως.

Τα χαρακτηριστικά και τα όρια ανίχνευσης της αναλυτικής μεθόδου που διατίθεται για την εκτέλεση των μελετών προσρόφησης παίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό των συνθηκών δοκιμής και την όλη πειραματική εκτέλεση της δοκιμής. Η μέθοδος αυτή ακολουθεί μια γενική πειραματική οδό και αποτελεί πηγή καθοδήγησης και κατευθύνσεων για εφαρμογή εναλλακτικών λύσεων αν τυχόν η αναλυτική μέθοδος και οι εργαστηριακές εγκαταστάσεις επιβάλλουν κάποιους περιορισμούς.

▼B

1.8.2. **Επιλογή των άριστων λόγων εδάφοις/διάλυμα**

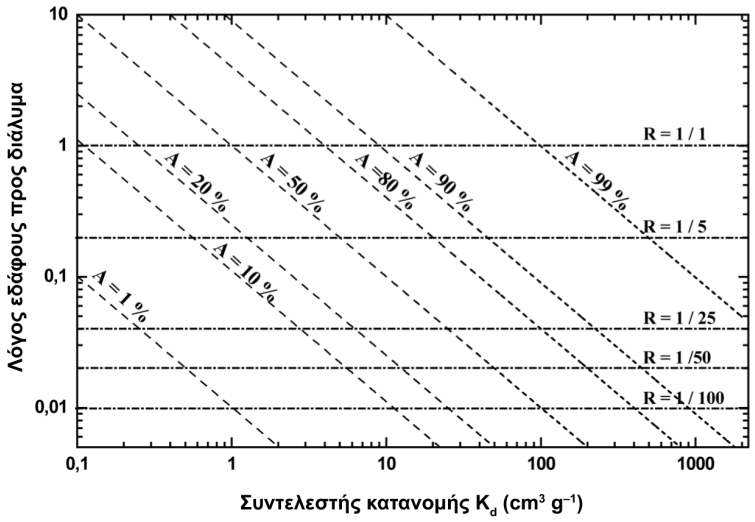
Η επιλογή των κατάλληλων λόγων εδάφους προς διάλυμα στις μελέτες προσρόφησης εξαρτάται από το συντελεστή κατανομής K_d και το σχετικό επιθυμητό βαθμό προσρόφησης. Η μεταβολή της συγκέντρωσης της ουσίας στο διάλυμα καθορίζει τη στατιστική ορθότητα της μέτρησης με βάση τη μορφή της εξίσωσης προσρόφησης και το όριο της αναλυτικής μεθοδολογίας, στην ανίχνευση της συγκέντρωσης της διαλελυμένης χημικής ουσίας. Συνεπώς, στην πράξη, είναι χρήσιμο να καθορίζονται μερικοί πάγιοι λόγοι στους οποίους το προσροφούμενο ποσοστό να είναι πάνω από 20 % και, κατά προτίμηση, > 50 % (62), ενώ ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίνεται ώστε η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στην υδατική φάση να διατηρείται αρκετά υψηλή για να λαμβάνονται ορθές μετρήσεις. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό στην περίπτωση υψηλών ποσοστών προσρόφησης.

Μια πρόσφορη προσέγγιση στην επιλογή των κατάλληλων λόγων εδάφους/νερό βασίζεται στον υπολογισμό της τιμής K_d είτε με προκαταρκτικές μελέτες είτε με καθιερωμένες τεχνικές εκτίμησης (προσάρτημα 3). Κατόπιν, μπορεί να γίνει επιλογή του κατάλληλου λόγου με βάση την καμπύλη των λόγων εδάφους/διάλυμα συναρτήσει των K_d νια συγκεκριμένα ποσοστά προσρόφησης (εικόνα 1). Στην γραφική αυτή παράσταση υποτίθεται ότι η εξίσωση προσρόφησης είναι γραμμική ([1]). Η προς εφαρμογή σχέση λαμβάνεται με αναδιασκευή της εξίσωσης (4) του K_d στη μορφή της εξίσωσης (Τ):

$$\frac{V_0}{m_{soil}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{ads}(eq)} - 1\right) K_d \qquad (1)$$

ή στη λογαριθμική της μορφή όπου $R = m_{soie}/Vo$ και $A_{eq}\,\%/100 = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0}$:

$$\log R = -\log K_d + \log\left[\frac{A_{eq}\%/100}{1 - A_{eq}\%/100}\right] \qquad (2)$$



Εικόνα 1. Σχέση μεταξύ λόγων εδάφους προς διάλυμα και τιμών K_d για διάφορα ποσοστά προσροφημένης υπό δοκιμή ουσίας

([1]) $C_s^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{ads}(eq)$.

▼B

Στην εικόνα 1 εμφαίνονται οι λόγοι εδάφους/διάλυμα σε συνάρτηση με τις τιμές K_d για διάφορα επίπεδα προσρόφησης. Για παράδειγμα, με λόγο εδάφους/διάλυμα 1:5 και τιμή K_d=20, η προσρόφηση ανέρχεται περίπου στο 80 %. Για την επίτευξη προσρόφησης 50 % με τον ίδιο K_d, πρέπει να χρησιμοποιη9είλόγος 1:25. Η προσέγγιση αυτή για την επιλογή των κατάλληλων λόγων εδάφους/διάλυμα παρέχει στον ερευνητή άνεση στην αντιμετώπιση των διαφόρων πειραματικών αναγκών.

Οι περιπτώσεις που είναι δυσκολότερο να αντιμετωπιστούν είναι εκείνες όπου η ουσία προσροφάται σε υψηλό ή πολύ χαμηλό βαθμό. Όταν η προσρόφηση είναι χαμηλή, συνιστάται λόγος εδάφους/διάλυμα 1:1, αν και στην περίπτωση ορισμένων πολύ οργανικών εδαφικών τύπων μπορεί να χρειάζονται μικρότεροι λόγοι για τη λήψη υδαρούς αιωρήματος. Πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια ώστε με την αναλυτική μεθοδολογία να μετρώνται μικρές μεταβολές στη συγκέντρωση του διαλύματος, Διαφορετικά, η μέτρηση προσροφήσεως δεν 9α είναι ακριβής. Από την άλλη μεριά, στην περίπτωση πολύ υψηλών συντελεστών κατανομής K_d, μπορεί να φθάσουμε σε τιμές λόγου 1:100 εδάφους/διάλυμα για να παραμείνει σημαντική ποσότητα ουσίας στο διάλυμα. Εντούτοις, πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια ώστε να διασφαλίζεται καλή ανάμειξη, να αφήνεται δε ικανός χρόνος για την αποκατάσταση ισορροπίας στο σύστημα. Μία εναλλακτική προσέγγιση είναι να προβλεφθεί η τιμή K_d εφαρμόζοντας τεχνικές εκτίμησης που βασίζονται, π.χ., στις τιμές P_{OW} (προσάρτημα 3). Η προσέγγιση αυτή είναι ιδιαίτερα χρήσιμη νια πολικές ουσίες χαμηλής προσρόφησης με $P_{ow} < 20$ και υψηλής ροφησιμότητας λιπόφιλες ουσίες με $P_{ow} > 10^4$.

1.9. ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.9.1. Συνθήκες δοκιμής

Όλα τα πειράματα γίνονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και, εφόσον είναι δυνατό, σε σταθερή θερμοκρασία μεταξύ 20 °C και 25 °C.

Με τις εφαρμοζόμενες συνθήκες φυγοκέντρησης θα πρέπει να μπορούν να απομακρύνονται από το διάλυμα σωματίδια με μέγεθος μεγαλύτερο από 0,2 μm. Η τιμή αυτή εκφράζει το μικρότερο σωματίδιο που θεωρείται ως στερεό σωματίδιο και αποτελεί το όριο μεταξύ στερεάς και κολλοειδούς καταστάσεως. Οδηγίες για τον καθορισμό των συνθηκών φυγοκέντρησης δίδονται στο προσάρτημα 4.

Εαν με τον υφιστάμενο φυγοκεντρικό εξοπλισμό δεν μπορεί να διασφαλιστεί η απομάκρυνση σωματιδίων μεγαλύτερων από 0,2 μm, μπορεί να χρησιμοποιηθεί συνδυασμός φυνοκέντρησης και διήθησης με φίλτρα 0,2 μm. Τα φίλτρα αυτά θα πρέπει να είναι από κατάλληλο αδρανές υλικό νια την αποφυγή τυχόν απωλειών της υπό δοκιμή ουσίας σε αυτά. Σε κάθε περίπτωση, θα πρέπει να αποδεικνύεται ότι δεν υπάρχει περίπτωση απωλειών της υπό δοκιμή ουσίας κατά τη διάρκεια της διήθησης.

1.9.2. **Μέρος 1 — Προκαταρκτική μελέτη**

Ο σκοπός της διεξαγωγής προκαταρκτικής μελέτης έχει ήδη αναφερθεί στο κεφάλαιο του πεδίου εφαρμογής. Κατευθύνσεις για τη διεξαγωγή της δοκιμής αυτής δίδονται με το περιγραφόμενο κατωτέρω πείραμα.

1.9.2.1. *Επιλογή των άριστων λόγων εδάφους/διάλυμα*

Χρησιμοποιούνται δύο τύποι εδαφών και τρεις λόγοι εδάφους/διάλυμα (έξι πειράματα). Ο ένας τύπος εδάφους έχει υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα και χαμηλή σε άργιλο ενώ ο άλλος έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα και υψηλή σε άργιλο. Προτείνονται οι ακόλουθοι λόγοι:

— 50 g εδάφους και 50 cm^3 υδατικού διαλύματος της υπό δοκιμή ουσίας (λόγος 1/1),

▼B

— 10 g εδάφους και 50 cm^3 υδατικού διαλύματος της υπό δοκιμή ουσίας (λόγος 1/5),

— 2 g εδάφους και 50 cm^3 υδατικού διαλύματος της υπό δοκιμή ουσίας (λόγος 1/25).

Η ελάχιστη ποσότητα εδάφους στην οποία μπορεί να εκτελεστεί το πείραμα εξαρτάται από τον εργαστηριακό εξοπλισμό και την απόδοση των χρησιμοποιούμενων αναλυτικών μεθόδων. Πάντως, συνιστάται να χρησιμοποιείται ποσότητα τουλάχιστον 1 g, και κατά προτίμηση 2 g, για τη λήψη αξιόπιστων αποτελεσμάτων από τη δοκιμή.

Σε δείγμα-μάρτυρα που αποτελείται μόνον από την υπό δοκιμή ουσία σε διάλυμα 0,01 M $CaCl_2$ (χωρίς έδαφος) εφαρμόζονται τα ίδια ακριβώς βήματα όπως και στα υπό δοκιμή συστήματα, για να ελεγχθεί η σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας στο διάλυμα του $CaCl_2$ και η πιθανή της προσρόφηση στην επιφάνεια των δοκιμαστικών δοχείων.

Για κάθε τύπο εδάφους διενεργείται τυφλό πείραμα με την ίδια ποσότητα εδάφους και συνολικό όγκο 50 cm^3 διαλύματος 0,01 M $CaCl_2$ (χωρίς υπό δοκιμή ουσία) ακολουθώντας την ίδια διαδικασία δοκιμής. Το πείραμα αυτό χρησιμεύει ως βασικός μάρτυρας κατά τη διάρκεια της ανάλυσης για την ανίχνευση τυχόν παρεμβαινουσών ουσιών ή μολυσμένων εδαφών.

Όλα τα πειράματα, συμπεριλαμβανομένων των μαρτύρων και των τυφλών, θα πρέπει να εκτελούνται τουλάχιστον εις διπλούν. Ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων που θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη μπορεί να υπολογιστεί με βάση τη μεθοδολογία που θα ακολουθηθεί.

Οι μέθοδοι για την προκαταρκτική μελέτη και την κύρια μελέτη είναι γενικά οι ίδιες, τυχόν δε εξαιρέσεις πρέπει να αναφέρονται.

Τα ξηραμένα στον αέρα δείγματα φέρονται σε κατάσταση ισορροπίας αναδεύοντας τα με 45 cm^3 0,01 M $CaCl_2$ όλη διαλύματος της υπό δοκιμή ουσίας μέχρι τελικού όγκου 50 cm^3. Ο προστιθέμενος αυτός όγκος αρχικού διαλύματος: (α) δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 10 % του τελικού όγκου των 50 cm^3 της υδατικής φάσης ώστε η μεταβολή στη φύση του προ της ισορροπίας διαλύματος να είναι όσο το δυνατό μικρότερη και (β) θα πρέπει κατά προτίμηση να οδηγεί σε μία αρχική συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας που έρχεται σε επαφή με το έδαφος (C_0) δύο τάξεις μεγέθους τουλάχιστον υψηλότερη από το όριο ανιχνεύσεως της αναλυτικής μεθόδου. Το ελάχιστο αυτό όριο εξασφαλίζει την πραγματοποίηση ορθών μετρήσεων ακόμη κι όταν υπάρχει υψηλή προσρόφηση (> 90 %) και τον προσδιορισμό αργότερα των ισόθερμων προσρόφησης. Συνιστάται επίσης, εφόσον είναι δυνατό, η αρχική συγκέντρωση της ουσίας (C_0) να μην υπερβαίνει το ήμισυ του ορίου διαλυτότητας της.

Ένα παράδειγμα του τρόπου υπολογισμού της συγκέντρωσης του αρχικού διαλύματος (C_{st}) δίδεται παρακάτω. Υποτίθεται ότι το όριο ανίχνευσης είναι 0,01 μg cm^{-3} και η προσρόφηση 90 %. Έτσι, η αρχική συγκέντρωση της σε επαφή με το έδαφος υπό δοκιμή ουσίας θα πρέπει κατά προτίμηση να είναι 1 μg cm^3 (δύο τάξεις μεγέθους υψηλότερη από το όριο ανίχνευσης). Υποθέτοντας ότι προστίθεται ο μέγιστος συνιστώμενος όγκος του αρχικού διαλύματος δηλαδή 5 έως 45 cm^3 διαλύματος εξισορρόπησης 0,01 M $CaCl_2$ (= 10 % του αρχικού διαλύματος έως τα 50 cm^3 συνολικού όγκου της υδατικής φάσης), η συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος θα πρέπει να είναι 10 μg cm^{-3}. Η τιμή αυτή είναι τρεις τάξεις μεγέθους υψηλότερη από το όριο ανίχνευσης της αναλυτικής μεθόδου.

Πριν και μετά την επαφή με το έδαφος θα πρέπει να μετριέται το pH της υδατικής φάσης επειδή παίζει σπουδαίο ρόλο στην όλη διεργασία προσρόφησης, ειδικά στην περίπτωση ιονισιμων ουσιών.

▼B

Το μείγμα ανακινείται μέχρις ότου επιτευχθεί ισορροπία προσρόφησης. Ο χρόνος ισορροπίας στα διάφορα εδάφη παρουσιάζει υψηλή διαφοροποίηση, ανάλογα με την ουσία και το έδαφος. Γενικά, 24 ώρες είναι αρκετές (77). Στην προκαταρκτική μελέτη, τα δείγματα μπορούν να συλλέγονται αλληλοδιαδοχως μέσα σε 48ωρο διάστημα ανάμειξης (π.χ. 4, 8, 24, 48 ώρες). Εντουτοις, οι χρόνοι αναλύσεως θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με ελαστικότητα σε σχέση με το χρονοδιάγραμμα στο εργαστήριο.

Υπάρχουν δυο επιλογές για την ανάλυση της υπό δοκιμή ουσίας στο υδατικό διάλυμα: (α) η παράλληλη μέθοδος και (β) η εν σειρά μέθοδος. Θα πρέπει να τονιστεί ότι, αν και η παράλληλη μέθοδος είναι πειραματικά πιο κουραστική, η μαθηματική επεξεργασία των αποτελεσμάτων είναι απλούστερη (προσάρτημα 5). Πάντως, η επιλογή της μεθοδολογίας που πρέπει να ακολουθηθεί, επαφίεται στον πειραματιζόμενο ο οποίος θα πρέπει να εξετάζει τις διαθέσιμες εργαστηριακές διευκολύνσεις και πόρους.

α) παράλληλη μέθοδος: παρασκευάζονται δείγματα με τον ίδιο λόγο εδάφους/διάλυμα, τόσα όσα και τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα στα οποία επιθυμείται να μελετηθεί η κινητική προσρόφησης. Μετά τη φυγοκέντρηση και, εφόσον επιθυμείται, τη διήθηση, η υδατική φάση του πρώτου σωλήνα ανακτάται όσο το δυνατό πληρέστερα και μετριέται μετά από π.χ. 4 ώρες, εκείνη του δεύτερου σωλήνα μετά από 8 ώρες, εκείνη του τρίτου σωλήνα μετά από 24 ώρες κ.λπ.

β) εν σειρά μέθοδος: για κάθε λόγο εδάφους/διάλυμα παρασκευάζεται μόνον ένα διπλό δείγμα. Σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα το μείγμα φυγοκεντρείται για να διαχωριστούν οι φάσεις. Μικρή ποσότητα της υδατικής φάσης υποβάλλεται αμέσως σε ανάλυση για την υπό δοκιμή ουσία, κατόπιν δε το πείραμα συνεχίζεται με το αρχικό μείγμα. Εφόσον μετά τη φυγοκέντρηση ακολουθεί διήθηση, το εργαστήριο θα πρέπει να διαθέτει το σχετικό εξοπλισμό για το χειρισμό της διήθησης μικρών υδατικών ποσοτήτων. Συνιστάται ο συνολικός όγκος των λαμβανομένων ποσοτήτων να μην υπέρβαινει το 1 % του συνολικού όγκου του διαλύματος, για να μην αλλάζει σημαντικά ο λόγος εδάφους/διάλυμα και μειώνεται η μάζα της διαθέσιμης για προσρόφηση κατά τη διάρκεια της δοκιμής διαλελυμένης ουσίας.

Η ποσοστιαία προσρόφηση A_{t_i} υπολογίζεται σε κάθε χρονική στιγμή (η) με βάση την ονομαστική αρχική συγκέντρωση και τη μετρούμενη συγκέντρωση κατά το χρόνο δειγματοληψίας (t_i), διορθωμένη ως προς I $@A_{t_i}$ την τιμή του τυφλού. Για την εκτίμηση της επίτευξης κατάστασης ([1]) ισορροπίας χαράσσονται καμπύλες της At_i συναρτήσει του χρόνου (εικόνα 1 προσάρτημα 5) ενώ υπολογίζεται επίσης και η τιμή K_d στην ισορροπία. Με βάση την τιμή αυτή K_d, επιλέγονται από την εικόνα 1 κατάλληλοι λόγοι εδάφους/διάλυμα, έτσι ώστε η εκατοστιαία προσρόφηση να φθάνει πάνω από το 20 % και κατά προτίμηση >50 % (61). Όλες οι εφαρμοζόμενες εξισώσεις και αρχές σχεδιασμού της γραφικής παράστασης δίδονται στο τμήμα «Δεδομένα και έκθεση αναφοράς» και στο προσάρτημα 5.

1.9.2.2. *Προσδιορισμός του χρόνου αποκατάστασης ισορροπίας προσρόφησης και της ποσότητας της προσροφημένης υπό δοκιμή ουσίας κατά την ισορροπία.*

Όπως αναφέρθηκε ήδη με τις γραφικές παραστάσεις των A_{t_i} η C_{aq}^{ads} συναρτήσει του χρόνου επιτυγχάνεται η εκτόπιση της επίτευξης ισορροπίας προσρόφησης και της ποσότητας της προσροφημένης στ ην ισορροπία υπό δοκιμή ουσίας. Στις εικόνες 1 και 2 του προσαρτήματος 5 εμφαίνονται παραδείγματα τέτοιων γραφικών παραστάσεων. Χρόνος αποκατάστασης ισορροπίας είναι ο χρόνος που χρειάζεται το σύστημα για να φθάσει σε οριζοντίωση της καμπύλης.

([1]) Οι γραφικές παραστάσεις συνκεντρωσης της υπό δοκιμη ουσίας στην υδατική φάση (C_{aq}^{ads}) συναρτήσει τον χρόνου θα απορούσαν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την εκτιμηση της επίτευξης κατάστασης ισορροπίας (βλέπε εικόνα 2 παραρτηια 5).

▼B

Εάν, σε ένα συγκεκριμένο έδαφος, δεν εμφανίζεται οριζοντίωση αλλά μόνο σταθερή αύξηση, αυτό μπορεί να οφείλεται σε διάφορους πολύπλοκους παράγοντες όπως βιοαποικοδόμηση ή βραδεία διάχυση. Το φαινόμενο της βιοαποικοδό-μησης μπορεί να καταδειχθεί επαναλαμβάνοντας το πείραμα με ένα στείρο δήγμα εδάφους. Εάν, ακόμη και σε αυτή την περίπτωση, δεν εμφανιστεί οριζοντίωση, ο πειραματιζόμενος θα πρέπει να ερευνήσει και για άλλα φαινόμενα που μπορεί να εμπλέκονται στις συγκεκριμένες μελέτες του. Αυτό μπορεί να γίνει με κατάλληλες τροποποιήσεις των συνθηκών πειραματισμού (θερμοκρασία, χρόνοι ανάδευσης, λόγοι εδάφους/διάλυμα). Εναπόκειται στον πειραματιζόμενο να αποφασίσει αν θα συνεχίσει τη διαδικασία δοκιμής παρά το ενδεχόμενο αποτυχίας στην αποκατάσταση ισορροπίας.

1.9.2.3. *Προσρόφηση στην επιφάνεια του δοκιμαστικού δοχείου και σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας*

Από την ανάλυση των δειγμάτων-μαρτύρων μπορεί να ληφθούν ορισμένες πληροφορίες για την προσρόφηση της υπό δοκιμή ουσίας στην επιφάνεια των δοκιμαστικών δοχείων. Εάν παρατηρηθεί έλλειμμα μεγαλύτερο από το τυποποιημένο σχιάλμα της αναλυτικής μεθόδου, αυτό μπορεί να σημαίνει την ύπαρξη αβιοτικής αποικοδόμησης ή/και προσρόφησης στην επιφάνεια του δοκιμαστικού δοχείου. Διάκριση μεταξύ των δύο αυτών φαινομένων μπορεί να γίνει πλέ-νο\τας προσεκτικά τα τοιχώματα του δοχείου με γνωστό όγκο κατάλληλου διαλύτη και υποβάλλοντας το διάλυμα πλύσεως σε ανάλυση για την υπό δοκιμή ουσία. Εφόσον στην επιφάνεια των δοκιμαστικών δοχείων δεν παρατηρηθεί προσρόφηση, το έλλειμμα αποδεικνύει αβιοτική αστάθεια της υπό δοκιμή ουσίας. Εφόσον διαπιστωθεί προσρόφηση, είναι αναγκαία η αλλαγή του υλικού των δοκιμαστικών δοχείων. Πάντως, τα δεδομένα για την προσρόφηση στην επιφάνεια των δοκιμαστικών δοχείων που λαμβάνονται από αυτό το πείραμα δεν μπορούν να παρεκταθούν άμεσα στο πείραμα εδάφους/διάλυμα. Η παρουσία του εδάφους επηρεάζει την προσρόφηση αυτή.

Πρόσθετες πληροφορίες για τη σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας μπορούν να αντληθούν προσδιορίζοντας το υπόλοιπο της αρχικής μάζας κατά τη διάρκεια του χρόνου. Αυτό σημαίνει ότι πραγματοποιείται ανάλυση για την υπό δοκιμή ουσία στην υδατική φάση, στα εδαφικά εκχυλίσματα και τα τοιχώματα του δοκιμαστικού δοχείου. Η διαφορά μεταξύ της μάζας της προστιθέμενης υπό δοκιμή ουσίας και του αθροίσματος των μαζών της χημικής ουσίας στην υδατική φάση, τα εδαφικά εκχυλίσματα και τα τοιχώματα του δοκιμαστικού δοχείου, είναι ίση με την αποικοδο-μημένη μάζα ή/και απωλεσθείσα λόγω πτητικότητας η/και μη εκχυλισθείσα. Για τον προσδιορισμό του υπολοίπου, θα πρέπει να έχει αποκατασταθεί ισορροπία προσρόφησης μέσα στο χρονικό διάστημα του πειράματος.

Η ανάλυση για το υπόλοιπο μάζας εκτελείται σε εδάφη και για ένα λόγο εδάφους/διάλυμα ανά έδαφος που εμφανίζει έλλειμμα πάνω από 20 % και κατά προτίιιηση> 50 % στην κατάσταση ισορροπίας. Όταν το πείραμα ανεύρεσης του λόγου ολοκληρωθεί με την ανάλυση του τελευταίου δείγματος της υδατικής φάσης μετά από 48 ώρες. οι φάσεις διαχωρίζονται με φυγοκέντρηση και, εφόσον επιθυμείται, διήθηση. Η υδατική φάση ανακτάται όσο το δυνατό πληρέστερα και στο έδαφος προστίθεται κατάλληλος διαλύτης εκχυλίσεως (συντελεστής εκχυλίσεως τουλάχιστον 95 %) για την εκχύλιση της υπό δοκιμή ουσίας. Συνιστάται η πραγματοποίηση δύο τουλάχιστον διαδοχικών εκχυλίσεων. Προσδιορίζεται η ποσότητα της υπό δοκιμή ουσίας στο έδαφος και τα εκχυλίσματα του δοκιμαστικού δοχείου και υπολογίζεται το υπόλοιπο μάζας (εξίσωση 10, «Δεδομένα και έκθεση αναφοράς»). Εάν είναι λιγότερο από 90 %, η υπό δοκιμή ουσία θεωρείται ως ασταθής στη χρονοκλίμακα της δοκιμής. Πάντως, οι μελέτες μπορούν ακόμη να συνεχιστούν, λαμβάνοντας υπόψη την αστάθεια της υπό δοκιμή ουσίας. Στην περίπτωση αυτή, συνιστάται να υποβάλλονται σε ανάλυση και οι δύο φάσεις στην κύρια μελέτη.

▼B

1.9.3. *Μέρος 2 — Κινητική προσρόφησης σε μία συγκέντωση της υπό δοκιμή ουσίας*

Χρησιμοποιούνται πέντε εδάφη που επιλέγονται από τον πίνακα 1. Το να συμπεριληφθούν μεταξύ των πέντε αυτών εδαφών ορισμένα ή και όλα τα εδάφη που χρησιμοποιούνται στην προκαταρκτική μελέτη, αποτελεί πλεονέκτημα. Στην περίπτωση αυτή, το μέρος 2 δεν χρειάζεται να επαναληφθεί για τα εδάφη που χρησιμοποιούνται στην προκαταρκτική μελέτη.

Ο χρόνος αποκατάστασης ισορροπίας, ο λόγος εδάφους/διάλυμα, το βάρος του εδαφικού δείγματος, ο όγκος της υδατικής φάσης που είναι σε επαφή με το έδαφος και η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο διάλυμα επιλέγονται με βάση τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής μελέτης. Η ανάλυση θα πρέπει να γίνεται κατά προτίμηση περίπου μετά από 2, 4, 6, 8 (ενδεχομένως και 10) και 24 ώρες επαφής. Ο χρόνος ανάδευσης μπορεί να φθάσει το πολύ τις 48 ώρες στην περίπτωση που μια χημική ουσία απαιτεί μεγαλύτερο χρόνο αποκατάστασης ισορροπίας σε σχέση με τα αποτελέσματα εύρεσης του λόγου. Πάντως, οι χρόνοι ανάλυσης μπορούν να αντιμετωπίζονται με ελαστικότητα.

Κάθε πείραμα (ένα έδαφος και ένα διάλυμα) γίνεται τουλάχιστον εις διπλούν για να μπορέσει να γίνει εκτίμηση της διακύμανσης των αποτελεσματων. Σε κάθε πείραμα περιλαμβάνεται και ένα τυφλό. Αποτελείται από το έδαφος και διάλυμα 0,01 M $CaCl_2$, χωρίς υπό δοκιμή ουσία, ενώ το βάρος και ο όγκος, αντίστοιχα, είναι ίδιος με εκείνους του πειράματος. Δείγμα-μάρτυρας που περιέχει μόνο την υπό δοκιμή ουσία σε διάλυμα 0,01 M $CaCl_2$ (χωρίς έδαφος) υποβάλλεται την ίδια διαδικασία δοκιμής, ενέργεια που αποβλέπει στη διασφάλιση του πειράματος από τυχόν απρόσμενα.

Η ποσοστιαία προσρόφηση υπολογίζεται σε κάθε χρονική στιγμή A_{t_i} ή/και χρονικό διάστημα $A_{\Delta t_i}$ (ανάλογα με τις ανάγκες) και παρίσταται ως γραφική συνάρτηση του χρόνου. Υπολογίζονται επίσης ο συντελεστής κατανομής K_d στην ισορροπία καθώς επίσης και ο τυποποιημένος συτελεστής κατανομής οργανικού άνθρακα K_{oc} (για μη πολικές οργανικές χημικές ουσίες).

Αποτελέσματα της δοκιμής κινητικής προσροφήσεως

Η γραμμική K_d τιμή περιγράφει γενικά με ορθότητα τη ροφητική συμπεριφορά στο έδαφος (35) (78) και αποτελεί έκφραση της εγγενούς κινητικότητας των χημικών στο έδαφος. Σε γενικές γραμμές, π.χ., ουσίες με $K_d < 1$ ψm^3 γ^{-1} θεωρούνται ως ποιοτικώς κινητικές. Ομοίως, από τους MacCall *et al.* (16), έχει αναπτυχθεί ένα σχήμα ταξινόμησης κινητικοτήτων με βάση τις τιμές K_{oc}. Επιπλέον, υπάρχουν σχήματα ταξινόμησης αποπλύσεων που βασίζονται σε μία σχέση μεταξύ K_{oc} και DT-50 ([1]) (32) (79).

Επίσης, σύμφωνα με μελέτες ανάλυσης σφαλμάτων (61), τιμές K_d κάτω των 0,3 cm^3 γ-^{1} δεν μπορούν να εκτιμηθούν ορθά από τη μείωση της συγκεντρώσεως στην υδατική φάση, ακόμη κι όταν εφαρμόζεται η ευνοϊκότερη (από πλευράς ορθότητας) σχέση εδάφους/διάλυμα, δηλαδή 1:1. Στην περίπτωση αυτή, συνιστάται να γίνεται ανάλυση και των δύο φάσεων, εδάφους και διαλύματος.

([1]) DT-50: χρόνος αποικοδόμησης για το 50 % της υπό δοκιμη ουσίας.

▼B

Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις, συνιστάται η μελέτη της προσροφητικής συμπεριφοράς μιας ουσίας στο έδαφος και της εν δυνάμει κινητικότητάς της να συνεχίζεται προσδιορίζοντας τις ισόθερμους προσροφήσεως Freund-lich για τα συστήματα αυτά, για τα οποία είναι δυνατός ο ορθός προσδιορισμός της K_d με το πειραματικό πρωτόκολλο που ακολουθείται στη μέθοδο αυτή δοκιμής. Ο ορθός προσδιορισμός είναι δυνατός εάν η τιμή η οποία προκύπτει πολλαπλασιάζοντας την K_d με το λόγο εδάφους/διάλυμα είναι > 0,3, όταν οι μετρήσεις βασίζονται στη μείωση της συγκέντρωσης στην υδατική φάση (έμμεση μέθοδος), ή > 0,1, όταν αναλύονται και οι δύο φάσεις (άμεση μέθοδος) (61).

1.9.4. *Μέρος 3 — Ισόθερμοι προσρόφησης και κινητική εκρόφησης/ισόθερμοι εκρόφησης*

1.9.4.1. Ισόθερμοι προσρόφησης

Χρησιμοποιούνται πέντε συγκεντρώσεις υπό δοκιμή ουσίας, που καλύπτουν κατά προτίμηση δύο τάξης μεγέθους. Για την επιλογή αυτών των συγκεντρώσεων, θα πρέπει να λαμβάνο\ται υπόψη η υδατοδιαλυτότητα και οι προκύπτουσες συγκεντρώσεις υδατικής ισορροπίας. Καθ' όλη τη μελέτη, θα πρέπει να τηρείται ο ίδιος λόγος εδάφους/διάλυμα κατά έδαφος. Η δοκιμή προσρόφησης εκτελείται όπως περιγράφεται ανωτέρω, με μόνη τη διαφορά ότι η υδατική φάση αναλύεται μόνο μία φορά κατά το χρόνο που απαιτείται για την επίτευξη ισορροπίας όπως προσδιορίστηκε προ-ηγουμένως στο μέρος 2. Οι συγκεντρώσεις ισορροπίας στο διάλυμα προσδιορίζονται και η προσροφημένη ποσότητα υπολογίζεται από τη μείωση της υπό δοκιμή ουσίας στο διάλυμα ή με την άμεση μέθοδο. Η προσροφημένη μάζα ανά μονάδα μάζας εδάφους παρίσταται ως συνάρτηση της συγκέντρωσης ισορροπίας της υπό δοκιμή ουσίας (βλέπε «Δεδομένα και έκθεση αναφοράς»).

Αποτελέσματα από το πείραμα ισοθέρμων προσρόφησης

Μεταξύ των μέχρι τούδε προταθέντων μαθηματικών μοντέλων προσρόφησης, η ισόθερμος Freundlich είναι η συχνότερα χρησιμοποιούμενη για την περιγραφή διεργασιών προσρόφησης. Λεπτομερέστερες πληροφορίες για την ερμηνεία και σπουδαιότητα των μοντέλων προσρόφησης παρέχονται στις παραπομπές (41) (45) (80) (81) (82).

Σημείωση: Θα πρέπει να αναφερθεί ότι σύγκριση τιμών K_F (συντελεστής προσρόφησης Freundlich) για διάφορες ουσίες είναι δυνατή μόνον εφόσον αυτές οι τιμές $K_Φ$ εκφράζονται στις ίδιες μονάδες (83).

1.9.4.2. Κινητική εκρόφησης

Σκοπός του πειράματος αυτού είναι να διευρευνηθεί αν μια χημική ουσία προσροφάται σε ένα έδαφος με τρόπο αναστρέψιμο ή μη. Οι πληροφορίες αυτές είναι σημαντικές, γιατί η διεργασία εκρόφησης παίζει και αυτή σημαντικό ρόλο στη συμπεριφορά μιας χημικής ουσίας σε ένα εδαφικό πεδίο. Περαιτέρω, τα δεδομένα εκρόφησης αποτελούν χρήσιμα προς εισαγωγή στοιχεία στη μέσω υπολογιστών σχεδίαση μοντέλων απόπλυσης και προσομοίωση απορροής διαλελυμένων ουσιών. Εφόσον επιθυμείται η διενέργεια μελέτης εκρόφησης, συνιστάται η μελέτη που περιγράφεται κατωτέρω να πραγματοποιείται σε κάθε σύστημα για το οποίο κατέστη δυνατός ο επακριβής προσδιορισμός του K_d στο προηγηθέν πείραμα κινητικής προσρόφησης.

Όπως και στη μελέτη της κινητικής προσρόφησης, υπάρχουν δύο επιλογές για την πραγματοποίηση του πειράματος της κινητικής εκρόφησης: α) η παράλληλη μέθοδος και β) η εν σειρά μέθοδος. Η επιλογή της προς εφαρμογή μεθοδολογίας εναπόκειται στον ερευνητή ο οποίος πρέπει να λαμβάνει υπόψη του τις διαθέσιμες εργαστηριακές εγκαταστάσεις και πόρους.

▼B

α) παράλληλη μέθοδος: για κάθε έδαφος που επιλέγεται να υποβληθεί σε μελέτη εκρόφησης, παρασκευάζονται δείγματα με τον ίδιο λόγο εδάφους/διάλυμα, όσα είναι και τα χρονικά διαστήματα στα οποία επιθυμείται να μελετηθεί η κινητική εκρόφησης. Κατά προτίμηση, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τα ίδια χρονικά διαστήματα με εκείνα του πειράματος της κινητικής προσρόφησης. Εντούτοις, ο συνολικός χρόνος μπορεί να παραταθεί όσο χρειάζεται ώστε το σύστημα να φθάσει σε ισορροπία εκρόφησης. Σε κάθε πείραμα (ένα έδαφος, ένα διάλυμα) αντιστοιχεί και ένα τυφλό. Το τυφλό συνίσταται από το έδαφος και διάλυμα 0,01 M $CaCl_2$, χωρίς υπό δοκιμή ουσία, αλλά με το ίδιο βάρος και όγκο, αντίστοιχα, με εκείνα του πειράματος. Στην ίδια διαδικασία δοκιμής υποβάλλεται ως δείγμα-μάρτυρας η υπό δοκιμή ουσία σε διάλυμα 0,01 M $CaCl_2$ (χωρίς έδαφος). Όλα τα μείγματα του εδάφους με το διάλυμα αναδεύονται μέχρι να επιτευχθεί ισορροπία προσρόφησης (όπως καθορίστηκε προηγουμένως στο τμήμα 2). Κατόπιν, οι φάσεις διαχωρίζονται με φυγοκέντρηση και οι υδατικές φάσεις απομακρύνονται όσο το δυνατό πληρέστερα. Ο όγκος του απομακρυνόμενου διαλύματος αντικαθίσταται από ίσο όγκο διαλύματος 0,01 M $CaCl_2$ χωρίς υπό δοκιμή ουσία και τα νέα μείγματα αναδεύονται ξανά. Η υδατική φάση του πρώτου σωλήνα ανακτάται όσο το δυνατό πληρέστερα και μετριέται έπειτα από, π.χ., 2 ώρες, εκείνη του δεύτερου σωλήνα έπειτα από 4 ώρες, εκείνη του τρίτου έπειται από 6 ώρες, μέχρις ότου να επιτευχθεί ισορροπία εκρόφησης.

β) εν σειρά μέθοδος: μετά το πείραμα της κινητικής προσρόφησης, το μείγμα φυγοκεντρείται και η υδατική φάση απομακρύνεται κατά το δυνατό πληρέστερα. Ο όγκος του απομακρυνόμενου διαλύματος αντικαθίσταται από ίσο όγκο 0,01 M $CaCl_2$ χωρίς υπό δοκιμή ουσία. Το νέο μείγμα αναδεύεται μέχρις ότου επιτευχθεί ισορροπία εκρόφησης. Κατά τη διάρκεια αυτού του χρονικού διαστήματος, σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα, το μείγμα φυγοκεντρείται προς διαχωρισμό των φάσεων. Μικρή ποσότητα της υδατικής φάσης υποβάλλεται αμέσως σε ανάλυση. Κατόπιν, το πείραμα συνεχίζεται με το αρχικό μείγμα. Ο όγκος κάθε επιμέρους ποσότητας θα πρέπει να είναι λιγότερο του 1 % του συνολικού όγκου. Η ίδια ποσότητα πρόσφατου διαλύματος 0,01 M $CaCl_2$ προστίθεται στο μείγμα προς διατήρηση του λόγου εδάφους προς διάλυμα και η ανάδευση συνεχίζεται μέχρι το επόμενο χρονικό διάστημα.

Η ποσοστιαία εκρόφηση υπολογίζεται σε κάθε χρονική στιγμή (D_{t_i}) ή/και χρονικό διάστημα ($D_{\Delta t_i}$) (ανάλογα με τις ανάγκες της μελέτης) και παρίσταται γραφικώς συνάρτησει του χρόνου. Υπολογίζεται επίσης ο συντελεστής εκρόφησης K_{des} στην κατάσταση ισορροπίας. Όλες οι εξισώσεις που εφαρμόζονται δίδο\ται στο τμήμα «Δεδομένα και έκθεση αναφοράς» και στο προσάρτημα 5.

Αποτελέσματα από το πείραμα κινητικής εκρόφησης

Με κοινές γραφικές παραστάσεις της ποσοστιαίας εκρόφησης D_{t_i} και προσρόφησης A_{t_i} συναρτήσει του χρόνου είναι δυνατή η εκτίμηση της αναστρεψιμοτητας της διεργασίας προσρόφησης. Εάν η ισορροπία εκρόφησης επιτευχθεί έστω και στο διπλάσιο του χρόνου της ισορροπίας προσρόφησης, και η συνολική εκρόφηση είναι πάνω από το 75 % της προσροφηθείσας ποσότητας, η προσρόφηση θεωρείται ότι είναι αναστρέψιμη.

▼B

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ**

Τα αναλυτικά στοιχεία παρουσιάζονται με τη μορφή πίνακα (βλέπε προσάρτημα 6). Δίδονται οι επιμέρους μετρήσεις και οι υπολογισθέντες μέσοι όροι. Παρέχονται γραφικές παραστάσεις των ισοθέρμων προσρόφησης. Οι υπολογισμοί πραγματοποιούνται όπως περιγράφεται κατωτέρω.

Για τους σκοπούς της δοκιμής, θεωρείται ότι το βάρος 1 cm^3 υδατικού διαλύματος είναι 1 g. Ο λόγος εδάφους/διάλυμα μπορεί να εκφραστεί σε μονάδες w/w ή w/vol με τον ίδιο αριθμό.

2.1. ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ

Ως προσρόφηση (A_{t_i}) ορίζεται η % ποσότητα της προσροφημένης στο έδαφος ουσίας σε σχέση με την ποσότητα που υπήρχε στην αρχή της δοκιμής, υπό τις συνθήκες δοκιμής. Εάν η υπό δοκιμή ουσία είναι σταθερή και δεν προσ-ροφάται σημαντικά στα τοιχώματα του δοχείου, η A_{t_i} υπολογίζεται σε κάθε χρονική στιγμή η, σύμφωνα με την εξίσωση:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0}(\%) \qquad (3)$$

όπου:

A_{t_i} = ποσοστιαία προσρόφηση τη χρονική στιγμή t_i, (%),

$m_s^{ads}(t_i)$ = μάζα της προσροφημένης στο έδαφος υπό δοκιμή ουσίας τη στιγμή t_i, (μg),

m_0 = μάζα της υπό δοκιμή ουσίας στο δοκιμαστικό σωλήνα στην αρχή της δοκιμής (μg).

Λεπτομερείς πληροφορίες για τον τρόπο υπολογισμού του ποσοστού προσρόφησης A_{t_i} με την παράλληλη και εν σειρά μέθοδο δίδονται στο προσάρτημα 5.

Συντελεστής κατανομής K_d είναι ο λόγος μεταξύ της συγκέντρωσης της ουσίας στην εδαφική φάση και της κ.ο. συγκέντρωσης της ουσίας στο υδατικό διάλυμα, υπό τις συνθήκες δοκιμής, όταν επιτευχθεί ισορροπία προσρόφησης.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}}(cm^3\ g^{-1}) \qquad (4)$$

όπου:

$C_s^{ads}(eq)$ = συγκέντρωση της προσροφημένης στο έδαφος ουσίας σε ισορροπία προσρόφησης (μg g^{-1}),

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = κ.ό. συγκέντρωση της ουσίας στην υδατική φάση σε ισορροπία προσρόφησης μg cm^{-3}). Η συγκέντρωση αυτή προσδιορίζεται αναλυτικώς λαμβάνοντας υπόψη τις τιμές που λαμβάνονται από τα τυφλά,

$m_s^{ads}(eq)$ = μάζα της προσροφηυένης στο έδαφος ουσίας σε ισορροπία προσρόφησης (μg),

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = μάζα της ουσίας στο διάλυμα σε ισορροπία προσρόφησης (μg),

m_{soil} = ποσότητα της εδαφικής φάσης, εκφρασμένη σε ξηρή μάζα εδάφους (g),

V_0 = αρχικός όγκος της υδατικής φάσης σε επαφή με το έδαφος (cm^3).

Η σχέση μεταξύ A_{eq} και K_d δίδεται από τον τύπο:

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}}(cm^3\ g^{-1}) \qquad (5)$$

▼B

όπου:

A_{eq} = ποσοστιαία προσρόφηση στην κατάσταση ισορροπίας, %.

Ο τυποποιημένος συντελεστής προσρόφησης οργανικού άνθρακα K_{oc} παρέχει τη σχέση του συντελεστή κατανομής K_d με την περιεκτικότητα του εδαφικού δείγματος σε οργανικό άνθρακα:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} (cm^3\ g^{-1}) \quad \% \quad (6)$$

οπου:

%OC = ποσοστό οργανικού άνθρακα στο εδαφικό δείγμα (g g^{-1}).

Ο συντελεστής K_{oc} αντιπροσωπεύει μία μοναδική τιμή που χαρακτηρίζει την κατανομή κυρίως μη πολικών οργανικών χημικών ουσιών μεταξύ οργανικού άνθρακα στο έδαφος ή ίζημα και νερό. Η προσρόφηση των χημικών αυτών ουσιών σχετίζεται με το οργανικό περιεχόμενο του ροφούντος στερεού (7). Έτσι, οι τιμές K_{oc} εξαρτώνται από τα ειδικά χαρακτηριστικά του χουμικών κλασμάτων που διαφέρουν σημαντικά στη ροφητική ικανότητα, λόγω διαφορών στην προέλευση, τη γένεση, κ.λπ.

2.1.1. **Ισόθερμοι προσροφήσεως**

Η εξίσωση των ισόθερμων προσροφήσεως Freundlich σχετίζει την ποσότητα της προσροφημένης υπό δοκιμή ουσίας με τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο διάλυμα κατά την ισορροπία (εξίσωση 8).

Η επεξεργασία των στοιχείων γίνεται όπως και στην ενότητα «Προσρόφηση» και, για κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, υπολογίζεται η συγκέντρωση της προσροφημένης στο έδαφος υπό δοκιμή ουσίας μετά τη δοκιμή προσρόφησης [$C_s^{ads}(eq)$ αλλού δηλούμενη ως x/m). Υποτίθεται ότι έχει επιτευχθεί ισορροπία και ότι το $C_s^{ads}(eq)$ αντιπροσωπεύει την τιμή ισορροπίας:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)].V_0}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (7)$$

Η εξίσωση προσρόφησης Freundlich αντιπροσωπεύεται από τον τύπο (8):

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads}.\ C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (8)$$

ή με τη γραμμική μορφή:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

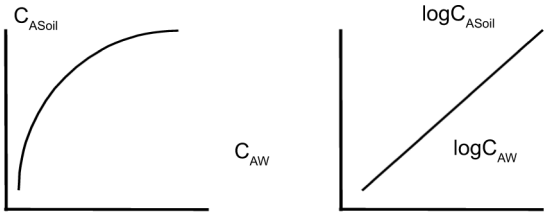
όπου:

K_F^{ads} = συντελεστής προσρόφησης Freundlich. Οι διαστάσεις του είναι $cm^3\ g^{-1}$ μόνον εφόσον 1/n = 1. Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις, στις διαστάσεις του εισέρχεται και το K_F^{ads} ($\mu g^{1—1/n}$ $(cm^3)^{1/n}\ g^{-1}$)

n = σταθερά αναγωγής. Το 1/n κυμαίνεται εν γένει μεταξύ 0,7-1,0, δείχνοντας ότι τα δεδομένα ροφήσεως είναι συχνά ελαφρώς μη γραμμικά.

Οι εξισώσεις (8) ανδ (9) παρίστανται γραφικώς και οι τιμές των K_F^{ads} και 1/η υπολογίζονται με ανάλυση αναγωγής χρησιμοποιώντας την εξίσωση 9. Υπολογίζεται επίσης ο συντελεστής συσχέτισης r^2 της λογαριθμικής εξισώσεως. Παράδειγμα τέτοιων καιιπυλών δίδεται στην εικόνα 2.

▼B



Εικόνα 2. Καμπύλη προσρόφησης Freundlich, κανονική και γραμμική

2.1.2. **Υπόλοιπο μάζας**

Ως υπόλοιπο μάζας (MB) ορίζεται το εκατοστιαίο ποσοστό της ουσίας που μπορεί να ανακτηθεί με αναλυτικά μέσα έπειτα από δοκιμή προσρόφησης συναρτήσει της ονομαστικής ποσότητας της ουσίας στην αρχή της δοκιμής.

Η επεξεργασία των στοιχείων διαφέρει εάν ο διαλύτης είναι πλήρως αναμείξιμος με νερό. Στην περίπτωση υδατοανα-μείξιμου διαλύτη, για τον προσδιορισμό της ποσότητας της ουσίας που ανακτάται με εκχύλιση με διαλύτη, μπορεί να εφαρμοστεί η επεξεργασία των στοιχείων που περιγράφεται στο κεφάλαιο «Εκρόφηση». Εάν ο διαλύτης είναι λιγότερο αναμείξιμος με νερό, πρέπει να γίνεται προσδιορισμός της ποσότητας.

Το υπόλοιπο μάζας MB για την προσρόφηση υπολογίζεται ως εξής: υποτίθεται ότι ο όρος (m_E) αντιστοιχεί στο άθροισμα των χημικών μαζών που εκχυλίζονται από το έδαφος και την επιφάνεια του δοκιμαστικού δοχείου με οργανικό διαλύτη:

$$MB = \frac{(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0}(\%) \qquad (10)$$

οπου:

MB = υπόλοιπο μάζας (%),

m_E = ολική μάζα της υπό δοκιμή ουσίας που εκχυλίζεται από το έδαφος και τα τοιχώματα του δοκιμαστικού δοχείου σε δύο στάδια (μg),

C_0 = αρχική κ. ό. συγκέντρωση του υπό δοκιμή διαλύματος σε επαφή με το έδαφος μg cm^{-3}),

V_{rec} = όγκος του υπερκειμένου που ανακτάται μετά την ισορροπία προσρόφησης (cm^{-3}).

2.2. ΕΚΡΟΦΗΣΗ

Ως εκρόφηση (D) ορίζεται το ποσοστό της υπό δοκιμή ουσίας που εκροφάται σε σχέση με την προηγουμένως προσ-ροφηθείσα ποσότητα ουσίας, υπό τις συνθήκες δοκιμής:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_S^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \qquad (11)$$

όπου:

D_{ti} = ποσοστό εκρόφησης τη χρονική στιγμή t_i, (%),

▼B

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = μάζα της εκροφημένης από το έδαφος υπό δοκιμή ουσίας τη χρονική στιγμή t_i μg)

$m_s^{des}(eq)$ = μάζα της προσροφημένης στο έδαφος υπό δοκιμή ουσίας κατά την ισορροπία προσρόφησης (μg).

Λεπτομερείς πληροφορίες για τον τρόπο υπολογισμού του ποσοστού εκρόφησης D_{t_i} στην παράλληλη και εν σειρά μέθοδο δίδονται στο προσάρτημα 5.

Φαινόμενος συντελεστής εκρόφησης (K_{des}), υπό τις συνθήκες δοκιμής, είναι η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης της ουσίας που παραμένει στην εδαφική φάση και της κ.ό. συγκέντρωσης της εκροφημένης ουσίας στο υδατικό διάλυμα, όταν επιτευχθεί ισορροπία εκρόφησης:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \quad (12)$$

όπου:

K_{des} = συντελεστής εκρόφησης ($cm^3\ \gamma^{-1}$).

$m_{aq}^{des}(eq)$ = συνολική μάζα της εκροφημένης από το έδαφος ουσίας στην ισορροπία εκρόφησης, (μg),

V_T = συνολικός όγκος της υδατικής φάσης σε επαφή με το έδαφος κατά τη διάρκεια της δοκιμής κινητικής εκρόφησης (cm^3).

Οδηγίες για τον υπολογισμό της $m_{aq}^{des}(eq)$ δίδονται στο προσάρτημα 5 υπό τον τιτλο «Εκρόφηση».

Παρατήρηση:

Εάν η προηγηθείσα δοκιμή προσρόφησης εκτελέστηκε με την παράλληλη μέθοδο, ο όγκος V_T στην εξίσωση (12) θεωρείται ότι είναι ίσος με V_0.

2.2.1. **Ισόθερμοι εκρόφησης**

Η εξίσωση των ισοθέρμων εκρόφησης Freundlich δίδει την υπάρχουσα σχέση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας που παραμένει προσροφημένη στο έδαφος με τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο διάλυμα σε κατάσταση ισορροπίας εκρόφησης (εξίσωση 16).

Για κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, η συγκέντρωση της ουσίας που παραμένει προσροφημένη στο έδαφος σε κατάσταση ισορροπίας εκρόφησης υπολογίζεται ως εξής:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ ορίζεται ως:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{aq}^A(\mu g) \quad (14)$$

όπου:

$C_s^{des}(eq)$ = συγκέντρωση της υπό δοκιμής ουσίας που παραμένει προσροφημένη στο έδαφος σε κατάσταση ισορροπίας εκρόφησης (μg g^{-1});

$m_m^{des}(eq)$ = μάζα ουσίας που προσδιορίζεται αναλυτικώς στην υδατική φάση σε κατάσταση ισορροπίας εκρόφησης

▼B

m_{aq}^{A} = μάζα της υπό δοκιμή ουσίας που περισσεύει από την ισορροπία προσρόφησης λόγω ατελούς κατ' όγκο αντικατάστασης (μg),

$m_{aq}^{des}(eq)$ = μάζα της ουσίας στο διάλυμα σε κατάσταση ισορροπίας προσρόφησης (μg);

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (15)$$

V_r^F = όγκος του διαλύματος που παραλαμβάνεται από το σωλήνα για τη μέτρηση της υπό δοκιμή ουσίας σε κατάσταση ισορροπίας εκρόφησης (cm^3);

V_R = όγκος του υπερκείμενου υγρού που απομακρύνεται από το σωλήνα μετά την επίτευξη ισορροπίας προσρόφησης και αντικαθίσταται από το ίδιο όγκο διαλύματος 0,01 M $CaCl_2$ (cm^3).

Η εξίσωση εκρόφησης Freundlich δίνεται από τον τύπο (16):

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (16)$$

με γραμμική μορφή:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{des}(eq) \quad (17)$$

όπου:

K_F^{des} = συντελεστής εκρόφησης Freundlich,

n = σταθερά αναγωγής,

$C_{aq}^{des}(eq)$ = κ.ό. συγκέντρωση της ουσίας στην υδατική φάση σε κατάσταση ισορροπίας εκρόφησης μg cm^{-3}).

Οι εξισώσεις 16 και 17 μπορούν να παρασταθούν γραφικώς και οι τιμές των και K_F^{des} 1/n υπολογίζονται με ανάλυση αναγωγής χρησιμοποιώντας την εξίσωση 17.

Παρατήρηση:

Εάν ο εκθέτης προσρόφησης η εκρόφησης Freundlich 1/n είναι ίσος με 1. οι σταθερές συνδέσεως προσρόφησης ή εκρόφησης Freundlich (και) θα είναι ίσες με τις σταθερές ισορροπίας προσρόφησης ή εκρόφησης (K_F^{ads} και K_F^{des}) αντιστοίχως, και οι καμπύλες των C_S εναντι C_{aq} θα είναι γραμμικές. Εάν οι εκθέτες δεν είναι ίσοι με 1. οι καμπύλες των C_b έναντι C_{aq} δεν θα είναι γραμμικές και ο; σταθερές προσρόφησης και εκρόφησης θα διαφέρουν κατά μήκος των ισοθέρμων.

2.2.2. **Έκθεση δοκιμής**

Στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται τα ακόλουθα στοιχεία:

— η πλήρης ταυτότητα των χρησιμοποιηθέντων εδαφικών δειγμάτων συμπεριλαμβανομένων:

— του γεωγραφικού εντοπισμού της τοποθεσίας (γεωγραφικό πλάτος και μήκος),

— της ημερομηνίας δειγματοληψίας,

▼B

— του προτύπου χρήσεως (π.χ. γεωργικό έδαφος, δάσος, κ.λπ.),

— του βάθους δειγματοληψίας,

— της περιεκτικότητας σε άμμο/προσχωσιγενή/άργιλο,

— των τιμών pH (σε 0,01 M $CaCl_2$),

— της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα,

— της περιεκτικότητας σε οργανική ύλη,

— της περιεκτικότητας σε άζωτο,

— της σχέσης C/N,

— της κατιοανταλλακτικής ικανότητας (mmol/kg),

— κάθε στοιχείου σχετικού με τη συλλογή και αποθήκευση εδαφικών δειγμάτων,

— όπου χρειάζεται, κάθε σχετικού στοιχείου για την ερμηνεία της προσρόφησης-εκρόφησης της υπό δοκιμή ουσίας,

— αναφοράς των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό κάθε παραμέτρου,

— πληροφορίες για την υπό δοκιμή ουσία, όπου απαιτείται,

— η θερμοκρασία των πειραμάτων,

— οι συνθήκες φυγοκέντρησης,

— η αναλυτική διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση της υπό δοκιμή ουσίας,

— αιτιολόγηση της τυχόν χρήσεως διαλυτοποιητικού μέσου για την παρασκευή του αρχικού διαλύματος της υπό δοκιμή ουσίας,

— επεξηγήσεις για τις τυχόν διορθώσεις που έγιναν στους υπολογισμούς,

— δεδομένα σύμφωνα με το έντυπο (προσάρτημα 6) και γραφικές παραστάσεις,

— κάθε πληροφορία και παρατήρηση που είναι χρήσιμη για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων των δοκιμών.

3. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02 045. Part II.

(2) Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L. (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02 045, Part I.

(3) Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication No 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.

(4) OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate. Italy, 1 18-20 January 1995 (June 1995).

(5) US Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.

▼B

(6) US Environment Protection Agency: Prevention. Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines. OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.

(7) ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K_{oc}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.

(8) Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.

(9) Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(10) Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.

(11) BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.

(12) Calvet R., (1989), «Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils», in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).

(13) Calvet R., (1980), «Adsorption-Desorption Phenomena» in Interactions between herbicides and the soil. (R. J. Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83-122.

(14) Hasset J. J., and Banwart W.L., (1989), The sorption of nonpolar organics by soils and sediments' in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, pp. 31-44.

(15) van Genuchten M. Th., Davidson J. M., and Wierenga P. J., (1974), «An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media». Soil Sci. Soc. Am. Proc, Vol. 38(1), pp. 29-3 5.

(16) McCall P. J., Laskowski D. A., Swann R. L., and Dishburger H. J., (1981), «Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis», in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.

(17) Lambert S. M., Porter P. E., and Schieferrstein R. H., (1965), «Movement and sorption of chemicals applied to the soil». Weeds, 13, pp. 185-190.

(18) Rhodes R. C, Belasco 1.]., and Pease H. L., (1970) «Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils». J.Agric.Food Chem., 18, pp. 524-528.

(19) Russell M. PL, (1995), «Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil» in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T. R. Roberts and P. C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.

(20) Esser H. O., Hemingway R. J., Klein W., Sharp D. B., Vonk J. W. and Holland P. T., (1988), «Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides», IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, pp. 901-932.

▼B

(21) Guth J. A., Burkhard N., and D. O. Eberle, (1976), «Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils». Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp. 137-157, BCPC, Surrey, UK.

(22) Furminge C. G. L., and Osgerby J. M., (1967). «Persistence of herbicides in soil». J. Sci. Fd Agric, 18, pp. 269-273.

(23) Burkhard N., and Guth J. A., (1981), «Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1.3,5-triazinc herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption». Pestic. Sci. 12, pp. 45-52.

(24) Guth). A., Gerber H. R., and Schlaepfer T., (1977), «Effect of adsorption, mowement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides». Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, pp. 961-971.

(25) Osgerby J. M., (1973). «Process affecting herbicide action in soil». Pestic. Sci., 4, pp. 247-258.

(26) Guth J. A., (1972), Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden'. Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, pp. 143-154.

(27) Hamaker J. W., (1975), «The interpretation of soil leaching experiments», in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), pp. 135-172. Plenum Press, NY.

(28) Helling C. S., (1971), «Pesticide mobility in soils». Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 35, pp. 732-210.

(29) Hamaker J. W., (1972). «Diffusion and volatilization» in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J. W. Hamaker eds). Vol. I. pp. 49-143.

(30) Burkhard N. and Guth J. A., (1981), «Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system». Pestic. Sci. 12, pp. 37-44.

(31) Cohen S. Z., Creeger S. M.. Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), «Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses», in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(32) Gustafson D. I., (1989), «Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide teachability». J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), pp. 339-357,

(33) Leistra M., and Dekkers W. A., (1976). «Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils». J. of Soil Sci., 28, pp. 340-350.

(34) Bromilov R. H., and Leistra M., (1980), «Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils». Pest. Sci., 11, pp. 389-395.

(35) Green R. E., and Karickoff S. W., (1990), «Sorption estimates for modeling», in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, pp. 80-101,

(36) Lambert S. M., (1967), «Functional relationship between sorption in soil and chemical structure». J. Agri. Food Chem., 15, pp. 572-576.

▼B

(37) Hance R. J., (1969), «An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils». J. Agri. Food Chem., 17, pp. 667-668.

(38) Briggs G. G. (1969), «Molecular structure of herbicides and their sorption by soils». Nature, 223, 1288.

(39) Briggs G. G. (1981). «Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor». J. Agric. Food Chem., 29, pp. 1050-1059.

(40) Sabljic A., (I984), «Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology». J. Agric. Food Chem., 32, pp. 243-246.

(41) Bailey G. W., and White J. L., (1970), «Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil». Residue Rev., 32, pp. 29-92.

(42) Bailey G. W., J. L. White and Y. Rothberg., (1968), Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate'. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32: pp. 222-234.

(43) Karickhoff S. W., (1981), «Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils». Chemosphere 10, pp. 833-846.

(44) Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), «Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners». Environ. Toxicol. Safety 21, pp. 1-17.

(45) Hamaker J. W., and Thompson J. M., (1972), «Adsorption in organic chemicals» in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring CAI. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, pp. 49-143.

(46) Deli]., and Warren G. F., 1971, «Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils». Weed Sci. 19: pp. 67-69.

(47) Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson]. M. and Santelmann, (1975), «Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils». Weed Science, Vol. 23, pp. 454-457.

(48) Haues M. H. B., Stacey M., and Thompson J. M., (1968), «Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations» in Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies, p.75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.

(49) Pionke H. B., and Deangelis R. J., (1980), «Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase», CREAMS, in A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.

(50) ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).

(51) Scheffer F.. and Schachtschabel, Lehrbuch der Bodenkunde, F. Enke Verlag. Stuttgart (1982). 11th edition.

(52) Black, Evans D. D., White J. L., Ensminger L. E., and Clark F. E., eds. «Methods of Soil Analysis», Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.

▼B

(53) ISO/DIS 10381-1 Soil Quality — Sampling — Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.

(54) ISO/DIS 10381-2 Soil Quality — Sampling — Part 2: Guidance on sampling techniques.

(55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality — Sampling — Part 3: Guidance on safety of sampling.

(56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality — Sampling — Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils,

(57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality — Sampling — Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.

(58) ISO 10381-6, 1993: Soil Quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(59) Green R. E., and Yamane V. K., (1970), «Precision in pesticide adsorption measurements». Soil Sci. Am. Proc, 34, pp. 353-354.

(60) Grover R., and Hance R. J. (1970), «Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine». Soil Sci., pp. 109-138.

(61) Boesten, J. J. T. I, «Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system». Pest. Sci. 1990, 30, pp. 31-41.

(62) Boesten, J. J. T. I. «Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106». Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26-29 April 1994.

(63) Bastide]., Cantier J. M., et Coste C., (1980), «Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique». Weed Res. 21, pp. 227-231.

(64) Brown D. S., and Flagg E. W., (1981), «Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments». J. Environ.QuaL, 10(3), pp. 382-386.

(65) Chiou C. T., Porter P. E., and Schmedding D. W., (1983), «Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water». Environ. Sci. Technol., 17(4), pp. 227-231.

(66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), «Sorption of organic substances by soils and sediments». J. Environm. Sci. Health. B19 (3), pp. 297-312.

(67) Vowles P. D., and Mantoura R. F. C, (1987), «Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons». Chemosphere, 16(1), pp. 109-116.

(68) Lyman W. J., Reehl W. F. and Rosenblatt D. H. (1990). Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds. American Chemical Society, Washington DC.

(69) Keniga E. E., and Goring, C. A. I. (1980). «Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota» in Aquatic Toxicology (eds J.G. Eaton, et al.), pp.78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.

▼B

(70) Chiou C. T., Peters L. J., and Freed V. H., (1979), Ά physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds'. Science, Vol. 206, pp. 831-832.

(71) Hassett J. J., Banwart W. I., Wood S. G., and Means J. C, (1981), «Sorption of/-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption». Soil Sci. Soc. Am.]. 45, pp. 38-42.

(72) Karickhoff S. W., (1981), «Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils». Chemosphere, Vol. 10(8), pp. 833-846.

(73) Moreale A., van Bladel R.. (1981), «Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilite-reactivite». Revue de l'Agric, 34 (4), pp. 319-322.

(74) Müller M., Kordel W. (1996), «Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil». Chemosphere, 32(12). pp. 2493-2504.

(75) Kordel \V., Kotthoff G.. Müller M. (1995). «HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — results of a ring test». Chemosphere 30 (7), pp. 1373-1384.

(76) Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), «HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — comparison of different stationary phases». Chemosphere 27 (12), pp. 2341-2352.

(77) Hance, R. J., (1967), «The Speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Invoking Herbicides». Weed Research, Vol. 7, pp. 29-36.

(78) Koskinen W. C., and Harper S. S., (1990), «The retention processes: mechanisms» in Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am. Book Series, No. 2, Madison, Wisconsin.

(79) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R. F., and Enfield C. G. (1984), «Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses», in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp.297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(80) Giles C. H., (1970), «Interpretation and use of sorption isotherms» in Sorption and Transport Processes in Soils. S.C.I. Monograph No. 37, pp. 14-32.

(81) Giles, C. H.; McEwan J. H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960), «Studies in adsorption: XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils». J. Chem. Soc, pp. 3973-93.

(82) Calvet R., Tercé M., and Arvien J. C, (1980), «Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caracteristiques générales de l'adsorption». Ann. Agron. 31: pp. 239-251.

(83) Bedbur E., (1996), «Anomalies in the Freundlich equation», Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, UK.

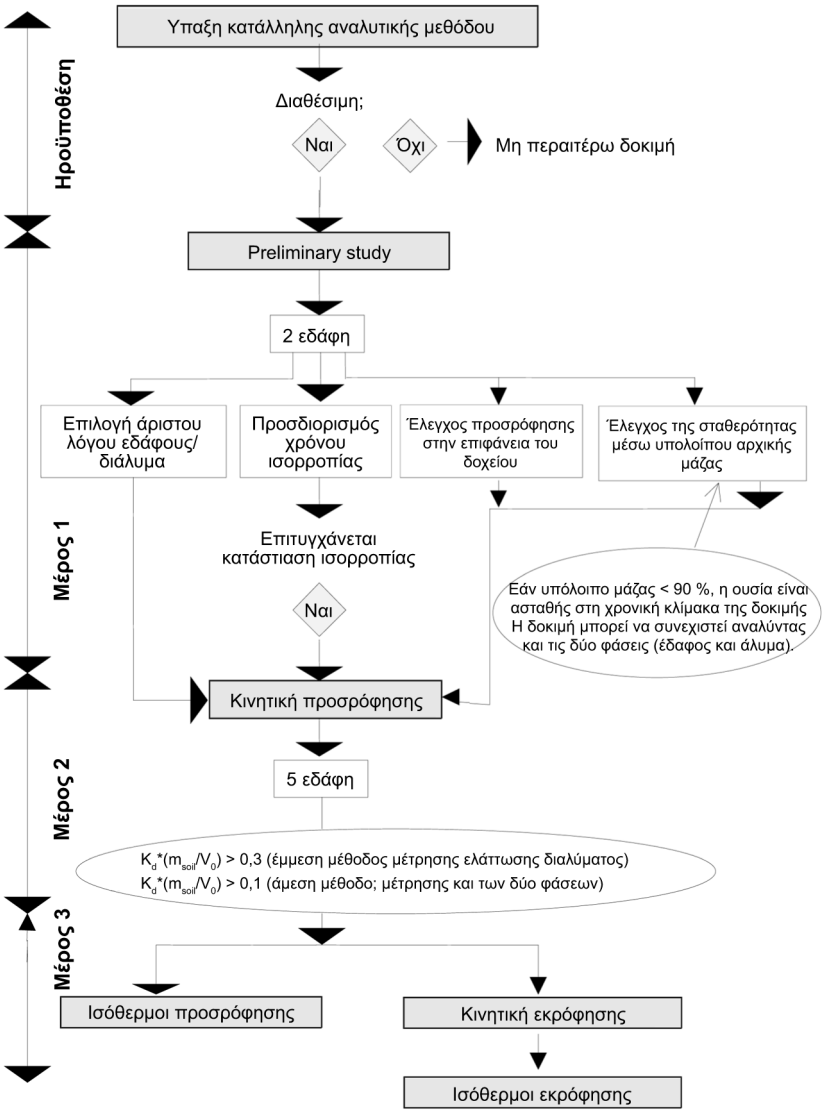
(84) Guth, J. A., (1985), Adsorption/desorption', in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1-3, Canterbury, UK.

(85) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

▼**B**

Προσαρτημα 1

Σχήμα δοκιμής



▼B

Προσαρτημα 2

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΟΡΘΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΣΤΗΝ ΟΡΘΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ

Από τον πίνακα που ακολουθεί (84) καθίσταται προφανές ότι όταν η διαφορά μεταξύ της αρχικής μάζας (m_0 = 110 μg) και της μάζας ισορροπίας [m_{aq}^{ads}(eq) = 100 μg] της υπό δοκιμή ουσίας στο διάλυμα είναι πολύ μικρή, σφάλμα 5 % στη μέτρηση της συγκέντρωσης ισορροπίας απολήγει σε σφάλμα 50 % στον υπολογισμό της συγκέντρωσης της προσροφημένης στο έδαφος ουσίας [m_s^{ads}(eq)] και 52,4 % στον υπολογισμό του K_d.

Ποσότητα εδάφους m_{soil} = 10 g

Όγκος διαλύματος V_0 = 100 cm^3

	m_{aq}^{ads}(eq) (μg)	C_{aq}^{ads}(eq) (μg cm^{-3})	R	m_s^{ads}(eq)* (μg)	C_s^{ads}(eq)* (μg g^{1})	R‡	K_d*	R‡
	ΓΙΑ A = 9 %							
m_0 = 110 μg ή C_0=1,100 μg/cm^3	100	1 000	αληθής τιμή	10	1,00	αληθής τιμή	ι	
	101	1 010	1 %	9	0,90	10 %	0,891	10,9 %
	103	1 050	5 %	3	0,50	30 %	0,476	52,4 %
	109	1 090	9 %	1	0,10	90 %	0,092	90,8 %
	ΓΙΑ A = 55 %							
m_0= 110 μg ή C_0=1,100 μg/cm^3	50,0	0,500	αληθής τιμή	60,0	60,0	αληθής τιμή	12,00	
	50,5	0,505	1 %	59,5	5,95	0,8 %	11,78	1,8 %
	52,5	0,525	5 %	57,5	5,75	4,0 %	10,95	8,8 %
	55,0	0,550	10 %	55,0	55,0	8,3 %	10,00	16,7 %
	ΓΙΑ A = 99 %							
m_0 = 110 μg ή C_0=1,100 μg/cm^3	1,100	0,011	αληθής τιμή	108,9	10,89	αληθής τιμή	990	
	1,111	0,01111	1 %	108,889	10,8889	0,01 %	980	1,0 %
	1,155	0,01155	5 %	108,845	10,8845	0,05 %	942	4,8 %
	1,21	0,0121	10 %	108,790	10,8790	0,10 %	899	9,2 %

$^*m_s^{ads}(eq) = m_0 - m_{aq}^{ads}(eq), C_s^{ads}(eq) = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right]V_0}{m_{soil}}$. $Kd = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \frac{V_0}{m_{soil}}$

m_s^{ads}(eq) = μάζα της υπό δοκιμή ουσίας στην εδαφική φάση εν ισορροπία, μg,

m_{aq}^{ads}(eq) = μάζα της υπό δοκιμή ουσίας στην υδατική φάση εν ισορροπία, μg,

C_s^{ads}(eq) = συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στην εδαφική φάση εν ισορροπία, μg g^{-1};

C_{aq}^{ads}(eq) = κ.ο. συγκέτρωση της υπό δοκιμή ονσίας στην υδατική φάση εν ισορροπία, μg cm^{-3};

R = αναλυτικό σφάλμα στον προσδιορισμό της m_{aq}^{ads}(eq);

R‡ = υπολογισθέν σφάλμα λόγω του αναλυτικού σφάλματος R.

▼B

Προσαρτημα 3

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΟΥ K_d

1. Οι τεχνικές εκτίμησης επιτρέπουν την πρόβλεψη του K_d με βάση συσχετισμούς με, π.χ., τιμές P_{ow} (12) (39) (63-68), δεδομένα υδατοδιαλυτότητας (12) (19) (21) (39) (68-73), ή δεδομένα πολικότητας προερχόμενα από εφαρμογή HPLC ανάστροφης φάσης (74-76). Όπως φαίνεται στους πίνακες 1 και 2, από τις εξισώσεις αυτές υπόλογίζονται οι K_{oc} ή K_{om} και στη συνέχεια, εμμέσως, ο K_d από τις εξισώσεις:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc}(cm^3 g^{-1}) \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1{,}724} \cdot \frac{100}{\%oc}(cm^3 g^{-1})$$

2. Η ιδέα αυτών των συσχετισμών βασίζεται σε δύο παραδοχές: 1. η προσρόφηση μιας ουσίας επηρεάζεται κυρίως από την οργανική ύλη του εδάφους και 2. οι εμφανιζόμενες αλληλεπιδράσεις είναι κυρίως μη πολικές. Ως εκ τούτου, οι συσχετισμοί αυτοί: 1. δεν εφαρμόζονται, ή εφαρμόζονται μόνο σε κάποιο βαθμό, σε πολικές ουσίες και 2. δεν εφαρμόζονται σε περιπτώσεις όπου η περιεκτικότητα του εδάφους σε οργανική ύλη είναι πολύ μικρή (12). Επιπλέον, αν και μεταξύ P_{0w} και προσρόφησης (19) βρέθηκαν ικανοποιητικοί συσχετισμοί, δεν μπορούμε να πούμε το ίδιο για τη σχέση μεταξύ υδατοδιαλυτότητας και βαθμού προσρόφησης (19) (21). Μέχρι τώρα, οι διάφορες μελέτες έχουν αποδειχθεί πολύ αντιφατικές.

3. Ορισμένα παραδείγματα συσχετισμών μεταξύ του συντελεστή προσρόφησης και του συντελεστή κατανομής οκτα-νόλης-νερού, καθώς επίσης και της υδατοδιαλυτότητας δίδονται στους πίνακες 1 και 2, αντιστοίχως.

Πίνακας 1.

Παραδείγματα συσχετισμών μεταξύ συντελεστή κατανομής προσρόφησης και συντελεστή κατανομής οκτα-νόλης-νερού. Για περαιτέρω παραδείγματα, βλέπε (12) (68)

Ουσίες	Συσχετισμοί	Συγγραφείς
Υποκατεστημένες ουρίες	$\log K_{om} = 0{,}69 + 0{,}52 \log P_{ow}$.	Briggs (1981) (39)
Αρωματικές χλωριωμένες ενώσεις	$\log K_{oc} = - 0{,}779 + 0{,}904 \log P_{ow}$	Chiou *et al*. (1983) (65)
Διάφορα γεωργικά φάρμακα	$\log K_{om} = 4{,}4 + 0{,}72 \log P_{ow}$	Gerstl και Mingelgrin (1984) (66)
Αρωματικοί υδρογονάνθρακες	$\log K_{oc} = - 2{,}53 + 1{,}15 \log P_{ow}$	Vowles και Mantoura (1987) (67)

Πίνακας 2.

Παραδείγματα συσχετισμών μεταξύ του συντελεστή κατανομής προσρόφησης και υδατοδιαλυτότητας. Για περαιτέρω παραδείματα, βλέπε (68) (69)

Ενώσεις	Συσχετισμοί	Συγγραφείς
Διάφορα γεωργικά φάρμακα	$\log K_{om} = 3{,}8 - 0{,}561 \log S_w$	Gerstl και Mingelgrin (1984) (66)
Αλειφατικές, αρωματικές χλωριωμένες ενώσεις	$\log K_{om} = (4{,}040 +/- 0{,}038) - (0{,}557 +/- 0{,}012) \log S_w$	Chiou *et al*. (1979) (70)
α-ναφθόλη	$\log K_{oc} = 4{,}273 - 0{,}686 \log S_w$	Hasset et al. (1981) (71)
Κυκλικές, αλειφατικές αρωματικές ενώσεις	$\log K_{oc} = - 1{,}405 - 0{,}921 \log S_w - 0{,}00953$ (mp-25)	Karickhoff (1981) (72)
Διάφορες ενώσεις	$\log K_{om} = 2{,}75 - 0{,}45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

▼B

Προσαρτημα 4

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗΣ

1. Ο χρόνος φυγοκέντρησης δίνεται από τον ακόλουθο τύπο, υποτιθεμένου ότι τα σωματίδια είναι σφαιρικά:

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 rp^2(\rho_s - \rho_{aq})}\right]\ln(R_b/R_t) \quad (1)$$

Για απλουστευτικούς λόγους, όλες οι παράμετροι εκφράζονται σε μονάδες SI (g, cm).

όπου:

ω = ταχύτητα περιστροφής (= π rpm/60), rad s^{-1},

rpm = στροφές ανά λεπτό,

η = ιξώδες διαλύματος, g s^{-1} cm^{-1},

r_p = ακτίνα σωματιδίων, cm,

ρ_s = πυκνότητα εδάφους, g cm^{-3},

ρ_{aq} = πυκνότητα διαλύματος, g cm,

R_t = απόσταση από το κέντρο του στροφείου της φυγοκέντρου μέχρι την άνωεπιφάνεια του διαλύματος στο σωλήνα φυγοκέντρησης, cm,

R_b = απόσταση από το κέντρο του στροφείου της φυγοκέντρου μέχρι τον πυθμένα του σωλήνα φυγοκέντρησης, cm,

R_b-R_t = μήκος του μείγματος εδάφους|διαλύματος στο σωλήνα φυγοκέντρησης, cm.

Στην πράξη, για να διασφαλιστεί πλήρης διαχωρισμός, χρησιμοποιούνται διπλάσιοι από τους υπολογιζόμενους χρόνους.

2. Η εξίσωση (1) μπορεί να απλοποιηθεί περαιτέρω αν θεωρήσουμε το ιξώδες (η) και την πυκνότητα (ρ_{aq}) του διαλύματος ως ίσα με το ιξώδες και την πυκνότητα του νερού στους 25 °C. Έτσι, $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g s^{-1} φμ^{-1} και ρ_{aq} = 1,0 g.cm^{-3}.

Τότε, ο χρόνος φυγοκέντρησης δίνεται από την εξίσωση ():

$$t = \frac{3.7}{(rpm)^2.r_p^2(\rho_s - 1)}\ln\frac{Rb}{Rt} \quad (2)$$

3. Από την εξίσωση 2 καθίσταται προφανές ότι για τον ορισμό των συνθηκών φυνοκέντρησης, δηλαδή του χρόνου (t) και της ταχύτητας (rpm), προκειμένου να επιτευχθεί διαχωρισμός σωματιδίων με συγκεκριμένο μέγεθος (στην περίπτωση μας 0,1 urn ακτίνα), δύο παράμετροι παίζουν σημαντικό ρόλο: 1. η πυκνότητα του εδάφους και . το μήκος του μείγματος στο σωλήνα φυγοκέντρησης (R_b-R_t). δηλαδή η απόσταση που καλύπτει ένα σωματίδιο εδάφους από την άνω επιφάνεια του διαλύματος μέχρι τον πυθμένα του σωλήνα. Προφανώς, νια συγκεκριμένο όγκο, το μήκος του μείγματος στο σωλήνα εξαρτάται από το τετράγωνο της ακτίνας του σωλήνα.

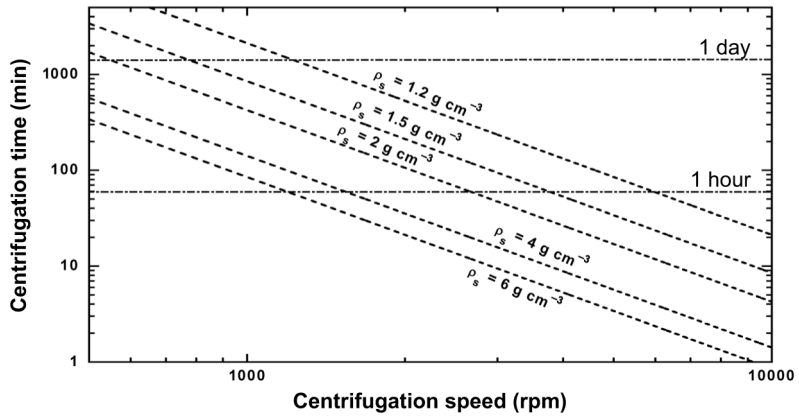
4. Στην εικόνα 1 παρίστανται οι μεταβολές του χρόνου φυγοκέντρησης (Ο συναρτήσει της ταχύτητας φυγοκέ\τρησης (rpm) νια διάφορες πυκνότητες εδάφους (p_s) (εικόνα Ια) και διάφορα μήκη του μείγματος στους σωλήνες φυγοκέντρησης (εικόνα 1 β). Από την εικόνα 1 α είναι εμφανης η επίδραση της εδαφικής πυκνότητας. Για παράδειγμα, για μία κλασική φυνοκέντρηση 3000 rpm ο χρόνος ουγοκεντρησης είναι περίπου 240 min για εδαφική πυκνότητα 1,2 g cm^3, ενώ για 2,0 g cm^3 είναι μόνον 50 min. μοιως, από την εικόνα 1β, για μία κλασική συγοκέντρηση 3000 rpm ο χρόνος συνοκέντρησης είναι περίπου 50 min νια μήκος μείγματος 10 cm και μόνον 7 min για μήκος 1 cm. Ε\τούτοις, παίζει σημαντικό ρολό το να βρεθεί η αρίστη σχέση μεταξύ φυγοκέντρησης που απαιτεί το λιγότερο δυνατό μήκος και εύκολου χειρισμού για τον ερευνητή στο διαχωρισμό των φάσεων μετά τη φυγοκέντρηση.

▼B

5. Περαιτέρω, όταν ορίζονται οι πειραματικές συνθήκες για το διαχωρισμό των φάσεων εδάφους/διαλύματος, είναι σημαντικό να εξεταστεί η πιθανή ύπαρξη μιας τρίτης «ψευδοφάσεως», των κολλοειδών. Τα σωματίδια αυτά, με μέγεθος μικρότερο από 0,2 μm, μπορεί να έχουν σημαντική επίπτωση στον όλο μηχανισμό προσρόφησης μιας ουσίας σε ένα εδαφικό εναιώρημα. Όταν εκτελείται φυγοκέντρηση όπως περιγράφεται ανωτέρω, τα κολλοειδή παραμένουν στην υδατική φάση και υποβάλλονται σε ανάλυση μαζί με την υδατική φάση. Έτσι, χάνονται οι πληροφορίες για την επίπτωσή τους.

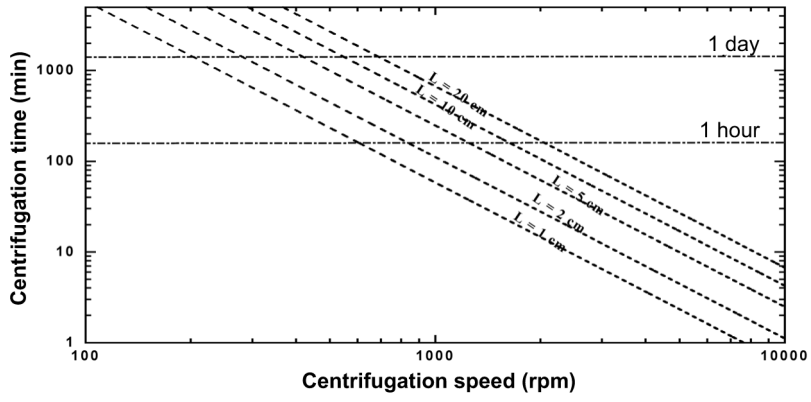
   Εάν το εργαστήριο διαθέτει εξοπλισμό υπερφυγοκένιρησης ή υπερδιήθησης, η προσρόφηση/εκρόφηση μιας ουσίας στο έδαφος μπορεί να μελετηθεί περισσότερο σε βάθος, συμπεριλαμβανομένων και στοιχείων για την προσρόφηση της ουσίας στα κολλοειδή. Στην περίπτωση αυτή, θα πρέπει να εφαρμόζεται υπερφυγοκέ\τρηση με 60 000 rpm/min ή υπερδιήθηση με πορώδες φίλτρου 100 000 Daltons για το διαχωρισμό των τριών φάσεων, έδαφος, κολλοειδή και διάλυμα. Το πρωτόκολλο δοκιμής θα πρέπει επίσης να τροποποιείται αναλόγως, ώστε και οι τρεις φάσεις να υποβληθούν σε ανάλυση για την ουσία.

Εικόνα 1α.



Μεταβολές χρόνου φυγοκέντρησης (υ) συναρτήσει της ταχύτητας φυγοκέντρησης (rpm) για διάφορες πυκνότητες εδάφους (ρ_s). R_t = 10 cm, R_b -R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3}g $s^{-1}$$cm^{-1}$ και ρ_{aq} = 1,0 g.cm^{-3} στους 25 °C.

Εικόνα 1β.



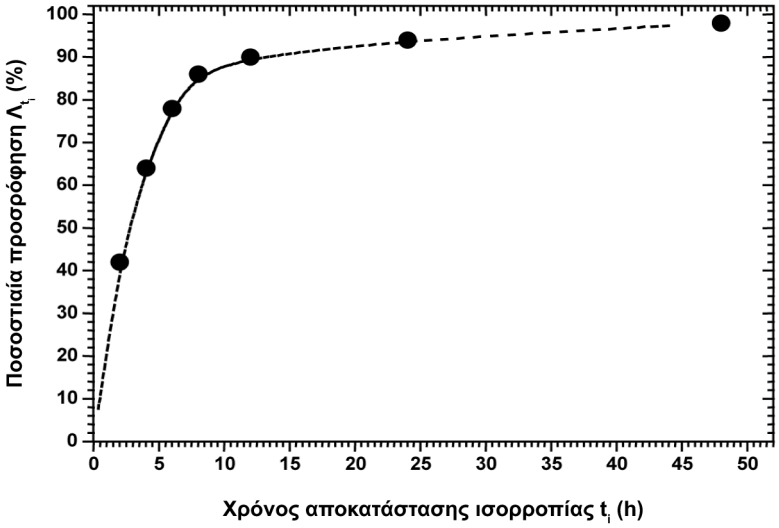
Μεταβολές του χρόνου φυγοκέντρησης (t) συναρτήσει της ταχύτητας φυγοκέ\τρησης (rpm) για διάφορα μήκη του μείγματος στο σωλήνα φυγοκεντρησης (Rb -Rt) = L; R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3}g $s^{-1}$$cm^{-1}$, ρ_{aq} = 1,0 g.cm^{-3} at 25 °C και ρ_s = 2,0 g cm^{-3}.

▼B

Προσαρτημα 5

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ A (%) ΚΑΙ ΕΚΡΟΦΗΣΗΣ D (%)

Το χρονικό σχήμα της διαδικασίας είναι:



Για όλους τους υπολογισμούς, υποτίθεται ότι η υπό δοκιμή ουσία είναι σταθερή και δεν προσροφάται σε μεγάλο βαθμό στα τοιχώματα του δοχείου.

ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ A (A%)

α) *Παράλληλη μέθοδος*

Η ποσοστιαία προσρόφηση υπολογίζεται για κά9ε δοκιμαστικό σωλήνα (i) σε κάθε χρονική στιγμή (t_i), σύμφωνα με την εξίσωση:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (1)$$

Οι όροι της εξίσωσης αυτής μπορούν να υπολογιστούν ως εξής:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (2)$$

$$m_s^{ads}(t_i) = m_0 - C_{aq}^{ads}(t_i) \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (3)$$

όπου:

A_{ti} = ποσοστιαία προσρόφηση (%) τη χρονική στιγμή t_i;

$m_s^{ads}(t_i)$ = μάζα της υπό δοκιμή ουσίας στο έδαφος τη χρονική στιγμή t_i που εκτελείται η ανάλυση (μg),

m_0 = μάζα της υπό δοκιμή ουσίας στο δοκιμαστικό σωλήνα, στην αρχή της δοκιμής (μg),

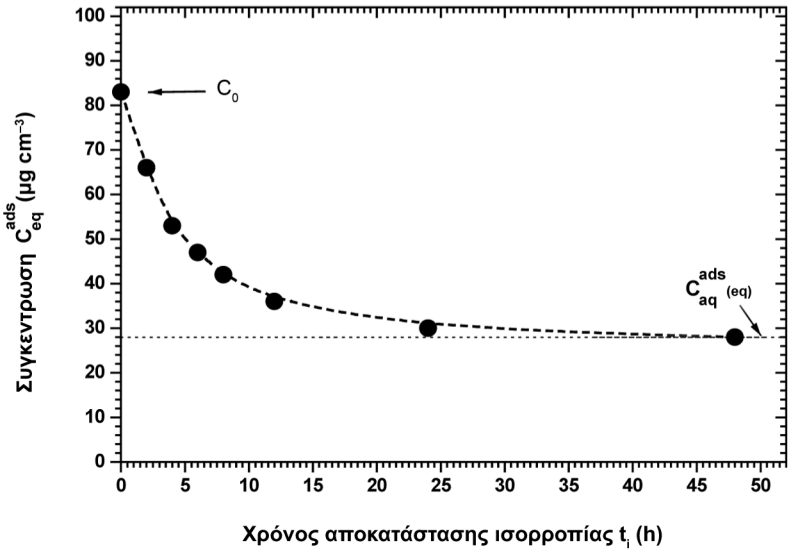
C_0 = αρχική κ.ό. συγκέντρωση του υπό δοκιμή διαλύματος που είναι σε επαφή με το έδαφος (μg cm^{-3});

▼B

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ = κ.ό. συγκέντρωση της ουσίας στην υδατική φάση τη χρονική στιγμή t_i κατά την οποία εκτελείται η ανάλυση (μg cm^{-3}). Η συγκέντρωση αυτή προσδιορίζεται αναλυτικώς λαμβάνοντας υπόψη τις τιμές που βρέθηκαν στα τυφλά,

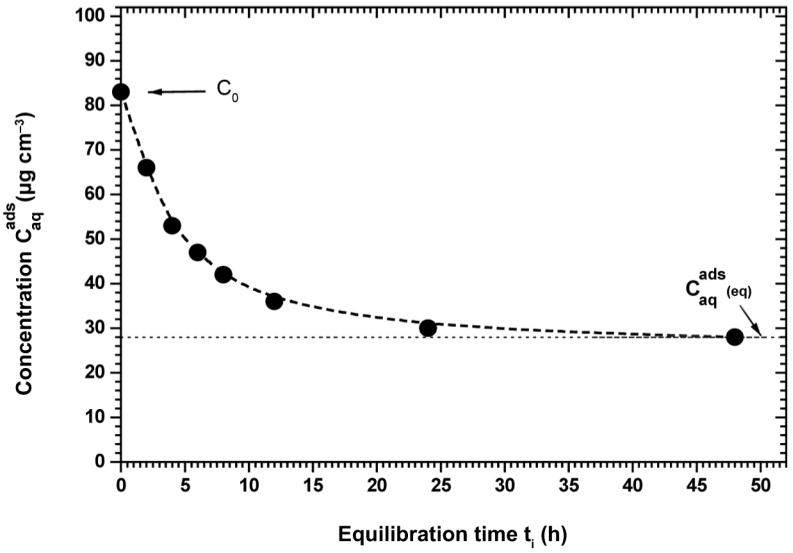
V_0 = αρχικός όγκος του υπό δοκιμή διαλύματος σε επαφή με το έδαφος (cm^3).

Οι τιμές του ποσοστού προσρόφησης A_{t_i} ή $C_{aq}^{ads}(t_i)$ παριστάνονται γραφικώς συναρτήσει του χρόνου και προσδιορίζεται ο χρόνος μετά τον οποίο επιτυγχάνεται ισορροπία ρόφησης. Παραδείγματα τέτοιων καμπυλών εμφαίνονται στις εικόνες 1 και 2 αχτιστοίχως.



Εικόνα 1.

Καμπύλη ισορροπίας προσρόφησης



Εικόνα 2.

Κ.ό. συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στην υδατική φάση (C_{aq}) συναρτήσει του χρόνου

▼B

β) *Εν σειρά μέθοδος*

Στις εξισώσεις που ακολουθούν λαμβάνεται υπόψη ότι η διαδικασία προσρόφησης εκτελείται με μετρήσεις της υπό δοκιμή ουσίας σε μικρές ποσότητες της υδατικής φάσης σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα

— Κατά τη διάρκεια κάθε χρονικού διαστήματος, η ποσότητα της προσροφημένης στο έδαφος ουσίας υπολογίζεται ως εξής:

— για το πρώτο χρονικό διάστημα $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) \quad (4)$$

— νια το δεύτερο χρονικό διάστημα $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (5)$$

— για το τρίτο χρονικό διάστημα $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (6)$$

— για το νιοστό χρονικό διάστημα $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{(V_0 - (n-1) \cdot v_a^A)}{v_a^A}\right) \quad (7)$$

— Το ποσοστιαία προσρόφηση σε κάθε χρονικό διάστημα, $A_{\Delta t_i}$, υπολογίζεται χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (8)\ (1)$$

ενώ το ποσοστιαία προσρόφηση A_{t_i} τη χρονική στιγμή t_i δίνεται από την εξίσωση:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (9)(1)$$

Οι τιμές της προσρόφησης A_{t_i} ή $A_{\Delta t_i}$ (ανάλογα με τις ανάγκες της μελέτης) παριστάνονται γραφικώς συναρτήσει του χρόνου και προσδιορίζεται ο χρόνος μετά τον οποίο επιτυγχάνεται ισορροπία ρόφησης.

— Κατά το χρόνο ισορροπίας t_{eq}:

— η μάζα της προσροφημένης στο έδαφος υπό δοκιμή ουσίας είναι:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)(1)$$

(1) Εξισωσεις εφαρμαξόμενες τόσο στην άμεση όσο και στην έμμεση μέθοδο. Όλες οι υπόλοιπες εξισώσεις εωαρμόζονται μόνον στην έμμεση μέθοδο.

▼B

— η μάζα της υπό δοκιμή ουσίας στο διάλυμα είναι:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)\ (^1)$$

— και το ποσοστιαία προσρόφηση στην ισορροπία είναι:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (12)(^1)$$

Οι παράμετροι που χρησιμοποιούνται παραπάνω ορίζονται ως:

$m_s^{ads}(\Delta t_1)$, $m_s^{ads}(\Delta t_2)$, ..., $m_s^{ads}(\Delta t_n)$ = μάζα της προσροφημένης στο έδαφος ουσίας κατά τη διάρκεια των χρονικών δια - στημάτων Δ_{t1}, Δ_{t2},..., Δ_{tn} αντιστοίχως (μg),

$m_m^{ads}(t_1)$, $m_m^{ads}(t_2)$, ..., $m_n^{ads}(t_n)$ = μάζα της ουσίας που μετριέται σε όγκο v_a^A τις χρονικές στιγμές t_1, t_2,t_n αντιστοίχως (μg),

$m_s^{ads}(eq)$ = μάζα της προσροφημένης στο έδαφος ουσίας κατά την ισορροπία προσρόφησης (μg).

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = μάζα της ουσίας στο διάλυμα κατά την ισορροπία προσρόφησης (μg),

v_a^A = όγκος της ποσότητας στην οποία μετριέται η υπό δοκιμή ουσία (cm^3),

$A_{\Delta ti}$ = ποσοστιαία προσρόφηση που αντιστοιχεί στο χρονικό διάστημα Δt_i (%),

A_{eq} = ποσοστιαία προσρόφηση κατά την ισορροπία προσρόφησης, (%).

ΕΚΡΟΦΗΣΗ D (%)

Ως χρόνος εκκίνησης του πειράματος κινητικής εκρόφησης t_0 λαμβάνεται η χρονική στιγμή κατά την οποία ο μέγιστος ανακτημένος όγκος του διαλύματος της υπό δοκιμή ουσίας (μετά την επίτευξη ισορροπίας προσρόφησης) αντικαθίσταται από ίσο όγκο διαλύματος 0,01 M $CaCl_2$.

α) *Παράλληλη μέθοδος*

Τη χρονική στιγμή t_i, μετριέται η μάζα της υπό δοκιμή ουσίας στην υδατική φάση που λαμβάνεται από το σωλήνα i (V_r^i), και η προσροφημένη μάζα υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{v_r^i}\right) - m_{aq}^{A} \quad (13)$$

Κατά την ισορροπία εκρόφησης $t_i = t_{eq}$ και συνεπώς $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$

Η μάζα της προσροφουμένης υπό δοκιμή ουσίας κατά τη χρονική περίοδο (Δt_i) δίνεται από την εξίσωση:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i-1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

Η ποσοστιαία εκρόφηση υπολογίζεται:

τη χροηκή στιγμή t_i από την εξίσωση:

(1) Εξισωσεις εφαρμαξόμενες τόσο στην άμεση όσο και στην έμμεση μέθοδο. Όλες οι υπόλοιπες εξισώσεις εωαρμόξονται μόνον στην έμμεση μέθοδο.

▼B

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \tag{15}$$

και κατά τη διάρκεια χρονικού διαστήματος (Δt_i) από την εξίσωση:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \tag{16}$$

όπου:

D_{ti} = ποσοστιαία εκρόφηση τη χρονική στιγμή t_i (%),

$D_{\Delta ti}$ = ποσοστιαία εκρόοηση που αντιστοιχεί σε χρονικό διάστηιια Δt_i (%),

$m_{aq}^{des}(t_1)$ = μάζα της προσροφημένης υπό δοκιμή ουσίας τη χρονική στιγμή t_i, (μg),

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$ = μάζα της προσροφουμένης υπό δοκιμή ουσίας κατά τη διάρκεια χρονικού διαστήματος Δt_i (μg),

$m_m^{des}(t_i)$ = μάζα της υπό δοκιμή ουσίας που ανευρίσκεται αναλυτικώς τη χρονική στιγμή t_i σε όγκο διαλύματος V_r^i που λαμβάνεται για ανάλυση, (μg),

$m_{aq}{}^{A}$ = μάζα της υπό δοκιμή ουσίας που περισσεύει από την ισορροπία προσρόφησης λόγω ατελούς κατ' όγκο αντικατάστασης, (μg):

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \tag{17}$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = μαία της υπο δοκιμή ουσίας στο διάλυμα σε κατάσταση ισορροπίας προσρόφησης (μg),

V_R = όγκος του υπερκειμένου υγρού που απομακρύνεται απο το σωλήνα μετά την αποκατάσταση ισορροπίας προσρόφησης και αντικαθίσταται απο τον ίδιο όγκο διαλύματος 0,01 M $CaCl_2$ solution (cm^3).

$V_r^{\ i}$ = όγκος του διαλύματος που λαμβάνεται από το σωλήνα (f) για τη μέτρησης της υπό δοκιμή ουσίας στο πείραμα της κινητικής εκρόφησης (cm^3).

Οι τιμές εκρόφησης $D_t^{\ i}$ or $D_{\Delta t^i}$ (ανάλογα με τις ανάγκες της μελέτης) παρίστανται γραφικώς συναρτήσει του χρόνου και προσδιορίζεται ο χρόνος μετά τον οποίο αποκαθίσταται ισορροπία εκρόψησης.

β) *Εν σειρά μέθοδος*

Στις εξισώσεις που ακολουθούν λαμβάνεται υπόψη ότι η διαδικασία προσρόφησης, που προηγήθηκε, πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της υπό δοκιμή ουσίας σε μικρές ποσότητες (v_a^A) της υδατικής φάσης (εν σειρά μέθοδος στην ενότητα «Εκτέλεση της δοκιμής» 1.9.). Υποτίθεται ότι: α) ο όγκος του υπερκείμενου υγρού που απομακρύνθηκε από το σωλήνα μετά το πείραμα κινητικής εχρόφησης αντικαταστάθηκε από τον ίδιο όγκο διαλύματος 0,01 M $CaCl_2$ solution (V_R) και β) ο συνολικός όγκος της υδατικής φάσης σε επαφή με το έδαφος (V_T) κατά τη διάρκεια του πειράματος κινητικής εκρόφησης παραμένει σταθερός και δίνεται από την εξίσωση:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \tag{18}$$

▼B

Τη χρονική στιγμή t_i:

— Σε μικρή ποσότητα (v_a^D) μετριέται η μάζα της υπό δοκιμή ουσίας και η προσροφημένη μάζα υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (i-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) \quad (19)$$

— Κατά την ισορροπία εκρόφησης $t_i = t_{eq}$ και συνεπώς $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

— Η ποσοστιαία εκρόφηση D_{t_i} υπολογίζεται με την ακόλουθη εξίσωση:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (20)$$

Σε χρονικό διάστημα (Δt_i):

Κατά τη διάρκεια κάθε χρονικού διαστήματος η ποσότητα της εκροφουμένης ουσίας υπολογίζεται ως εξής:

— το πρώτο χρονικό διάστημα $\Delta t_1 = t_1\text{-}t_0$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \text{ και } m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— για το δεύτερο χρονικό διάστημα $\Delta t_2 = t_2\text{-}t_1$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right)$$

και (22)

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)\right]$$

— για το νιοστό χρονικό διάστημα $\Delta t_n = t_n\text{-}t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (n-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) - \sum_{i=1, n\neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_T - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right]$$

και (23)

$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1, n\neq 1}^{n} m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$$

Τελικά, η ποσοστιαία εκρόφηση σε κάθε χρονικό διάστημα, $D_{\Delta t_i}$, υπολογίζεται με την ακόλουθη εξίσωση:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (24)$$

ενώ η ποσοστιαία εκρόφηση D_{t_i} τη χρονική στιγμή t_i δίνεται από την εξίσωση:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_i}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (25)$$

▼B

όπου οι ανωτέρω χρησιμοποιούμενες παράμετροι ορίζονται ως:

$m_s^{des}(\Delta t_1)$, $m_s^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_s^{des}(\Delta t_n)$ = μάζα της ουσίας που παραμένει προσροφημένη στο έδαφος μετά τα χρονικά διαστήματα Δt_1, Δt_2,..., Δt_n αντιστοίχως (μg),

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$, $m_{aq}^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_{aq}^{des}(\Delta t_n)$ = μάζα της εκροφουμένης υπό δοκιμή ουσίας κατά τη διάρκεια των χρονικών δια στημάτων Δt_1, Δt_2,..., Δt_n αντιστοίχως (μg),

$m_m^{des}(t_1)$, $m_m^{des}(t_2)$,... , $m_m^{des}(t_n)$ = μάζα της ουσίας που ανευρίσκεται σε ποσότητα (v_a^D) κατά τις χρονικές στιγμές t_1,t_2,..., t_n, αντιστοίχως (μg),

V_T = συνολικός όγκος της σε επαφή με το έδαφος υδατικής φάσης κατά τη διάρκεια του πειράματος κινητικής εκρόφησης που εκτελείται με την εν σειρά μέθοδο (cm^3),

m^A_{aq} = μάζα της υπό δοκιμή ουσίας που περισσεύει από την ισορροπία προσρόφησης λόγω ατελούς κατ' όγκο αντικατάστασης, (μg),

$$m_{aq}^A = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right) - V_R}{V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i)} \right) \cdot m_{aq}^{ads}(eq) \qquad (26)$$

V_R = όγκος του υπερκειμένου υγρού που απομακρύνεται από το σωλήνα μετά την απο- κατάσταση ισορροπίας προσρόφησης και αντικαθίσταται από τον ίδιο όγκο 0,01 M $CaCl_2$ (cm^3),

v_a^D = όγκος της ποσότητας που δειγματίζεται για αναλυτικούς σκοπούς από το σωλήνα (i), κατά τη διάρκεια του πειράματος κινητικής εκρόφησης που εκτελείται με την εν σειρά μέθοδο, (cm^3),

$$v_a^D \leq 0{,}02 \cdot V_T \qquad (27)$$

▼B

Προσαρτημα 6

ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ-ΕΚΡΟΦΗΣΗ ΣΕ ΕΛΑΦΗ: ΦΥΛΛΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Υπό δοκιμή ουσία:

Υπό δοκιμή έδαφος:

Ξηρά μάζα του εδάφους (105 °C, 12 h): ..... %

Θερμοκρασία: ..... °C

Καταλληλότητα της αναλυτικής μεθόδου

Ζυγισθέν έδαφος	g	
Έδαφος: ξηρά μάζα	g	
Όγκος διαλύματος $CaCl_2$	cm^3	
Ονομαστική συγκέντρωση τελικού διαλύματος	μg cm^{-3}	
Συγκέντρωση τελικού διαλύματος βάσει αναλύσεως	μg cm^{-3}	

Αρχή της χρησιμοποιηθείσας αναλυτικής μεθόδου:

Διακρίβωση της αναλυτικής μεθόδου:

Υπό δοκιμή ουσία:

Υπό δοκιμή έδαφος:

Ξηρά μάζα του εδάφους (105 °C, 12 h): ..... %

Θερμοκρασία: ..... °C

Ακολουθούμενη αναλυτική μεθοδολογία: Έμμεση ☐ Παράλληλη ☐ Εν σειρά ☐

Αμεση ☐

Δοκιμή προσρόφησης: Δείγματα δοκιμής

	Σύμβολο	Μονάδες	Χρόνος ισορροπίας		Χρόνος ισορροπίας		Χρόνος ισορροπίας		Χρόνος ισορροπίας	
Σωλήνας αριθ.										
Ζυγισθέν έδαφος	—	g								
Έδαφος: ξηρά μάζα	m_{soil}	g								
Όγκος ύδατος στο ζυγισθέν έδαφος (υπολογισθείς)	V_{WS}	cm^3								
Όγκος 0,01 M $CaCl_2$ για εξισορρόπηση του εδάφους		cm^3								
Όγκος αρχικού διαλύματος		cm^3								
Συνολικός όγκος υδατικής φάσης σε επαφή με το έδαφος	V_0	cm^3								
Αρχική συγκέντρωση Διάλυμα δοκιμής	C_0	μg cm^{-3}								
Μάζα υπό δοκιμή ουσίας στην αρχή της δοκιμής	m_0	μg								

▼B

	Σύμβολο	Μονάδες	Χρόνος ισορροπίας		Χρόνος ισορροπίας		Χρόνος ισορροπίας		Χρόνος ισορροπίας	
Έπειτα από ανάδευση και φυγοκέντρηση										
ΕΜΜΕΣΗ ΜΕΘΟΔΟΣ										
Παράλληλη μέθοδος										
Συγκέντρωση ουσίας στην υδατική φάση, λαμβανομένου υπόψη και του τυφλού	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	$\mu g\ cm^{-3}$								
Εν σειρά μέθοδος										
Μετρηθείσα μάζα ουσίας σε όγκο V_a [A]	$m_m^{ads}(t_i)$	μg								
ΑΜΕΣΗ ΜΕΘΟΔΟΣ										
Μάζα υπό δοκιμή ουσίας προσρο-φημένη στο έδαφος	$m_s^{ads}(t_i)$	μg								
Υπολογισμός προσρόφησης										
Προσρόφηση	A_{t_i}	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Μέσος ορος										
Συντελεστής προσρόφησης	K_d	$cm^3_1\ g^-$								
Μέσος όρος										
Συντελεστής προσρόφησης	K_{oc}	$cm^3_1\ g^-$								
Μέσος όρος										

Υπό δοκιμή ουσία:

Υπό δοκιμή έδαφος:

Ξηρά μάζα εδάφους (105 °C, 12 h): ..... %

Θερμοκρασία: ..... °C

Δοκιμή προσρόφησης: τυφλά και μάρτυρας

	Σύμβολο	Μονάδες	Τυφλό		Τυφλό		Μάρτυρας	
Σωλήνας αριθ.								
Ζυγισθέν έδαφος		g					0	0
Όγκος ύδατος στο ζυγισθέν έδαφος (υπολογιζθείς)		cm3					—	—
Όγκος προστεθέντος διαλύματος 0,01 M $CaCl_2$		cm^3						
Όγκος του προστεοέντος αρχικού διαλύματος της υπό δοκιμή ουσίας		cm^3	0	0				
Συνολικός όγκος υδατικής φύσεως (υπολογισθείς)		cm3					—	—

▼B

	Σύμβολο	Μονάδες	Τυφλό		Τυφλό		Μάρτυρας	
Αρχική συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στην υδατική φάση		μg cm^{-3}						

Έπειτα από ανάδευση και φυγοκέντρηση

Συγκέντρωση στην υδατική φάση		μg cm^{-3}						

Παρατήρηση: Εφόσον χρειάζεται, προσθέστε στήλες.

Υπό δοκιμή ουσία:

Υπό δοκιμή έδαφος:

Ξηρά μάζα του εδάφους (105 °C, 12 h): ..... %

Θερμοκρασία: ..... °C

Υπόλοιπο μάζας

	Σύμβολο	Μονάδες				
Σωλήνας αριθ.						
Ζυγισθέν έδαφος	—	g				
Έδαφος: ξηρά μάζα	m_{soil}	g				
Όγκος ύδατος στο ζυγισθέν έδαφος (υπολογιζθείς)	V_{WS}	ml				
Όγκος 0,01 M $CaCl_2$ για την εξισορρόπηση του εδάφους		ml				
Όγκος αρχικού διαλύματος		cm3				
Συνολικός όγκος υδατικής φάσης σε επαφή με το έδαφος	v_0	cm^3				
Αρχική συγκέντρωση διαλύματος δοκιμής	C_0	μg cm^{-3}				
Χρόνος αποκατάστασης ισορροπίας	—	h				

Έπειτα από ανάδευση και φυγοκέντρηση

Συγκέντρωση υπό δοκιμή ουσίας στην υδατική φάση σε ισορροπία προσρόφησης, λαμβανομένου υπόψη και του τυφλού	$C_{aq}^{ads}(eq)$	μg cm^{-3}				
Χρόνος αποκατάστασης ισορροπίας	t_{eq}	η				

1η αραίωση με διαλύτη

Απομακρυνθείς όγκος υδατικής φάσης	V_{rec}	cm3				
Προστεθείς όγκος διαλύτη	ΔV	cm3				

1η εκχύλιση με διαλύτη

Αναλυτής σήματος στο διαλύτη	s_{E1}	var.				
Συγκέντρωση υπό δοκιμή ουσίας στο διαλύτη	C_{E1}	Mg cm^{-3}				

▼B

	Σύμβολο	Μονάδες				
Μάζα ουσίας εκχυλισΟείσα από το έδαφος και τα τοιχώματα του δοχείου	m_{E1}	μg				

2η αραίωση με διαλύτη

Απομακρυνθείς όγκος διαλύτη	ΔV_S	cm^3				
Προστεθείς όγκος διαλύτη	ΔV	cm^3				

2η εκχύλιση με διαλύτη

Αναλτής σήματος στη φάση του διαλύτη	S_E	var.				
Συγκέντρωση υπό δοκιμή ουσίας στο διαλύτη	C_{E2}	μg^{cm-3}				
Μάζα ουσίας εκχυλισθεισα από το έδαφος και τα τοιχώματα του δοχείου	m_{E2}	μg				
Συολική μάζα υπό δοκιμή ουσίας εκχυλισθεισα σε δύο στάδια	m_E	μg				
Υπόλοιπη μαξα	MB	%				

Υπό δοκιμή ουσία:

Υπό δοκιμή έδαφος:

Ξηρά μάζα του εδάφους (105 °C. 12 h): ..... %

Θερμοκρασία: ..... °C

Ισόθερμοι προσρόφησης

	Σύμβολο	Μονάδες								
Σωλήνας αριθ.										
Ζυγισθέν έδαφος	—	g								
Έδαφος: ξηρά μάζα	E	g								
Όγκος ύδατος στο ζυγισθέν έδαφος {υπολογισθείς)	v_{ws}	cm^3								
Όγκος 0,01 M $CaCl_2$ για εξισορρόπηση του εδάφους		cm^3								
Όγκος προστεθέντος αρχικού διαλύματος		cm^3								
Συνολικός όγκος υδατικής φάσης σε επαφή με το έδαφος (υπολογισθείς)	V_0	cm^3								
Συγκέντρωση διαλύματος	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$								
Χρόνος αποκατάστασης ισορροπίας	—	h								

▼B

	Σύμβολο	Μονάδες								

Έπειτα από ανάδευση και φυγοκέντρηση

Συγκέντρωση ουσίας στην υδατική φάση, λαμβανομένου υπόψη και του τυφλού	$C_{aq}^{ads}(eq)$	μg cm^{-3}								
Θερμοκρασία		X								
Προσροφη9είσα μάζα ανά μονάδα εδάφους	$C_{s}^{ads}(eq)$	μg g^{-1}								

Αναγωγή:

τιμή $K^{ads}{}_{t}$:

τιμή l/n:

συντελεστής αναγωγής r^2:

Υπό δοκιμή ουσία:

Υπό δοκιμή έδαφος:

Ξηρά μάζα εδάφους (105 °C, 12 h): ..... %

Θερμοκρασία: ..... °C

Ακολουθηθείσα μεθοδολογία ανάλυσης: Έμμεση □ Παράλληλη □ Εν σειρά □

Δοκιμή εκρόφησης

		Σύμβολο	Μονάδες	Χρονικό διάστημα	Χρονικό διάστημα	Χρονικό διάστημα	Χρονικό διάστημα
Σωλήνας αριθ. προερχόμενος από το στάδιο προσρόφησης							
Μάζα ουσίας προσροφη9είσα στο έδαφος σε κατάσταση ισορροπίας προσρόφησης		$m_{s}^{ads}(eq)$	μg				
Απομακρυνθείς όγκος υδατικής φάσης, αντικατασταθείς από 0,01 M $CaCl_2$		V_R	cm^3				
Συνολικός όγκος υδατικής φάσης σε επαφή με το έδαφος	PM	V_0	cm^3				
	SM	V_T	cm				
Μάζα ουσίας που περισσεύει από την ισορροπία προσρόφησης λόγω ατελούς κατ' όγκο αντικατάστασης		m_{aq}^{A}	μg				

Κινητική εκρόφησης

Μετρηθείσα μάζα εκροφημένης από το έδαφος ουσίας τη χρονική στιγμή t_1		$m_{m}^{des}(t_i)$	μg				
Όγκος του διαλύματος που λαμβάνεται από το σωλήνα (i) για τη μέτρηση της υπό δοκιμή ουσίας	PM	$V^{i}{}_{t}$	cm^3				
	SM	$V^{D}{}_{a}$	cm^3				
Μάζα ουσίας εκροφημένη από το έδαφος τη χρονική στιγμή t_i (υπολογισθείσα)		$m_{aq}^{des}(t_i)$	μg				
Μάζα ουσίας εκροφουμένη από το έδαφος κατά τη διάρκεια του χρονικού διαστήματος Δt_i (υπολογισθείσα)		$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	μg				

▼B

	Σύμβολο	Μονάδες	Χρονικό διάστημα	Χρονικό διάστημα	Χρονικό διάστημα	Χρονικό διάστημα
Ποσοστιαία εκρόφηση						
Εκρόφηση τη χρονική στιγμή t_i	D_{t_i}	%				
Εκρόφηση κατά το χρονικό διάστημα At_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Φαινομενικός συντελεστής εκρόφησης	K_{des}					

PM: Παράλληλη μέθοδος

SM: Εν σειρά μέθοδος

▼B

Γ.19. **ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ (K_{OC}) ΤΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΑΣΠΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟΝΟΜΩΝ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

Η παρούσα μέθοδος αποτελεί αναπαραγωγή της OECD TG121 (2000).

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ροφητική συμπεριφορά των ουσιών στο έδαφος ή στις λάσπες των υπονόμων μπορεί να περιγραφεί μέσω παραμέτρων που προσδιορίζονται πειραματικά με τη μέθοδο δοκιμής Γ.18. Μια σημαντική παράμετρος είναι ο συντελεστής προσροφήσεως που ορίζεται ως ο λόγος της συγκεντρώσεως της ουσίας στο έδαφος/λάσπη προς τη συγκέντρωση της ουσίας στην υδατική φάση σε κατάσταση ισορροπίας προσροφήσεως. Ο τυποποιημένος σε σχέση με την περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα του εδάφους συντελεστής προσροφήσεως K_{oc} είναι ένας χρήσιμος δείκτης της συνδετικής ικανότητας μιας χημικής ουσίας με την οργανική ύλη του εδάφους και τη λάσπη των υπονόμων που επιτρέπει να γίνονται συγκρίσεις μεταξύ διαφόρων χημικών ουσιών. Η παράμετρος αυτή μπορεί να υπολογιστεί μέσω συσχετισμού με την υδατοδιαλυτότητα και το συντελεστή κατανομής ν-οκτανόλης/νερού (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

Στην πειραματική μέθοδο που περιγράφεται στην παρούσα δοκιμή χρησιμοποιείται HPLC για τον υπολογισμό του συντελεστή προσρόφησης K_{oc} στο έδαφος και στη λάσπη των υπονόμων (8). Τα αποτελέσματα είναι μεγαλύτερης αξιοπιστίας από εκείνα που λαμβάνονται με υπολογισμούς QSAR (9). Ως εκτιμητική μέθοδος, δεν μπορεί να αντικαταστήσει πλήρως τα πειράματα ισορροπίας παρτίδας που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο δοκιμής Γ.18. Εντούτοις, η υπολογιζόμενη K_{oc} μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμη για την επιλογή κατάλληλων παραμέτρων δοκιμής για μελέτες προσρόφησης/εκρόφησης σύμφωνα με τη μέθοδο δοκιμής Γ.18 με υπολογισμό του K_d (συντελεστής κατανομής) ή K_f (συντελεστής προσρόφησης Freundlich) σύμφωνα με την εξίσωση 3 (βλέπε σημείο 1.2).

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

K_d: Ως συντελεστής κατανομής ορίζεται ο λόγος των συγκεντρώσεων ισορροπίας C διαλελυμένης υπό δοκιμή ουσίας σε διφασικό σύστημα που αποτελείται από ένα ροφητικό μέσο (έδαφος ή λάσπη υπονόμων) και μια υδατική φάση. Είναι αδιάστατο μέγεθος όταν οι συγκεντρώσεις και στις δύο φάσεις εκφράζονται ως βάρος/βάρος. Στην περίπτωση που η συγκέντρωση στην υδατική φάση δίνεται ως βάρος/όγκο, τότε οι μονάδες είναι ml· g^{-1}. Ο K_d μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τις ιδιότητες του ροφητικού μέσου, ενώ μπορεί να εξαρτάται και από τη συγκέντρωση.

$$K_d = \frac{C_{soil}}{C_{aq}} \; or \; \frac{C_{sludge}}{C_{aq}} \qquad (1)$$

όπου:

C_{soil} = συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο έδαφος σε κατάσταση ισορροπίας (μg· g^{-1}),

C_{sludge} = συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας σιη λάσπη σε κατάσταση ισορροπίας (μg· g^{-1}),

C_{aq} = συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στην υδατική φάση σε κατάσταση ισορροπίας (μg· g^{-1}, μg . ml^{-1}).

▼B

K_f: Ως συντελεστής προσρόφησης Freundlich ορίζεται η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο έδαφος ή στη λάσπη υπονόμων (x/m) όταν η συγκέντρωση σε κατάσταση ισορροπίας C_{aq} στην υδατική φάση είναι ίση με ένα. Οι μονάδες είναι μg· g^{-1} ροφητικού μέσου. Η τιμή μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τις ιδιότητες του ροφητικού μέσου.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{aq} \quad (2)$$

όπου:

x/m = ποσότητα της υπό δοκιμή ουσίας χ (μg) προσφροφημένη σε ποσότητα ροφητικού m (g) σε κατάσταση ισορροπίας,

1/η = κλίση της ισοθέρμου προσρόφησης Freundlich,

C_{aq} = συγκέντρωση της υπο δοκιμή ουσίας στην υδατική φάση σε κατάσταση ισορροπίας (μg· ml^{-1}).

$$\Sigma\varepsilon\ C_{aq} = 1;\ \log K_f = \log \frac{x}{m}$$

K_{oc}: Συντελεστής κατανομής (K_d) ή συντελεστής κατανομής Freundlich (K_f) τυποποιημένος ως προς την περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (f_{oc}) ενός ροφητικού. Στην περίπτωση, ιδιαίτερα, μη ιοντισμένων χημικών ουσιών, αποτελεί κατά προσέγγιση δείκτη του βαθμού προσρόφησης μεταξύ μιας ουσίας και του ροφητικού και παρέχει τη δυνατότητα πραγματοποίησης συγκρίσεων μεταξύ διαφόρων χημικών ουσιών. Ανάλογα με τις διαστάσεις των K_d και K_f ο K_{oc} μπορεί να είναι αδιάστατος ή να έχει τις μονάδες ml· g^{-1} ή μg· g^{-1} οργανικής ύλης.

$$Koc = \frac{Kd}{foc}\ (\text{αδιάστατος ή ml} \cdot g^{-1}) \text{or} \frac{Kf}{foc}\ (\mu g \cdot g^{-1}) \quad (3)$$

Η σχέση μεταξύ K_{oc} και K_d δεν είναι πάντοτε γραμμική και έτσι, οι τιμές του K_{oc}, μπορεί να ποικίλουν από έδαφος σε έδαφος, η μεταβλητότητα τους όμως είναι μειωμένη σε μεγάλο βαθμό σε σύγκριση με τις τιμές των K_d ή K_f.

Ο συντελεστής προσροφήσεως (K_{oc}) εξάγεται από τον παράγοντα ικανότητας (k') χρησιμοποιώντας καμπύλη διακρίβωσης του log k' συναρτήσει του log K_{oc} των επιλεγμένων ενώσεων αναφοράς.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

όπου:

t_R: χρόνος κατακράτησης υπό δοκιμή ουσίας και ουσίας αναφοράς HPLC (λεπτά),

t_0: νεκρός χρόνος HPLC (λεπτά) (βλέπε σημείο 1.S.2).

P_{0W}: Ως συντελεστής κατανομής οκτανόλης-νερού ορίζεται ο λόγος των συγκεντρώσεων της διαλελυμένης ουσίας σε n-οκτανόλη και νερό. Είναι αδιάστατο μέγεθος.

$$Pow = \frac{Coctanol}{Caq}\ (Kow) \quad (5)$$

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Πριν να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος, θα πρέπει να είναι γνωστά ο συντακτικός τύπος, η καθαρότητα και η σταθερά διαστάσεως (εάν υπάρχει). Χρήσιμο, επίσης, είναι να υπάρχουν στοιχεία για τη διαλυτότητα στο νερό και σε οργανικούς διαλύτες, για το συντελεστή κατανομής οκτανόλης-νερού και για τα χαρακτηριστικά υδρόλυσης.

▼B

Για να συσχετισιούν τα μετρούμενα δεδομένα κατακράτησης HPLC μιας υπό δοκιμή ουσίας με το συντελεσή προσροφήσεως K_{oc}, πρέπει να χαραχθεί καμπύλη διακρίβωσης του log K_{oc} συναρτήσει του log k^T. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται έξι, κατ' ελάχιστο, σημεία αναφοράς, τουλάχιστον ένα πάνω και ένα κάτω από την αναμενόμενη τιμή της υπό δοκιμή ουσίας. Η ορθότητα (accuracy) της μεθόδου βελτιώνεται σημαντικά αν χρησιμοποιηθούν ουσίες αναφοράς με σύνταξη σχετική με εκείνη της υπό δοκιμή ουσίας. Εφόσον δεν υπάρχουν διαθέσιμα τέτοια δεδομένα, επαφίεται στον χρήστη να επιλέξει τις κατάλληλες ουσίες διακρίβωσης. Στην περίπτωση αυτή, θα πρέπει να επιλέγεται ένα γενικότερο σύνολο συντακτικώς ετερογενών ουσιών. Ουσίες και τιμές K_{oc} που μπορούν να χρησιμοποιηθούν αναγράφονται στο προσάρτημα, στον πίνακα 1 για τη λάσπη υπονόμων και στον πίνακα 3 για το έδαφος. Τυχόν επιλογή άλλων ουσιών διακρίβωσης θα πρέπει να αιτιολογείται.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η HPLC εκτελείται σε αναλυτικές στήλες πληρωμένες με διαθέσιμη στο εμπόριο κυανοπροπυλική στερεά φάση, η οποία περιέχει λιπόφιλα και πολικά τμήματα. Χρησιμοποιείται μετρίως πολική στατική φάση με βάση πυρίτια:

- O - Si	- CH_2 - CH_2 - CH_2	- CN
πυριτία	μη πολικό τμήυα διαχωρισυού	πολικό τμήμα

Η αρχή της μεθόδου είναι παρόμοια με εκείνη της μεθόδου δοκιμής A.8 (συντελεστής κατανομής, μέθοδος HPLC). Η ουσία, καθώς διέρχεται διαμέσου της στήλης μαζί με την κινητή φάση, αλληλεπιδρά με τη στατική φάση. Λόγω της κατανομής μεταξύ κινητής και στατικής φάσης, η υπό δοκιμή ουσία καθυστερεί. Η διττή σύσταση της στατικής φάσης με πολικές και μη πολικές περιοχές επιτρέπει την αλληλεπίδραση πολικών και μη πολικών ομάδων ενός μορίου με παρόμοιο τρόπο όπως στην περίπτωση οργανικής ύλης ευρισκόμενης στο έδαφος ή σε λάσπη υπονόμων. Αυτό δίνει τη δυνατότητα προσδιορισμού της σχέσης μεταξύ χρόνου κατακράτησης στη στήλη και συντελεστή προσρόφησης στην οργανική ύλη.

Το pH έχει σημαντική επίδραση στη ροφητική συμπεριφορά, ιδιαίτερα στην περίπτωση πολικών ουσιών. Στα γεωργικά εδάφη ή στις δεξαμενές εργοστασίων επεξεργασίας λυμάτων, το pH κυμαίνεται, κανονικά, μεταξύ pH 5,5 και 7,5. Για τις ιοντίσιμες ουσίες, θα πρέπει να πραγματοποιούνται δύο δοκιμές, σε ιοντισμένη και σε μη ιοντισμένη μορφή, σε κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα, στις περιπτώσεις όμως μόνο όπου το 10 % τουλάχιστον της υπό δοκιμή ενώσεως δίσταται σε περιοχή pH 5,5 έως 7,5.

Δεδομένου ότι, για την εκτίμηση, χρησιμοποιείται μόνον η σχέση μεταξύ της κατακράτησης στη στήλη HPLC και του συντελεστή προσρόφησης, δεν απαιτείται κάποια ποσοτική αναλυτική μέθοδος και αυτό που χρειάζεται μόνον είναι ο προσδιορισμός του χρόνου κατακράτησης. Εάν υπάρχει διαθέσιμο κάποιο κατάλληλο σύνολο ουσιών αναφοράς και μπορούν να χρησιμοποιηθούν τυπικές πειραματικές συνθήκες, η μέθοδος παρέχει έναν ταχύ και αποτελεσματικό τρόπο εκτίμησης του συντελεστή προσρόφησης K_{oc}.

1.5. ΕΦΑΡΜΟΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η μέθοδος HPLC μπορεί να εφαρμοστεί σε χημικές ουσίες (επισημασμένες ή μη) για τις οποίες υπάρχει διαθέσιμο κάποιο κατάλληλο σύστημα ανίχνευσης (π.χ. φασματοφωτόμετρο, ανιχνευτής ραδιενέργειας) και οι οποίες είναι επαρκώς σταθερές κατά τη διάρκεια του πειράματος. Ιδιαίτερα χρήσιμη μπορεί να αποδειχθεί για ουσίες που είναι δύσκολο να μελετηθούν σε άλλα πειραματικά συστήματα (δηλαδή πτητικές ουσίες, ουσίες οι οποίες δεν είναι διαλυτές στο νερό σε επίπεδα συγκέντρωσης που να μπορούν να μετρηθούν αναλυτικά, ουσίες υψηλής συγγένειας με την επιφάνεια συστημάτων επώασης). Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μείγματα που παρέχουν μη διακριτές ζώνες εκλούσεως. Στην περίπτωση αυτή, θα πρέπει να δηλώνονται τα άνω και κάτω όρια των τιμών log K_{oc} των ενώσεων του υπό δοκιμή μείγματος.

▼B

Η ύπαρξη προσμείξεων μπορεί, μερικές φορές, να προκαλέσει προβλήματα στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων HPLC, δεν έχει όμως ιδιαίτερη σημασία εφόσον η υπό δοκιμή ουσία μπορεί σαφώς να ταυτοποιηθεί αναλυτικά και να διαχωριστεί από τις προσμείξεις.

Η μέθοδος είναι έγκυρη για τις ουσίες που περιλαμβάνονται στον πίνακα 1 του προσαρτήματος, ενώ εφαρμόζεται επίσης και σε διάφορες άλλες χημικές ουσίες που ανήκουν στις ακόλουθες χημικές τάξεις:

— αρωματικές αμίνες (π.χ. τριφλουραλίνη, 4-χλωροανιλίνη, 3,5-δινιτροανιλίνη, 4-μεθυλανιλίνη, N-μεθυλανιλίνη, 1-ναφθυλαμίνη),

— εστέρες αρωματικών καρβοξυλικών οξέων (π.χ. μεθυλεστέρας βενζοϊκού οξέος, αιθυλεστέρας 3,5-δινιτροβενζο-ϊκού οξέος),

— αρωματικοί υδρογονάνθρακες (π.χ. τολουόλιο, ξυλόλιο, αιθυλοβενζόλιο, νιτροβενζόλιο),

— εστέρες αρυλοξυφαινοξυπροπιονικών οξέων (π.χ. diclofop-methyl, fenoxaprop-ethyl, fenoxaprop-P-ethyl),

— μυκητοκτόνα βενζιμιδαζολίου και ιμιδαζολίου (π.χ. carbendazim, fuberidazole, triazoxide),

— αμίδια καρβοξυλικών οξέων (π.χ. 2-χλωροβενζαμίδιο, N.N-διμεθυλοβενζαμίδιο, 3,5-δινιτροβενζαμίδιο, N-μεθυλο-βενζαμίδιο, 2-νιτροβενζαμίδιο, 3-νιτροβενζαμίδιο),

— χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες (π.χ. endosulfan. DDT, εξαχλωροβενζόλιο, quintozene, 1,2,3-τριχλωροβενζόλιο),

— οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (π.χ. azinphos-methyl, disulfoton, fenamiphos, isofenphos, pyrazophos, sulprofos, triazophos),

— φαινόλες (π.χ. φαινόλη, 2-νιτροφαινόλη, 4-νιτροφαινόλη. πενταχλωροφαινόλη, 2,4,6-τριχλωροφαινόλη. 1-να-φθόλη),

— παράγωγα φαινυλουρίας (π.χ. isoproturon, monolinuron. pencycuron),

— χρωστικές πιγμέντων (π.χ. Acid Yellow 219. Basic Blue 41, Direct Red 81),

— πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες (π.χ. ακεναφθένιο, ναφθαλίνιο),

— ζιζανιοκτόνα 1,3,5-τριαζίνης (π.χ. προμετρζν, προπαυινε. σιμαυινε, τερβθτρζν),

— παράγωγα τριαζολίου (π.χ. tebuconazole, triadimefon, tradimenol, triapenthenol).

Η μέθοδος δεν εφαρμόζεται σε ουσίες του αντιδρούν είτε με το εκλουστικό μέσο, είτε με τη στατική φάση. Δεν εφαρμόζεται επίσης σε ουσίες που αλληλεπιδρούν με ειδικό τρόπο με ανόργανα συστατικά (π.χ. σχηματισμός συμπλόκων με ορυκτές αργίλους). Η μέθοδος μπορεί να μην είναι κατάλληλη για επιφανειοδραστικές ουσίες, ανόργανες ενώσεις και μετρίως ή ισχυρά οργανικά οξέα και βάσεις. Μπορούν να προσδιοριστούν τιμές log K_{oc} στην περιοχή από 1,5 έως 5,0. Οι ιοντίσιμες ουσίες πρέπει να μετρώνται με τη χρησιμοποίηση ρυθμισμένης κινητής φάσης, πρέπει όμως να δίνεται προσοχή για την αποφυγή καθίζησης ρυθμιστικών συστατικών ή της υπό δοκιμή ουσίας.

▼B

1.6. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

1.6.1. **Ορθότητα**

Κανονικά, ο συντελεστής προσρόφησης μιας υπό δοκιμή ουσίας μπορεί να εκτιμηθεί με προσέγγιση ± 0,5 λογαριθμικής μονάδας της τιμής που προσδιορίζεται με τη μέθοδο ισορροπίας παρτίδας (βλέπε πίνακα 1 στο προσάρτημα). Υψηλότερη ορθότητα μπορεί να επιτευχθεί, εφόσον οι χρησιμοποιούμενες ουσίες αναφοράς έχουν συντακτική δομή σχετική με εκείνη της υπό δοκιμή ουσίας.

1.6.2. **Επαναληψιμότητα**

Οι προσδιορισμοί θα πρέπει να γίνονται τουλάχιστον εις διπλούν. Οι τιμές log K_{oc} που προέρχονται από μεμονωμένες μετρήσεις θα πρέπει να κυμαίνονται στα πλαίσια 0,25 λογαριθμικής μονάδας.

1.6.3. **Αναπαραγωγιμότητα**

Η εμπειρία που έχουν αποκομιστεί μέχρι τώρα από την εφαρμογή της μεθόδου αποτελεί στοιχείο υποστηρικτικό της εγκυρότητάς της. Διερεύνηση της μεθόδου HPLC, χρησιμοποιώντας 48 ουσίες (κατά το πλείστον γεωργικά φάρμακα) για τις οποίες υπήρχαν διαθέσιμα αξιόπιστα δεδομένα για το K_{oc} σε εδάφη, έδωσε συντελεστή συσχετισμού R = 0,95 (10) (11).

Πραγματοποιήθηκε διεργαστηριακή συγκριτική δοκιμή με 11 συμμετέχοντα εργαστήρια για τη βελτίωση και επικύρωση της μεθόδου (12). Τα αποτελέσματα δίνονται στον πίνακα 2 του προσαρτήματος.

1.7. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.7.1. **Προκαταρκτική εκτίμηση του συντελεστή προσρόφησης**

Ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης-νερού P_{0W}. (= K_{oc}) και, σε έναν ορισμένο βαθμό, η υδατοδιαλυτότητα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες του βαθμού προσρόφησης, ιδιαίτερα για μη ιοντίσιμες ουσίες και, έτσι, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για προκαταρκτική εύρεση εύρους. Έχουν δημοσιευτεί ποικίλοι χρήσιμοι συσχετισμοί για διάφορες ομάδες χημικών ουσιών (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

1.7.2. **Εξοπλισμός**

Απαιτείται υγρός χρωματογράφος, εφοδιασμένος με απαλμική α\τλία και κατάλληλη διάταξη ανίχνευσης. Συνιστάται η χρήση βαλβίδας εγχύσεως με βρόχο εγχύσεως. Πρέπει να χρησιμοποιούνται διαθέσιμες στο εμπόριο κυανοπροπυ-λικές ρητίνες ενωμένες χημικώς σε βάση πυριτίας (π.χ. Hypersil και Zorbax CN). Μεταξύ του συστήματος εγχύσεως και της αναλυτικής στήλης μπορεί να τοποθετηθεί στήλη προφύλαξης. Οι στήλες από διάφορους προμηθευτές μπορεί να διαφέρουν σημαντικά από πλευράς ικανότητας διαχωρισμού. Κατά κανόνα, θα πρέπει να επιτυγχάνονται οι ακόλουθοι παράγοντες ικανότητας k': log k' > 0,0 για log K_{oc} = 3,0 και log k' > - 0,4 για log K_{oc} = 2,0 όταν, ως κινητή φάση, χρησιμοποιείται μεθανόλη/νερό 55/45 %.

1.7.3. **Κινητές φάσεις**

Έχουν δοκιμαστεί διάφορες κινητές φάσεις και από αυτές συνιστώνται οι ακόλουθες δύο:

— αεθανολη/νερό (55/45 % V/V).

— μεθανόλη/ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών 0,01 M, pH 6,0 (55:45 % v/v).

▼B

Για την παρασκευή του διαλύτη εκλούσεως χρησιμοποιούνται μεθανόλη καθαρότητας HPLC και απεσταγμένο νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών. Το μείγμα απαεριώνεται πριν από τη χρήση. Θα πρέπει να γίνεται χρήση ισοκρατικής εκλούσεως. Εάν τα μείγματα μεθανόλης/νερού δεν είναι κατάλληλα, μπορούν να δοκιμαστούν και μείγματα άλλου οργανικού διαλύτη/νερού, π.χ. μίγματα αιθανόλης/νερού ή ακετονιτριλίου/νερού. Για τις ιοντίσιμες ενώσεις, συνιστάται η χρησιμοποίηση ρυθμιστικού διαλύματος για τη σταθεροποίηση του πΗ. Πρέπει να δίδεται ιδιαίτερη προσοχή στην αποφυγή καθίζησης αλάτων και φθοράς της στήλης, πράγμα το οποίο μπορεί να συμβεί με ορισμένα μείγματα οργανικής φάσης/ρυθμιστικού.

Πρόσθετα, όπως αντιδραστήρια ιοντικού ζεύγους, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν επειδή μπορεί να επηρεάσουν τις ροφητικές ιδιότητες της στατικής φάσης. Οι αλλαγές αυτές της στατικής φάσης μπορεί να είναι μη αναστρέψιμες. Για το λόγο αυτό, πειράματα στα οποία χρησιμοποιούνται πρόσθετα, είναι υποχρεωτικό να γίνονται σε ξεχωριστές στήλες.

1.7.4. **Διαλυόμενα σώματα**

Οι ουσίες δοκιμής και αναφοράς θα πρέπει να διαλύονται στην κινητή φάση.

1.8. ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.8.1. **Συνθήκες δοκιμής**

Η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια των μετρήσεων θα πρέπει να καταγράφεται. Συνιστάται ζωηρά η χρησιμοποίηση διαμερίσματος στήλης ελεγχόμενης θερμοκρασίας για τη διασφάλιση σταθερών συνθηκών κατά τη διάρκεια των εργασιών διακρίβωσης και εκτίμησης και μέτρησης της υπό δοκιμή ουσίας.

1.8.2. **Προσδιορισμός του νεκρού χρόνου t_0**

Για τον προσδιορισμό του νεκρού χρόνου t_0, μπορούν να χρησιμοποιηθούν δύο διαφορετικές μέθοδοι (βλέπε επίσης σημείο 1.2).

1.8.2.1. *Προσδιορισμός του νεκρού χρόνου t_0 μέσω ομόλογης σειράς*

Η διαδικασία αυτή έχει αποδειχθεί ότι παρέχει αξιόπιστες και τυποποιημένες τιμές t_0. Για λεπτομέρειες, βλέπε μέθοδο δοκιμής Α.8: συντελεστής κατανομής (ηοκτανόλη/νερό), μέθοδος HPLC.

1.8.2.2. *Προσδιορισμός του νεκρού χρόνου t_0 με αδρανείς ουσίες που δεν κατακρατούνται από τη στήλη*

Η τεχνική αυτή βασίζεται στην έγχυση διαλυμάτων φορμαμιδίου, ουρίας ή νιτρικού νατρίου. Οι μετρήσεις θα πρέπει να γίνονται τουλάχιστον εις διπλούν.

1.8.3. **Προσδιορισμός των χρόνων κατακράτησης t_R**

Οι ουσίες αναφοράς θα πρέπει να επιλέγονται όπως περιγράφεται στο σημείο 1.3. Μπορούν να εγχύονται ως μικτό πρότυπο για τον προσδιορισμό των χρόνων κατακράτησής τους, υπό την προϋπόθεση ότι έχει επιβεβαιωθεί ότι ο χρόνος κατακράτησης κάθε κάθε προτύπου αναφοράς δην επηρεάζεται από την παρουσία των άλλων προτύπων αναφοράς. Η διακρίβωση θα πρέπει να εκτελείται σε τακτικά χρονικά διαστήματα δύο φορές, τουλάχιστον, ημερησίως, ώστε να λαμβάνονται υπόψη τυχόν απροσδόκητες μεταβολές στην απόδοση της στήλης. Το καλύτερο είναι, οι εγχύσεις διακρίβωσης να πραγματοποιούνται πριν και μετά τις εγχύσεις της υπό δοκιμή ουσίας ώστε να επιβεβαιώνεται ότι δεν έχουν υπάρξει μεταβολές στους χρόνους κατακράτησης. Οι υπό δοκιμή ουσίες εγχύονται ξεχωριστά σε όσο το δυνατό μικρότερες ποσότητες (για να αποφεύγεται υπερφόρτωση της στήλης) και προσδιορίζονται οι χρόνοι κατακράτησης τους.

▼B

Για την αύξηση της αξιοπιστίας της μετρήσεως, θα πρέπει να γίνονται δύο, τουλάχιστον, προσδιορισμοί. Οι τιμές του log K_{0C} που προέρχονται από μεμονωμένες μετρήσεις θα πρέπει να είναι σια όρια του 0,25 λογαριθμικής μονάδας.

1.8.4. **Εκτίμηση**

Οι παράγοντες ικανότητας k' υπολογίζονται από το νεκρό χρόνο t_0 και τους χρόνους κατακράτησης t_R των επιλεγμένων ουσιών αναφοράς σύμφωνα με την εξίσωση 4 (βλέπε σημείο 1.2). Στη συνέχεια, τα δεδομένα του log k' των ουσιών αναφοράς σημειώνονται επί χάρτου συναρτήσει των τιμών του log K_{oc} από δοκιμές ισορροπίας παρτίδας που εμφαίνονται στους πίνακες 1 και 3 του προσαρτήματος. Χρησιμοποιώντας τη γραφική αυτή συνάρτηση, η τιμή log k' μιας υπό δοκιμή ουσίας χρησιμοποιείται στη συνέχεια για τον προσδιορισμό της τιμής της log K_{OC} Εάν τα λαμβανόμενα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο K_{oc} της υπό δοκιμή ουσίας είναι εκτός της περιοχής διακρίβωσης, η δοκιμή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται χρησιμοποιώντας διαφορετικές, πιο κατάλληλες ουσίες αναφοράς.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΧΕΤΙΚΗ ΕΚΘΕΣΗ**

Στην έκθεση πρέπει να αναφέρονται τα ακόλουθα στοιχεία:

— ταυτότητα των ουσιών δοκιμής και αναφοράς και καθαρότητα τους, καθώς και οι τιμές pK_a, αν χρειάζεται,

— περιγραφή εξοπλισμού και συνθηκών εργασίας, π.χ. τύπος και διαστάσεις της αναλυτικής (και προφυλακτικής) στήλης, μέσα ανίχνευσης, κινητή φάση {λόγος συστατικών και pH), περιοχή θερμοκρασιών κατά τις μετρήσεις,

— νεκρός χρόνος και μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της,

— ποσότητες ουσιών δοκιμής και αναφοράς που εισάγονται στη στήλη,

— χρόνοι κατακράτησης των ουσιών αναφοράς που χρησιμοποιούνται για διακρίβωση,

— λεπτομέρειες για τη διαμορφωμένη καμπύλη αναγωγής (log k' συναρτήσει log K_{oc}) και γράφημα της καμπύλης αναγωγής,

— στοιχεία μέσου χρόνου κατακράτησης και εκτιμώμενη τιμή log K_{oc} για την υπό δοκιμή ουσία,

— χρωματογραφήματα.

3. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, Chap. 4, McGraw-Hill, New York.

(2) J. Hodson, N. A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 1 67.

(3) G. G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, pp. 1050-1059.

(4) C. T. Chiou, P. E. Porter, DAY. Schmedding (198 3). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, pp. 227-231.

(5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, pp. 297-312.

▼B

(6) C. T. Chiou, L. J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, pp. 831-832.

(7) S. W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, pp. 833-846.

(8) W. Kordel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), pp. 121-128.

(9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), pp. 2493-2504.

(10) \V. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12), pp. 2341-2352.

(11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, pp. 285-304.

(12) W. Kördel, G. Kotthoff,). Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), pp. 1373-1384.

▼B

Προσαρτημα

Πίνακας 1

Σύγκριση τιμών K_{OC} για εδάφη και λάσπες υπονόμων και εκτιμώμενες τιμές με τη μέθοδο προσανατολισμού HPLC [1] [2]

Ουσία	Αριθ. CAS	log K_{OC} λασπών υπονόμων	log K_{OC} HPLC	Δ	log K_{OC} εδαφών	log K_{OC} HPLC	Δ
Ατραζίνη	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuron	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fenthion	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuron	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Φαινανθρένιο	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Φαινυλεστέρας βενζοϊκού οξέος	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Βενζαμίδιο	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-Νιτροβενζαμίδιο	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Ακετανιλίδιο	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Ανιλίνη	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-Διχλωροανιλίνη	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

[1] W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), pp. 121-128.
[2] W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), pp. 107-119.

Πίνακας 2

Αποτελέσματα διεργαοτηριακής συγκριτικής δοκιμής (11 συμμετέχοντα εργαστήρια) που πραγματοποιήθηκε για τη βελτίωση και επικύρωση της μεθόδου HPLC [1]

Ουσία	Αριθ. CAS	log K_{oc}	K_{OC}	log $K_{(K}$
		(OECD 106)	(Μέθοδος HPLC)	
Ατραζίνη	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monuron	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapenthenol	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linuron	330-55-2	2,59	465 + 62	2,67
Fenthion	55-38-9	3,31	2062 ± 648	3,31

[1] W. Kördel, G. Kotthoff,]. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30([7]). pp. 1373-1384.

▼B

Πίνακας 3

Συνιστώμενες ουσίες αναφοράς για τη μέθοδο προσανατολισμού HPLC που βασίζεται σε δεδομένα προσρόφησης εδάφους

Ουσία αναφοράς	Αριθ. CAS	Μέσες τιμές log K_{OC} από ισορροπία παρτίδας	Αριθμός δεδομένων K_{oc}	log S.D.	Πηγή
Ακετανιλίδιο	103-84-4	1,25	4	0,48	(α)
Φαινόλη	108-95-2	1,32	4	0,70	(α)
2-Νιτροβενζαμίδιο	610-15-1	1,45	3	0,90	(β)
N, N-διμεθυλοβενζαμίδιο	611-74-5	1,52	2	0,45	(α)
4-Μεθυλοβενζαμίδιο	619-55-6	1,78	3	1,76	(α)
Βενζοικός μεθυλεστέρας	93-58-3	1,80	4	1,08	(α)
Ατραζίνη	1912-24-9	1,81	3	1,08	(γ)
Isoproturon	34123-59-6	1,86	5	1,53	(γ)
3-Νιτροβενζαμίδιο	645-09-0	1,95	3	1,31	(β)
Ανιλίνη	62-53-3	2,07	4	1,73	(α)
3,5-Δινιτροβενζαμίδιο	121-81-3	2,31	3	1,27	(β)
Carbendazim	10605-21-7	2,35	3	1,37	(γ)
Triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	(γ)
Triazoxide	72459-58-6	2,44	3	1,66	(γ)
Triazophos	24017-47-8	2,55	3	1,78	(γ)
Linuron	330-55-2	2,59	3	1,97	(γ)
Ναφθαλίνιο	91-20-3	2,75	4	2,20	(α)
Endosulfan-diol	2157-19-9	3,02	5	2,29	(γ)
Methiocarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	(γ)
Acid Yellow 219	63405-8 5-6	3,16	4	2,83	(α)
1,2,3-Τριγλωροβενζόλιο	87-61-6	3,16	4	1,40	(α)
γ-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	(α)
Fenthion	55-38-9	3,31	3	2,49	(γ)
Direct Red 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	(α)
Pyrazophos	13457-18-6	3,65	3	2,70	(γ)
a-Endosulfan	959-98-8	4,09	5	3,74	(γ)
Diclofop-methyl	51338-27-3	4,20	3	3,77	(γ)
Φαινανθρένιο	85-01-8	4,09	4	3,83	(α)
Basic Blue 41 (mix)	26850-47-5 12270-13-2	4,89	4	4,46	(α)
DDT	50-29-3	5,63	1	—	(β)

(α) W. Kördel, J. Müller (1994), Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R&D Report No 106 01044 (1904).
(β) B.V. Oepen. \V. Kördel. \V. Klein (1991)i. Chemosphere, 22, pp. 2S5-304,
(γ) Data provided by industry.

▼M7

Γ.20. ΔΟΚΙΜΉ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΣΕ *DAPHNIA MAGNA*

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 211 του ΟΟΣΑ (2012). Οι κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών του ΟΟΣΑ επανεξετάζονται κατά περιόδους με βάση την επιστημονική πρόοδο. Η κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών αναπαραγωγής 211 προέρχεται από την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 202, μέρος ΙΙ, Δοκιμή αναπαραγωγής σε *Daphnia* sp. (1984). Αναγνωρίζεται γενικά ότι τα δεδομένα από δοκιμές που διεξάγονται σύμφωνα με την εν λόγω TG 202 μπορεί να είναι μεταβλητά. Η διαπίστωση αυτή οδήγησε σε σημαντικές προσπάθειες για τον προσδιορισμό των λόγων στους οποίους οφείλεται η εν λόγω μεταβλητότητα, με σκοπό την κατάρτιση καλύτερης μεθόδου δοκιμών. Η κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 211 βασίζεται στα αποτελέσματα των σχετικών ερευνητικών δραστηριοτήτων, διεργαστηριακών δοκιμών τεχνικής ικανότητας (ring-test) και μελετών επικύρωσης που πραγματοποιήθηκαν το 1992 (1), το 1994 (2) και το 2008 (3).

Οι βασικές διαφορές μεταξύ του αρχικού κειμένου (TG 202, 1984) και της δεύτερης έκδοσης (TG211, 1998) της κατευθυντήριας γραμμής δοκιμών αναπαραγωγής είναι οι εξής:

— το συνιστώμενο είδος προς χρήση είναι το *Daphnia magna*·

— η διάρκεια της δοκιμής είναι 21 ημέρες·

— για ημιστατικές δοκιμές, ο αριθμός ζώων που πρέπει να χρησιμοποιούνται σε κάθε συγκέντρωση δοκιμής μειώθηκε από τουλάχιστον 40, κατά προτίμηση χωρισμένα σε τέσσερις ομάδες των 10 ζώων, σε τουλάχιστον 10 ζώα που διατηρούνται χωριστά (αν και μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικοί σχεδιασμοί σε δοκιμές συνεχούς ροής)·

— διατυπώθηκαν πιο συγκεκριμένες συστάσεις όσον αφορά το θρεπτικό μέσο δοκιμής και τις συνθήκες σίτισης.

— Οι βασικές διαφορές μεταξύ της δεύτερης έκδοσης της κατευθυντήριας γραμμής δοκιμών αναπαραγωγής (TG 211, 1998) και της παρούσας έκδοσης είναι οι εξής:

— προστέθηκε το προσάρτημα 7 για να περιγραφούν οι διαδικασίες αναγνώρισης του φύλου των νεογνών, εάν απαιτείται. Σύμφωνα και με τις προηγούμενες εκδόσεις της παρούσας μεθόδου δοκιμών, η αναλογία των φύλων είναι προαιρετικό τελικό σημείο·

— η μεταβλητή απόκρισης που συνίσταται στον αριθμό ζωντανών απογόνων ανά επιζώντα γεννήτορα συμπληρώνεται με μία επιπλέον μεταβλητή απόκρισης για την αναπαραγωγή της δαφνίας, δηλαδή τον συνολικό αριθμό ζωντανών απογόνων στο τέλος της δοκιμής ανά γονική δαφνία στην αρχή της, ενώ εξαιρείται από την ανάλυση η τυχαία και/ή απροσδόκητη γονική θνησιμότητα. Με την προστεθείσα μεταβλητή απόκρισης επιδιώκεται η εναρμόνιση των μεταβλητών απόκρισης με άλλες μεθόδους δοκιμών αναπαραγωγής σε ασπόνδυλα. Επιπλέον, με τη συγκεκριμένη μεταβλητή απόκρισης είναι δυνατόν, στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, να εξαλειφθεί μια πηγή σφάλματος, και συγκεκριμένα η επίδραση της απροσδόκητης και/ή τυχαίας γονικής θνησιμότητας, εάν επέλθει στη διάρκεια της περιόδου έκθεσης·

— προστίθενται στατιστικές κατευθύνσεις για τον σχεδιασμό της δοκιμής και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, τόσο για την προσέγγιση της ECx (π.χ. EC10 ή EC50) όσο και για την προσέγγιση της NOEC/LOEC·

— εισάγεται οριακή δοκιμή.

Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Πρωταρχικός στόχος της δοκιμής είναι να εκτιμηθούν οι επιδράσεις των χημικών ουσιών στην αναπαραγωγική απόδοση των καρκινοειδών του είδους *Daphnia magna*. Για τον σκοπό αυτό, νεαρές θηλυκές δαφνίες (οι γεννήτορες), ηλικίας μικρότερης των 24 ωρών κατά την έναρξη της δοκιμής, εκτίθενται σε μια σειρά υδατικών διαλυμάτων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η διάρκεια της δοκιμής είναι 21 ημέρες. Στο τέλος της δοκιμής, υπολογίζεται ο συνολικός αριθμός ζωντανών απογόνων. Η αναπαραγωγική απόδοση των γεννητόρων μπορεί να εκφραστεί και με άλλους τρόπους (π.χ. αριθμός ζωντανών απογόνων ανά ζώο ανά ημέρα, με αφετηρία την πρώτη ημέρα κατά

▼M7

την οποία παρατηρούνται απόγονοι), τα δεδομένα όμως αυτά θα πρέπει να αναφέρονται επιπλέον του συνολικού αριθμού ζωντανών απογόνων στο τέλος της δοκιμής. Λόγω του ιδιαίτερου σχεδιασμού της ημιστατικής δοκιμής σε σύγκριση με άλλες μεθόδους δοκιμών αναπαραγωγής με ασπόνδυλα, είναι επίσης δυνατόν να καταμετρώνται οι ζωντανοί απόγονοι κάθε επιμέρους γεννήτορα. Με τον τρόπο αυτό, σε αντίθεση με άλλες μεθόδους δοκιμών αναπαραγωγής με ασπόνδυλα, σε περίπτωση τυχαίου/απροσδόκητου θανάτου του γεννήτορα κατά τη διάρκεια της περιόδου δοκιμής, οι απόγονοί του μπορούν να εξαιρεθούν από την αξιολόγηση των δεδομένων. Ως εκ τούτου, σε περίπτωση γονικής θνησιμότητας στις εκτεθείσες επαναλήψεις (replicates), θα πρέπει να εξετάζεται αν η θνησιμότητα ακολουθεί μοντέλο σχέσης συγκέντρωσης-απόκρισης ή όχι, π.χ. αν παρατηρείται σημαντική παλινδρόμηση της απόκρισης συναρτήσει της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, με θετική κλίση (προς τούτο μπορεί να χρησιμοποιηθεί στατιστικός έλεγχος, όπως ο έλεγχος τάσης Cochran-Armitage). Εάν η θνησιμότητα δεν ακολουθεί μοντέλο σχέσης συγκέντρωσης-απόκρισης, οι επαναλήψεις με γονική θνησιμότητα θα πρέπει να εξαιρούνται από την ανάλυση του αποτελέσματος της δοκιμής. Εάν η θνησιμότητα ακολουθεί μοντέλο σχέσης συγκέντρωσης-απόκρισης, η γονική θνησιμότητα θα πρέπει να χαρακτηρίζεται επίδραση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και οι επαναλήψεις δεν θα πρέπει να εξαιρούνται από την ανάλυση. Σε περίπτωση θανάτου του γεννήτορα κατά τη διάρκεια της δοκιμής — τυχαίου, εξαιτίας εσφαλμένου χειρισμού του ζώου ή ατυχήματος, ή απροσδόκητου, λόγω ανεξήγητου περιστατικού που δεν συνδέεται με την επίδραση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας — ή εάν αποδειχθεί ότι ο γεννήτορας είναι αρσενικό άτομο, η αντίστοιχη επανάληψη εξαιρείται από την ανάλυση (βλ. περισσότερες λεπτομέρειες στην παράγραφο 51). Η τοξική επίδραση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην αναπαραγωγική απόδοση εκφράζεται ως ECx, με προσαρμογή των δεδομένων σε κατάλληλο μοντέλο με μη γραμμική παλινδρόμηση για την εκτίμηση της συγκέντρωσης που θα προκαλούσε x % μείωση της αναπαραγωγικής απόδοσης, ή εναλλακτικά ως τιμή NOEC/LOEC (4). *Οι συγκεντρώσεις δοκιμής θα πρέπει κατά προτίμηση να περικλείουν τη χαμηλότερη από τις χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις στις οποίες παρατηρείται επίδραση (π.χ. την EC_{10}), που σημαίνει ότι η τιμή αυτή θα υπολογίζεται με παρεμβολή και όχι με παρέκταση.*

Θα πρέπει επίσης να αναφέρονται η επιβίωση των γεννητόρων και ο χρόνος μέχρι την εμφάνιση της πρώτης γενεάς απογόνων. Μπορούν επίσης να εξετάζονται και άλλες σχετιζόμενες με τη χημική ουσία επιδράσεις σε παραμέτρους όπως η ανάπτυξη (π.χ. μήκος) και, ενδεχομένως, ο ενδογενής ρυθμός αύξησης του πληθυσμού (βλ. παράγραφο 44).

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

Τα αποτελέσματα δοκιμής οξείας τοξικότητας (βλ. κεφάλαιο Γ. 2 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμή οξείας ακινητοποίησης σε δαφνία), που διεξήχθη με το είδος καρκινοειδών *Daphnia magna*, μπορεί να είναι χρήσιμα για την επιλογή κατάλληλου εύρους συγκεντρώσεων δοκιμής για τις δοκιμές αναπαραγωγής. Θα πρέπει να είναι γνωστές η υδατοδιαλυτότητα και η τάση ατμών της υπό δοκιμή ουσίας και να υπάρχει αξιόπιστη αναλυτική μέθοδος για την ποσοτικοποίηση της χημικής ουσίας στα διαλύματα δοκιμής, μέθοδος της οποίας έχουν αναφερθεί η απόδοση ανάκτησης και το όριο προσδιορισμού.

Στις πληροφορίες σχετικά με την υπό δοκιμή χημική ουσία που μπορεί να είναι χρήσιμες για τον καθορισμό των συνθηκών δοκιμής περιλαμβάνονται ο συντακτικός τύπος, η καθαρότητα της ουσίας, η σταθερότητα στο φως, η σταθερότητα στις συνθήκες της δοκιμής, οι τιμές pKa και P_{ow}, καθώς και τα αποτελέσματα δοκιμών άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας [βλ. κεφάλαια Γ.4 (προσδιορισμός «άμεσης» βιοαποικοδομησιμότητας) και Γ.29 (άμεση βιοαποικοδομησιμότητα — CO_2 σε σφραγισμένα δοχεία) του παρόντος παραρτήματος].

ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η δοκιμή είναι έγκυρη, εφόσον οι μάρτυρες πληρούν τα ακόλουθα κριτήρια επιδόσεων:

— η θνησιμότητα των γεννητόρων (θηλυκές δαφνίες) δεν υπερβαίνει το 20 % στο τέλος της δοκιμής,

— ο μέσος αριθμός ζωντανών απογόνων ανά επιζώντα γεννήτορα στο τέλος της δοκιμής είναι ≥ 60.

Σημείωση: Το ίδιο κριτήριο εγκυρότητας (20 %) μπορεί να χρησιμοποιείται για την τυχαία και την απροσδόκητη γονική θνησιμότητα στους μάρτυρες και σε καθεμία από τις συγκεντρώσεις δοκιμής.

▼M7

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Εργαστηριακός εξοπλισμός

Τα δοχεία δοκιμής και ο λοιπός εξοπλισμός που έρχονται σε επαφή με τα διαλύματα δοκιμής θα πρέπει να αποτελούνται εξ ολοκλήρου από γυαλί ή άλλο χημικώς αδρανές υλικό. Τα δοχεία δοκιμής είναι κατά κανόνα γυάλινα ποτήρια ζέσεως.

Επιπλέον, απαιτούνται ορισμένα από τα ακόλουθα όργανα ή και όλα:

— οξυγονόμετρο (με μικροηλεκτρόδιο ή άλλο κατάλληλο εξοπλισμό μέτρησης διαλυμένου οξυγόνου σε δείγματα μικρού όγκου),

— κατάλληλη συσκευή ελέγχου της θερμοκρασίας,

— πεχάμετρο,

— εξοπλισμός προσδιορισμού της σκληρότητας του νερού,

— εξοπλισμός προσδιορισμού της συγκέντρωσης ολικού οργανικού άνθρακα (TOC) στο νερό ή εξοπλισμός προσδιορισμού του χημικώς απαιτούμενου οξυγόνου (COD),

— κατάλληλη συσκευή για τον έλεγχο του φωτισμού και τη μέτρηση της φωτεινής έντασης.

Οργανισμός δοκιμής

Το είδος που πρέπει να χρησιμοποιείται στη δοκιμή είναι το *Daphnia magna* Straus ([1]).

Ο κλώνος θα πρέπει κατά προτίμηση να έχει ταυτοποιηθεί με γονοτύπηση. Η έρευνα (1) έδειξε ότι η αναπαραγωγική απόδοση του κλώνου A (ο οποίος προέρχεται από το ερευνητικό ινστιτούτο IRCHA της Γαλλίας) (5) ανταποκρίνεται σταθερά στο κριτήριο εγκυρότητας που απαιτεί να είναι ≥ 60 ο μέσος όρος των ζωντανών απογόνων ανά επιζώντα γεννήτορα, όταν καλλιεργούνται στις συνθήκες που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών. Είναι όμως αποδεκτοί και άλλοι κλώνοι, αρκεί να αποδεικνύεται ότι η καλλιέργεια δαφνιών ανταποκρίνεται στα κριτήρια εγκυρότητας της δοκιμής.

Κατά την έναρξη της δοκιμής, τα ζώα θα πρέπει να είναι ηλικίας μικρότερης των 24 ωρών και να μην είναι απόγονοι πρώτης γέννας. Θα πρέπει επίσης να προέρχονται από υγιές απόθεμα (να μην εμφανίζουν δηλαδή σημεία καταπόνησης, όπως υψηλή θνησιμότητα, παρουσία αρσενικών και εφιππίων, καθυστέρηση στη γέννηση της πρώτης γέννας, αποχρωματισμένα ζώα κ.λπ.). Τα ζώα του αποθέματος θα πρέπει να διατηρούνται σε συνθήκες καλλιέργειας (φωτισμός, θερμοκρασία, θρεπτικό μέσο, διατροφή και αριθμός ζώων ανά μονάδα όγκου) παρόμοιες με εκείνες υπό τις οποίες θα διεξαχθεί η δοκιμή. Εάν το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας δαφνιών που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή διαφέρει από το χρησιμοποιούμενο για τις συνήθεις καλλιέργειες δαφνιών, η ορθή πρακτική υπαγορεύει να προηγείται της δοκιμής ένα χρονικό διάστημα εγκλιματισμού τριών συνήθως εβδομάδων (δηλ. μιας γενεάς), ώστε να αποφεύγεται η καταπόνηση των γεννητόρων.

Θρεπτικό μέσο δοκιμής

Συνιστάται η χρησιμοποίηση επακριβώς καθορισμένου θρεπτικού μέσου στην παρούσα δοκιμή. Αποφεύγεται με τον τρόπο αυτόν η χρήση προσθέτων (π.χ. φύκη, εκχυλίσματα εδάφους κ.λπ.), που χαρακτηρίζονται δύσκολα, με αποτέλεσμα να βελτιώνονται οι δυνατότητες τυποποίησης μεταξύ εργαστηρίων. Μέσα κατάλληλα προς τούτο θεωρούνται τα Elendt M4 (6) και M7 (βλέπε προσάρτημα 2). Αποδεκτά είναι όμως κι άλλα μέσα [π.χ. (7) (8)], αρκεί οι επιδόσεις της καλλιέργειας δαφνιών να ανταποκρίνονται αποδεδειγμένα στα κριτήρια εγκυρότητας της δοκιμής.

([1]) Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες δαφνίδες, υπό τον όρο ότι ανταποκρίνονται στα κριτήρια εγκυρότητας, κατά περίπτωση (το κριτήριο εγκυρότητας που αφορά την αναπαραγωγική απόδοση των μαρτύρων θα πρέπει κανονικά να αφορά όλα τα είδη). Εάν χρησιμοποιούνται άλλες δαφνίδες θα πρέπει να ταυτοποιούνται επακριβώς και να αιτιολογείται η χρήση τους.

▼M7

Εάν χρησιμοποιούνται θρεπτικά μέσα που περιέχουν ακαθόριστα πρόσθετα, τα τελευταία θα πρέπει να προσδιορίζονται επακριβώς και στην έκθεση της δοκιμής, να παρέχονται πληροφορίες για τη σύνθεσή τους, αναφορικά κυρίως με την περιεκτικότητα σε άνθρακα, δεδομένου ότι αυτή μπορεί να συνεισφέρει στο χορηγούμενο σιτηρέσιο. Συνιστάται να προσδιορίζεται ο ολικός οργανικός άνθρακας (TOC) και/ή το χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (COD) του παρασκευάσματος παρακαταθήκης του οργανικού προσθέτου και να εκτιμάται η συνακόλουθη συνεισφορά του στην περιεκτικότητα του θρεπτικού μέσου δοκιμής σε TOC/COD. Συνιστάται επιπλέον να μην υπερβαίνουν τα επίπεδα TOC στο θρεπτικό μέσο (προτού προστεθούν τα φύκη) τα 2 mg/l (9).

Όταν οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες περιέχουν μέταλλα, είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη ότι οι ιδιότητες του θρεπτικού μέσου δοκιμής (π.χ. σκληρότητα, ικανότητα χηλίωσης) μπορεί να έχουν επίπτωση στην τοξικότητα της υπό δοκιμή ουσίας. Για τον λόγο αυτό, είναι σκόπιμο να χρησιμοποιείται πλήρως καθορισμένο θρεπτικό μέσο. Τα μόνα όμως πλήρως καθορισμένα θρεπτικά μέσα που είναι γνωστό ότι ενδείκνυνται για μακροχρόνιες καλλιέργειες *Daphnia magna* είναι επί του παρόντος τα Elendt M4 και M7. Περιέχουν και τα δύο το χηλικό αντιδραστήριο EDTA. Έχει προκύψει από εργασίες (2) ότι η «φαινόμενη τοξικότητα» του καδμίου είναι κατά κανόνα χαμηλότερη όταν για τη δοκιμή αναπαραγωγής χρησιμοποιούνται τα μέσα M4 και M7 σε σύγκριση με τη χρήση μέσων που δεν περιέχουν EDTA. Συνεπώς, τα μέσα M4 και M7 δεν συνιστώνται για τις δοκιμές χημικών ουσιών που περιέχουν μέταλλα, θα πρέπει δε να αποφεύγονται και άλλα μέσα που περιέχουν γνωστά χηλικά αντιδραστήρια. Για τις χημικές ουσίες που περιέχουν μέταλλα, είναι ίσως σκόπιμο να χρησιμοποιείται εναλλακτικό θρεπτικό μέσο όπως, π.χ. το σκληρό γλυκό ανασυσταθέν ύδωρ κατά ASTM (9), που δεν περιέχει EDTA. Ο συνδυασμός του σκληρού γλυκού ανασυσταθέντος ύδατος κατά ASTM με εκχύλισμα φυκών (10) είναι κατάλληλος για τη μακροχρόνια καλλιέργεια *Daphnia magna* (2).

Η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 3 mg/l στην αρχή και κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Το pH θα πρέπει να βρίσκεται στην περιοχή 6-9 και, κανονικά, να μην μεταβάλλεται κατά περισσότερο από 1,5 μονάδες στη διάρκεια της δοκιμής. Η σκληρότητα (εκφρασμένη ως $CaCO_3$) συνιστάται να είναι μεγαλύτερη από 140 mg/l. Δοκιμές που διεξήχθησαν με την τιμή αυτή ή και μεγαλύτερες έδειξαν αναπαραγωγικές επιδόσεις ανταποκρινόμενες στα κριτήρια εγκυρότητας (11) (12).

Διαλύματα δοκιμής

Τα διαλύματα δοκιμής των επιλεγμένων συγκεντρώσεων παρασκευάζονται συνήθως με αραίωση διαλύματος παρακαταθήκης. Τα διαλύματα παρακαταθήκης θα πρέπει να παρασκευάζονται, κατά προτίμηση, χωρίς τη χρήση διαλυτών ή μέσων διασποράς, στο μέτρο του δυνατού, με ανάμειξη ή ανάδευση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο θρεπτικό μέσο δοκιμής με τη βοήθεια μηχανικών μέσων, όπως η ανακίνηση, η ανάδευση ή η έκθεση σε υπερήχους, ή με άλλες κατάλληλες μεθόδους. Είναι προτιμότερο να εκτίθενται τα συστήματα δοκιμής στις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στη μελέτη, για όσο χρονικό διάστημα απαιτείται για να αποδειχθεί η διατήρηση σταθερών συγκεντρώσεων έκθεσης, πριν από την εισαγωγή των υπό δοκιμή οργανισμών. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι δυσδιάλυτη στο νερό, θα πρέπει να ακολουθούνται οι διαδικασίες που προβλέπονται στο έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ σχετικά με τον χειρισμό δύσκολων ουσιών (13). Η χρήση διαλυτών ή μέσων διασποράς θα πρέπει να αποφεύγεται, αλλά μπορεί να είναι απαραίτητη σε ορισμένες περιπτώσεις, προκειμένου να παρασκευασθεί ένα κατάλληλα πυκνό διάλυμα παρακαταθήκης.

Εκτός από τις συγκεντρώσεις δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνεται στη δοκιμή μάρτυρας με νερό αραίωσης και, εάν είναι αναπόφευκτο, μάρτυρας με διαλύτη, με επαρκή αριθμό επαναλήψεων και στις δύο περιπτώσεις. Για τη δοκιμή θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο διαλύτες ή μέσα διασποράς που, σύμφωνα με τα αποτελέσματα ερευνών, έχουν ασήμαντες ή ελάχιστες επιπτώσεις στην μεταβλητή απόκρισης Παραδείγματα κατάλληλων διαλυτών (π.χ. ακετόνη, αιθανόλη, μεθανόλη, διμεθυλοφορμαμίδιο και τριαιθυλενογλυκόλη) και μέσων διασποράς (π.χ. Cremophor RH 40, μεθυλοκυτταρίνη 0,01 % και HCO-40) παρέχονται στη βιβλιογραφική παραπομπή (13). Όταν χρησιμοποιείται διαλύτης ή μέσο διασποράς, η τελική του συγκέντρωση θα πρέπει να μην υπερβαίνει το 0,1 ml/l (13) και

▼M7

να είναι η ίδια σε όλα τα δοχεία δοκιμής, εκτός από εκείνο που περιέχει τον μάρτυρα με νερό αραίωσης. Ωστόσο, θα πρέπει να καταβάλλεται κάθε δυνατή προσπάθεια για να διατηρείται η συγκέντρωση του διαλύτη στα κατώτατα δυνατά επίπεδα.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Συνθήκες έκθεσης

Διάρκεια

Η διάρκεια της δοκιμής είναι 21 ημέρες.

Πληθυσμιακός φόρτος

Οι γεννήτορες διατηρούνται σε ατομικά δοχεία δοκιμής που περιέχουν συνήθως 50-100 ml θρεπτικού μέσου (για το είδος *Daphnia magna*, ενώ είναι δυνατόν να απαιτούνται μικρότεροι όγκοι, ιδίως για μικρότερες δαφνιίδες, π.χ. του είδους *Ceriodaphnia dubia*), εκτός εάν απαιτείται σχεδιασμός δοκιμής συνεχούς ροής.

Ενδέχεται να χρειαστούν σε ορισμένες περιπτώσεις μεγαλύτεροι όγκοι για την ικανοποίηση των απαιτήσεων της ακολουθούμενης αναλυτικής διαδικασίας για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, μολονότι επιτρέπεται η συγχώνευση επαναλήψεων για τη χημική ανάλυση. Εάν χρησιμοποιηθούν όγκοι μεγαλύτεροι από 100 ml, ενδέχεται να χρειαστεί να αυξηθεί η μερίδα που χορηγείται στις δαφνίες, για να διασφαλιστεί αφθονία τροφής και να πληρούνται τα κριτήρια εγκυρότητας.

Πειραματόζωα

Για τις ημιστατικές δοκιμές απαιτούνται 10 τουλάχιστον ζώα, το καθένα από τα οποία εκτίθεται σε κάθε συγκέντρωση δοκιμής, και 10 τουλάχιστον ζώα για τη σειρά των μαρτύρων.

Για τις δοκιμές συνεχούς ροής, έχει αποδειχθεί ότι κατάλληλος αριθμός είναι 40 ζώα σε τέσσερις ομάδες των 10 για κάθε συγκέντρωση δοκιμής (1). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί μικρότερος αριθμός οργανισμών δοκιμής, συνιστώνται όμως τουλάχιστον 20 ζώα ανά συγκέντρωση κατανεμημένα σε δύο ή περισσότερες ομάδες επανάληψης με τον ίδιο αριθμό ζώων (π.χ. τέσσερις ομάδες επανάληψης των πέντε δαφνιίδων). Να σημειωθεί ότι, σε δοκιμές όπου τα ζώα διατηρούνται ομαδικά, δεν είναι δυνατόν να εξαιρεθούν απόγονοι από τη στατιστική ανάλυση σε περίπτωση απροσδόκητης/τυχαίας γονικής θνησιμότητας αφού έχει αρχίσει η αναπαραγωγή και, ως εκ τούτου, στις περιπτώσεις αυτές, η αναπαραγωγική απόδοση θα πρέπει να εκφράζεται ως συνολικός αριθμός ζωντανών απογόνων ανά παρόντα στην αρχή της δοκιμής γεννήτορα.

Η κατανομή των μεταχειρίσεων μεταξύ των δοχείων δοκιμής και όλοι οι μετέπειτα χειρισμοί τους θα πρέπει να γίνονται κατά τρόπο τυχαίο. Σε αντίθετη περίπτωση, ενδέχεται να προκύψει μεροληψία που θα μπορούσε να ερμηνευθεί ως επίδραση της συγκέντρωσης. Πιο συγκεκριμένα, εάν ο χειρισμός των πειραματικών μονάδων γίνεται κατά σειρά μεταχείρισης ή συγκέντρωσης, τότε κάποιο φαινόμενο συνδεόμενο με τον χρόνο, π.χ. κόπωση του τεχνικού ή άλλο σφάλμα, θα μπορούσε να πολλαπλασιάσει τις επιδράσεις των υψηλότερων συγκεντρώσεων. Επιπλέον, εάν υπάρχει πιθανότητα επηρεασμού των αποτελεσμάτων της δοκιμής από μια αρχική ή περιβαλλοντική συνθήκη της δοκιμής, όπως π.χ. η θέση στο εργαστήριο, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο εκτέλεσης της δοκιμής σε παρτίδες (μπλοκ).

Σίτιση

Στις ημιστατικές δοκιμές, η τροφή θα πρέπει κατά προτίμηση να χορηγείται καθημερινά, και πάντως τουλάχιστον τρεις φορές εβδομαδιαίως (δηλ. παράλληλα με κάθε αλλαγή θρεπτικού μέσου). Η ενδεχόμενη αραίωση των συγκεντρώσεων έκθεσης λόγω της προσθήκης της τροφής θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη και να αποφεύγεται όσο το δυνατόν περισσότερο, με επαρκώς πυκνά εναιωρήματα φυκών. Τυχόν διαφοροποιήσεις (π.χ. σε δοκιμές συνεχούς ροής) θα πρέπει να αναφέρονται.

Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, το σιτηρέσιο των γεννητόρων θα πρέπει κατά προτίμηση να συνίσταται σε ζωντανά μονοκύτταρα φύκη ενός ή περισσοτέρων από τα ακόλουθα είδη: *Chlorella* sp., *Pseudokirchneriella subcapitata* (πρώην *Selenastrum capricornutum*) και *Desmodesmus subspicatus* (πρώην *Scenedesmus subspicatus*). Το χορηγούμενο σιτηρέσιο θα πρέπει να βασίζεται στην ποσότητα οργανικού άνθρακα (C) που παρέχεται σε κάθε γεννήτορα. Η έρευνα (14) έχει δείξει ότι, για το είδος *Daphnia magna*, μερίδες μεταξύ 0,1 και 0,2 mg C/δαφνία/ημέρα αρκούν για να επιτευχθεί ο απαιτούμενος αριθμός ζωντανών απογόνων ώστε να πληρούνται τα κριτήρια εγκυρότητας της δοκιμής. Η μερίδα μπορεί να

▼M7

χορηγείται είτε με σταθερό ρυθμό καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής είτε, εάν κριθεί σκόπιμο, με βραδύτερο ρυθμό στην αρχή, που θα αυξάνεται στη συνέχεια για να λαμβάνεται υπόψη η ανάπτυξη των γεννητόρων. Στην περίπτωση αυτή, ωστόσο, η μερίδα πρέπει πάντοτε να παραμένει στη συνιστώμενη περιοχή των 0,1 έως 0,2 mg C/δαφνία/ημέρα.

Εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικές παράμετροι για τον υπολογισμό της απαιτούμενης μερίδας, όπως π.χ. ο αριθμός κυττάρων φυκών ή η απορρόφηση του φωτός (για πρακτικούς λόγους, δεδομένου ότι η μέτρηση της περιεκτικότητας σε άνθρακα είναι χρονοβόρος), κάθε εργαστήριο θα πρέπει να εκπονεί το δικό του νομογράφημα που να συνδέει την εναλλακτική παράμετρο με την περιεκτικότητα της καλλιέργειας φυκών σε άνθρακα (βλ. συστάσεις για την εκπόνηση νομογραφήματος στο παράρτημα 3). Τα νομογραφήματα θα πρέπει να ελέγχονται τουλάχιστον σε ετήσια βάση, συχνότερα δε εάν μεταβληθούν στο μεταξύ οι συνθήκες της καλλιέργειας φυκών. Έχει διαπιστωθεί ότι η απορρόφηση του φωτός υπερτερεί του αριθμού κυττάρων ως υποκατάστατο της περιεκτικότητας σε άνθρακα (15).

Οι δαφνίες θα πρέπει να σιτίζονται με πυκνό εναιώρημα φυκών, ώστε ο όγκος θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας φυκών που μεταγγίζεται στα δοχεία δοκιμής να είναι ο ελάχιστος δυνατός. Συμπύκνωση των φυκών μπορεί να επιτευχθεί με φυγοκέντρηση και σχηματισμό νέου εναιωρήματος σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας δαφνιών.

Φως

Δεκαέξι ώρες φωτός, με ένταση που δεν υπερβαίνει τα 15-20 μE · m^{-2} · s^{-1} μετρούμενη στην επιφάνεια του νερού των δοχείων. Στην περίπτωση των φωτομέτρων που είναι βαθμονομημένα σε lux, το πεδίο τιμών 1 000-1 500 lux, προκειμένου για ψυχρό λευκό φως, αντιστοιχεί περίπου στη συνιστώμενη φωτεινή ένταση των 15-20 μE · m^{-2} · s^{-1}.

Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία των θρεπτικών μέσων δοκιμής θα πρέπει να είναι 18-22 °C. Ωστόσο, στη διάρκεια κάθε δοκιμής, θα πρέπει κατά το δυνατόν να μην αποκλίνει από τα όρια αυτά κατά περισσότερο από 2 °C (π.χ. 18-20, 19-21 ή 20-22 °C) ως ημερήσιο εύρος τιμών. Για τις ανάγκες παρακολούθησης της θερμοκρασίας, ενδείκνυται ίσως η χρήση ενός επιπλέον δοχείου δοκιμής.

Αερισμός

Τα δοχεία δεν θα πρέπει να αερίζονται κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

Σχεδιασμός της δοκιμής

Δοκιμή προσδιορισμού εύρους δόσεων

Όταν είναι αναγκαίο, διεξάγεται δοκιμή προσδιορισμού εύρους δόσεων, για παράδειγμα με πέντε συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και δύο επαναλήψεις για κάθε μεταχείριση και μάρτυρα. Πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με την οξεία τοξικότητα για τη δαφνία και/ή άλλους υδρόβιους οργανισμούς, προερχόμενες από δοκιμές με παρόμοιες χημικές ουσίες ή από τη βιβλιογραφία, μπορεί επίσης να είναι χρήσιμες για να αποφασιστεί το εύρος συγκεντρώσεων που θα χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή προσδιορισμού εύρους δόσεων.

Η διάρκεια της δοκιμής προσδιορισμού εύρους δόσεων είναι 21 ημέρες ή επαρκές χρονικό διάστημα για την αξιόπιστη πρόβλεψη των επιπέδων επίδρασης. Στο τέλος της δοκιμής, αξιολογείται η αναπαραγωγή των δαφνιών. Θα πρέπει να καταγράφονται ο αριθμός των γεννητόρων και η εμφάνιση απογόνων.

Οριστική δοκιμή

Κανονικά, η δοκιμή θα πρέπει να διεξάγεται με πέντε τουλάχιστον συγκεντρώσεις που να περικλείουν την αποτελεσματική συγκέντρωση (π.χ. EC_x) και να είναι διατεταγμένες σε γεωμετρική πρόοδο, με λόγο προόδου που να μην υπερβαίνει, κατά προτίμηση, το 3,2. Για κάθε συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να χρησιμοποιείται κατάλληλος αριθμός επαναλήψεων (βλ. παραγράφους 24-25). Εάν χρησιμοποιούνται λιγότερες από πέντε συγκεντρώσεις, η επιλογή αυτή θα πρέπει να αιτιολογείται. Οι χημικές ουσίες δεν θα πρέπει να ελέγχονται σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από το όριο διαλυτότητάς τους στο θρεπτικό μέσο

▼M7

της δοκιμής. Πριν από την εκτέλεση του πειράματος είναι σκόπιμο να εξετάζεται η στατιστική ισχύς του σχεδιασμού της δοκιμής με τη χρήση κατάλληλων στατιστικών μεθόδων (4). Κατά τον καθορισμό του εύρους συγκεντρώσεων θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα ακόλουθα:

i) Όταν εκτιμάται η EC_x που σχετίζεται με επιδράσεις στην αναπαραγωγή, είναι σκόπιμο να χρησιμοποιούνται επαρκείς συγκεντρώσεις για τον καθορισμό της τιμής της με την ενδεδειγμένη στάθμη εμπιστοσύνης. Οι χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις δοκιμής θα πρέπει, κατά προτίμηση, να περικλείουν την εκτιμώμενη EC_x, ώστε η τιμή της να προκύπτει με παρεμβολή και όχι με παρέκταση. Είναι πλεονέκτημα για τη μετέπειτα στατιστική ανάλυση να υπάρχουν περισσότερες συγκεντρώσεις δοκιμής (π.χ. 10) και λιγότερες επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση (π.χ. 5, με αποτέλεσμα να παραμένει σταθερός ο συνολικός αριθμός των δοχείων) και 10 μάρτυρες.

ii) Κατά την εκτίμηση της LOEC και/ή NOEC, η κατώτατη συγκέντρωση θα πρέπει να είναι αρκούντως χαμηλή ώστε η αναπαραγωγική απόδοση στην εν λόγω συγκέντρωση να μην είναι σημαντικά μικρότερη σε σχέση με τον μάρτυρα. Σε αντίθετη περίπτωση, η δοκιμή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται με μειωμένη κατώτατη συγκέντρωση.

iii) Κατά την εκτίμηση της LOEC και/ή NOEC, η ανώτατη συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να είναι αρκούντως υψηλή, ώστε η αναπαραγωγική απόδοση στην εν λόγω συγκέντρωση να είναι σημαντικά μικρότερη σε σχέση με τον μάρτυρα. Σε αντίθετη περίπτωση, η δοκιμή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται με αυξημένη ανώτατη συγκέντρωση, εκτός εάν ως ανώτατη συγκέντρωση κατά την αρχική δοκιμή χρησιμοποιήθηκε η μέγιστη απαιτούμενη συγκέντρωση δοκιμής για χρόνιες επιδράσεις (δηλ. 10 mg/l).

Εάν δεν παρατηρηθεί καμία επίδραση στην υψηλότερη συγκέντρωση κατά τη δοκιμή προσδιορισμού εύρους δόσεων (π.χ. σε 10 mg/l) ή όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι πολύ πιθανό να είναι χαμηλής/μηδενικής τοξικότητας με βάση την απουσία τοξικότητας για άλλους οργανισμούς και/ή τη μικρή/μηδενική πρόσληψη, η δοκιμή αναπαραγωγής μπορεί να διεξαχθεί ως οριακή δοκιμή, με τη χρήση συγκέντρωσης δοκιμής της τάξης των 10 mg/l και ενός μάρτυρα. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται δέκα επαναλήψεις, τόσο για τις ομάδες μεταχείρισης όσο και για τις ομάδες μαρτύρων. Όταν είναι ενδεχομένως αναγκαίο να διεξαχθεί οριακή δοκιμή με σύστημα συνεχούς ροής, επαρκούν λιγότερες επαναλήψεις. Η οριακή δοκιμή προσφέρει την ευκαιρία να καταδειχθεί ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές επιδράσεις στην οριακή συγκέντρωση, αλλά εάν καταγραφούν επιδράσεις, απαιτείται κατά κανόνα πλήρης δοκιμή.

Μάρτυρες

Επιπλέον της σειράς των συγκεντρώσεων δοκιμής, θα πρέπει να περιλαμβάνονται στη δοκιμή μια σειρά μαρτύρων του θρεπτικού μέσου δοκιμής και, κατά περίπτωση, μια σειρά μαρτύρων που να περιέχουν τον διαλύτη ή το μέσο διασποράς. Όταν χρησιμοποιείται διαλύτης ή μέσο διασποράς, η συγκέντρωσή του θα πρέπει να είναι η ίδια με την χρησιμοποιούμενη στα δοχεία που περιέχουν την υπό δοκιμή ουσία. Επιπλέον, απαιτείται κατάλληλος αριθμός επαναλήψεων (βλ. παραγράφους 23-24).

Γενικότερα, εάν η δοκιμή εκτελεστεί σωστά, ο συντελεστής μεταβλητότητας του μέσου αριθμού ζωντανών απογόνων ανά γεννήτορα στους μάρτυρες θα πρέπει να είναι ≤ 25 % και το στοιχείο αυτό θα πρέπει να αναφέρεται όταν πρόκειται για σχεδιασμούς δοκιμών κατά τις οποίες τα ζώα διατηρούνται σε ατομικά δοχεία.

Ανανέωση του θρεπτικού μέσου

Η συχνότητα ανανέωσης του θρεπτικού μέσου εξαρτάται από τη σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, θα πρέπει πάντως να είναι τουλάχιστον τρεις φορές εβδομαδιαίως. Εάν σε προκαταρκτικές δοκιμές σταθερότητας (βλ. παράγραφο 7) έχει διαπιστωθεί ότι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας δεν είναι σταθερή (βρίσκεται δηλαδή εκτός των ορίων 80-120 % της ονομαστικής συγκέντρωσης ή μειώνεται σε επίπεδα κάτω του 80 % της μετρηθείσας αρχικής συγκέντρωσης) κατά τη μέγιστη περίοδο ανανέωσης (3 ημέρες), θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο να ανανεώνεται συχνότερα το θρεπτικό μέσο ή να διεξαχθεί δοκιμή συνεχούς ροής.

▼M7

Κατά την ανανέωση του θρεπτικού μέσου σε ημιστατικές δοκιμές, ετοιμάζεται μια δεύτερη σειρά δοχείων δοκιμής, όπου μεταφέρονται οι γεννήτορες, π.χ. με γυάλινο σιφώνιο κατάλληλης διαμέτρου. Ο όγκος του θρεπτικού μέσου που μεταγγίζεται μαζί με τις δαφνίες θα πρέπει να είναι ο ελάχιστος δυνατός.

Παρατηρήσεις

Τα αποτελέσματα των παρατηρήσεων κατά τη δοκιμή θα πρέπει να καταγράφονται σε πίνακες (βλ. παραδείγματα στα προσαρτήματα 4 και 5). Αν χρειαστεί να γίνουν κι άλλες μετρήσεις (βλ. παράγραφο 44), θα υπάρξουν ενδεχομένως κι άλλες παρατηρήσεις.

Απόγονοι

Οι απόγονοι κάθε γεννήτορα είναι προτιμότερο να απομακρύνονται από τα δοχεία και να καταμετρώνται σε ημερήσια βάση, αφότου εμφανιστεί η πρώτη γέννα, ώστε να μην καταναλώνουν τροφή προοριζόμενη για τους γεννήτορες. Για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου δοκιμών, είναι αναγκαίο να καταμετρώνται μόνο οι ζωντανοί απόγονοι, θα πρέπει όμως να καταγράφονται τα αβγά που δεν εκκολάφθηκαν, καθώς και οι νεκροί απόγονοι.

Θνησιμότητα

Η θνησιμότητα των γεννητόρων θα πρέπει να καταγράφεται σε ημερήσια κατά προτίμηση βάση και, τουλάχιστον, κάθε φορά που καταμετρώνται οι απόγονοι.

Άλλες παράμετροι

Μολονότι η παρούσα μέθοδος δοκιμών αποβλέπει κατά κύριο λόγο στην αξιολόγηση των επιδράσεων στην αναπαραγωγική απόδοση, ενδέχεται να παρατηρηθούν και άλλες επιδράσεις, επαρκώς ποσοτικοποιημένες ώστε να είναι εφικτή η στατιστική τους ανάλυση. Μπορεί να καταγράφεται η αναπαραγωγική απόδοση ανά επιζώντα γεννήτορα, δηλ. ο αριθμός ζωντανών απογόνων που γεννήθηκαν κατά τη διάρκεια της δοκιμής ανά επιζώντα γεννήτορα. Ο αριθμός αυτός μπορεί να συγκρίνεται με την κύρια μεταβλητή απόκρισης (αναπαραγωγική απόδοση ανά γεννήτορα παρόντα στην αρχή της δοκιμής που δεν πέθανε τυχαία ή απροσδόκητα κατά τη διάρκεια της δοκιμής). Σε περίπτωση γονικής θνησιμότητας σε εκτεθείσες επαναλήψεις, θα πρέπει να εξετάζεται αν η θνησιμότητα ακολουθεί μοντέλο σχέσης συγκέντρωσης-απόκρισης ή όχι, π.χ. αν παρατηρείται σημαντική παλινδρόμηση της απόκρισης συναρτήσει της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, με θετική κλίση (προς τούτο μπορεί να χρησιμοποιηθεί στατιστικός έλεγχος, όπως ο έλεγχος τάσης Cochran-Armitage). Εάν η θνησιμότητα δεν ακολουθεί μοντέλο σχέσης συγκέντρωσης-απόκρισης, οι επαναλήψεις με γονική θνησιμότητα θα πρέπει να εξαιρούνται από την ανάλυση του αποτελέσματος της δοκιμής. Εάν η θνησιμότητα ακολουθεί μοντέλο σχέσης συγκέντρωσης-απόκρισης, η γονική θνησιμότητα θα πρέπει να χαρακτηρίζεται επίδραση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και οι επαναλήψεις δεν θα πρέπει να εξαιρούνται από την ανάλυση του αποτελέσματος της δοκιμής. Οι μετρήσεις της ανάπτυξης είναι ιδιαίτερα επιθυμητές, διότι παρέχουν πληροφορίες για πιθανές υποθανατηφόρες επιδράσεις, οι οποίες ενδέχεται να είναι χρήσιμες συμπληρωματικά στις παραμέτρους αναπαραγωγής. Συνιστάται η μέτρηση του μήκους των γεννητόρων (μήκος του σώματος χωρίς την εδρική άκανθα) στο τέλος της δοκιμής. Άλλες παράμετροι που μπορούν να μετρηθούν ή να υπολογιστούν είναι ο χρόνος μέχρι την εμφάνιση της πρώτης γέννας (και των επόμενων), ο αριθμός και το μέγεθος των γεννών ανά ζώο, ο αριθμός των αυγών που δεν εκκολάφθηκαν, η παρουσία αρσενικών νεογνών (ΟΟΣΑ, 2008) ή εφιππίων και, ενδεχομένως, ο ενδογενής ρυθμός αύξησης του πληθυσμού (βλ. ορισμό στο προσάρτημα 1 και αναγνώριση του φύλου των νεογνών στο προσάρτημα 7).

Συχνότητα αναλυτικών προσδιορισμών και μετρήσεων

Η συγκέντρωση του οξυγόνου, η θερμοκρασία, η σκληρότητα και το pH θα πρέπει να μετρώνται τουλάχιστον μία φορά εβδομαδιαίως, πριν και μετά την ανανέωση του θρεπτικού μέσου, στους μάρτυρες και στην υψηλότερη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, οι συγκεντρώσεις της δοκιμαζόμενης ουσίας προσδιορίζονται σε τακτά διαστήματα.

Στις ημιστατικές δοκιμές όπου η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας αναμένεται να παραμένει εντός ορίων ± 20 % της ονομαστικής τιμής (να βρίσκεται δηλαδή εντός του εύρους 80-120 % — βλ. παραγράφους 6, 7 και 39), συνιστάται να προσδιορίζονται τουλάχιστον η υψηλότερη και η χαμηλότερη

▼M7

συγκέντρωση αμέσως μόλις παρασκευαστούν τα διαλύματα και κατά τον χρόνο ανανέωσης, μία φορά κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας της δοκιμής (δηλ. θα πρέπει να υποβάλλονται σε ανάλυση δείγματα του ίδιου διαλύματος, μία φορά μόλις παρασκευαστεί και μια δεύτερη όταν ανανεωθεί). Στη συνέχεια, οι προσδιορισμοί αυτοί θα πρέπει να επαναλαμβάνονται σε εβδομαδιαία τουλάχιστον βάση.

Στις δοκιμές όπου η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας αναμένεται να μην παραμένει εντός των ορίων ± 20 % της ονομαστικής της τιμής, είναι απαραίτητο να προσδιορίζονται όλες οι συγκεντρώσεις, αμέσως μόλις παρασκευαστούν τα διαλύματα και κατά την ανανέωση. Εντούτοις, σε δοκιμές όπου η μετρηθείσα αρχική συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας δεν βρίσκεται εντός ορίων ± 20 % της ονομαστικής της τιμής, αλλά μπορεί να αποδειχθεί ότι οι αρχικές συγκεντρώσεις είναι επαναλήψιμες και σταθερές (δηλ. εντός εύρους 80-120 % των αρχικών συγκεντρώσεων), οι χημικές αναλύσεις κατά τη διάρκεια της δεύτερης και της τρίτης εβδομάδας της δοκιμής μπορούν να περιορίζονται στην υψηλότερη και τη χαμηλότερη συγκέντρωση. Σε όλες τις περιπτώσεις, ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας πριν την ανανέωση αρκεί να εκτελείται μόνο σε ένα δοχείο επανάληψης για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης.

Σε δοκιμή συνεχούς ροής, ενδείκνυται καθεστώς δειγματοληψίας ανάλογο με το περιγραφόμενο για ημιστατικές δοκιμές (στην περίπτωση όμως αυτή δεν ισχύουν οι μετρήσεις «παλαιών» διαλυμάτων). Εντούτοις, μπορεί να είναι σκόπιμο να αυξηθεί ο αριθμός των δειγματοληψιών στη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας (π.χ. τρεις σειρές μετρήσεων) ώστε να είναι βέβαιο ότι οι συγκεντρώσεις δοκιμής παραμένουν σταθερές. Στις δοκιμές αυτού του τύπου, η ταχύτητα ροής του μέσου αραίωσης και της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να ελέγχονται καθημερινά.

Εάν μπορεί να αποδειχθεί ότι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας παρέμεινε σε ικανοποιητικό βαθμό εντός ορίων ± 20 % της ονομαστικής ή της μετρηθείσας αρχικής συγκέντρωσης σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής, τα αποτελέσματα μπορούν να βασίζονται στις ονομαστικές ή τις μετρηθείσες αρχικές τιμές. Εάν η απόκλιση από την ονομαστική ή την μετρηθείσα αρχική συγκέντρωση είναι μεγαλύτερη από ± 20 %, τα αποτελέσματα θα πρέπει να εκφράζονται ως χρονοσταθμισμένη μέση τιμή (βλ. καθοδήγηση για τον υπολογισμό στο προσάρτημα 6).

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Σκοπός της δοκιμής είναι να προσδιοριστούν οι επιδράσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην αναπαραγωγική απόδοση. Ο συνολικός αριθμός ζώντων απογόνων ανά ζώντα γεννήτορα πρέπει να υπολογίζεται για κάθε δοχείο (επανάληψη). Η αναπαραγωγική απόδοση μπορεί επίσης να υπολογιστεί από την παραγωγή ζώντων απογόνων από τους επιζήσαντες γεννήτορες. Ωστόσο, η σημαντικότερη από οικολογικής πλευράς μεταβλητή απόκρισης είναι ο συνολικός αριθμός ζωντανών απογόνων ανά γεννήτορα που δεν πεθαίνει τυχαία ([1]) ή απροσδόκητα ([2]) κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Σε περίπτωση τυχαίου ή απροσδόκητου θανάτου του γεννήτορα κατά τη διάρκεια της δοκιμής ή εάν αυτός αποδειχθεί αρσενικό άτομο, η επανάληψη εξαιρείται από την ανάλυση. Η ανάλυση θα βασίζεται τότε σε μειωμένο αριθμό επαναλήψεων. Σε περίπτωση γονικής θνησιμότητας σε εκτεθείσες επαναλήψεις, θα πρέπει να εξετάζεται αν η θνησιμότητα ακολουθεί μοντέλο σχέσης συγκέντρωσης-απόκρισης ή όχι, π.χ. αν παρατηρείται σημαντική παλινδρόμηση της απόκρισης συναρτήσει της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, με θετική κλίση (προς τούτο μπορεί να χρησιμοποιηθεί στατιστικός έλεγχος, όπως ο έλεγχος τάσης Cochran-Armitage). Εάν η θνησιμότητα δεν ακολουθεί μοντέλο σχέσης συγκέντρωσης-απόκρισης, οι επαναλήψεις με γονική θνησιμότητα θα πρέπει να εξαιρούνται από την ανάλυση του αποτελέσματος της δοκιμής. Εάν η θνησιμότητα ακολουθεί μοντέλο σχέσης συγκέντρωσης-απόκρισης, η γονική θνησιμότητα θα πρέπει να χαρακτηρίζεται επίδραση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και οι επαναλήψεις δεν θα πρέπει να εξαιρούνται από την ανάλυση του αποτελέσματος της δοκιμής.

Συνοπτικά, όταν χρησιμοποιούνται οι τιμές LOEC και NOEC ή EC_x για την έκφραση των επιδράσεων, συνιστάται να υπολογίζεται η επίδραση στην αναπαραγωγή με τη χρήση και των δύο μεταβλητών απόκρισης που αναφέρονται ανωτέρω, δηλαδή

([1]) Τυχαία θνησιμότητα: θνησιμότητα που δεν σχετίζεται με χημική ουσία και οφείλεται σε τυχαίο συμβάν(δηλαδή γνωστής αιτιολογίας)

([2]) Απροσδόκητη θνησιμότητα: θνησιμότητα άγνωστης αιτιολογίας που δεν σχετίζεται με τη χημική ουσία

▼M7

— του συνολικού αριθμού ζωντανών απογόνων ανά γεννήτορα που δεν πεθαίνει τυχαία ή απροσδόκητα κατά τη διάρκεια της δοκιμής και·

— του αριθμού ζωντανών απογόνων ανά επιζώντα γεννήτορα·

και, στη συνέχεια, να χρησιμοποιείται ως τελικό αποτέλεσμα η χαμηλότερη από τις τιμές LOEC και NOEC ή EC_x που υπολογίζονται με τη χρήση αυτών των δύο μεταβλητών απόκρισης.

Πριν από τη στατιστική ανάλυση, π.χ. εφαρμογή διαδικασιών ANOVA, σύγκριση των μεταχειρίσεων με τους μάρτυρες με ελέγχους t του Student, Dunnett Williams ή με έλεγχο Jonckheere-Terpstra με αποκλιμάκωση (stepdown), συνιστάται να εξετάζεται το ενδεχόμενο μετασχηματισμού των δεδομένων, εφόσον είναι αναγκαίο για την εκπλήρωση των απαιτήσεων του συγκεκριμένου στατιστικού ελέγχου. Πιθανές μη παραμετρικές εναλλακτικές λύσεις είναι οι έλεγχοι των Dunn ή Mann-Whitney. Υπολογίζονται τα διαστήματα εμπιστοσύνης 95 % για τις μέσες τιμές των μεμονωμένων αγωγών.

Ο αριθμός επιζώντων γεννητόρων στους μάρτυρες χωρίς μεταχείριση αποτελεί κριτήριο εγκυρότητας και θα πρέπει να τεκμηριώνεται και να αναφέρεται. Στην τελική έκθεση θα πρέπει να αναφέρεται και κάθε άλλη επιβλαβής επίδραση, όπως π.χ. αφύσικη συμπεριφορά και σημαντικά τοξικολογικά ευρήματα.

ECx

Οι τιμές ECx, συμπεριλαμβανομένων των αντίστοιχων κατώτατων και ανώτατων ορίων εμπιστοσύνης, υπολογίζονται με τη χρήση κατάλληλων στατιστικών μεθόδων (π.χ. λογιστική συνάρτηση ή συνάρτηση Weibull, απλοποιημένη μέθοδος Spearman-Karber ή απλή παρεμβολή). Για να υπολογιστούν οι τιμές EC10, EC_{50} ή οποιαδήποτε άλλη τιμή ECx, θα πρέπει να υποβάλλεται σε ανάλυση παλινδρόμησης το πλήρες σύνολο δεδομένων.

NOEC/LOEC

Εάν η στατιστική ανάλυση αποσκοπεί στον προσδιορισμό της NOEC/LOEC, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες στατιστικές μέθοδοι σύμφωνα με το έγγραφο αριθ. 54 του ΟΟΣΑ«Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application» (4). Σε γενικές γραμμές, οι δυσμενείς επιδράσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε σύγκριση με τον μάρτυρα διερευνώνται με χρήση του μονόπλευρου ελέγχου υποθέσεων με $p \leq 0,05$.

Η κανονική κατανομή και η ομοιογένεια της διασποράς μπορούν να εξακριβωθούν με κατάλληλο στατιστικό έλεγχο, π.χ. έλεγχος Shapiro-Wilk και έλεγχος Levene αντίστοιχα ($p \leq 0,05$). Μπορεί να διενεργηθεί μονόδρομος έλεγχος διασποράς (ANOVA) και να επακολουθήσουν έλεγχοι πολλαπλών συγκρίσεων. Οι έλεγχοι πολλαπλών συγκρίσεων (π.χ. έλεγχος Dunnett) ή τάσης με αποκλιμάκωση (π.χ. έλεγχος Williams ή έλεγχος Jonckheere-Terpstra με αποκλιμάκωση) μπορούν να χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της σημαντικότητας των διαφορών ($p \leq 0,05$) ανάμεσα στους μάρτυρες και στις διάφορες συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας [επιλογή συνιστώμενου ελέγχου σύμφωνα με το έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 54 του ΟΟΣΑ (4)]. Διαφορετικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν μη παραμετρικές μέθοδοι (π.χ. έλεγχος Bonferroni-U κατά Holm ή έλεγχος τάσεων Jonckheere-Terpstra) για να προσδιοριστούν οι τιμές NOEC και LOEC.

Οριακή δοκιμή

Εάν έχει διεξαχθεί οριακή δοκιμή (σύγκριση μεταξύ του μάρτυρα και μίας μόνο μεταχείρισης) και πληρούνται οι προϋποθέσεις των διαδικασιών παραμετρικού ελέγχου (κανονικότητα, ομοιογένεια), οι μετρικές αποκρίσεις μπορούν να αξιολογούνται με έλεγχο Student (t-test). Εάν δεν πληρούνται οι απαιτήσεις αυτές, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο έλεγχος t άνισης διασποράς (Welch-t) ή ένας μη παραμετρικός έλεγχος, όπως ο Mann-Whitney-U.

Για τον προσδιορισμό σημαντικών διαφορών μεταξύ των μαρτύρων (μάρτυρας και μάρτυρας με διαλύτη ή μέσο διασποράς), οι επαναλήψεις κάθε μάρτυρα μπορούν να ελέγχονται με τον τρόπο που περιγράφεται για την οριακή δοκιμή. Εάν με τους ελέγχους αυτούς δεν εντοπίζονται σημαντικές διαφορές, μπορεί να γίνει συγχώνευση όλων των επαναλήψεων του μάρτυρα και του μάρτυρα με διαλύτη. Διαφορετικά, όλες οι κατεργασίες θα πρέπει να συγκρίνονται με τον μάρτυρα με διαλύτη.

▼M7

Έκθεση δοκιμής

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

— φυσική μορφή και φυσικοχημικές ιδιότητες που άπτονται της δοκιμής·

— δεδομένα χημικής ταυτοποίησης, συμπεριλαμβανομένης της καθαρότητας.

Υπό δοκιμή είδος:

— κλώνος (διευκρινίζεται αν έχει γονοτυπηθεί), προμηθευτής ή πηγή (εάν είναι γνωστά) και συνθήκες καλλιέργειας. Εάν χρησιμοποιείται άλλο είδος αντί του *Daphnia magna*, η επιλογή αυτή θα πρέπει να αναφέρεται και αιτιολογείται.

Συνθήκες δοκιμής:

— ακολουθούμενη διαδικασία δοκιμής (π.χ. ημιστατική ή συνεχούς ροής, όγκος, πληθυσμιακός φόρτος ως αριθμός δαφνιών ανά λίτρο)·

— φωτοπερίοδος και ένταση του φωτός·

— σχεδιασμός της δοκιμής (π.χ. αριθμός επαναλήψεων, αριθμός γεννητόρων ανά επανάληψη)·

— λεπτομερείς πληροφορίες για το μέσο καλλιέργειας·

— τυχόν προστιθέμενες οργανικές ύλες (σύνθεση, πηγή προέλευσης, μέθοδος παρασκευής) εάν χρησιμοποιήθηκαν, TOC/COD των πυκνών διαλυμάτων, προσδιορισμός TOC/COD στο μέσο όπου γίνεται η δοκιμή·

— λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη σίτιση, μεταξύ των οποίων ποσότητα τροφής (σε mg C/δαφνία/ημέρα) και πρόγραμμα (π.χ. τύπος τροφής και, εάν πρόκειται για φύκη, όνομα του είδους και, εάν είναι γνωστά, στέλεχος και συνθήκες της καλλιέργειας)·

— μέθοδος παρασκευής των διαλυμάτων παρακαταθήκης και συχνότητα ανανέωσης (αναφέρονται ο διαλύτης ή μέσο διασποράς, εφόσον χρησιμοποιείται, και η συγκέντρωσή του).

Αποτελέσματα:

— αποτελέσματα τυχόν προκαταρκτικών μελετών σχετικά με τη σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας·

— ονομαστικές συγκεντρώσεις δοκιμής και αποτελέσματα όλων των αναλύσεων για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στα δοχεία δοκιμής (βλ. παραδείγματα φύλλων δεδομένων στο προσάρτημα 5)· θα πρέπει επίσης να αναφέρονται η απόδοση ανάκτησης της μεθόδου και το όριο προσδιορισμού·

— ποιότητα του νερού στα δοχεία δοκιμής (pH, θερμοκρασία, συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου, TOC και/ή COD και σκληρότητα, κατά περίπτωση) (βλ. παράδειγμα φύλλου δεδομένων στο προσάρτημα 4)·

— πλήρης καταγραφή της γέννησης ζωντανών απογόνων κατά τη διάρκεια της δοκιμής ανά γεννήτορα (βλ. παράδειγμα φύλλου δεδομένων στο προσάρτημα 4)·

— αριθμός θανάτων μεταξύ των γεννητόρων και ημέρα επέλευσης (βλ. παράδειγμα φύλλου δεδομένων στο προσάρτημα 4)·

— συντελεστής μεταβλητότητας της αναπαραγωγικής απόδοσης των μαρτύρων (βάσει του συνολικού αριθμού ζωντανών απογόνων ανά επιζώντα γεννήτορα στο τέλος της δοκιμής)·

— διάγραμμα του συνολικού αριθμού ζωντανών απογόνων ανά γεννήτορα σε κάθε επανάληψη σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, με εξαίρεση των γεννητόρων που ενδεχομένως πέθαναν τυχαία ή απροσδόκητα κατά τη διάρκεια της δοκιμής·

▼M7

— κατά περίπτωση, διάγραμμα του συνολικού αριθμού ζωντανών απογόνων ανά επιζώντα γεννήτορα σε κάθε επανάληψη σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας·

— κατά περίπτωση, ελάχιστη συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται επίδραση (LOEC) στην αναπαραγωγή, με περιγραφή των στατιστικών διαδικασιών που χρησιμοποιήθηκαν και ένδειξη του προβλεπόμενου ανιχνεύσιμου μεγέθους της επίδρασης (για την παροχή αυτού του στοιχείου μπορεί να διενεργηθεί ανάλυση ισχύος πριν από την έναρξη του πειράματος), καθώς και συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρείται επίδραση (NOEC) στην αναπαραγωγή· πληροφορίες σχετικά με τη μεταβλητή απόκρισης που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των LOEC και NOEC (είτε συνολικός αριθμός ζωντανών απογόνων ανά μητρικό οργανισμό που δεν πέθανε τυχαία ή απροσδόκητα κατά τη διάρκεια της δοκιμής είτε συνολικός αριθμός ζωντανών απογόνων ανά επιζώντα μητρικό οργανισμό) και, κατά περίπτωση, LOEC και NOEC για τη θνησιμότητα των γεννητόρων·

— κατά περίπτωση, η τιμή της EC_x για την αναπαραγωγή, με διαστήματα εμπιστοσύνης (π.χ. 90 % ή 95 %) και γραφική παράσταση του προσαρμοσμένου μοντέλου που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της, κλίση της καμπύλης δόσης-απόκρισης και τυπικό σφάλμα·

— άλλες παρατηρηθείσες ή μετρηθείσες βιολογικές επιδράσεις· αναφέρονται τυχόν άλλες βιολογικές επιδράσεις που παρατηρήθηκαν ή μετρήθηκαν (π.χ. στην ανάπτυξη των γεννητόρων), συνοδευόμενες ενδεχομένως από κατάλληλη εξήγηση·

— αιτιολόγηση κάθε παρέκκλισης από τη μέθοδο δοκιμών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD Test Guidelines Programme. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, U.K., 20-21 March 1993.

(2) OECD (1997). Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.6. OECD, Paris.

(3) OECD (2008). Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No.88. OECD, Paris.

(4) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Number 54. OECD, Paris.

(5) Baird, D.J., *et al*. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. Ecotox. and Environ. Safety, 21, 257-265.

(6) Elendt, B.-P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

(7) EPA (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition. EPA/821/R-02/012. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. www.epa.gov/waterscience/methods

(8) Vigano, L. (1991). Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 47, 775-782.

(9) ASTM. (2008) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. Στο: Annual Book of ASTM Standards; Water and Environmental Technology, vol. 11.04; ASTM E729 — 96 (2007) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA

(10) Baird, D.J., *et al*. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. Στο: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988. (H. Løkke, H. Tyle and F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp 144-148.

▼**M7**

(11) Parkhurst, B.R., J.L Forte. And G.P. and Wright (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26: 1-8.

(12) Cowgill, U.M. and Milazzo, D.P. (1990). The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120 (2): 185-196.

(13) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23. OECD, Paris.

(14) Sims, I.R., S. Watson. and D. Holmes (1993) Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environ. Toxicol. and Chem., 12, 2053-2058.

(15) Sims, I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, 459-466.

▼M7

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου δοκιμών χρησιμοποιούνται οι ακόλουθοι ορισμοί:

Τυχαία θνησιμότητα: θνησιμότητα που δεν σχετίζεται με χημική ουσία και οφείλεται σε τυχαία επίπτωση (δηλαδή γνωστής αιτιολογίας).

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

ECx: η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, διαλυμένης σε νερό, που έχει ως αποτέλεσμα να μειώνεται κατά x % η αναπαραγωγή των δαφνιών σε συγκεκριμένη περίοδο έκθεσης.

Απροσδόκητη θνησιμότητα: θνησιμότητα άγνωστης αιτιολογίας που δεν σχετίζεται με χημική ουσία.

Ενδογενής ρυθμός αύξησης του πληθυσμού: μέτρο της αύξησης του πληθυσμού, στο οποίο έχουν ενσωματωθεί η αναπαραγωγική απόδοση και η ειδική κατά ηλικία θνησιμότητα (1) (2) (3). Σε πληθυσμούς σε σταθερή κατάσταση είναι μηδενικός. Σε αυξανόμενους πληθυσμούς είναι θετικός και σε πληθυσμούς που συρρικνώνονται αρνητικός. Στην τελευταία περίπτωση, οι πληθυσμοί προφανώς δεν είναι βιώσιμοι και τελικώς θα εξαφανιστούν.

Όριο ανίχνευσης: η χαμηλότερη ανιχνεύσιμη, όχι όμως και ποσοτικοποιημένη συγκέντρωση.

Όριο προσδιορισμού: η χαμηλότερη ποσοτικά μετρήσιμη συγκέντρωση.

Ελάχιστη συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται επίδραση (Lowest Observed Effect Concentration/LOEC): η χαμηλότερη δοκιμασθείσα συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται ότι η χημική ουσία έχει στατιστικά σημαντική επίδραση (με $p < 0,05$) στην αναπαραγωγή και στη γονική θνησιμότητα, συγκριτικά με τους μάρτυρες, σε συγκεκριμένη περίοδο έκθεσης. Ωστόσο, όλες οι συγκεντρώσεις δοκιμής που υπερβαίνουν τη LOEC θα πρέπει να έχουν επιβλαβή επίδραση ίση με εκείνη που παρατηρείται στη LOEC ή μεγαλύτερη. Σε περίπτωση που δεν είναι δυνατόν να τηρηθούν οι δύο αυτοί όροι, θα πρέπει να εξηγείται πλήρως ο τρόπος επιλογής της LOEC (και, κατ' επέκταση, της NOEC).

Θνησιμότητα: ένα ζώο καταγράφεται ως νεκρό εάν παραμένει ακίνητο, δηλαδή όταν δεν μπορεί να κολυμπήσει, ή εάν δεν παρατηρηθεί κίνηση των αποφύσεων ή της μετακοιλιακής περιοχής 15 δευτερόλεπτα μετά από ήπια ανατάραξη του δοχείου δοκιμής. (Εάν χρησιμοποιείται άλλος ορισμός, θα πρέπει να αναφέρεται, συνοδευόμενος από τη σχετική παραπομπή).

Συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρείται επίδραση (No Observed Effect Concentration/NOEC): η αμέσως χαμηλότερη της LOEC συγκέντρωση, η οποία, συγκριτικά με τους μάρτυρες, δεν έχει στατιστικά σημαντική επίδραση ($p < 0,05$) σε συγκεκριμένη περίοδο έκθεσης.

Απόγονοι: οι νεαρές δαφνίες που γεννιούνται από τους γεννήτορες κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

Γεννήτορες: οι θηλυκές δαφνίες που είναι παρούσες κατά την έναρξη της δοκιμής και των οποίων η αναπαραγωγική απόδοση αποτελεί το αντικείμενο της μελέτης.

Αναπαραγωγική απόδοση: ο αριθμός ζωντανών απογόνων των γεννητόρων, που γεννιούνται κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Βιβλιογραφία

(1) Wilson, E.O. and Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

▼M7

(2) Poole, R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, p 532.

(3) Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L.L. and Boyce, M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156-1166.

▼M7

Προσάρτημα 2

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΕΠΑΚΡΙΒΩΣ ΚΑΘΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΜΕΣΩΝ ELENDT M7 ΚΑΙ M4

Εγκλιματισμός στα θρεπτικά μέσα Elendt M7 και M4

Ορισμένα εργαστήρια έχουν συναντήσει δυσκολίες στη μεταφορά των δαφνιών κατευθείαν στα θρεπτικά μέσα M4 και M7. Ωστόσο, αυτές υπερνικήθηκαν ως ένα βαθμό με σταδιακό εγκλιματισμό, δηλαδή μεταφορά από το θρεπτικό μέσο του εργαστηρίου σε Elendt 30 %, κατόπιν σε Elendt 60 % και τέλος σε Elendt 100 %. Η διάρκεια των περιόδων εγκλιματισμού ενδέχεται να χρειαστεί να φθάσει τον ένα μήνα.

Προετοιμασία

Ιχνοστοιχεία

Πρώτα παρασκευάζονται χωριστά διαλύματα παρακαταθήκης (I) των επιμέρους ιχνοστοιχείων σε νερό κατάλληλης καθαρότητας, π.χ. απιονισμένο, απεσταγμένο ή καθαρισμένο με αντίστροφη όσμωση. Από τα εν λόγω διαλύματα παρακαταθήκης (I) παρασκευάζεται ένα δεύτερο, ενιαίο διάλυμα παρακαταθήκης (II), το οποίο περιέχει όλα τα ιχνοστοιχεία (συνδυασμένο διάλυμα), δηλαδή:

Διάλυμα/-τα παρακαταθήκης I (μία μόνο ουσία)	Ποσότητα που προστίθεται σε νερό	Συγκέντρωση (σε σχέση με το θρεπτικό μέσο M4)	Για την παρασκευή του συνδυασμένου διαλύματος παρακαταθήκης II, προστίθεται σε νερό η ακόλουθη ποσότητα διαλύματος παρακαταθήκης I	
	mg/l		ml/l	
			M 4	M 7
H_3BO_3	57 190	20 000 x	1,0	0,25
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	7 210	20 000 x	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000 x	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000 x	1,0	0,25
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$	3 040	20 000 x	1,0	0,25
NaBr	320	20 000 x	1,0	0,25
$Mo\ Na_2O_4 \cdot 2\ H_2O$	1 260	20 000 x	1,0	0,25
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$	335	20 000 x	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000 x	1,0	1,0
$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	20 000 x	1,0	1,0
KI	65	20 000 x	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000 x	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000 x	1,0	1,0
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$	5 000	2 000 x	—	—
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1 991	2 000 x	—	—

Τα διαλύματα Na_2EDTA και $FeSO_4$ παρασκευάζονται χωριστά, αναμειγνύονται και αποστειρώνονται αμέσως σε αυτόκαυστο. Με τον τρόπο αυτό λαμβάνονται:

Διάλυμα Fe-EDTA		1 000 x	20,0	5,0

▼**M7**

Θρεπτικά μέσα M4 και M7

Παρασκευάζονται με διάλυμα παρακαταθήκης II, μακροθρεπτικά στοιχεία και βιταμίνες ως εξής:

	Ποσότητα που προστίθεται σε νερό	Συγκέντρωση (σε σχέση με το θρεπτικό μέσο M4)	Ποσότητα διαλύματος παρακαταθήκης που προστίθεται για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου	
	mg/l		ml/l	
			M 4	M 7
Διάλυμα παρακαταθήκης II (συνδυασμός ιχνοστοιχείων)		20 x	50	50
Διαλύματα παρακαταθήκης μακροθρεπτικών στοιχείων (μία μόνο ουσία)				
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1 000 x	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	2 000 x	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000 x	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000 x	1,0	1,0
$Na_2SiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	5 000 x	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000 x	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000 x	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000 x	0,1	0,1
Διάλυμα παρακαταθήκης συνδυασμού βιταμινών	—	10 000 x	0,1	0,1

Το διάλυμα παρακαταθήκης συνδυασμού βιταμινών παρασκευάζεται με την προσθήκη 3 βιταμινών σε 1 λίτρο νερού, όπως εμφαίνεται κατωτέρω:

	mg/l			
Υδροχλωρική θειαμίνη	750	10 000 x		
Κυανοκοβαλαμίνη (B12)	10	10 000 x		
Βιοτίνη	7,5	10 000 x		

Το διάλυμα παρακαταθήκης συνδυασμού βιταμινών φυλάσσεται στην κατάψυξη, χωρισμένο σε μερίδες. Οι βιταμίνες προστίθενται στα θρεπτικά μέσα λίγο πριν από τη χρήση.

ΣΗΜ 1: Προς αποφυγή καθίζησης αλάτων κατά την παρασκευή του πλήρους θρεπτικού μέσου, οι μερίδες των διαλυμάτων παρακαταθήκης προστίθενται σε 500-800 ml απιονισμένου νερού και εν συνεχεία ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι το 1 λίτρο.

ΣΗΜ. 2: Πρώτη δημοσίευση του θρεπτικού υλικού M4: Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

▼**M7**

Προσάρτημα 3

ΑΝΑΛΥΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΟΡΓΑΝΙΚΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ (TOC) ΚΑΙ ΕΚΠΟΝΗΣΗ ΝΟΜΟΓΡΑΦΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ ΑΠΟ ΦΥΚΗ ΣΕ TOC

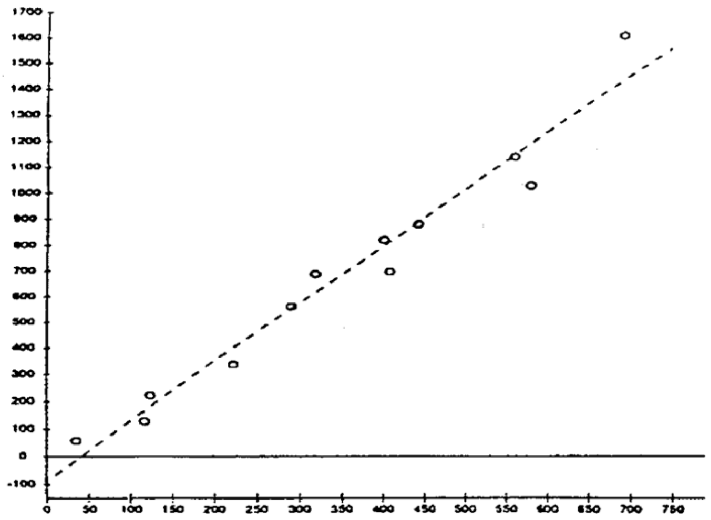
Αναγνωρίζεται ότι η περιεκτικότητα των ζωοτροφών από φύκη σε άνθρακα δεν μετράται κατά κανόνα άμεσα αλλά συνάγεται έμμεσα με τη βοήθεια συσχετισμών (δηλ. νομογραφημάτων), για τους οποίους χρησιμοποιούνται υποκατάστατες παράμετροι, όπως ο αριθμός κυττάρων φυκών ή η απορρόφηση του φωτός.

Για τη μέτρηση του TOC θα πρέπει να προτιμάται η οξείδωση σε υψηλή θερμοκρασία έναντι άλλων μεθόδων, όπως η μέθοδος υπεριώδους ακτινοβολίας ή η μέθοδος υπερθειικού άλατος. (Για συμβουλές βλ.: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Για την εκπόνηση του νομογραφήματος, τα φύκη διαχωρίζονται από το θρεπτικό μέσο με φυγοκέντρηση και εν συνεχεία επαναιωρούνται σε απεσταγμένο νερό. Μετράται η υποκατάστατη παράμετρος και η συγκέντρωση TOC σε κάθε δείγμα εις τριπλούν. Αναλύονται τυφλά δείγματα που περιέχουν απεσταγμένο νερό και η συγκέντρωση TOC σε αυτά αφαιρείται από εκείνη του δείγματος φυκών.

Τα νομογραφήματα θα πρέπει να είναι γραμμικά στην περιοχή συγκεντρώσεων άνθρακα που ενδιαφέρει. Σχετικά παραδείγματα εμφαίνονται κατωτέρω.

ΣΗΜ: Τα νομογραφήματα που ακολουθούν δεν θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν για μετατροπές. Είναι απαραίτητο να εκπονούν τα εργαστήρια τα δικά τους νομογραφήματα.



Chlorella vulgaris, ποικιλία viridis (CCAP 211/12).

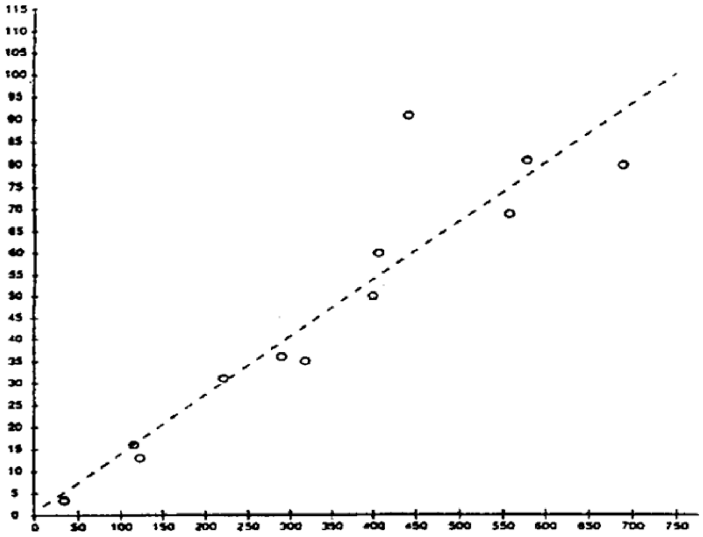
Παλινδρόμηση mg/l ξηρού βάρους σε mg C/l. Δεδομένα από πυκνά εναιωρήματα κυττάρων καλλιεργειών ημισυνεχούς ροής, μετά από επαναιώρηση σε απεσταγμένο νερό.

άξονας x: mg C/l συμπυκνωμένης ζωοτροφής από φύκη

άξονας y: mg/1 ξηρό βάρος συμπυκνωμένης ζωοτροφής από φύκη

Διορθωτικός συντελεστής -0,980

▼**M7**



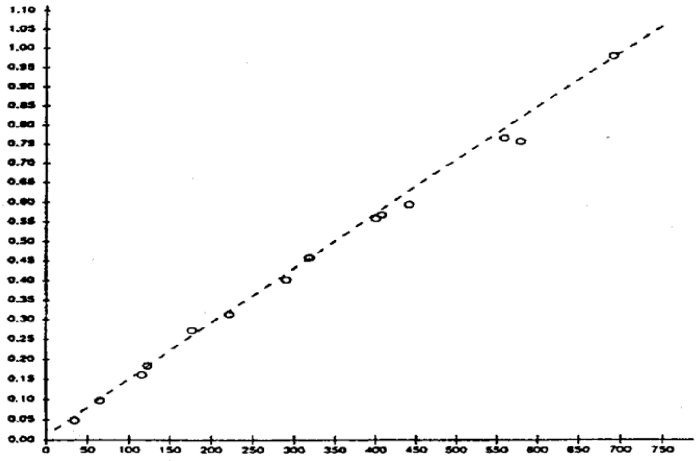
Chlorella vulgaris, ποικιλία viridis (CCAP 211/12).

Παλινδρόμηση αριθμού κυττάρων σε mg C/l. Δεδομένα από πυκνά εναιωρήματα κυττάρων καλλιεργειών ημισυνεχούς ροής, μετά από επαναιώρηση σε απεσταγμένο νερό.

άξονας x: mg C/l συμπυκνωμένης ζωοτροφής από φύκη

άξονας y: αριθ. κυττάρων/l συμπυκνωμένης ζωοτροφής από φύκη

Διορθωτικός συντελεστής -0,926



Chlorella vulgaris, ποικιλία viridis (CCAP 211/12).

Παλινδρόμηση απορρόφησης σε mg C/l (μήκος διαδρομής 1 cm). Δεδομένα από πυκνά εναιωρήματα κυττάρων καλλιεργειών ημισυνεχούς ροής, μετά από επαναιώρηση σε απεσταγμένο νερό.

άξονας x: mg C/l συμπυκνωμένης ζωοτροφής από φύκη

άξονας y: Απορρόφηση στα 440 nm συμπυκνωμένης ζωοτροφής από φύκη, μετά από αραίωση 1/10

Διορθωτικός συντελεστής -0,998

▼M7

Προσάρτημα 4

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΦΥΛΛΟΥ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΟΠΟΥ ΚΑΤΑΓΡΑΦΟΝΤΑΙ Η ΑΝΑΝΕΩΣΗ ΤΟΥ ΜΕΣΟΥ, ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ, Η ΔΙΑΤΡΟΦΗ, Η ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΔΑΦΝΙΩΝ ΚΑΙ Η ΓΟΝΙΚΗ ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ

Αρ. πειράματος:	Ημερομηνία έναρξης:						Κλώνος:			Θρεπτικό μέσο:				Είδος τροφής:				Υπό δοκιμή χημική ουσία:					Ονομαστικές συγκεντρώσεις:	
Ημέρα	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Ανανέωση του μέσου (σημειώστε αν έγινε)																								
pH (*)																							νέο	
																							παλαιό	
O_2 (mg/l) (*)																							νέο	
																							παλαιό	
Θερμοκρασία (°C) (*)																							νέο	
																							παλαιό	
Χορήγηση τροφής (σημειώστε αν έγινε)																								
Αρ. ζωντανών απογόνων (**)																								Σύνολο
Δοχείο 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								

02008R0440 — EL — 16.10.2019 — 008.001 — 1825

▼M7

Αρ. πειράματος:	Ημερομηνία έναρξης:						Κλώνος:			Θρεπτικό μέσο:				Είδος τροφής:				Υπό δοκιμή χημική ουσία:					Ονομαστικές συγκεντρώσεις:	
Ημέρα	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																							Σύνολο	
Σωρευτική γονική θνησιμότητα (***)																								

(*) Σημειώνεται ποιο δοχείο χρησιμοποιήθηκε για τα πείραμα.
(**) Τα αυγά που δεν εκκολάφθηκαν καταγράφονται με την ένδειξη «AB» (aborted) στο αντίστοιχο τετραγωνίδιο.
(***) Η θνησιμότητα των γεννητόρων καταγράφεται με την ένδειξη «M» (mortality) στο αντίστοιχο τετραγωνίδιο.

▼**M7**

Προσάρτημα 5

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΦΥΛΛΟΥ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΧΗΜΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ

α) **Μετρηθείσες συγκεντρώσεις**

Ονομαστική συγκέντρωση	Δείγμα 1ης εβδομάδας		Δείγμα 2ης εβδομάδας		Δείγμα 3ης εβδομάδας	
	Νέο διάλυμα	Παλαιό διάλυμα	Νέο διάλυμα	Παλαιό διάλυμα	Νέο διάλυμα	Παλαιό διάλυμα

β) **Μετρηθείσες συγκεντρώσεις ως επί τοις εκατό ποσοστό της ονομαστικής τιμής**

Ονομαστική συγκέντρωση	Δείγμα 1ης εβδομάδας		Δείγμα 2ης εβδομάδας		Δείγμα 3ης εβδομάδας	
	Νέο διάλυμα	Παλαιό διάλυμα	Νέο διάλυμα	Παλαιό διάλυμα	Νέο διάλυμα	Παλαιό διάλυμα

▼M7

Προσάρτημα 6

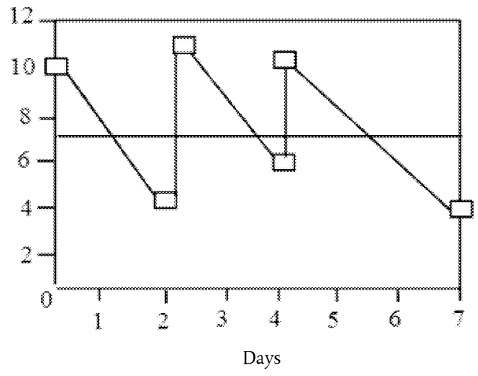
ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΧΡΟΝΟΣΤΑΘΜΙΣΜΕΝΗΣ ΜΕΣΗΣ ΤΙΜΗΣ

Χρονοσταθμισμένη μέση τιμή

Δεδομένου ότι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας μπορεί να μειωθεί κατά το χρονικό διάστημα ανάμεσα σε δύο ανανεώσεις του θρεπτικού μέσου, είναι απαραίτητο να εξετάζεται ποια συγκέντρωση θα πρέπει να επιλεγεί ως αντιπροσωπευτική του εύρους συγκεντρώσεων στις οποίες εκτίθενται οι γονικές δαφνίες. Η επιλογή θα πρέπει να βασίζεται τόσο σε βιολογικά όσο και σε στατιστικά κριτήρια. Εάν για παράδειγμα θεωρείται ότι η αναπαραγωγή επηρεάζεται περισσότερο από τη μέγιστη συγκέντρωση, τότε χρησιμοποιείται η μέγιστη συγκέντρωση. Εάν όμως θεωρείται ότι υπερισχύει η αθροιστική ή η μακροχρόνια επίδραση της τοξικής χημικής ουσίας, καταλληλότερος είναι ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων. Στην περίπτωση αυτή, ενδείκνυται να χρησιμοποιείται ως μέσος όρος η χρονοσταθμισμένη μέση τιμή συγκέντρωσης, δεδομένου ότι σε αυτήν συνυπολογίζεται η μεταβολή της στιγμιαίας συγκέντρωσης με την πάροδο του χρόνου.

Σχήμα 1:

Παράδειγμα χρονοσταθμισμένης μέσης τιμής



Στο σχήμα 1 εμφαίνεται παράδειγμα (απλοποιημένης) δοκιμής διάρκειας 7 ημερών με ανανέωση του θρεπτικού μέσου τις ημέρες 0, 2 και 4.

— Η λεπτή τεθλασμένη γραμμή παριστάνει τη συγκέντρωση σε κάθε χρονικό σημείο. Χρησιμοποιείται η παραδοχή ότι η πτώση της συγκέντρωσης ακολουθεί εκθετική πορεία.

— Τα έξι σημεία από τα οποία διέρχεται η καμπύλη αντιπροσωπεύουν τις συγκεντρώσεις που μετρήθηκαν στην αρχή και στο τέλος κάθε περιόδου ανανέωσης.

— Η παχιά ευθεία γραμμή δείχνει τη θέση της χρονοσταθμισμένης μέσης τιμής.

Η χρονοσταθμισμένη μέση τιμή υπολογίζεται κατά τρόπο ώστε το εμβαδόν κάτω από τη γραμμή της να ισούται με το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη της συγκέντρωσης. Ο υπολογισμός για το ανωτέρω παράδειγμα επεξηγείται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1

Υπολογισμός χρονοσταθμισμένης μέσης τιμής

Αριθ. ανανέωσης	Ημέρες:	Συγκ 0	Συγκ 1	ln(συγκ 0)	ln(συγκ 1)	Εμβαδόν
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781

▼**M7**

Αριθ. ανανέωσης	Ημέρες:	Συγκ 0	Συγκ 1	ln(συγκ 0)	ln(συγκ 1)	Εμβαδόν
Συνολικός αριθμός ημερών:	7				Συνολικό εμβαδόν:	50,092
					Μέση τιμή TW:	7,156

Ημέρες είναι η διάρκεια μιας περιόδου ανανέωσης.

Συγκ 0 είναι η συγκέντρωση που μετράται στην αρχή κάθε περιόδου ανανέωσης.

Συγκ 1 είναι η συγκέντρωση που μετράται στο τέλος κάθε περιόδου ανανέωσης.

ln(συγκ 0) είναι ο φυσικός λογάριθμος της συγκέντρωσης 0.

ln(συγκ 1) είναι ο φυσικός λογάριθμος της συγκέντρωσης 1.

Εμβαδόν είναι το εμβαδόν κάτω από την εκθετική καμπύλη για κάθε περίοδο ανανέωσης, υπολογιζόμενο βάσει του τύπου:

$$εμβαδόν = \frac{συγκ\ 0 - συγκ\ 1}{ln(συγκ\ 0) - ln(συγκ\ 1)} \times σημέρα$$

Η χρονοσταθμισμένη μέση τιμή (*μέση τιμή TW*) είναι το πηλίκο του *συνολικού εμβαδού* δια του *συνολικού αριθμού ημερών*.

Εξυπακούεται ότι για τη δοκιμή αναπαραγωγής με δαφνίες ο πίνακας θα πρέπει να επεκταθεί για να καλύψει 21 ημέρες.

Είναι σαφές ότι όταν γίνεται παρατήρηση μόνο στην αρχή και στο τέλος κάθε περιόδου ανανέωσης, δεν υπάρχει δυνατότητα να επιβεβαιωθεί ότι η μείωση ακολουθεί όντως εκθετική πορεία. Διαφορετική καμπύλη θα οδηγούσε σε διαφορετικό υπολογισμό του *εμβαδού*. Εντούτοις, η εκθετική μείωση δεν αποκλείεται, είναι μάλιστα η προσφορότερη καμπύλη αν δεν υπάρχουν άλλες πληροφορίες.

Χρειάζεται πάντως προσοχή σε περίπτωση κατά την οποία δεν ανιχνεύεται η ουσία με τη χημική ανάλυση στο τέλος της περιόδου ανανέωσης. Εάν δεν υπάρχει τρόπος να εκτιμηθεί η ταχύτητα με την οποία εξαφανίζεται η χημική ουσία από το διάλυμα, είναι αδύνατον να προκύψει ρεαλιστικό εμβαδόν κάτω από την καμπύλη και, κατ' επέκταση, εύλογη χρονοσταθμισμένη μέση τιμή.

▼M7

Προσάρτημα 7

ΚΑΘΟΔΗΓΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ ΤΩΝ ΝΕΟΓΝΩΝ

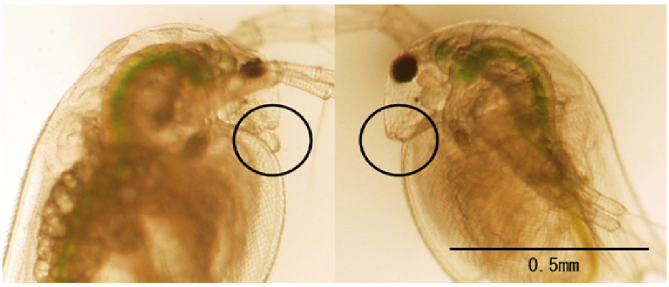
Είναι δυνατόν να γεννηθούν αρσενικά νεογνά υπό μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως η συντόμευση της φωτοπεριόδου, η αλλαγή της θερμοκρασίας, η μείωση της συγκέντρωσης της τροφής και η αύξηση της πυκνότητας του πληθυσμού (Hobaek και Larson, 1990· Kleiven και συν., 1992). Η γέννηση αρσενικών απογόνων είναι επίσης γνωστή απόκριση σε ορισμένους ρυθμιστές ανάπτυξης εντόμων (Oda και συν., 2005). Υπό συνθήκες όπου χημικοί στρεσογόνοι παράγοντες προκαλούν μείωση των αναπαραγωγικών παρθενογενετικών θηλυκών ατόμων, μπορεί να αναμένεται αυξημένος αριθμός αρσενικών (ΟΟΣΑ, 2008). Με βάση τις διαθέσιμες πληροφορίες, δεν είναι δυνατόν να προβλεφθεί ποιο από τα δύο τελικά σημεία — αναλογία των φύλων ή αναπαραγωγή — θα είναι πιο ευαίσθητο· ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις (βλ. «Έκθεση επικύρωσης», μέρος 1) ότι αυτή η αύξηση του αριθμού των αρσενικών ατόμων μπορεί να είναι λιγότερο ευαίσθητη από την μείωση των απογόνων. Δεδομένου ότι ο πρωταρχικός σκοπός της μεθόδου δοκιμών είναι η εκτίμηση του αριθμού των απογόνων, η εμφάνιση αρσενικών ατόμων είναι προαιρετική παρατήρηση. Εάν σε μια μελέτη αξιολογείται αυτό το προαιρετικό τελικό σημείο, θα πρέπει να εφαρμόζεται ένα πρόσθετο κριτήριο εγκυρότητας της δοκιμής, συγκεκριμένα να μην υπερβαίνει το ποσοστό των αρσενικών ατόμων στους μάρτυρες το 5 %.

Ο πιο πρακτικός και εύκολος τρόπος διάκρισης του φύλου της δαφνίας είναι να χρησιμοποιούνται τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, δεδομένου ότι τα αρσενικά και τα θηλυκά άτομα είναι γενετικά πανομοιότυπα και το φύλο καθορίζεται από το περιβάλλον. Τα αρσενικά άτομα διαφέρουν από τα θηλυκά ως προς το μήκος και τη μορφολογία των πρώτων κεραιών, οι οποίες είναι μακρύτερες στα αρσενικά απ' ό,τι στα θηλυκά (εικόνα 1). Η διαφορά αυτή είναι αναγνωρίσιμη αμέσως μετά τη γέννηση, ενώ άλλα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου αναπτύσσονται με την πρόοδο της ηλικίας (ενδεικτικά, βλ. εικόνα 2 στη δημοσίευση των Olmstead και LeBlanc, 2000).

Για την παρατήρηση του μορφολογικού φύλου, τα νεογνά κάθε ζώου δοκιμής θα πρέπει να μεταφέρονται με πιπέτα σε τρυβλίο Petri με θρεπτικό μέσο δοκιμής. Το θρεπτικό μέσο περιορίζεται στο ελάχιστο για τον περιορισμό της κίνησης των ζώων. Οι πρώτες κεραίες μπορούν να παρατηρηθούν με στερεοσκόπιο (μεγέθυνση (× 10-60).

Εικόνα 1

Αρσενικό (αριστερά) και θηλυκό (δεξιά) άτομο ηλικίας 24 ωρών, του είδους *D. magna*. Τα αρσενικά άτομα διακρίνονται από τα θηλυκά από το μήκος και τη μορφολογία των πρώτων κεραιών, όπως φαίνεται στους κύκλους (Tatarazako *και συν.*, 2004).



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Hobaek A and Larson P. 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. Ecology 71: 2255-2268.

Kleiven O.T., Larsson P., Hobaek A. 1992. Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. Oikos 65, 197-206.

Oda S., Tatarazako N, Watanabe H., Morita M., and Iguchi T. 2005. Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. Chemosphere 61:1168-1174.

▼**M7**

OECD, 2008. Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna r*eproduction test. OECD Series on Testing and Assessment, Number 88. Οργανισμός Οικονομικής Συνεργασίας και Ανάπτυξης, Παρίσι.

Olmstead, A.W., LeBlanc, G.A., 2000. Effects of endocrine-active chemicals on the development characteristics of *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry 19:2107-2113.

Tatarazako, N., Oda, S., Abe, R., Morita M. and Iguchi T., 2004. Development of a screening method for endocrine disruptors in crustaceans using *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea). Environmental Science 17, 439-449.

▼B

Γ.21. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΕΔΑΦΟΥΣ: ΔΟΚΙΜΗ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ ΑΖΩΤΟΥ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδοη δοκιμήη αποτελεί αναπαραγετγή της OECD TG 216 (1999).

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμής περτγράφει εργαστηριακή μέθοδο προοριζόμενη για τη διερεύνηση των μακροπρόθεσμων επιδράσεων χημικών ουσιών, έειτα από εφάπαξ έκθεση, στην ικανότητα μικροργανισμών του εδάφους να μετατρέπουν το άζωτο. Η δοκιμςή αυτή βασίζεται κυριως στις συστάοεις του Ευρωπαίκού και Μεσογεγεπακού Οργανισμού Φυτοπροστασίας (1). Ωστόσο, ελήφθησαν υπόψη και άλλες κατευθυντήριες οδηγίες, συμπεριλαμβανομένων και εκεινων των German Biologische Bundesastalt (2), του Οργανιομού Προστασίας του Περιβάλλοντος των ΟΟΣΑ για την επιλογή εδαφών/ιζημάτων, του έγινε στο Belgirate, Ιταλια, το 1995 (6) συμφωνήθηκε ο αριθμός και ο τάπος των προς χρήση εδαφών στην παρούσα σοκιμή. Οι συοτάοεις για τη συλλογή, χειρσμό και αποθήκευση των εδαφικών δετγμάτων βασίξονται οε κείμενο οδηγιών του ISO (7) και συστάσεις από τη συνάντηση του Belgirate. Για την αξιολόγηση και εκτίμηση των τοξικών χαρακτηριστικών των υπό δοκιμή όυσιών, μπορεί να απαττελται προσδιορισμός των επιδράσεων οτη μικροβιακή δρασεικότητα του εδάφους, π.χ. όταν απαιτούνται στοιχεία για τις δυνητικές παρενέργειες προιόντων προστασίας καλλιεργειών στη μικροχλωρίδα του εδάφους ή όταν αναμένεται έκθεση μικροοργανισμών του εδάφους σε άλλες χημικές ουσίες εκτός προϊόντων προστασίας καλλιεργειών. Η σοκιμή μετατροπής του αζώτου πραγματοποιείται για τον προσδιορισμό των επιδράσεων εν λόγξ χημικών στη μικροχλωρίδα του εδάφους. Εφόσον δοκιμάζονται αγροχημικά (π.χ. προιόντα προστασίας καλλιεργειών, λεπάσματα, δασοκομικά χημυκά), πραγματοποιούνται δοκιμές για τη μετατροπή τόσο του αζώτου όσο και του άνθρακα. Εφόσον δεν δοκιμάζονται αγροχημικά, αρκεί η δοκιμή είναι στην περιοχή των τιμών που βρίσκονται για διαθέσιμους οτο εμπόριο αναστολείς νιτροποίησης (π.χ. νιτραπυρίνη), μπορεί να διεξαχθεί και δοκιμή μετατροπής του άνθρακα για την απόκτηση περαιτέρω πληροφοριών.

Τα εδάφη συνίστανται από ζώντα και μη ζώντα συστατικά στοιχεία που υφίστανται σε πολύπλοκα και ετερογενή μιγματα. Οι μικροοργανιομοί παίζουν σηςαντικό ρόλο στη διάσπαση και μετατροπή οργανικής ύλης σε γόνιμα χώμιττα με πολλά είδη που συνεισφέρουν σε διάφορες πτυχές των εδαφών. Τυχόν μακροπρόθεσμη παρέμβαση σε αυτές τις βιοχημικές σιεργασίες μπορει να έχει ενδεχομένως επγσραση στον κύκλο των θρεπτικών αλάτων και να αλλοιωθεί η γονιμότητα του εδάφους. Σε όλα τα γόνιμα εδάφη επέρχεται μετατροπή του αζώτου και του άνθρακα. Αν και οι μικροβιακές κοινότητες που είναι υπεύθυνες για τις διεργασίες αυτές διαφέρουν απο έδαφος οε έδαφος, οι οδοί μετατροπής ειναι ουσιαστικώς οι ίδιες.

Η περιγραφόμενη παρούας στη διεργασία μετατροπής του αζώτου σε αερόβια επιφανειακά εδάφη. Η μέφοδος δοκιμής επιτρέπει επίσης την εκτίμήση των επιδράσεων ουσιών στη μετατροπή του άνθρακα από τη μικροχλωρίδα του εδάφους. Ο σχηματιουός νιτρικών γίνεται μετά την αποικοδόμηση των δεσμών άνθρακααζώτου. Συνεπώς, εάν βρεθούν τα ίδια ποσοστά παραγωγής αποικοδόμησης του άνθρακα να είναι άθικτες και λειτουργικές. Το επιλεγμένο για τη δοκιμή μεταξύ 12/1 και 16/1). Λόγω τούτου, μειώνεται κατά τη διάρκεια της δοκιμής η στέρηση άνθρακα και εάν μικροβιακές κοινότητες καταστραφούν από κάποιο χημικό, αυτές μτορεί να ανανήψουν μέσα οε 100 ημέρες.

▼B

Οι δοκιμές από τις οποίες αναπτύχθηκε η παρούσα μέθοδος δοκιμής είχαν αρχικά σχεδιαστεί για ουσίες για τις οποίες μροβλεφθεί η ποσότητα που φθάνει οτο έδαφος. Αυτό ιοχύει, π.χ., στην περίπτωση προϊόντων προστασίας καλλιεργειών για τα οποία ειναι γνωστό το ποσοστό χρήσης στα εδάφη. Για τα αγροχημικά, αρκεί η δοκιμή δύο δόσεων σχετικών με το προαναμενόμενο ή προβλεπόμενο ποσοστό χρήσης. Τα αγροχημικά μπορούν να δοκιμαστούν ως σραστικά συστατικά (δ.σ.) ή ως τυποτοιημένης συνθέσεως προϊόντα. Ωστόσο, η σοκιμή δεν περιορίζεται στα αγροχημικά. Αλλάξοντας τόσο τις ποσότητες της εφαρμοζόμενης στο έσαφος υπό δοκιμή ουσίας, όσο και τον τρόπο με τον οποίο αξιαλογούνται τα δεδομένα, η δοκιμή μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για χημικά για τα οποία δεν είναι γνωστή η αναμενόμενη να φθάσει στο έδαφος ποσότητα. Ετσι, στην περιπτωση χημικών του δεν εμπίπτουν στην κατηγορία των αγροχημικών, προσδιορίζονται οι επιδράσεις μιας σειράς συγκεντρώσεων στην μετατροπή τυ αζώτου. Τα στοιχεία από τις δοκιμές αυτές χρησιμοποιούνται για τη χάραξη καμπύλης δόσεχως-απόκρισης και τον υπολογισμό τιμών EC_{21} άπου το χ ορίζεται ως η % επιδραση.

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

Μετατροπή αζώτου: είναι η τελική αποικοδόμηση από μικροοργανισμούς οργανικής ύλης που περιέχει άζωτο, μέσω των διεργασιών της αμμωνιοποίησης και νιτροποίησης, στο αντίστοιχο ανόργανο τελικό νιτρικό προϊόν.

EC_X (συγκέντρωση αποτελέσματος χ): είναι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο έδαφος, η οποία απολήγει σε χ % αναστολή της μετατροπής του αζώτου σε νιτρικά.

EC_{50} (συγκέντρωση διάμεσου αποτελέσματος): είναι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο έδαφος, η οποία απολήγει σε 50 % αναστολή της μετατροπής του αζώτου σε νιτρικά.

1.3 ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Καμμία

1.4 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Κοσκινισμένο χώμα τροποποιείται με την προσθήκη κονιοποιημένου αλεύρου μηδικής και στη συνέχεια είτε υποβάλλεται σε κατεργασία με την υπό δοκιμή ουσία, είτε αφήνεται ακατέργαστο (μάρτυρας). Εάν δοκιμάζονται αγροχημικά, συνιστώνται κατ' ελάχιστο δύο συγκεντρώσεις για δοκιμή επιλεγόμενες μεταξύ των υψηλότερων αναμενόμενων επιτόπιων συγκεντρώσεων. Μετά 0, 7, 14 ημέρες και 28 ημέρες επώασης, εκχυλίζονται με κατάλληλο διαλύτη δείγματα κατεργασμένων και μη κατεργασμένων εδαφών και προσδιορίζονται οι ποσότητες των νιτρικών στα εκχυλίσματα. Το ποσοστό σχηματισμού νιτρικών στα κατεργασμένα δείγματα συγκρίνεται με το ποσοστό στα δείγματα-μάρτυρες και υπολογίζεται η % απόκλιση των κατεργασμένων από τα μη κατεργασμένα (μάρτυρες). Όλες οι δοκιμές διαρκούν τουλάχιστον 28 ημέρες. Εάν, την 28η ημέρα, οι διαφορές μεταξύ κατεργασμένων και μη κατεργασμένων εδαφών είναι ίσες ή μεγαλύτερες του 25 %, οι μετρήσεις συνεχίζονται μέχρι 100 ημέρες το πολύ. Εάν δεν δοκιμάζονται αγροχημικά, στα δείγματα του εδάφους προστίθεται μια σειρά συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή ουσίας και μετά 28 ημέρες επώασης μετρώνται οι ποσότητες των νιτρικών που σχηματίζονται στα κατεργασμένα δείγματα και στα δείγματα μάρτυρες. Τα αποτελέσματα από τις δοκιμές με τις πολλαπλές συγκεντρώσεις αναλύονται χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο αναγωγής και υπολογίζονται οι τιμές EQ_X (δη. EC_{50}, EC_{25} και/ή EC_{10}). Βλ. ορισμούς.

1.5 ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Οι αξιολογήσεις των αποτελεσμάτων των δοκιμών με αγροχημικά βασίζονται σε σχετικώς μικρές διαφορές (δηλ. μέση τιμή ±25 %) μεταξύ των συγκεντρώσεων νιτρικών σε δείγματα κατεργασμένων εδαφών και εδαφών μαρτύρων, έτσι τυχόν μεγάλες διακυμάνσεις στους μάρτυρες μπορεί να οδηγήσουν σε εσφαλμένα αποτελέσματα. Συνεπώς, η διακύμανση μεταξύ επαναληπτικών δειγμάτων μαρτύρων θα πρέπει να είναι μικρότερη του ±15 %.

▼B

1.6 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.6.1 **Εξοπλισμός**

Χρησιμοποιούνται δοχεία δοκιμής κατασκευασμένα από χημικώς αδρανές υλικό. Τα δοχεία θα πρέπει να είναι κατάλληλης χωρητικότητας ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη διαδικασία για την επώαση των εδαφών, δηλ. επώαση σε χύδην κατάσταση ή ως σειρά επιμέρους δειγμάτων εδάφους (βλ. ενότητα 1.7.1.2). Θα πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια τόσο για την ελαχιστοποίηση της απώλειας νερού όσο και για την παροχή δυνατότητας ανταλλαγής αερίων (π.χ. τα δοχεία δοκιμής μπορούν να καλύπτονται με διάτρητο φύλλο πολυαιθυλενίου). Όταν δοκιμάζονται πτητικές ουσίες, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σφραγιζόμενα και αεροστεγή δοχεία. Τα δοχεία θα πρέπει να είναι κατάλληλου μεγέθους ώστε με το εδαφικό δείγμα να πληρούται το ένα τέταρτο περίπου του όγκου τους.

Χρησιμοποιείται συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός, συμπεριλαμβανομένων των ακολούθων:

— διάταξη αναδεύσεως: μηχανικός αναδευτήρας ή παρόμοιος εξοπλισμός

— φυγόκεντρος (3 000 g) ή διάταξη διηθήσεως (με χρήση χάρτινου ηθμού απηλλαγμένου νιτρικών)

— όργανο κατάλληλης ευαισθησίας και αναπαραγωγιμότητας για ανάλυση νιτρικών.

1.6.2 **Επιλογή και αριθμός εδαφών**

Χρησιμοποιείται ένα μοναδικό έδαφος. Τα συνιστώμενα εδαφικά χαρακτηριστικά είναι τα εξής:

— περιεκτικότητα σε άμμο: τουλάχιστον 50 % μέχρι το πολύ 75 %

— pH: 5,5-7,5;

— περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα: 0,5-1,5 %;

— θα πρέπει να μετριέται η μικροβιακή βιομάζα (8)(9) και η περιεκτικότητα της σε άνθρακα θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 1 % του συνόλου του οργανικού άνθρακα του εδάφους.

Στις περισσότερες περιπτώσεις, έδαφος με τα χαρακτηριστικά αυτά αντιπροσωπεύει τη χειρότερη περίπτωση, αφού η προσρόφηση του υπό δοκιμή χημικού είναι ελάχιστη και η διαθεσιμότητά του στη μικροχλωρίδα μέγιστη. Συνεπώς, δεν χρειάζονται εν γένει δοκιμές με άλλα εδάφη. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, π.χ. όταν η προβλεπόμενη κύρια χρήση της υπό δοκιμή ουσίας είναι για συγκεκριμένα εδάφη, όπως όξινα εδάφη δασών, ή στην περίπτωση ηλεκτροστατικώς φορτισμένων χημικών, μπορεί να χρειάζεται να χρησιμοποιηθεί και κάποιο άλλο ακόμη έδαφος.

▼B

1.6.3 **Συλλογή και αποθήκευση δειγμάτων εδαφών**

1.6.3.1 *Συλλογή*

Θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμες λεπτομερείς πληροφορίες για το ιστορικό του συγκεκριμένου τόπου από τον οποίο συλλέγεται το προς δοκιμή δείγμα. Στα στοιχεία πρέπει να περιλαμβάνονται η ακριβής τοποθεσία, η υπάρχουσα βλάστηση, οι ημερομηνίες κατεργασίας με προϊόντα προστασίας καλλιεργειών, κατεργασίες με οργανικά και ανόργανα λιπάσματα, προσθήκες βιολογικών υλικών ή τυχαίες επιμολύνσεις. Ο επιλεγμένος τόπος για τη συλλογή εδάφους θα πρέπει να επιτρέπει τη μακροπρόθεσμη χρήση. Κατάλληλοι προς τούτο είναι μόνιμα βοσκοτόπια, αγροί με ετήσιες καλλιέργειες δημητριακών (εκτός αραβοσίτου) ή πυκνοσπαρμένοι με χλωρό λίπασμα. Ο επιλεγμένος τόπος δειγματοληψίας δεν θα πρέπει να έχει υποβληθεί σε κατεργασία με προϊόντα προστασίας καλλιεργειών για ένα τουλάχιστον χρόνο πριν από τη δειγματοληψία. Επίσης, για έξι μήνες τουλάχιστον δεν θα πρέπει να έχει χρησιμοποιηθεί οργανικό λίπασμα. Η χρήση ανόργανου λιπάσματος είναι αποδεκτή μόνον όταν είναι σύμφωνη με τις απαιτήσεις της καλλιέργειας και δεν θα πρέπει να λαμβάνονται δείγματα εδάφους παρά μόνον τρεις μήνες τουλάχιστον μετά από τη χρήση του λιπάσματος. Θα πρέπει να αποφεύγεται η χρήση εδάφους κατεργασμένου με λιπάσματα με γνωστές βιοκτόνες επιδράσεις (π.χ. κυαναμίδιο ασβεστίου).

Θα πρέπει να αποφεύγεται δειγματοληψία κατά τη διάρκεια ή αμέσως μετά μακρές περιόδους (μεγαλύτερες των 30 ημερών) ξηρασίας ή κατάκλυσης με νερό. Για οργωμένα εδάφη, τα δείγματα θα πρέπει να λαμβάνονται από βάθος 0 έως 20 cm. Για χορτολιβαδικές εκτάσεις (βοσκές) ή άλλα εδάφη τα οποία δεν οργώνονται για μακρύτερες περιόδους (τουλάχιστον μία καλλιεργητική περίοδος), το μέγιστο βάθος δειγματοληψίας μπορεί να είναι ελαφρώς μεγαλύτερο από 20 cm (π.χ. έως 25 cm).

Τα δείγματα εδάφους θα πρέπει να μεταφέρονται χρησιμοποιώντας δοχεία και υποθερμοκρασιακές συνθήκες που να εγγυώνται ότι δεν υπάρχει περίπτωση σημαντικής μεταβολής των αρχικών ιδιοτήτων του εδάφους.

1.6.3.2 *Αποθήκευση*

Προτιμάται η χρήση εδαφών προσφάτως συλλεγέντων από την τοποθεσία συλλογής: Εάν δεν μπορεί να αποφευχθεί η αποθήκευση στο εργαστήριο, τα εδάφη μπορούν να αποθηκεύονται στο σκοτάδι στους 4±2 °C για τρεις μήνες κατ' ανώτατο όριο. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των εδαφών, πρέπει να διασφαλίζεται η ύπαρξη αερόβιων συνθηκών. Εάν τα εδάφη συλλέγονται από περιοχές όπου είναι κατεψυγμένα για τρεις μήνες τουλάχιστον το χρόνο, μπορεί να εξεταστεί και η αποθήκευση για έξι μηνες στους - 18 °C έως - 22 °C. Πριν από κάθε πείραμα μετριέται η μικροβιακή βιομάζα των αποθηκευμένων εδαφών, ο άνθρακας δε στη βιομάζα θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 1 % του συνολικώς περιεχομένου στο έδαφος οργανικού άνθρακα (βλ. ενότητα 1.6.2).

1.6.4 **Χειρισμός και προετοιμασία των εδαφών για τη δοκιμή**

1.6.4.1 *Προεπώαση*

Εφόσον το έδαφος αποθηκεύτηκε (βλ. ενότητα 1.6.3.2), συνιστάται προεπώαση για μια περίοδο μεταξύ 2 και 28 ημερών. Η θερμοκρασία και υγρασία του εδάφους κατά τη διάρκεια της προεπώασης θα πρέπει να είναι παρόμοιες με τις χρησιμοποιούμενες στη δοκιμή (βλ. ενότητες 1.6.4.2 και 1.7.1.3).

▼B

1.6.4.2 *Φυσικοχημικά χαρακτηριστικό.*

Το έδαφος καθαρίζεται με το χέρι από τυχόν ενυπάρχοντα μεγάλα αντικείμενα (π.χ. πέτρες, μέρη φυτών, κλπ) και κατόπιν κοσκινίζεται εν υγρώ χωρίς υπερβολική ξήρανση για λήψη σωματιδίων μεγέθους μέχρι το πολύ 2 mm. Η υγρασία του δείγματος εδάφους θα πρέπει να ρυθμίζεται με αποσταγμένο ή απιονισμένο νερό σε τιμή μεταξύ 40 και 60 % της μέγιστης ικανότητας για συγκράτηση νερού.

1.6.4.3 *Τροποποίηση με οργανικό υπόστρωμα*

Το έδαφος θα πρέπει να τροποποιείται με κατάλληλο οργανικό υπόστρωμα, π.χ. κονιοποιημένο άλευρο πράσινης μηδικής (κύριο συστατικό: *Medicago sativa)* με λόγο C/N μεταξύ 12/l και 16/l. Ο συνιστώμενος λόγος μηδικής-εδάφους είναι 5 g μηδικής ανά χιλιόγραμμο εδάφους (ξηρά μάζα).

1.6.5 **Προετοιμασία της υπό δοκιμή ουσίας για εφαρμογή στο έδαφος**

Η υπό δοκιμή ουσία εφαρμόζεται κυρίως χρησιμοποιώντας κάποιον φορέα. Ο φορέας μπορεί να είναι νερό (για υδατοδιαλυτές ουσίες) ή αδρανές στερεό όπως λεπτή χαλαζιακή άμμος (μέγεθος σωματιδίων: 0,1-0,5 mm). Αλλοι υγροί φορείς (π.χ. οργανικοί διαλύτες όπως ακετόνη, χλωροφόρμιο) εκτός νερού θα πρέπει να αποφεύγονται επειδή μπορεί να καταστρέψουν τη μικροχλωρίδα. Εφόσον ως φορέας χρησιμοποιείται άμμος, αυτή μπορεί να επιχρίεται με την υπό δοκιμή ουσία διαλελυμένη ή εναιωρούμενη σε κατάλληλο διαλύτη. Στις περιπτώσεις αυτές, ο διαλύτης θα πρέπει να απομακρύνεται με εξάτμιση πριν από την ανάμειξη με το έδαφος. Για άριστη κατανομή της υπό δοκιμή ουσίας στο έδαφος, συνιστάται μια σχέση 10 g άμμου ανά χιλιόγραμμο εδάφους (ξηρά μάζα). Τα δείγματα-μάρτυρες υποβάλλονται σε κατεργασία με ισοδύναμη ποσότητα νερού και/ή χαλαζιακής άμμου μόνον.

Όταν δοκιμάζονται πτητικά χημικά, θα πρέπει να αποφεύγονται κατά το δυνατόν απώλειες κατά την κατεργασία και να γίνεται προσπάθεια για τη διασφάλιση ομοιογενούς κατανομής στο έδαφος (π.χ. η υπό δοκιμή ουσία θα πρέπει να εγχύεται στο έδαφος σε διάφορα σημεία).

1.6.6 **Συγκεντρώσεις δοκιμής**

Όταν δοκιμάζονται αγροχημικά, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον δύο συγκεντρώσεις. Η μικρότερη συγκέντρωση θα πρέπει να αντιπροσωπεύει τουλάχιστον τη μέγιστη ποσότητα που αναμένεται να φθάσει στο έδαφος υπό συνθήκες συναντώμενες στην πράξη ενώ η μεγαλύτερη συγκέντρωση θα πρέπει να είναι πολλαπλάσια της μικρότερης συγκέντρωσης. Οι συγκεντρώσεις της προστιθέμενης στο έδαφος υπό δοκιμή ουσίας υπολογίζονται υποθέτοντας ομοιόμορφη ενσωμάτωση μέχρι βάθους 5 cm και φαινόμενη πυκνότητα εδάφους 1,5. Για αγροχημικά που εφαρμόζονται απευθείας στο έδαφος, ή για χημικά για τα οποία μπορεί να προβλεφθεί η ποσότητα που φθάνει στό έδαφος, οι συνιστώμενες συγκεντρώσεις δοκιμής είναι η μέγιστη Προβλεπόμενη Περιβαλλοντική Συγκέντρωση (ΠΠΣ) και το πενταπλάσιο αυτής της συγκέντρωσης. Ουσίες που αναμένεται να εφαρμοστούν σε εδάφη αρκετές φορές σε μια καλλιεργητική περίοδο θα πρέπει να δοκιμάζονται σε συγκεντρώσεις προκύπτουσες από τον πολλαπλασιασμό της ΠΠΣ επί το μέγιστο αναμενόμενο αριθμό εφαρμογών. Η μεγαλύτερη, ωστόσο, συγκέντρωση δοκιμής δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το δεκαπλάσιο του μέγιστου εφάπαξ ποσοστού εφαρμογής. Εάν δοκιμάζονται μη αγροχημικά, χρησιμοποιείται γεωμετρική σειρά πέντε τουλάχιστον συγκεντρώσεων. Οι συγκεντρώσεις δοκιμής θα πρέπει να καλύπτουν το εύρος που απαιτείται για τον προσδιορισμό των τιμών EC_X.

▼B

1.7 ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.7.1 **Συνθήκες έκθεσης**

1.7.1.1 *Κατεργασία και έλεγχος*

Εάν δοκιμάζονται αγροχημικά, το εδαφικό δείγμα διαιρείται σε τρία τμήματα ίσου βάρους. Δύο τμήματα αναμειγνύονται με το φορέα που περιέχει το προϊόν, ενώ το άλλο αναμειγνύεται με το φορέα χωρίς το προϊόν (μάρτυρας). Τόσο για τα κατεργασμένα όσο και για τα ακατέργαστα εδάφη συνιστάται η παρασκευή τουλάχιστον τριών επαναληπτικών δειγμάτων. Εάν δοκιμάζονται μη αγροχημικά, το εδαφικό δείγμα χωρίζεται σε έξι τμήματα ίσου βάρους. Πέντε από τα δείγματα αναμειγνύονται με τον φορέα που περιέχει την υπό δοκιμή ουσία, ενώ το έκτο δείγμα αναμειγνύεται με τον φορέα χωρίς το χημικό. Τόσο για τα κατεργασμένα, όσο και για τους μάρτυρες, συνιστάται η παρασκευή τριών επαναληπτικών δειγμάτων. Θα πρέπει να δίδεται προσοχή ώστε να διασφαλίζεται η ομοιογενής κατανομή της υπό δοκιμή ουσίας στα κατεργασμένα εδαφικά δείγματα. Κατά τη διάρκεια της ανάμειξης, θα πρέπει να αποφεύγεται το έδαφος να λαμβάνει συμπαγή μορφή ή μορφή σβώλων.

1.7.1.2 *Επώαση των εδαφικών δειγμάτων*

Η επώαση των εδαφικών δειγμάτων μπορεί να γίνεται με δύο τρόπους: ως χύδην δείγματα κάθε κατεργασμένου και μη κατεργασμένου εδάφους ή ως σειρά επιμέρους και ταυτόσημου μεγέθους μερικών δειγμάτων κάθε κατεργασμένου και μη κατεργασμένου εδάφους. Ωστόσο, όταν δοκιμάζονται πτητικές ουσίες, η δοκιμή θα πρέπει να γίνεται μόνον μια μια σειρά επιμέρους μερικών δειγμάτων. Όταν τα εδάφη επωάζονται χύδην, προετοιμάζονται μεγάλες ποσότητες κάθε κατεργασμένου και μη εδάφους και τα προς ανάλυση μερικά δείγματα λαμβάνονται όπως απαιτείται κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Η αρχικώς προετοιμαζόμενη ποσότητα για κάθε κατεργασία και μαρτυρία εξαρτάται από το μέγεθος των μερικών δειγμάτων, τον αριθμό των επαναληπτικών δειγμάτων που χρησιμοποιούνται για ανάλυση και τον αναμενόμενο μέγιστο αριθμό χρόνων δειγματοληψίας. Τα χύδην επωαζόμενα εδάφη θα πρέπει να αναμειγνύονται επισταμένως πριν από τη λήψη των μερικών δειγμάτων. Όταν τα εδάφη επωάζονται ως σειρά επιμέρους εδαφικών δειγμάτων, κάθε χύδην κατεργασμένο και μη έδαφος διαιρείται στον απαιτούμενο αριθμό μερικών δειγμάτων και τα τελευταία χρησιμοποιούνται όπως απαιτείται. Σε δοκιμές όπου μπορούν να αναμένονται περισσότεροι των δύο χρόνοι δειγματοληψίας, θα πρέπει να παρασκευάζεται ικανός αριθμός μερικών δειγμάτων ώστε να καλύπτονται, από πλευράς αριθμού, το σύνολο των επαναληπτικών δειγμάτων και των χρόνων δειγματοληψίας. Θα πρέπει να επωάζονται τουλάχιστον τρία επαναληπτικά δείγματα του υπό δοκιμή εδάφους υπό αερόβιες συνθήκες (βλ. ενότητα 1.7.1.1). Κατά τη διάρκεια όλων των δοκιμών, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται δοχεία με επαρκή κενό χώρο άνωθεν για να αποφεύγεται η ανάπτυξη αναερόβιων συνθηκών. Όταν δοκιμάζονται πτητικές ουσίες, η δοκιμή θα πρέπει να εκτελείται μόνον με μια σειρά επιμέρους μερικών δηγμάτων.

1.7.1.3 *Συνθήκες και διάρκεια δοκιμής*

Η δοκιμή εκτελείται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου 20±2 °C. Η υγρασία των εδαφικών δειγμάτων θα πρέπει να διατηρείται κατά τη διάρκεια της δοκιμής μεταξύ 40 % και 60 % της μέγιστης ικανότητας συγκράτησης νερού του εδάφους (βλ. ενότητα 1.6.4.2) με διακύμανση ±5 %. Εφόσον χρειάζεται, μπορεί να προστεθεί απεσταγμένο, απιονισμένο νερό.

Η ελάχιστη διάρκεια των δοκιμών είναι 28 ημέρες. Εάν δοκιμάζονται αγροχημικά, συγκρίνονται τα ποσοστά σχηματισμού νιτρικών σε κατεργασμένα και σε δείγματα μάρτυρες. Εάν την 28η ημέρα διαφέρουν κατά ποσοστό άνω του 25 %, η δοκιμή συνεχίζεται μέχρις ότου ληφθεί διαφορά ίση ή μικρότερη του 25 %, ή για μέγιστο χρονικό διάστημα 100 ημερών, ανάλογα με το ποιο επιτυγχάνεται συντομότερα. Για μη αγροχημικά, η δοκιμή τερματίζεται μετά 28 ημέρες. Την 28η ημέρα, προσδιορίζονται οι ποσότητες των νιτρικών στα κατεργασμένα και στα δείγματα μάρτυρες και υπολογίζονται οι τιμές EC_X.

▼B

1.7.2 **Δειγματοληψία και ανάλυση εδαφών**

1.7.2.1 *Χρονογιάγραμμα δειγματοληψίας εδαφών*

Εάν δοκιμάζονται αγροχημικά, τα εδαφικά δείγματα αναλύονται για νιτρικά κατά τις ημέρες 0, 7, 14 και 28.

Εάν απαιτείται παρατεταμένη δοκιμή, θα πρέπει να γίνονται περαιτέρω μετρήσεις σε διαστήματα 14 ημερών μετά την 28η ημέρα. Εάν δοκιμάζονται μη αγροχημικά, χρησιμοποιούνται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις δοκιμής και τα εδαφικά δείγματα αναλύονται για χημικά στην αρχή (ημέρα 0) και στο τέλος της περιόδου έκθεσης (28 ημέρες). Εφόσον κριθεί αναγκαίο, μπορεί να προστεθεί και μια ενδιάμεση μέτρηση, π.χ. την 7η ημέρα. Τα δεδομένα της 28ης ημέρας χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της τιμής EC_X του χημικού. Εφόσον είναι επιθυμητό, για την αναφορά της αρχικής ποσότητας νιτρικών στο έδαφος μπορούν να χρησιμοποιηθούν δεδομένα από τα δείγματα-μάρτυρες της ημέρας 0.

1.7.2.2 *Ανάλνοη εδαφικών δειγμάτων*

Σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας προσδιορίζεται η ποσότητα των νιτρικών που σχηματίζονται σε κάθε επαναληπτικό κατεργασμένο δείγμα και δείγμα-μάρτυρα. Τα νιτρικά εκχυλίζονται από το έδαφος αναδεύοντας δείγματα με κατάλληλο διαλύτη εκχύλισης, π.χ. διάλυμα χλωριούχου καλίου 0,1 M. Συνιστάται μια σχέση 5 ml διαλύματος KC1 ανά γραμμάριο ξηρού βάρους ισοδύναμου εδάφους. Για βελτιστοποίηση της εκχύλισης, τα δοχεία με το έδαφος και το διάλυμα εκχύλισης δεν θα πρέπει να είναι γεμάτα πάνω από το μισό. Τα μίγματα αναδεύονται με 150 σ.α.λ για 60 λεπτά Τα μίγματα φυγοκεντρούνται ή διηθούνται και οι υγρές φάσεις αναλύονται για νιτρικά Υγρά εκχυλίσματα απηλλαγμένα σωματιδίων μπορούν να αποθηκευτούν πριν από την ανάλυση σε θερμοκρασία - 20±5 °C για μέχρι έξι μήνες.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Εάν διεξάγονται δοκιμές με αγροχημικά, θα πρέπει να καταγράφεται η ποσότητα των νιτρικών που σχηματίζονται σε κάθε επαναληπτικό δείγμα εδάφους και να καταγράφονται σε πίνακα οι μέσες τιμές όλων των επαναληπτικών δειγμάτων. Τα ποσοστά μετατροπής του αζώτου θα πρέπει να εκτιμώνται με κατάλληλες και εν γένει αποδεκτές στατιστικές μεθόδους (π.χ. F-δοκιμή, 5 % επίπεδο σημαντικότητας). Οι ποσότητες των σχηματιζομένων νιτρικών εκφράζονται σε mg νιτρικών/kg ξηρού βάρους εδάφους/ημέρα. Το ποσοστό μετατροπής νιτρικών σε κάθε κατεργασία συγκρίνεται με εκείνο του μάρτυρα και υπολογίζεται η % απόκλιση από τον μάρτυρα.

Εάν πραγματοποιούνται δοκιμές με μη αγροχημικά, προσδιορίζεται η ποσότητα των νιτρικών σε κάθε επαναληπτικό δείγμα και χαράσσεται καμπύλη δόσης-απόκρισης για υπολογισμό των τιμών EC_X. Οι ανευρισκόμενες ποσότητες νιτρικών (δηλ. mg νιτρικών/kg ξηρού βάρους εδάφους) στα κατεργασμένα δείγματα μετά 28 ημέρες συγκρίνονται με τις ανευρισκόμενες στο μάρτυρα. Από τα στοιχεία αυτά, υπολογίζονται οι % τιμές αναστολής για κάθε συγκέντρωση δοκιμής. Τα % ποσοστά αυτά καταγράφονται γραφικώς συναρτήσει της συγκεντρώσεως και στη συνέχεια χρησιμοποιούνται στατιστικές διαδικασίες για τον υπολογισμό των τιμών EC_X. Προσδιορίζονται επίσης όρια εμπιστοσύνης (ρ = 0,95) για τις υπολογιζόμενες τιμές EC_X χρησιμοποιώντας τυποποιημένες διαδικασίες (10)(11)(12).

Οι υπό δοκιμή ουσίες που περιέχουν υψηλές ποσότητες αζώτου μπορεί να συνεισφέρουν στις ποσότητες νιτρικών που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Εάν οι ουσίες αυτές δοκιμάζονται σε υψηλή συγκέντρωση (π.χ. χημικά που αναμένεται να χρησιμοποιηθούν επανειλημμένως), στη δοκιμή πρέπει να περιλαμβάνονται κατάλληλοι μάρτυρες (δηλ. έδαφος με υπό δοκιμή ουσία αλλά χωρίς φυτάλευρο). Στους υπολογισμούς EC_X πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα δεδομένα από τους ελέγχους αυτούς.

▼B

2.2 ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Όταν υπολογίζονται αποτελέσματα από δοκιμές με αγροχημικά και η διαφορά στα ποσοστά σχηματισμού νιτρικών μεταξύ της με χαμηλότερο ποσοστό κατεργασίας (δηλ. της μέγιστης προβλεπόμενης συγκέντρωσης) και μάρτυρα είναι ίση ή μικρότερη του 25 % σε οποιοδήποτε χρόνο δειγματοληψίας μετά την 28η ημέρα, το προϊόν μπορεί να αξιολογηθεί ως μη έχον μακροπρόθεσμη επίδραση στη μετατροπή του αζώτου στα εδάφη. 'Οταν αξιολογούνται αποτελέσματα από δοκιμές με χημικά άλλα εκτός των αγροχημικών, χρησιμοποιούνται οι τιμές EC50, EC_{25} και/ή EC_{10}.

3. **ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— Πλήρη ταυτοποίηση του χρησιμοποιηθέντος εδάφους, συμπεριλαμβανομένων των εξής:

— γεωγραφικό στίγμα του τόπου (γεωγραφικό πλάτος και μήκος)

— πληροφορίες για το ιστορικό του τόπου (δηλ. κάλυψη από βλάστηση, κατεργασίες με προϊόντα προστασίας καλλιεργειών, κατεργασίες με λιπάσματα, τυχαία επιμόλυνση, κλπ)

— πρότυπο χρήσης (π.χ. γεωργικό έδαφος, δάσος, κλπ.)

— βάθος δειγματοληψίας (cm);

— περιεκτικότητα σε άμμο/ιλύ/άργιλο (% επί ξηρού βάρους)

— pH (στο νερό)

— περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (% επί ξηρού βάρους)

— περιεκτικότητα σε άζωτο (% επί ξηρού βάρους)

— αρχική συγκέντρωση νιτρικών (mg νιτρικών/kg ξηρής μάζας)

— κατιοανταλλακτική ικανότητα (mmol/kg)

— μικροβιακή βιομάζα ως ποσοστό του συνολικού οργανικού άνθρακα

— αναφορά των χρησιμοποιηθεισών μεθόδων για τον προσδιορισμό κάθε παραμέτρου

— κάθε πληροφορία σχετικά με τη συλλογή και αποθήκευση εδαφικών δειγμάτων

— λεπτομέρειες για την προεπώαση του εδάφους, εφόσον συντρέχει περίπτωση. Υπό δοκιμή ουσία:

φυσική υπόσταση της ουσίας και, όπου χρειάζεται, φυσικοχημικές ιδιότητες

— δεδομένα χημικής ταυτοποίησης, όπου χρειάζεται, συμπεριλαμβανομένου του χημικού τύπου, της καθαρότητας (δηλ. για προϊόντα προστασίας καλλιεργειών, το ποσοστό του δραστικού συστατικού), περιεκτικότητα σε άζωτο.

— Υπόστρωμα:

πηγή υποστρώματος,

— σύνθεση (δηλ. άλευρο μηδικής, άλευρο πράσινης μηδικής),

— περιεκτικότητα σε άνθρακα, άζωτο (% επί ξηρού βάρους),

— μέγεθος κοσκινού (mm).

▼B

— Συνθήκες δοκιμής:

λεπτομέρειες της τροποποίησης του εδάφους με οργανικό υπόστρωμα,

— αριθμός χρησιμοποιηθεισών συγκεντρώσεων του υπό δοκιμή χημικού και, όπου κρίνεται σκόπιμο, αιτιολόγηση των επιλεγεισών συγκεντρώσεων,

— λεπτομέρειες για την εφαρμογή της υπό δοκιμή ουσίας στο έδαφος,

— θερμοκρασία επώασης,

— υγρασία εδάφους στη αρχή και κατά τη διάρκεια της δοκιμής,

— χρησιμοποιηθείσα μέθοδος επώασης εδάφους (δηλ. χύδην ή ως σειρά επιμέρους μερικών δειγμάτων),

— αριθμός επαναληπτικών δειγμάτων,

— χρόνοι δειγματοληψίας,

— χρησιμοποιηθείσα μέθοδος για εκχύλιση των νιτρικών από το έδαφος

— Αποτελέσματα:

χρησιμοποιηθείσα αναλυτική διαδικασία και εξοπλισμός για ανάλυση των νιτρικών,

— δεδομένα σε μορφή πίνακα, συμπεριλαμβανομένων μεμονωμένων και μέσων τιμών για μετρήσεις νιτρικών,

— διακύμανση μεταξύ των επαναληπτικών δειγμάτων σε κατεργασμένα δείγματα και σε δείγματα μάρτυρες,

— εξηγήσεις διορθώσεων που έγιναν στους υπολογισμούς, εφόσον συντρέχει περίπτωση,

— η % διακύμανση στα ποσοστά σχηματισμού νιτρικών σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας ή,

— εάν κρίνεται σκόπιμο, η τιμή EC_{50} με 95 % όριο εμπιστοσύνης, άλλες τιμές EC_X (π.χ. EC_{25} ή EC_{10}) με διαστήματα εμπιστοσύνης και ένα γράφημα της καμπύλης δόσης-απόκρισης,

— στατιστική κατεργασία αποτελεσμάτων,

— κάθε πληροφορία και παρατήρηση χρήσιμη για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

(5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality — Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: *Soil Quality -Biological Methods.*

▼B

(6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(7) ISO 10381-6 (1993). Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method.

(9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

(10) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.

(11) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

(12) Finney, D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

Γ.22. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΕΔΑΦΟΥΣ: ΔΟΚΙΜΗ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ ΑΝΘΡΑΚΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμής αποτλει αναπαραγωγή της OECD TG 217 (1999).

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμής περιγράφει εργαστηριακή μέθοδο προοριζόμενη για τη διερεύνηση των μακροπρόθεσμων δυνητικών επιδράσεων που έχει η εφάπας έκθεση προδόντων προστασιας καλλιεπγειάγν και πιθανόν και άλλων χημικών στην ικανότητα μικροοργανισμών του εδάφους να μετατρέπουν τον άνθρακα. Η δοκιμή αυτή βασίξεται κυριως στις συστάσεις του Ευρωπαικού και Μεσογειακού Οργανισμού Φυτοπροστασίας (1). Ωστόσο, ελήφθησαν υπόψη και άλλες κατευθυντήριες οδηγίες, συμτεριλαμβανομένων και εκείνων των German Biologische Bundesanstalt (2), του Οργανισμού Προστασίας του Περιβάλλοντος των ΗΠΑ (3), και της SETAC (4). Σε συνάντηση εργασιας του ΟΟΣΑ για την εκιλογή εδαφών/ιζημάτων, που έγινε στο Belgirate, Ιταλια, το 1995 (5) συμφωνήθηκε ο αριθμός και ο τύπος των προς χρήση εδαφών στην καρούσα δοκιμή. Οι συστάσεις για τη συλλογή, χειρισμό και αποθήκευση των εδαφικών δετγμάτων βασιζονται σε κείμενο οδηγιών του ISO (6) και συστάσεις από τη συνάντηση του Belgirate.

Για την αζισλόγηση και εκτίμηση των τοζικών ξαρακτηριστικών υπό δσκιμή συσιών, μτορεί να ακαιτείται προσδιορισμός των επιδράσεων στη μικροβιακή δραστικότητα του εδάφους, π.χ. όταν απαιτούνται στοιχεία για τις δυνητικές παρενέργειες προτόντων προστασίας καλλιεργειών στη μικροχλωριδα του εδάφους ή όταν αναμένεται έκσεση μικροοργανισμών του εδάφους σε άλλες χημικές συσίες εκτός προτόντων προστασιας καλλιεργειών. Η δοκιμή μετατραπής του άνθρακα πραγματομοκιείται για του μροσδιορισμό των εμιδράσεων των εν λόγω χημικών στη μικροχλωριδα του εδάφους. Εφόσον δοκιμάζονται αγροχημικά (π.χ. προιόντα τροστασίας καλλιεργειών, λιπάσματα, δασοκομικά χημικά), πραγματαποισύνται δοκιμές για τη μετατροπή τόσο του αζώτου όσο και του άνθρακα. Εφόον δεν δοκιμάζονται αγροχημικά, απκει η δοκιμή μετατροπής του αζώτου. Ωστόσο, εάν οι τιμές EC_{50} της δοκιμής μετατροπής του αζώτου για τα εν λόγω χημικά ειναι στην περιοχή των τιμών που βπισκονται για διαθέσιμους στο εμπόριο αναστολεις νιτροποιησης (π.χ. νιτραπυρίνη). μπορεί να διεξαχθεί και δοκιμή μετατροπής του άνθρακα για την απόκτηση περαιτέρω πληροφάπησης.

Τα εδάφη συνίστανται από ζώντα και μη ζώντα συστατικά στοιχεια που υφίστανται σε πολχίπλοκα και ετερογενή μίγματα. Οι μικροοργανισμοί παίζουν σημαντικό ρόλο στη διάσπαση και μετατροπή οργανιπής ύλης σε γόνιμα χώματα με πολλά είδη που συνεισφερουν σε διάφορες πτυχές της ψονιμότητας των εδαφών. Τυχόν μακροπρόθεσμη παρέμβαση σε αυτές τις βιοχημικές διεργασιες μπορει να έχει δυνητικώς επιδραση στον κύκλο των θρεπτικών αλάτων και να αλλοιωθει η γονιμότητα του εδάφους. Σε όλα τα γόνιμα εδάφη επέρχεται μετατροπή του αζώτου και του άνθρακα. Αν και οι μικροβιακές κοινότητες που ειναι υπεύθυνες για τις διεργασίες αυτές διαφέρουν ατό έδαφος σε έδαφος, οι οδοι μετατροπής ειναι ουσιαστικώς οι ιδιες.

▼B

Η περιραφόμενη παρούσα μέθοδος δοκιμής προορίζεται για την ανίχνευση μακροπρόθεσμων δυσμενών επιδράσεων μιας ουσίας στη διεργασια μετατροπής του άνθρακα σε αερόβια επιφανειακά εδάφη. Η δοκιμή είναι ευαισθητη σε μεταβολές μεγέθους και δραστικότητας των μικροβιακών κοινοτήτων που ειναι υπεύθυνες για τη μετατροπή του άνθρακα δεδομένου ότι κατά τη δοκιμή οι κοινότητες αυτές υποβάλλονται τόσο σε χημική καταπόνηση όσο και σε στέρηση άνθρακα. Χρησιμοκοισίται αμμιοδες έδαφας χαμηλής περιεκτικότητας σε οργανική ύλη. Το έδαφος αυτό υποβάλλεται σε κατεργασία με την υπό σοκιμή συσία και επωάζεται υπο συνθήκες που επιτρέπουν ταχύ μικροβιακό μεταβολισμό. Υπό τις συνθήκες αυτές, οι πηγές ευκόλως διαθτσιμου άνθπακα στο έδαφος εξαντλούνται με ταχύ ρυθμό. Αυτό προκαλεί έλλειψη άνθρακα με αποτέλεσμα τη θανάτωση των μικροβιακών κυττάρων και την εμφάνιση λανθάνουσας κατάστασης και/ή δημιουργια οπορίων. Εάν η δοκιμή διαρκέσει για πάνα από 28 ημέρες, ο συνδυασμός των αντιδράσεων αυτών μπορεί να μετρηθεί σε (ακατέργαστο έδαφος) μάπτυρες ως προοδευτική απώλεια μεταβολικώς ενεπγού μικροβιακής βιομάζας (7). Εάν βιομάζα εδαφών που αντιμετωπίζουν στερηρικά φαινόμενα από πλευράς άνθρακα, υπό τις συνθήκες της δοκιμής, επηρεαστεί από την παρουσία χημικής συσιας, μπορεί να μην επιστρέψει στα ιδια επιπεδα με εκεινα του μάρτυρα. Έτσι, διαταχές που προκαλούνται από την υπό δακιμή αυσία ανά πάσα ατιγμή κατά την διάρκεια της δοκιμής διαπκούν συχνά μέχρι το τέλοσ της δοκιμής.

Οι δοκιμές από τις οποίες αναπτύχθηκε η παρούσα μέθοδος δοκιμής είχαν αρχικά σχεδιαστεί για ουσίες για τις οποίες μπορεί να προβλεφθεί η ποσότητα που φθάνει στο έδαφος. Αυτό ισχύει, π.χ., στην περίπτωση προϊόντων προστασίας καλλιεργειών για τα οποία είναι γνωστό το ποσοστό χρήσης στα εδάφη. Για τα αγροχημικά, αρκεί . η δοκιμή δύο δόσεων σχετικών με το προαναμενόμενο ή προβλεπόμενο ποσοστό χρήσης. Τα αγροχημικά μπορούν να δοκιμαστούν ως δραστικά συστατικά (δ.σ.) ή ως τυποποιημένης συνθέσεως προϊόντα. Ωστόσο, η δοκιμή δεν περιορίζεται σε χημικά με προβλέψιμες περιβαλλοντικές συγκεντρώσεις. Αλλάζοντας τόσο τις ποσότητες της εφαρμοζόμενης στο έδαφος υπό δοκιμή ουσίας, όσο και τον τρόπο με τον οποίο αξιολογούνται τα δεδομένα, η δοκιμή μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για χημικά για τα οποία δεν είναι γνωστή η αναμενόμενη να φθάσει στο έδαφος ποσότητα. Έτσι, στην περίπτωση χημικών που δεν εμπίπτουν στην κατηγορία των αγροχημικών, προσδιορίζονται οι επιδράσεις μιας σειράς συγκεντρώσεων στην μετατροπή του άνθρακα. Τα στοιχεία από τις δοκιμές αυτές χρησιμοποιούνται για τη χάραξη καμπύλης δόσεως-απόκρισης και τον υπολογισμό τιμών EC_X, όπου το x ορίζεται ως η % επίδραση.

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

Μετατροπή άνθρακα: είναι η αποικοδόμηση από μικροοργανισμούς οργανικής ύλης για το σχηματισμό διοξειδίου του άνθρακα ως τελικού ανόργανου προϊόντος.

EC_x (συγκέντρωση αποτελέσματος x): είναι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο έδαφος, η οποία απολήγει σε x % αναστολή της μετατροπής του άνθρακα σε διοξείδιο του άνθρακα.

EC_{50} (συγκέντρωση διάμεσου αποτελέσματος): είναι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο έδαφος, η οποία απολήγει σε 50 % αναστολή της μετατροπής άνθρακα σε διοξείδιο του άνθρακα.

1.3 ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Καμμία.

▼B

1.4 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Κοσκινισμένο χώμα υποβάλλεται σε κατεργασία με την υπό δοκιμή ουσία ή αφήνεται ακατέργαστο (μάρτυρας). Εάν δοκιμάζονται αγροχημικά, συνιστώνται δύο κατ' ελάχιστο συγκεντρώσεις δοκιμής που θα πρέπει να επιλέγονται ανάλογα με την υψηλότερη αναμενόμενη επιτόπια συγκέντρωση. Μετά 0, 7, 14 και 28 ημέρες επώασης, δείγματα κατεργασμένου και μη κατεργασμένου (μάρτυρας) εδάφους αναμειγνύονται με γλυκόζη και για 12 διαδοχικές ώρες μετρώνται οι επαγόμενοι από τη γλυκόζη ρυθμοί αναπνοής. Οι ρυθμοί αναπνοής εκφράζονται ως απελευθερούμενο διοξείδιο του άνθρακα (mg διοξειδίου του άνθρακα/kg ξηρού εδάφους/h) ή ως καταναλισκόμενο οξυγόνο (mg οξυγόνου/kg εδάφους/h). Ο μέσος ρυθμός αναπνοής στα κατεργασμένα εδαφικά δείγματα συγκρίνεται με εκείνον του μάρτυρα και υπολογίζεται η % απόκλιση του κατεργασμένου από το μάρτυρα. Όλες οι δοκιμές διαρκούν τουλάχιστον 28 ημέρες. Εάν, την 28η ημέρα, οι διαφορές μεταξύ κατεργασμένων και μη κατεργασμένων εδαφών είναι ίσες ή μεγαλύτερες του 25 %, οι μετρήσεις συνεχίζονται σε διαστήματα 14 ημερών μέχρι 100 ημέρες το πολύ. Εάν οι υπό δοκιμή ουσίες δεν ανήκουν στα αγροχημικά, στα δείγματα του εδάφους προστίθεται μια σειρά συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή ουσίας και μετά 28 ημέρες μετρώνται οι προκαλούμενοι από τη γλυκόζη ρυθμοί αναπνοής (δηλ ο μέσος όρος των σχηματιζομένων ποσοτήτων διοξειδίου του άνθρακα ή των καταναλισκομένων ποσοτήτων οξυγόνου). Τα αποτελέσματα από τις δοκιμές με τη σειρά συγκεντρώσεων αναλύονται χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο αναγωγής και υπολογίζονται οι τιμές EC_x (δη. EC_{50}, EC_{25} και/ή EC_{10}). Βλ. ορισμούς.

1.5 ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Οι αξιολογήσεις των αποτελεσμάτων των δοκιμών με αγροχημικά βασίζονται σε σχετικώς μικρές διαφορές (δηλ. μέση τιμή ±25 %) μεταξύ του απελευθερούμενου διοξειδίου του άνθρακα ή του καταναλισκόμενου οξυγόνου, στα (ή από) τα κατεργασμένα εδαφικά δείγματα ή δείγματα-μάρτυρες, έτσι τυχόν μεγάλες διακυμάνσεις στους μάρτυρες μπορεί να οδηγήσουν σε εσφαλμένα αποτελέσματα. Συνεπώς, η διακύμανση μεταξύ επαναληπτικών δειγμάτων-μαρτύρων θα πρέπει να είναι μικρότερη του ±15 %.

1.6 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.6.1 **Εξοπλισμός**

Χρησιμοποιούνται δοχεία δοκιμής κατασκευασμένα από χημικώς αδρανές υλικό. Τα δοχεία θα πρέπει να είναι κατάλληλης χωρητικότητας ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη διαδικασία για την επώαση των εδαφών, δηλ. επώαση σε χύδην κατάσταση ή ως σειρά επιμέρους δηγμάτων εδάφους (βλ. ενότητα 1.7.1.2). Θα πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια τόσο για την ελαχιστοποίηση της απώλειας νερού όσο και για την παροχή δυνατότητας ανταλλαγής αερίων (π.χ. τα δοχεία δοκιμής μπορούν να καλύπτονται με διάτρητο φύλλο πολυαιθυλενίου). Όταν δοκιμάζονται πτητικές ουσίες, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σφραγιζόμενα και αεροστεγή δοχεία. Τα δοχεία θα πρέπει να είναι κατάλληλου μεγέθους ώστε με το εδαφικό δείγμα να πληρούται το ένα τέταρτο περίπου του όγκου τους.

Για τον προσδιορισμό της προκαλούμενης από τη γλυκόζη αναπνοής, απαιτούνται συστήματα επωάσεων και όργανα για τη μέτρηση της παραγωγής διοξειδίου του άνθρακα ή κατανάλωσης οξυγόνου. Παραδείγματα τέτοιων συστημάτων και οργάνων ανευρίσκονται στη βιβλιογραφία (8) (9) (10) (11).

1.6.2 **Επιλογή και αριθμός εδαφών**

Χρησιμοποιείται ένα μοναδικό έδαφος. Τα συνιστώμενα εδαφικά χαρακτηριστικά είναι τα εξής:

— περιεκτικότητα σε άμμο: τουλάχιστον 50 % μέχρι το πολύ 75 %

▼B

— ρΗ: 5,5-7,5;

— περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα: 0,5-1,5 %;

— θα πρέπει να μετριέται η μικροβιακή βιομάζα (12)(13) και η περιεκτικότητά της σε άνθρακα θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 1 % του συνόλου του οργανικού άνθρακα του εδάφους.

Στις περισσότερες περιπτώσεις, έδαφος με τα χαρακτηριστικά αυτά αντιπροσωπεύει τη χειρότερη περίπτωση, αφού η προσρόφηση του υπό δοκιμή χημικού είναι ελάχιστη και η διαθεσιμότητά του στη μικροχλωρίδα μέγιστη. Συνεπώς, δεν χρειάζονται εν γένει δοκιμές με άλλα εδάφη. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, π.χ. όταν η προβλεπόμενη κύρια χρήση της υπό δοκιμή ουσίας είναι για συγκεκριμένα εδάφη, όπως όξινα εδάφη δασών, ή στην περίπτωση ηλεκτροστατικώς φορτισμένων χημικών, μπορεί να χρειάζεται να χρησιμοποιηθεί και κάποιο άλλο ακόμη έδαφος.

1.6.3 **Συλλογή και αποθήκευση δειγμάτων εδαφών**

1.6.3.1 *Συλλογή*

Θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμες λεπτομερείς πληροφορίες για το ιστορικό του συγκεκριμένου τόπου από τον οποίο συλλέγεται το προς δοκιμή δείγμα. Στα στοιχεία πρέπει να περιλαμβάνονται η ακριβής τοποθεσία, η υπάρχουσα βλάστηση, οι ημερομηνίες κατεργασίας με προϊόντα προστασίας καλλιεργειών, κατεργασίες με οργανικά και ανόργανα λιπάσματα, προσθήκες βιολογικών υλικών ή τυχαίες επιμολύνσεις. Ο επιλεγμένος τόπος για τη συλλογή εδάφους θα πρέπει να επιτρέπει τη μακροπρόθεσμη χρήση. Κατάλληλοι προς τούτο είναι μόνιμα βοσκοτόπια, αγροί με ετήσιες καλλιέργειες δημητριακών (εκτός αραβοσίτου) ή πυκνοσπαρμένοι με χλωρό λίπασμα. Ο επιλεγμένος τόπος δειγματοληψίας δεν θα πρέπει να έχει υποβληθεί σε κατεργασία με προϊόντα προστασίας καλλιεργειών για ένα τουλάχιστον χρόνο πριν από τη δειγματοληψία. Επίσης, για έξι μήνες τουλάχιστον δεν θα πρέπει να έχει χρησιμοποιηθεί οργανικό λίπασμα Η χρήση ανόργανου λιπάσματος είναι αποδεκτή μόνον όταν είναι σύμφωνη με τις απαιτήσεις της καλλιέργειας και δεν θα πρέπει να λαμβάνονται δείγματα εδάφους παρά μόνον τρεις μήνες τουλάχιστον μετά από τη χρήση του λιπάσματος. Θα πρέπει να αποφεύγεται η χρήση εδάφους κατεργασμένου με λιπάσματα με γνωστές βιοκτόνες επιδράσεις (π.χ. κυαναμίδιο ασβεστίου).

Θα πρέπει να αποφεύγεται δειγματοληψία κατά τη διάρκεια ή αμέσως μετά μακρές περιόδους (μεγαλύτερες των 30 ημερών) ξηρασίας ή κατάκλυσης με νερό. Για οργωμένα εδάφη, τα δείγματα θα πρέπει να λαμβάνονται από βάθος 0 έως 20 cm. Για χορτολιβαδικές εκτάσεις (βοσκές) ή άλλα εδάφη τα οποία δεν οργώνονται για μακρότερες περιόδους (τουλάχιστον μία καλλιεργητική περίοδος), το μέγιστο βάθος δειγματοληψίας μπορεί να είναι ελαφρώς μεγαλύτερο από 20 cm (π.χ. έως 25 cm). Τα δείγματα εδάφους θα πρέπει να μεταφέρονται χρησιμοποιώντας δοχεία και κάτω από συνθήκες θερμοκρασίας που να εγγυώνται ότι δεν υπάρχει περίπτωση σημαντικής μεταβολής των αρχικών ιδιοτήτων του εδάφους.

1.6.3.2 *Αποθήκευση*

Προτιμάται η χρήση εδαφών προσφάτως συλλεγέντων από την τοποθεσία συλλογής. Εάν δεν μπορεί να αποφευχθεί η αποθήκευση στο εργαστήριο, τα εδάφη μπορούν να αποθηκεύονται στο σκοτάδι στους 4±2 °C για τρεις μήνες κατ' ανώτατο όριο. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των εδαφών, πρέπει να διασφαλίζεται η ύπαρξη αερόβιων συνθηκών. Εάν τα εδάφη συλλέγονται από περιοχές όπου είναι κατεψυγμένα για τρεις μήνες τουλάχιστον το χρόνο, μπορεί να εξεταστεί και η αποθήκευση για έξι μηνες στους - 18 °C. Πριν από κάθε πείραμα μετριέται η μικροβιακή βιομάζα των αποθηκευμένων εδαφών, ο άνθρακας δε στη βιομάζα θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 1 % του συνολικώς περιεχομένου στο έδαφος οργανικού άνθρακα (βλ ενότητα 1.6.2).

▼B

1.6.4 **Χειρισμός και προετοιμασία των εδαφών για τη δοκιμή**

1.6.4.1 *Προεπώαση*

Εφόσον το έδαφος αποθηκεύτηκε (βλ. ενότητες 1.6.4.2 και 1.7.1.3), συνιστάται προεπώαση για μια περίοδο μεταξύ 2 και 28 ημερών. Η θερμοκρασία και υγρασία του εδάφους κατά τη διάρκεια της προεπώασης θα πρέπει να είναι παρόμοιες με τις χρησιμοποιούμενες στη δοκιμή (βλ. ενότητες 1.6.4.2 και 1.7.1.3).

1.6.4.2 *Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά*

Το έδαφος καθαρίζεται με το χέρι από τυχόν ενυπάρχοντα μεγάλα αντικείμενα (π.χ. πέτρες, μέρη φυτών, κλπ) και κατόπιν κοσκινίζεται εν υγρώ χωρίς υπερβολική ξήρανση για λήψη σωματιδίων μεγέθους μέχρι το πολύ 2 mm. Η υγρασία του δείγματος εδάφους θα πρέπει να ρυθμίζεται με αποσταγμένο ή απιονισμένο νερό σε τιμή μεταξύ 40 και 60 % της μέγιστης ικανότητας για συγκράτηση νερού.

1.6.5 **Προετοιμασία της υπό δοκιμή ουσίας για εφαρμογή στο έδαφος**

Η υπό δοκιμή ουσία εφαρμόζεται κυρίως χρησιμοποιώντας κάποιον φορέα Ο φορέας μπορεί να είναι νερό (για υδατοδιαλυτές ουσίες) ή αδρανές στερεό όπως λεπτή χαλαζιακή άμμος (μέγεθος σωματιδίων: 0,1-0,5 mm). Άλλοι υγροί φορείς (π.χ. οργανικοί διαλύτες όπως ακετόνη, χλωροφόρμιο) εκτός νερού θα πρέπει να αποφεύγονται επειδή μπορεί να καταστρέψουν τη μικροχλωρίδα. Εφόσον ως φορέας χρησιμοποιείται άμμος, αυτή μπορεί να επιχρίεται με την υπό δοκιμή ουσία διαλελυμένη ή εναιωρούμενη σε κατάλληλο διαλύτη. Στις περιπτώσεις αυτές, ο διαλύτης θα πρέπει να απομακρύνεται με εξάτμιση πριν από την ανάμειξη με το έδαφος. Για άριστη κατανομή της υπό δοκιμή ουσίας στο έδαφος, συνιστάται μια σχέση 10 g άμμου ανά χιλιόγραμμο εδάφους (ξηρού βάρους). Τα δείγματα-μάρτυρες υποβάλλονται σε κατεργασία με ισοδύναμη ποσότητα νερού και/ή χαλαζιακής άμμου μόνον.

Όταν δοκιμάζονται πτητικά χημικά, θα πρέπει να αποφεύγονται κατά το δυνατόν απώλειες κατά την κατεργασία και να γίνεται προσπάθεια για τη διασφάλιση ομοιογενούς κατανομής στο έδαφος (π.χ. η υπό δοκιμή ουσία θα πρέπει να εγχύεται στο έδαφος σε διάφορα σημεία).

1.6.6 **Συγκεντρώσεις δοκιμής**

Όταν δοκιμάζονται προϊόντα προστασίας καλλιεργειών ή άλλα χημικά με προβλέψιμες περιβαλλοντικές συγκεντρώσεις, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον δύο συγκεντρώσεις Η μικρότερη συγκέντρωση θα πρέπει να αντιπροσωπεύει τουλάχιστον τη μέγιστη ποσότητα που αναμένεται να φθάσει στο έδαφος υπό συνθήκες συναντώμενες στην πράξη ενώ η μεγαλύτερη συγκέντρωση θα πρέπει να είναι πολλαπλάσια της μικρότερης συγκέντρωσης. Οι συγκεντρώσεις της προστιθέμενης στο έδαφος υπό δοκιμή ουσίας υπολογίζονται υποθέτοντας ομοιόμορφη ενσωμάτωση μέχρι βάθους 5 cm και φαινόμενη πυκνότητα εδάφους 1,5. Για αγροχημικά που εφαρμόζονται απευθείας στο έδαφος, ή για χημικά για τα οποία μπορεί να προβλεφθεί η ποσότητα που φθάνει στο έδαφος, οι συνιστώμενες συγκεντρώσεις δοκιμής είναι η μέγιστη Προβλεπόμενη Περιβαλλοντική Συγκέντρωση (ΠΠΣ) και το πενταπλάσιο αυτής της συγκέντρωσης. Ουσίες που αναμένεται να εφαρμοστούν σε εδάφη αρκετές φορές σε μια καλλιεργητική περίοδο θα πρέπει να δοκιμάζονται σε συγκεντρώσεις προκύπτουσες από τον πολλαπλασιασμό της ΠΠΣ επί το μέγιστο αναμενόμενο αριθμό εφαρμογών. Η μεγαλύτερη, ωστόσο, συγκέντρωση δοκιμής δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το δεκαπλάσιο του μέγιστου εφάπαξ ποσοστού εφαρμογής.

Εάν δοκιμάζονται μη αγροχημικά, χρησιμοποιείται γεωμετρική σειρά πέντε τουλάχιστον συγκεντρώσεων. Οι συγκεντρώσεις δοκιμής θα πρέπει να καλύπτουν το εύρος που απαιτείται για τον προσδιορισμό των τιμών EC_x.

▼B

1.7 ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.7.1 **Συνθήκες έκθεσης**

1.7.1.1 *Κατεργασία και έλεγχος*

Εάν δοκιμάζονται αγροχημικά, το εδαφικό δείγμα διαιρείται σε τρία τμήματα ίσου βάρους. Δύο τμήματα αναμειγνύονται με το φορέα που περιέχει το προϊόν, ενώ το άλλο αναμειγνύεται με το φορέα χωρίς το προϊόν (μάρτυρας). Τόσο για τα κατεργασμένα όσο και για τα ακατέργαστα εδάφη συνιστάται η παρασκευή τουλάχιστον τριών επαναληπτικών δειγμάτων. Εάν δοκιμάζονται μη αγροχημικά, το εδαφικό δείγμα χωρίζεται σε έξι τμήματα ίσου βάρους. Πέντε από τα δείγματα αναμειγνύονται με τον φορέα που περιέχει την υπό δοκιμή ουσία, ενώ το έκτο δείγμα αναμειγνύεται με τον φορέα χωρίς το χημικό. Τόσο για τα κατεργασμένα, όσο και για τους μάρτυρες, συνιστάται η παρασκευή τριών επαναληπτικών δειγμάτων. Θα πρέπει να δίδεται προσοχή ώστε να διασφαλίζεται η ομοιογενής κατανομή της υπό δοκιμή ουσίας στα κατεργασμένα εδαφικά δείγματα. Κατά τη διάρκεια της ανάμειξης, θα πρέπει να αποφεύγεται το έδαφος να λαμβάνει συμπαγή μορφή ή μορφή σβώλων.

1.7.1.2 *Επώαση των εδαφικών δειγμάτων*

Η επώαση των εδαφικών δειγμάτων μπορεί να γίνεται με δύο τρόπους: ως χύδην δείγματα κάθε κατεργασμένου και μη κατεργασμένου εδάφους ή ως σειρά επιμέρους και ταυτόσημου μεγέθους μερικών δειγμάτων κάθε κατεργασμένου και μη κατεργασμένου εδάφους. Ωστόσο, όταν δοκιμάζονται πτητικές ουσίες, η δοκιμή θα πρέπει να γίνεται μόνον μια σειρά επιμέρους μερικών δειγμάτων. Όταν τα εδάφη επωάζονται χύδην, προετοιμάζονται μεγάλες ποσότητες κάθε κατεργασμένου και μη εδάφους και τα προς ανάλυση μερικά δείγματα λαμβάνονται όπως απαιτείται κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Η αρχικώς προετοιμαζόμενη ποσότητα για κάθε κατεργασία και μαρτυρία εξαρτάται από το μέγεθος των μερικών δειγμάτων, τον αριθμό των επαναληπτικών δειγμάτων που χρησιμοποιούνται για ανάλυση και τον αναμενόμενο μέγιστο αριθμό χρόνων δειγματοληψίας. Τα χύδην επωαζόμενα εδάφη θα πρέπει να αναμειγνύονται επισταμένως πριν από τη λήψη των μερικών δειγμάτων. Όταν τα εδάφη επωάζονται ως σειρά επιμέρους εδαφικών δειγμάτων, κάθε χύδην κατεργασμένο και μη έδαφος διαιρείται στον απαιτούμενο αριθμό μερικών δειγμάτων και τα τελευταία χρησιμοποιούνται όπως απαιτείται. Σε δοκιμές όπου μπορούν να αναμένονται περισσότεροι των δύο χρόνοι δειγματοληψίας, θα πρέπει να παρασκευάζεται ικανός αριθμός μερικών δειγμάτων ώστε να καλύπτονται, από πλευράς αριθμού, το σύνολο των επαναληπτικών δειγμάτων και των χρόνων δειγματισμού. Θα πρέπει να επωάζονται τουλάχιστον τρία επαναληπτικά δείγματα του υπό δοκιμή εδάφους υπό αερόβιες συνθήκες (βλ. ενότητα 1.7.1.1). Κατά τη διάρκεια όλων των δοκιμών, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται δοχεία με επαρκή κενό χώρο άνωθεν για να αποφεύγεται η ανάπτυξη αναερόβιων συνθηκών. Όταν δοκιμάζονται πτητικές ουσίες, η δοκιμή θα πρέπει να εκτελείται μόνον με μια σειρά επιμέρους μερικών δειγμάτων.

1.7.1.3 *Συνθήκες και διάρκεια δοκιμής*

Η δοκιμή εκτελείται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου 20±2 °C. Η υγρασία των εδαφικών δειγμάτων θα πρέπει να διατηρείται κατά τη διάρκεια της δοκιμής μεταξύ 40 % και 60 % της μέγιστης ικανότητας συγκράτησης νερού του εδάφους (βλ. ενότητα 1.6.4.2) με διακύμανση ±5 %. Εφόσον χρειάζεται, μπορεί να προστεθεί απεσταγμένο, απιονισμένο νερό.

Η ελάχιστη διάρκεια των δοκιμών είναι 28 ημέρες. Εάν δοκιμάζονται αγροχημικά, συγκρίνονται οι ποσότητες του απελευθερούμενου διοξειδίου του άνθρακα ή καταναλισκόμενου οξυγόνου στα κατεργασμένα και στα δείγματα μάρτυρες. Εάν την 28η ημέρα διαφέρουν κατά ποσοστό άνω του 25 %, η δοκιμή συνεχίζεται μέχρις ότου ληφθεί διαφορά ίση ή μικρότερη του 25 %, ή για μέγιστο χρονικό διάστημα 100 ημερών, ανάλογα με το ποιο επιτυγχάνεται συντομότερα Για μη αγροχημικά, η δοκιμή τερματίζεται μετά 28 ημέρες. Την 28η ημέρα, προσδιορίζονται οι ποσότητες του απελευθερούμενου διοξειδίου του άνθρακα ή του καταναλισκόμενου οξυγόνου στα κατεργασμένα και στα δείγματα μάρτυρες και υπολογίζονται οι τιμές EC_x.

▼B

1.7.2 **Δειγματοληψία και ανάλυση εδαφών**

1.7.2.1 *Χρονογιάγραμμα δειγματοληψίας εδαφών*

Εάν δοκιμάζονται αγροχημικά, τα εδαφικά δείγματα υποβάλλονται σε ανάλυση προσδιορισμού ρυθμού αναπνοής προκαλούμενης από γλυκόζη κατά τις ημέρες 0, 7, 14 και 28. Εάν απαιτείται παρατεταμένη δοκιμή, θα πρέπει να γίνονται περαιτέρω μετρήσεις σε διαστήματα 14 ημερών μετά την 28η ημέρα.

Εάν δοκιμάζονται μη αγροχημικά, χρησιμοποιούνται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις δοκιμής και τα εδαφικά δείγματα αναλύονται για τον προσδιορισμό της προκαλούμενης από τη γλυκόζη αναπνοής στην αρχή (ημέρα 0) και στο τέλος της περιόδου έκθεσης (28 ημέρες). Εφόσον κριθεί αναγκαίο, μπορεί να προστεθεί και μια ενδιάμεση μέτρηση, π.χ. την 7η ημέρα. Τα δεδομένα της 28ης ημέρας χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της τιμής EC_x του χημικού. Εφόσον επιθυμείται, για την εκτίμηση των αρχικών ποσοτήτων της μεταβολικώς ενεργού μικροβιακής βιομάζας στο έδαφος, μπορούν να χρησιμοποιηθούν δεδομένα από τα δείγματα-μάρτυρες της ημέρας 0(12).

1.7.2.2 *Μέτρηση ρυθμών αναπνοής προκαλούμενης από τη γλυκόζη*

Σε κάθε χρονικό σημείο δειγματιγμού, προσδιορίζεται ο επαγόμενος από τη γλυκόζη ρυθμός αναπνοής σε κάθε επαναληπτικό κατεργασμένο δείγμα και δείγμα-μάρτυρα. Τα εδαφικά δείγματα αναμειγνύονται με επαρκή ποσότητα γλυκόζης για την επίτευξη της άμεσης μέγιστης αναπνευστικής απόκρισης. Η ποσότητα γλυκόζης που χρειάζεται για την επίτευξη μέγιστης αναπνευστικής απόκρισης από δεδομένο έδαφος μπορεί να προσδιοριστεί σε προκαταρκτική δοκιμή χρησιμοποιώντας μια σειρά συγκεντρώσεων γλυκόζης (14). Ωστόσο, σε αμμώδη εδάφη με 0,5-1,5 % οργανικό άνθρακα, αρκεί συνήθως μια ποσότητα 2 000 mg έως 4 000 mg γλυκόζης ανά kg ξηρού βάρους εδάφους. Η γλυκόζη μπορεί να αλεστεί σε σκόνη με καθαρή χαλαζιακή άμμο (10 g άμμου/kg ξηρού βάρους εδάφους) και να αναμειχθεί ομοιογενώς με το έδαφος.

Τα τροποποιημένα με γλυκόζη εδαφικά δείγματα επωάζονται σε κατάλληλη συσκευή για τη μέτρηση ρυθμών αναπνοής είτε συνεχώς, κάθε ώρα, ή κάθε δύο ώρες (βλ. ενότητα 1.6.1) στους 20 ± 2 °C. Μετράται για 12 συνεχείς ώρες το απελευθερούμενο διοξείδιο του άνθρακα ή το καταναλισκόμενο οξυγόνο, οι δε μετρήσεις θα πρέπει να ξεκινούν όσο το δυνατόν συντομότερα, δηλ. μέσα σε 1 έως 2 ώρες από την προσθήκη της γλυκόζης. Μετριώνται οι συνολικές ποσότητες του απελευθερούμενου διοξειδίου του άνθρακα ή του καταναλισκόμενου οξυγόνου κατά τη διάρκεια των 12 ωρών και προσδιορίζονται οι μέσοι ρυθμοί αναπνοής.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Εάν διεξάγονται δοκιμές με αγροχημικά, θα πρέπει να καταγράφεται το απελευθερούμενο διοξείδιο του άνθρακα ή το καταναλισκόμενο οξυγόνο από κάθε επαναληπτικό δείγμα εδάφους και να παρατίθενται σε πίνακα οι μέσες τιμές όλων των επαναληπτικών δειγμάτων. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να αξιολογούνται με κατάλληλες και γενικά αποδεκτές στατιστικές μεθόδους (π.χ. F-δοκιμή, 5 % επίπεδο σημαντικότητας). Οι ρυθμοί της επαγόμενης από γλυκόζη αναπνοής εκφράζονται mg διοξειδίου του άνθρακα/kg ξηρού εδαφους/h ή mg οξυγόνου/kg ξηρού βάρους εδάφους/h. Ο μέσος ρυθμός σχηματισμού διοξειδίου του άνθρακα ή ο μέσος ρυθμός κατανάλωσης οξυγόνου σε κάθε κατεργασία συγκρίνεται με εκείνον του μάρτυρα και υπολογίζεται η % απόκλιση από τον μάρτυρα.

▼B

Εάν πραγματοποιούνται δοκιμές με μη αγροχημικά, προσδιορίζονται οι ποσότητες του απελευθερούμενου διοξειδίου του άνθρακα ή του καταναλισκόμενου οξυγόνου σε κάθε επαναληπτικό δείγμα και χαράσσεται καμπύλη δόσης-απόκρισης για υπολογισμό των τιμών EC_x. Οι ανευρισκόμενοι ρυθμοί επαγόμενης από γλυκόζη αναπνοής (δηλ. mg διοξειδίου του άνθρακα/kg ξηρού βάρους εδάφους/h ή mg οξυγόνου/kg ξηρού βάρους δάφους/h) στα κατεργασμένα δείγματα μετά 28 ημέρες συγκρίνονται με τους ανευρισκόμενους στο μάρτυρα. Από τα στοιχεία αυτά, υπολογίζονται οι % τιμές αναστολής για κάθε συγκέντρωση δοκιμής. Τα ποσοστά αυτά καταγράφονται γραφικώς συναρτήσει της συγκεντρώσεως και στη συνέχεια χρησιμοποιούνται στατιστικές διαδικασίες για τον υπολογισμό των τιμών EC_x. Προσδιορίζονται επίσης όρια εμπιστοσύνης ($\rho = 0,95$) για τις υπολογιζόμενες τιμές EC_x χρησιμοποιώντας τυποποιημένες διαδικασίες (15)(16)(17).

2.2 ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Όταν υπολογίζονται αποτελέσματα από δοκιμές με αγροχημικά και η διαφορά στους ρυθμούς αναπνοής μεταξύ της με χαμηλότερο ποσοστό κατεργασίας (δηλ. της μέγιστης προβλεπόμενης συγκέντρωσης) και μάρτυρα είναι ίση ή μικρότερη του 25 % σε οποιοδήποτε χρόνο δειγματοληψίας μετά την 28η ημέρα, το προϊόν μπορεί να αξιολογηθεί ως μη έχον μακροπρόθεσμη επίδραση στη μετατροπή του άνθρακα στα εδάφη. Όταν αξιολογούνται αποτελέσματα από δοκιμές με χημικά άλλα εκτός των αγροχημικών, χρησιμοποιούνται οι τιμές EC_{50}, EC_{25} καν/ή EC_{10}.

3. **ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Πλήρη ταυτοποίηση του χρησιμοποιηθέντος εδάφους, συμπεριλαμβανομένων των εξής:

— γεωγραφικό στίγμα του τόπου (γεωγραφικό πλάτος και μήκος)

— πληροφορίες για το ιστορικό του τόπου (δηλ. κάλυψη από βλάστηση, κατεργασίες με προϊόντα προστασίας καλλιεργειών, κατεργασίες με λιπάσματα, τυχαία επιμόλυνση, κλπ)

— πρότυπο χρήσης (π.χ. γεωργικό έδαφος, δάσος, κλπ.)

— βάθος δειγματοληψίας (cm);

— περιεκτικότητα σε άμμο/ιλύ/άργιλο (% επί ξηρού βάρους)

— pH (στο νερό)

— περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (% επί ξηρού βάρους)

— περιεκτικότητα σε άζωτο (% επί ξηρού βάρους)

— κατιοανταλλακτική ικανότητα (mmol/kg)

— αρχική μικροβιακή βιομάζα ως ποσοστό του συνολικού οργανικού άνθρακα

— αναφορά των χρησιμοποιηθεισών μεθόδων για τον προσδιορισμό κάθε παραμέτρου

— κάθε πληροφορία σχετικά με τη συλλογή και αποθήκευση εδαφικών δειγμάτων

— λεπτομέρειες για την προεπώαση του εδάφους, εφόσον συντρέχει

▼B

Υπό δοκιμή ουσία:

— φυσική υπόσταση της ουσίας και, όπου χρειάζεται, φυσικοχημικές ιδιότητες

— δεδομένα χημικής ταυτοποίησης, όπου χρειάζεται, συμπεριλαμβανομένου του χημικού τύπου, της καθαρότητας (δηλ. για προϊόντα προστασίας καλλιεργειών, το ποσοστό του δραστικού συστατικού), περιεκτικότητα σε άζωτο.

Συνθήκες δοκιμής:

— λεπτομέρειες της τροποποίησης του εδάφους με οργανικό υπόστρωμα,

— αριθμός χρησιμοποιηθεισών συγκεντρώσεων του υπό δοκιμή χημικού και, όπου κρίνεται σκόπιμο, αιτιολόγηση των επιλεγεισών συγκεντρώσεων,

— λεπτομέρειες για την εφαρμογή της υπό δοκιμή ουσίας στο έδαφος,

— θερμοκρασία επώασης,

— υγρασία εδάφους στη αρχή και κατά τη διάρκεια της δοκιμής,

— χρησιμοποιηθείσα μέθοδος επώασης εδάφους (δηλ. χύδην ή ως σειρά επιμέρους μερικών δειγμάτων),

— αριθμός επαναληπτικών δειγμάτων,

— χρόνοι δειγματοληψίας.

Αποτελέσματα:

— χρησιμοποιηθείσα μέθοδος και εξοπλισμός για τη μέτρηση των ρυθμών αναπνοής

— δεδομένα σε μορφή πίνακα, συμπεριλαμβανομένων μεμονωμένων και μέσων τιμών ποσοτήτων διοξειδίου του άνθρακα ή οξυγόνου

— διακύμανση μεταξύ των επαναληπτικών δειγμάτων σε κατεργασμένα δείγματα και σε δείγματα μάρτυρες

— εξηγήσεις διορθώσεων που έγιναν στους υπολογισμούς, εφόσον συντρέχει περίπτωση

— η % διακύμανση των επαγόμενων από τη γλυκόζη ρυθμών αναπνοής σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας ή, εάν κρίνεται σκόπιμο, η τιμή EC_{50} με 95 % όριο εμπιστοσύνης, άλλες τιμές EC_x (π.χ. EC_{25} ή EC_{10}) με διαστήματα εμπιστοσύνης και ένα γράφημα της καμπύλης δόσης-απόκρισης

— στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων, όπου χρειάζεται

— κάθε πληροφορία και παρατήρηση χρήσιμη για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

▼B

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

(5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(6) ISO 10381-6 (1993). Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(7) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in «Pesticide Effects on Soil Microflora». Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Chap. 3: 45-60.

(8) Anderson, J.P.E. (1982). Soil Respiration, in «Methods of Soil Analysis — Part 2: Chemical and Microbiological Properties». Agronomy Monograph N° 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41:831-871.

(9) ISO 11266-1. (1993). Soil Quality — Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.

(10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality — Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(11) Heinemeye, r O., Insam, H., Kaiser, E.A, and Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. Plant and Soil, 116: 77-81.

(12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method.

(13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

(14) Malkomes, H.-P. (1986). Einfluß von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig, 38: 113-120.

(15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol, and Exper. Ther., 96, 99-113.

(16) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

(17) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

Γ.23. **ΑΕΡΟΒΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

Η παρούσα μέθοδος δοκιμής είναι αναπαραγωγή της OECD TG 307 (2002)

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμής βασίζεται σε υφιστάμενες κατευθυντήριες οδηγίες (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Η περιγραφόμενη στο παρόν μέθοδος δοκιμής σχεδιάστηκε για την εκτίμηση της αερόβιας και αναερόβιας μετατροπής χημικών στο έδαφος. Τα πειράματα εκτελούνται για τον προσδιορισμό (i) του ρυθμού μετατροπής της υπό δοκιμή ουσιας, και (ii) της φύσης και των ρυθμών σχηματισμού και απομάκρυνσης πρσιόντων μετατροπής στα οποία μπορεί να εκτεθούν και οργανισμοί του εδάφους. Τέτοιες μελέτες απαιτούνται για χημικά τα οποια εφαρμόζονται απευθειας στο έδαφος ή τα σποία είναι πιθανόν να φθάσουν στο εδαφικό περιβάλλον. Τα αποτελέσματα των εργασιηριακών αυτών μελετών μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την κατάρτιση πρωτοκόλλων δειγματοληψίας και ανάλυσης σε σχετικές επιτόπιες μελέτες.

Για την αξιαλόγηση της πορείας μετατροπής αρκούν γενικά αερόβιες και αναερόβιες μελέτες με ένα τύπο εδάφους (8)(10)(11). Οι ρυθμοί μετατροπής θα πρέπει να προσδιοριξονται σε τρία τουλάχιστον πρόσθετα εδάφη (8)(10).

Σε συνάντηση ανταλλαγής απόψεων του ΟΟΣΑ σχετικά με την επιλογή και ιζημάτων, η οποία έλαβε χώρα στην Belgirate στην Ιταλια το 1995 (7) επήλθε συμφωνια, ειδικότερα, για τον αριθμό και τον τύπο των προς χρήση εδαφών στγν οαριύσα δοκιμή. Οι τύποι των υποβαλλόμενων σε δοκιμή εδαφών θα πρέπει να ειναι αντιπροσωπευτικοί των περιβαλλοντικών συνθηκών όπου πραγματοποιείται χρήση ή επέρχεται απελευθέρωση. Για παράδειγμα, χημικά τα οπσια μπορει να απελευθερώνονται σε υποτρσπικά έως τροπικά κλιματα θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή με Ferrasols ή Nitosols (σύστημα FAO). Στη συνάντηση, δόθηκαν επίσης συστάοεις σχετικά με τη συλλογή, χειρισμό και αποθήκευση εδαφικών δειγμάτων, με βάση τις κατευθυντήριες οδηγίες του ISO (15). Στην παρούσα μέθοδο εξετάζεται επίσης και χσήση ορυζοεδαφών.

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

Ουσία δοκιμής: κάθε ουσία, αρχική ή σχετικά προιόντα μετατροπής

Προϊόντα μετατροπής: όλες οι ουσίες που προκύπτουν από ανπδράεις βιοτικής ή αβιοτικής μετατροπής της ουσίας δοκιμής, συμπεριλαμβανομένου του CO_2 και προϊότων σε δεσλεψλένα υπολείμματα.

Δεσλενμένα απιλείμματα: Ως «δεσμευμένα υπολειμματα» χαρακτηρίζονται ενώσεις στο έδαφος, σε φυτά ή σε ζώα, οι σποίες παραμένουν στο υπόστρωμα με τη μορφή της αρχικής ουσίας ή μεταβολιτών της/προϊόντων μετατροπής μετά από εκχύλιση. Η μέθοδος εκχυλίσεως πρέπει να μεταβάλλει συσιαστικώη αυτές καθ' αυτές τις ενώσεις ή τη δομή του υποστρώματος. Η φύση του δεσμού μπορεί να προσδιοπριστει εν μέρει με τη βοήθεια μεθόδων εκχυλίσεως που μεταβάλλουν το υπόστρωμα και εξειδικευμένες αναλντικές τεχνικές. Μέχσι σήμερα, για παράδειγλα, έχσυν ταυτοποιηθεί με τον τρόπο αυτό ομοιοπολικσι, ιονικσι και ροφητικοί δεσμοί, καθώς επίσης και παψιδεύσεις. Γενικά, ο σχηματισμός δεσμευμένων υπολειμμάτων μειώει σημανπκώς τη βιοπροσβασιμότητα και βιοδιαθεσιμότητα (12) [τροποποιηση από IUPAC 1984 (13)].

Αερόβια μετατραπή: ανπδράσεις που λαμβάνουν χώρα παρουσια μοριακού οξυγόνου (14).

▼B

Αναερόβια μετατροπή: (αναγωγική): αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα απουσία μοριακού οξυλόνου (14).

Έδαφος: μίγμα ανόργανων και οργανικών χημικών συστατικών, όπου στα τελευταία περιλαμβάνονται ενώσεις υψηλής περιεκτικότητας σε άνθρακα και άζωτο και υψηλού μοριακού βάρους, στο οποίο εμφανίζεται ζωή με τη μορφή μικρών (κυρίως μικρο-) οργανισμών. Το έδαφος μπορεί να χρησιμοποιηθεί υπό δύο καταστάσεις:

(α) αδιατάρακτο, όπως έχει διαμορφωθεί με τον καιρό, σε χαρακτηριστικά σιρώματα διαγόρων τύπων εδαφών

(β) διαταραγμένο, όπως συνήθως βρίσκεται σε αρώσιμες εκτάσεις ή όπως εμφανίζεται όταν λαμβάνονται δείγματα με σκάψιμο και χρησιμοποιούνται στην παρούσα μέθοδο δοκιμής (14).

Ανοργανοποίηση: η πλήρης αποικοδόμηση μιας οργανικής ενώσεως σε $C0_2$, H_20 υπό αερόβιες συνθήκες και CH_4, $C0_2$ και H_20 υπό αναερόβιες συνθήκες. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμής, όταν χρησιμοποιείται επισημασμένη με ^{14}C ένωση, ανοργανοποίηση σημαίνει εκτεταμένη αποικοδόμηση κατά την οποία επισημασμένο άτομο άνθρακα οξειδώνεται με απελευθέρωση αντίστοιχης ποσότητας $^{14}C0_2$ (14).

Χρόνος ημιζωής, $t_{0,5}$, είναι ο χρόνος που απαιτείται για την κατά 50 % μετατροπή της ουσίας δοκιμής, όταν η κινητική της αντιδράσεως μετατροπής είναι πρώτης τάξεως είναι ανεξάρτητος της συγκέντρωσης.

DT_{50} (Χρόνος μειώσεως 50): είναι το χρονικό διάστημα στο οποίο η συγκέντρωση της ουσίας δοκιμής μειώνεται κατά 50 %. Διαφέρει από το χρόνο ημιζωής $t_{0,5}$ όταν η μετατροπή δεν ακολουθεί κινητική αντιδράσεως πρώτης τάξεως.

DT_{75} (Χρόνος μειώσεως 75): είναι το χρονικό διάστημα στο οποίο η συγκέντρωση της ουσίας δοκιμής μειώνεται κατά 75 %.

DT_{90} (Χρόνος μειώσεως 90): είναι το χρονικό διάστημα στο οποίο η συγκέντρωση της ουσίας δοκιμής μειώνεται κατά 90 %.

1.3 ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Για τον χαρακτηρισμό και/ή ταυτοποίηση των προϊόντων μετατροπής με τη βοήθεια φασματοσκοπικών και χρωματογραφικών μεθόδων, πρέπει να χρησιμοποιούνται ουσίες αναφοράς.

1.4 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η μέθοδος εφαρμόζεται σε όλες τις χημικές ουσίες (μη επισημασμένες ή ραδιοεπισημασμένες) για τις οποίες υπάρχει διαθέσιμη αναλυτική μέθοδος ικανοποιητικής ακριβείας και ευαισθησίας. Εφαρμόζεται σε μη πτητικές ενώσεις, ελαφρώς πτητικές ενώσεις, υδατοδιαλυτές ενώσεις ή και σε υδατοαδιάλυτες ενώσεις. Η δοκιμή δεν θα πρέπει να εφαρμόζεται σε ιδιαιτέρως πτητικές από το έδαφος χημικές ουσίες (π.χ. ατμίζουσες, οργανικοί διαλύτες), οι οποίες δεν μπορούν επομένως να διατηρηθούν στο έδαφος υπό τις πειραματικές συνθήκες της παρούσας δοκιμής.

▼B

1.5 ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΥΣΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

Για τη μέτρηση του ρυθμού μετατροπής μπορεί να χρησιμοποιηθεί επισημασμένη ή μη ουσία δοκιμής. Για τη μελέτη της πορείας μετατροπής και τον προσδιορισμό του ισοζυγίου μάζας, απαιτείται επισημασμένη ουσία. Συνιστάται η επισήμανση με ^{14}C, ωστόσο μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμη και η χρήση άλλων ισοτόπων όπως ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P. Η επισήμανση θα πρέπει να γίνεται στο σταθερότερο ή σταθερότερα μέρη του μορίου ([1]), όσο αυτό είναι δυνατόν. Η καθαρότητα της ουσίας δοκιμής πρέπει να είναι τουλάχιστον 95 %.

Πριν από τη διεξαγωγή δοκιμής αερόβιας ή αναερόβιας μετατροπής στο έδαφος, θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμα τα ακόλουθα στοιχεία σχετικά με την ουσία δοκιμής:

(α) διαλυτότητα σε νερό (Μέθοδος Α.6)

(β) διαλυτότητα σε οργανικούς διαλύτες

(γ) τάση ατμών (Μέθοδος Α.4) και η σταθερά του νόμου του Henry

(δ) συντελεστής κατανομής σε n-οκτανόλη/νερό (Μέθοδος Α.8)

(ε) χημική σταθερότητα στο σκοτάδι (υδρόλυση) (Μέθοδος C.7);

(στ) η pK_a, εάν κάποιο μόριο μπορεί να υποστεί πρωτονίωση ή απο-πρωτονίωση [Κατ. οδ. ΟΟΣΑ 112] (16).

Άλλες χρήσιμες πληροφορίες μπορεί να είναι δεδομένα για την τοξικότητα της ουσίας δοκιμής στους μικροοργανισμούς του εδάφους [Μέθοδοι δοκιμής C.21 και C.22] (16).

Θα πρέπει επίσης να υπάρχουν διαθέσιμες αναλυτικές μέθοδοι (συμπεριλαμβανομένων και μεθόδων εκχυλίσεως και καθαρισμού) για την ταυτοποίηση και ποσοτικό προσδιορισμό της ουσίας δοκιμής και των προϊόντων μετατροπής της.

1.6 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Δείγματα εδάφους υποβάλλονται σε κατεργασία με την ουσία δοκιμής και επωάζονται στο σκοτάδι σε βιομετρικές φιάλες ή σε συστήματα διελεύσεως ροής υπό ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες (σε σταθερή θερμοκρασία και υγρασία εδάφους) Σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα, δείγματα εδάφους εκχυλίζονται και αναλύονται όσον αφορά την αρχική ουσία και τα προϊόντα μετατροπής. Συλλέγονται, επίσης, για ανάλυση και πτητικά προϊόντα χρησιμοποιώντας κατάλληλες διατάξεις απορροφήσεως. Χρησιμοποιώντας επισημασμένο με ^{14}C υλικό, μπορούν να μετρηθούν οι διάφορες ταχύτητες ανοργανοποίησης παγιδεύοντας το εκλυόμενο $^{14}C0_2$ και να προσδιοριστεί ένα ισοζύγιο μάζας, συμπεριλαμβανομένου του σχηματισμού δεσμευμένων στο έδαφος υπολειμμάτων.

1.7 ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

1.7.1 **Ανάκτηση**

Από την εκχύλιση και ανάλυση διπλών, τουλάχιστον, εδαφικών δειγμάτων αμέσως μετά την προσθήκη της ουσίας δοκιμής, προκύπτει μια πρώτη ένδειξη της επαναληψιμότητας της αναλυτικής μεθόδου και της ομοιομορφίας της διαδικασίας εφαρμογής για την ουσία δοκιμής. Οι τιμές ανάκτησης σε μεταγενέστερα στάδια των πειραμάτων προκύπτουν από τα αντίστοιχα ισοζύγια μάζας. Τα ποσοστά ανάκτησης θα πρέπει να κυμαίνονται από 90 έως 110 % για επισημασμένες χημικές ουσίες (8) και από 70 έως 110 % για μη επισημασμένες χημικές ουσίες (3).

([1]) Για παράδειγμα, αν η ουσία περιέχει έναν δακτύλιο, απαιτείται επισήμανση στον δακτύλιο αυτό αν η ουσία δοκιμής περιέχει δύο ή περισσοτέρους δακτυλίους, ίσως χρειαστεί η διεξαγωγή ξεχωριστών μελετών για την αξιολόγηση της τύχης κάθε επισημασμένου δακτυλίου και για τη λήψη καταλλήλων πληροφοριών για το σχηματισμό προϊόντων μετατροπής.

▼B

1.7.2 **Επαναληψιμότητα και ευαισθησία της αναλυτικής μεθόδου**

Η επαναληψιμότητα της αναλυτικής μεθόδου (μη συμπεριλαμβανομένης της αποδοτικότητας της αρχικής εκχυλίσεως) για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ουσίας δοκιμής και των προϊόντων μετατροπής, μπορεί να ελεγχθεί με τη βοήθεια διπλής αναλύσεως του ίδιου εδαφικού εκχυλίσματος, μετά ικανή επώαση για τον σχηματισμό προϊόντων μετατροπής.

Το όριο ανιχνεύσεως (LOD) της αναλυτικής μεθόδου για την ουσία δοκιμής και για τα προϊόντα μετατροπής θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 0,01 $mg.kg^{-1}$ εδάφους (ως ουσία δοκιμής) ή 1 % της αρχικής εφαρμοσθείσας δόσεως, όποια τιμή από τις δύο είναι χαμηλότερη. Θα πρέπει επίσης να προσδιορίζεται και το όριο του ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ)

1.7.3 **Ακρίβεια δεδομένων μετατροπής**

Από την ανάλυση αναγωγής των συγκεντρώσεων της ουσίας δοκιμής ως συνάρτησης του χρόνου, προκύπτουν τα σχετικά στοιχεία για την αξιοπιστία της καμπύλης μετατροπής και είναι δυνατός ο υπολογισμός των ορίων εμπιστοσύνης για τους χρόνους ημιζωής (αν ισχύει κινητική ψευδο-πρώτης τάξως) ή τις τιμές DT_{50} και, όπου κρίνεται σκόπιμο, DT_{75} και DT_{90}.

1.8 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.8.1 **Εξοπλισμός και χημικά αντιδραστήρια**

Τα συστήματα επωάσεως αποτελούνται από στατικά κλειστά συστήματα ή κατάλληλα συστήματα διελεύσεως ροής (7)(17). Παραδείγματα κατάλληλων συσκευών διελεύσεως ροής για επώαση εδάφους και φιαλών τύπου βιομέτρου εμφαίνονται στα σχήματα 1 και 2, αντίστοιχα. Αμφότεροι οι τύποι συστημάτων επώασης έχουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα (7)(17).

Απαιτείται συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός και, ειδικότερα, τα ακόλουθα:

— Αναλυτικά όργανα όπως GLC, HPLC, TLC-εξοπλισμός, συμπεριλαμβανομένων των κατάλληλων συστημάτων ανίχνευσης για την ανάλυση ραδιοεπισημασμένων ή μη επισημασμένων ουσιών ή μεθόδου ανάστροφης αραίωσης ισοτόπων

— Όργανα για σκοπούς ταυτοποίησης (π.χ. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR, κλπ)

— Υγρός απαριθμητής σπινθηρισμών

— Οξειδωτικό σύστημα για την καύση ραδιενεργού υλικού

— Φυγόκεντρος

— Συσκευή εκχυλίσεως (π.χ., σωλήνες φυγοκέντρου για ψυχρή εκχύλιση και συσκευή Soxhlet για συνεχή εκχύλιση υπό αναρροή)

— Όργανα συμπύκνωσης διαλυμάτων και εκχυλισμάτων (π.χ. περιστροφικός εξατμιστήρας)

— Υδρόλουτρο

— Διάταξη μηχανικής ανάμειξης (π.χ. μηχανή μαλάξεως, περιστροφικός αναμεικτήρας).

▼B

Στα χρησιμοποιούμενα χημικά αντιδραστήρια περιλαμβάνονται, π.χ.:

— NaOH, αναλυτικής καθαρότητας, 2 mol· dm^{-3}, ή άλλη κατάλληλη βάση (π.χ. KOH, αιθανολαμίνη)

— H_2S0_4, αναλυτικής καθαρότητας, 0,05 mol· dm^{-3}

— Αιθυλενογλυκόλη, αναλυτικής καθαρότητας;

— Στερεά απορροφητικά υλικά όπως νατράσβεστος και βύσματα πολυουρεθάνης

— Οργανικοί διαλύτες, αναλυτικής καθαρότητας, όπως ακετόνη, μεθανόλη, κλπ.

— Υγρό σπινθηρισμών.

1.8.2 **Εφαρμογή ουσίας δοκιμής**

Για την προσθήκη και κατανομή στο έδαφος, η ουσία δοκιμής μπορεί να διαλυθεί σε νερό (απιονισμένο ή απεσταγμένο) ή, όταν είναι αναγκαίο, σε ελάχιστες ποσότητες ακετόνης ή άλλων οργανικών διαλυτών (6) όπου η ουσία δοκιμής είναι επαρκώς διαλυτή και σταθερή. Ωστόσο, η ποσότητα του επιλεγόμενου διαλύτη δεν θα πρέπει να έχει σημαντική επίδραση στην εδαφική μικροβιακή δραστικότητα (βλ. 1.5 και 1.9.2-1.9.3) Η χρήση διαλυτών που αναστέλουν τη μικροβιακή δράση, όπως το χλωροφόρμιο, το διχλωρομεθάνιο και άλλοι αλογονωμένοι διαλύτες, θα πρέπει να αποφεύγεται.

Η ουσία δοκιμής μπορεί να προστίθεται επίσης ως στερεό, π.χ. αναμεμειγμένη σε χαλαζιακή άμμο (6) ή σε μικρό μερικό δείγμα του υπό δοκιμή εδάφους που έχει ξηρανθεί με αέρα και αποστειρωθεί. Εάν η ουσία δοκιμής προστεθεί χρησιμοποιώντας κάποιο διαλύτη, ο διαλύτης θα πρέπει να αφήνεται να εξατμιστεί πριν το μερικό δείγμα προστεθεί στο αρχικό μη στείρο εδαφικό δείγμα.

Για χημικά εν γένει, η κύρια οδός εισόδου των οποίων στο έδαφος είναι μέσω γεωργικής εφαρμογής/λάσπης υπονόμων, η υπό δοκιμή ουσία θα πρέπει πρώτα να προστίθεται σε λάσπη που στη συνέχεια εισάγεται στο εδαφικό δείγμα, (βλ. ενότητες 1.9.2 και 1.9.3)

Δεν συνιστάται η συνήθης χρήση τυποποιημένων στη σύνθεση προϊόντων. Ωστόσο, για μη ευκόλως διαλυόμενες ουσίες δοκιμής, η χρήση τυποποιημένου υλικού μπορεί να είναι μια κατάλληλη εναλλακτική λύση.

1.8.3 **Εδάφη**

1.8.3.1 *Επιλογή εδαφών*

Για τον προσδιορισμό της πορείας μετατροπής, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα αντιπροσωπευτικό έδαφος συνιστάται κάποιο αμμώδες αργιλούχο ή λασπώδες αργιλούχο ή αργιλώδες έδαφος ή αργιλώδης άμμος (sandy loam/silty loam/loam/loamy sand) [σύμφωνα με την ταξινόμηση FAO και USDA (18)] με pH 5,5-8,0, περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα 0,5-2,5 % και μικροβιακή βιομάζα τουλάχιστον 1 % του συνολικού οργανικού άνθρακα (10).

Για μελέτες ρυθμού μετατροπής θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τρία ακόμη εδάφη που να αντιπροσωπεύουν μια σειρά σχετικών εδαφών. Τα εδάφη θα πρέπει να ποικίλουν από πλευράς περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα, pH, περιεκτικότητα σε άργιλο και μικροβιακή βιομάζα (10).

▼B

Όλα τα εδάφη θα πρέπει να χαρακτηρίζονται, τουλάχιστον, ως προς την υφή τους (% άμμος, % ιλύς, % άργιλος) [σύμφωνα με την ταξινόμηση FAO και USDA (18)], το pH, την κατιοανταλλακτική τους ικανότητα, την περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, τη φαινόμενη πυκνότητα, τις ιδιότητές του ως προς τη συγκράτηση νερού ([1]) και τη μικροβιακή βιομάζα (για αερόβιες μόνο μελέτες). Τυχόν πρόσθετες πληροφορίες για τις ιδιότητες των εδαφών μπορεί να είναι χρήσιμες στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Για τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών των εδαφών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι μέθοδοι που συνιστώνται στις παραπομπές (19)(20)(21)(22)(23). Η μικροβιακή βιομάζα θα πρέπει να προσδιορίζεται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της επαγόμενης υπό του υποστρώματος αναπνοής (SIR) (25)(26) ή εναλλακτικές μεθόδους (20).

1.8.3.2 *Συλλογή, χειρισμός και αποθήκευση εδαφών*

Θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμες λεπτομερείς πληροφορίες για το ιστορικό του τόπου απ' όπου συλλέγεται το προς δοκιμή έδαφος. Στις πληροφορίες περιλαμβάνονται ο ακριβής τόπος, η κάλυψη από βλάστηση, κατεργασίες με χημικά, κατεργασίες με οργανικά και ανόργανα λιπάσματα, προσθήκες βιολογικών υλικών ή άλλη μόλυνση. Εάν εδάφη έχουν υποστεί κατεργασία με την υπό δοκιμή ουσία ή δομικά της ανάλογα μέσα στα προηγούμενα τέσσερα χρόνια, αυτά δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για μελέτες μετατροπής (10)(15).

Το έδαφος θα πρέπει να έχει συλλεγεί πρόσφατα από τον τόπο προέλευσης (από τον ορίζοντα A ή την άνω στιβάδα πάχους 20 cm) με περιεκτικότητα σε νερό τέτοια που να διευκολύνει το κοσκίνισμα. Για εδάφη άλλα εκείνων από ορυζώνες, η δειγματοληψία θα πρέπει να αποφεύγεται κατά τη διάρκεια ή αμέσως μετά μακρές περιόδους (> 30 ημέρες) ξηρασίας, παγετού ή πλημμυρών (14). Τα δείγματα θα πρέπει να μεταφέρονται με τρόπο που να ελαχιστοποιεί μεταβολές στην υγρασία του εδάφους και θα πρέπει να διατηρούνται στο σκοτάδι με ελεύθερη πρόσβαση αέρα, κατά το δυνατόν. Μια χαλαρά δεμένη σακούλα πολυαιθυλενίου είναι γενικά κατάλληλη για το σκοπό αυτό.

Το έδαφος θα πρέπει να υποβάλλεται σε κατεργασία το συντομότερο δυνατό μετά τη δειγματοληψία. Βλάστηση, μεγάλου μεγέθους εδαφική πανίδα και πέτρες θα πρέπει να απομακρύνονται πριν από τη διέλευση του εδάφους μέσω κοσκίνου 2 mm που απομακρύνει μικρές πέτρες, πανίδα και υπολείμματα φυτών. Θα πρέπει να αποφεύγεται εκτεταμένη ξήρανση και σύνθλιψη του εδάφους πριν από το κοσκίνισμα (15).

Όταν το χειμώνα είναι δύσκολη η δειγματοληψία στο ύπαιθροό (παγωμένο έδαφος ή καλυμμένο από στιβάδες χιονιού), αυτή μπορεί να γίνει από εδάφη θερμοκηπίου υπό φυτική κάλυψη (π.χ. χλόη ή μίγματα χλόης-τριφυλιού). Προτιμώνται οπωσδήποτε.εδάφη προσφάτως συλλεγμένα από την ύπαιθρο, εάν όμως το συλλεγέν και επεξεργασθέν χώμα πρέπει να αποθηκευθεί πριν από την έναρξη της μελέτης, οι συνθήκες αποθήκευσης πρέπει να είναι κατάλληλες και για περιορισμένο χρονικό διάστημα μόνο (4 ± 2 °C το πολύ για τρεις μήνες) για διατήρηση της μικροβιακής δραστικότητας ([2]). Λεπτομερείς οδηγίες για τη συλλογή, το χειρισμό και την αποθήκευση των εδαφών που προορίζονται να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα βιομετατροπής μπορούν να βρεθούν στα (8)(10)(15)(26)(27).

([1]) Το χαρακτηριστικό της συγκράτησης νερού από ένα έδαφος μπορεί να μετρηθεί ως επί του πεδίου ικανότητα, ως ικανότητα συγκράτησης νερού ή ως τάση ρόφησης νερού (pF). Για εξηγήσεις, βλ. παράρτημα 1. Θα πρέπει να αναφέρεται στην έκθεση δοκιμής αν τα χαρακτηριστικά της συγκράτησης νερού και της φαινομενικής πυκνότητας των εδαφών προσδιορίστηκαν σε αδιατάρακτα δείγματα πεδίου ή σε διαταραγμένα (επεξεργασμένα) δείγματα.

([2]) Πρόσφατα ερευνητικά αποτελέσματα δείχνουν ότι εδάφη από εύκρατες ζώνες μπορούν να αποθηκευτούν και στους - 20 °C για περισσότερους από τρεις μήνες (28)(29) χωρίς σημαντικές απώλειες μικροβιακής δραστικότητας.

▼B

Προτού το επεξεργασμένο χώμα χρησιμοποιηθεί για την παρούσα δοκιμή, θα πρέπει να προεπωάζεται για να επέρχεται φύτρωμα και απομάκρυνση των σπόρων και να αποκαθίσταται εκ νέου ισορροπία μικροβιακού μεταβολισμού μετά την αλλαγή από συνθήκες δειγματοληψίας ή αποθήκευσης σε συνθήκες επώασης. Γενικά, αρκεί περίοδος προεπώασης μεταξύ 2 και 28 ημερών με πλησίστιες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας με εκείνες της πραγματικής δοκιμής (15). Ο χρόνος αποθήκευσης και προεπώασης δεν θα πρέπει να υπερβαίνει συνολικά τους τρεις μήνες.

1.9 ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.9.1 **Συνθήκες δοκιμής**

1.9.1.1 *θερμοκρασία δοκιμής*

Κατά τη διάρκεια της όλης περιόδου δοκιμής, τα εδάφη θα πρέπει να επωάζονται στο σκοτάδι σε σταθερή θερμοκρασία αντιπροσωπευτική των κλιματικών συνθηκών όπου θα γίνει χρήση ή θα επέλθει απελευθέρωση. Για όλες τις ουσίες δοκιμής που μπορεί να φθάσουν στο έδαφος σε εύκρατα κλίματα, συνιστάται θερμοκρασία 20 ± 2 °C. Η θερμοκρασία θα πρέπει να ελέγχεται.

Για χημικές ενώσεις χρησιμοποιούμενες ή απελευθερούμενες σε ψυχρότερα κλίματα (π.χ. σε βόρειες χώρες, κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου/χειμώνα), θα πρέπει να επωάζονται πρόσθετα εδαφικά δείγματα και σε χαμηλότερη θερμοκρασία (π.χ. 10 ± 2 °C).

1.9.1.2 *Υγρασία*

Σε δοκιμές μετατροπής υπό αερόβιες συνθήκες, η υγρασία του εδάφους ([1]) θα πρέπει να προσαρμόζεται και να διατηρείται σε τιμές pF μεταξύ 2,0 και 2,5 (3)· Η υγρασία του εδάφους εκφράζεται ως μάζα ύδατος ανά μάζα ξηρού εδάφους και θα πρέπει να ελέγχεται τακτικά (π.χ. ανά δύο εβδομάδες) ζυγίζοντας τις φιάλες επώασης και αναπληρώνοντας τις υδατικές απώλειες με προσθήκη νερού (κατά προτίμηση διηθημένο σε στείρο περιβάλλον νερό βρύσης). Θα πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια για την πρόληψη ή ελαχιστοποίηση απωλειών ουσίας δοκιμής και/ή προϊόντων μετατροπής λόγω διαφυγής πτητικών συστατικών και/ή τυχόν φωτοαποικοδόμησης κατά τη διάρκεια προσθήκης υγρασίας.

Σε δοκιμές μετατροπής υπό αναερόβιες και συνθήκες ορυζώνων, το χώμα κορέννυται σε νερό με κατάκλυση.

1.9.1.3 *Αερόβιες συνθήκες επώασης*

Στα συστήματα διελεύσεως ροής, οι αερόβιες συνθήκες διατηρούνται με ενδιάμεσες αποχύσεις ή με συνεχή αερισμό με ένυγρο αέρα. Στις βιομετρικές φιάλες, η ανταλλαγή αέρα διατηρείται με διάχυση.

1.9.1.4 *Στείρες αερόβιες συνθήκες*

Για τη λήψη πληροφοριών όσον αφορά τη σπουδαιότητα της αβιοτικής μετατροπής μιας ουσίας δοκιμής, τα εδαφικά δείγματα μπορούν να αποστειρώνονται (για μεθόδους αποστείρωσης βλ. παραπομπές 16 και 29), να υποβάλλονται σε κατεργασία με στείρα ουσία δοκιμής (π.χ. προσθήκη διαλύματος μέσω στείρου φίλτρου) και να αερίζονται με ένυγρο στείρο αέρα όπως περιγράφεται στο 1.9.1.3. Στην περίπτωση εδαφών ορυζώνα, έδαφος και νερό θα πρέπει να αποστειρώνονται και η επώαση να εκτελείται όπως περιγράφεται στο 1.9.1.6.

([1]) Το έδαφος δεν θα πρέπει να είναι ούτε πολύ υγρό ούτε πολύ ξηρό για τη διατήρηση επαρκούς αερισμού και διατροφής της μικροχλωρίδας του εδάφους. Οι συνιστώμενες τιμές υγρασίας για άριστη μικροβιακή ανάπτυξη είναι από 40-60 % ικανότητα συγκράτησης νερού (WHC) και από 0,1-0,33 bar (6). Η τελευταία περιοχή ισοδυναμεί με περιοχή pF 2,0-2,5. Τυπικές τιμές υγρασίας διαφόρων τύπων εδαφών δίδονται στο παράρτημα 2.

▼B

1.9.1.5 *Αναερόβιες συνθήκες επώασης*

Για την αποκατάσταση και διατήρηση αναερόβιων συνθηκών, το έδαφος, αφού υποστεί κατεργασία με την ουσία δοκιμής και επωαστεί υπό αερόβιες συνθήκες επί 30 ημέρες ή για χρονικό διάστημα αντιστοιχούν σε μια ημιζωή ή DT_{50} (όποιο χρονικό διάστημα είναι συντομότερο), στη συνέχεια κατακλύζεται με νερό (υδατική στιβάδα 1-3 cm) και το σύστημα επώασης καθαρίζεται με αδρανές αέριο (π.χ. άζωτο ή αργό) ([1]). Το σύστημα δοκιμής πρέπει να επιτρέπει τη διενέργεια μετρήσεων παραμέτρων όπως το pH, η συγκέντρωση οξυγόνου και το δυναμικό οξειδοαναγωγής και να περιλαμβάνει διατάξεις παγίδευσης για πτητικά προϊόντα. Το βιομετρικό σύστημα πρέπει να είναι κλειστό για να αποφεύγεται η είσοδος αέρα με διάχυση.

1.9.1.6 *Επώαση υπό συνθήκες αναπτυσσόμενης (μη αποφλοιωμένης) όρυζας*

Για τη μελέτη της μετατροπής σε εδάφη αναπτυσσόμενης όρυζας, το χώμα κατακλύζεται με στρώμα νερού πάχους 1-5 cm και στην υδατική φάση προσάγεται η ουσία δοκιμής (9). Συνιστάται βάθος εδάφους τουλάχιστον 5 cm. Το σύστημα αερίζεται με αέρα ως υπό αερόβιες συνθήκες. Θα πρέπει να παρακολουθείται και να αναφέρεται το pH, η συγκέντρωση οξυγόνου και το δυναμικό οξειδοαναγωγής της υδατικής στιβάδας. Πριν από την έναρξη της μελέτης μετατροπής, απαιτείται περίοδος προεπώασης τουλάχιστον δύο εβδομάδων (βλ. ενότητα 1.8.3.2).

1.9.1.7 *Διάρκεια δοκιμής*

Οι μελέτες ρυθμού και πορείας δεν θα πρέπει κανονικά να υπερβαίνουν τις 120 ημέρες ([2]) (3)(6)(8), διότι στη συνέχεια θα πρέπει να αναμένεται με το χρόνο μείωση της μικροβιακής δραστικότητας του εδάφους δεδομένου ότι πρόκειται για τεχνητό εργαστηριακό· σύστημα απομονωμένο από φυσικό ανεφοδιασμό. Όπου είναι αναγκαίο για το χαρακτηρισμό της μείωσης της ουσίας δοκιμής και το σχηματισμό και απομάκρυνση βασικών προϊόντων μετατροπής, οι μελέτες μπορούν να συνεχίζονται για μεγαλύτερες περιόδους (π.χ. 6 ή 12 μήνες) (8). Τυχόν μεγαλύτερες περίοδοι επώασης θα πρέπει να αιτιολογούνται στην έκθεση δοκιμής και να συνοδεύονται από μετρήσεις βιομάζας κατά τη διάρκεια και στο τέλος των περιόδων αυτών.

1.9.2 **Εκτέλεση της δοκιμής**

Σε κάθε φιάλη επωάσεως φέρονται περίπου 50 έως 200 g εδάφους (σε ξηρή βάση) (βλ. σχήματα 1 και 2 στο παράρτημα 3) και το έδαφος υποβάλλεται σε κατεργασία με την ουσία δοκιμής με μία από τις μεθόδους που περιγράφονται στο 1.8.2. Όταν για την προσαγωγή της ουσίας δοκιμής χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες, αυτοί θα πρέπει να απομακρύνονται από το έδαφος με εξάτμιση. Κατόπιν το έδαφος αναμειγνύεται επισταμένως με μια σπάτουλα και/ή με ανακίνηση της φιάλης. Εάν η μελέτη διεξάγεται υπό συνθήκες αναπτυσσόμενης όρυζας, έδαφος και νερό θα πρέπει να αναμειγνύονται επισταμένως μετά την εφαρμογή της ουσίας δοκιμής. Κατάλληλες μικρές ποσότητες (π.χ. 1 g) των κατεργασμένων εδαφών θα πρέπει να αναλύονται για την ουσία δοκιμής για να ελέγχεται αν υπάρχει ομοιόμορφη κατανομή. Για εναλλακτική μέθοδο, βλ. κατωτέρω.

([1]) Σε επιφανειακά εδάφη, ακόμη και σε υποεπιφανειακά εδάφη, επικρατούν αερόβιες συνθήκες όπως φαίνεται από χρηματοδοτηθέν από την ΕΕ ερευνητικό έργο [K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270-277, 17-21 August 1992, Sigtuna, Sweden]. Αναερόβιες συνθήκες μπορούν να απαντηθούν μόνον περιοδικώς κατά τη διάρκεια πλημμυρών εδαφών μετά από ισχυρές βροχοπτώσεις ή όταν σε ορυζώνες δημιουργούνται συνθήκες αναπτυσσόμενης (μη αποφλοιωμένης) όρυζας (paddy conditions).

([2]) Οι αερόβιες μελέτες μπορεί να τερματιστούν πολύ πριν από τις 120 ημέρες υπό την προϋπόθεση ότι μέχρι το χρονικό αυτό σημείο έχουν φθάσει σαφώς στο τελικό τους σημείο η πορεία μετατροπής και η ανοργανοποίηση. Ο τερματισμός της δοκιμής είναι δυνατός και μετά 120 ημέρες, ή όταν έχει μετατραπεί το 90 % τουλάχιστον της ουσίας δοκιμής, αλλά μόνον εάν έχει σχηματιστεί τουλάχιστον 5 % $C0_2$.

▼B

Το ποσοστό κατεργασίας θα πρέπει να ανταποκρίνεται στο μέγιστο ποσοστό εφαρμογής ενός προϊόντος προστασίας καλλιεργειών που συνιστάται στις οδηγίες χρήσεως και σε ομοιόμορφη ενσωμάτωση σε κατάλληλο βάθος στο έδαφος (π.χ. άνω στιβάδα εδάφους πάχους 10 cm ([1]). Για παράδειγμα, για χημικά που εφαρμόζονται στο φύλλωμα ή στο έδαφος χωρίς ενσωμάτωση, το κατάλληλο βάθος για τον υπολογισμό της ποσότητας χημικού που θα πρέπει να προστεθεί σε κάθε φιάλη είναι 2,5 cm. Στην περίπτωση χημικών ενσωματούμενων στο έδαφος, το κατάλληλο βάθος είναι το βάθος ενσωμάτωσης που προσδιορίζεται στις οδηγίες χρήσεως. Για χημικά εν γένει, το ποσοστό εφαρμογής θα πρέπει να εκτιμάται με βάση τον κυριότερο τρόπο εισόδου για παράδειγμα, όταν η σημαντικότερη οδός εισόδου στο έδαφος είναι μέσω λάσπης υπονόμων, το χημικό θα πρέπει να προστίθεται στη λάσπη σε συγκέντρωση που να αντικατοπτρίζει την αναμενόμενη συγκέντρωση στη λάσπη ενώ η ποσότητα της προστιθέμενης στο έδαφος λάσπης θα πρέπει να αντικατοπτρίζει το κανονικό φορτίο λάσπης των γεωργικών εδαφών. Εάν η συγκέντρωση αυτή δεν είναι αρκετά υψηλή για την ταυτοποίηση βασικών προϊόντων μετατροπής, μπορεί να είναι χρήσιμη η επώαση ξεχωριστών εδαφικών δειγμάτων με υψηλότερα ποσοστά, θα πρέπει όμως να αποφεύγονται υπερβολικά ποσοστά που επηρεάζουν τις λειτουργίες των μικροοργανισμών του εδάφους (βλ. 1.5 και 1.8.2).

Εναλλακτικώς, μπορεί να υποβληθεί σε κατεργασία με την ουσία δοκιμής και κάποια μεγαλύτερη ποσότητα (δηλ. 1 έως 2 kg) εδάφους, προσεκτικά αναμεμειγμένη σε κατάλληλο μηχάνημα μείξεως και κατόπιν να μεταφερθεί σε μικρές ποσότητες των 50 έως 200 g σε φιάλες επωάσεως (π.χ. με τη χρήση διαχωριστών δειγμάτων). Κατάλληλες μικρές ποσότητες (π.χ. 1 g) του υποβληθέντος σε κατεργασία εδάφους θα πρέπει να αναλύονται για τον έλεγχο της ομοιόμορφης κατανομής της υπό δοκιμή ουσίας. Η διαδικασία αυτή προτιμάται επειδή παρέχει τη δυνατότητα πιο ομοιόμορφης κατανομής της υπό δοκιμή ουσίας στο έδαφος.

Υπό τις ίδιες συνθήκες (αερόβιες) με εκείνες δειγμάτων υποβληθέντων σε κατεργασία με την υπό δοκιμή ουσία επωάζονται και μη κατεργασμένα εδαφικά δείγματα. Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιούνται για μετρήσεις βιομάζας κατά τη διάρκεια και στο τέλος των μελετών.

Όταν η ουσία δοκιμής εφαρμόζεται στο έδαφος διαλελυμένη σε οργανικό ή οργανικούς διαλύτες, εδαφικά δείγματα επεξεργασμένα με την ίδια ποσότητα διαλύτη ή διαλυτών επωάζονται υπό τις αυτές συνθήκες (αερόβιες) με εκείνες των κατεργασμένων με την ουσία δοκιμής δειγμάτων. Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιούνται για μετρήσεις βιομάζας στην αρχή, κατά τη διάρκεια και στο τέλος των μελετών για τον έλεγχο των επιδράσεων του ή των διαλυτών στη μικροβιακή βιομάζα.

Οι φιάλες που περιέχουν το κατεργασμένο έδαφος είτε τοποθετούνται στο σύστημα διελεύσεως ροής που περιγράφεται στο σχήμα 1, είτε κλείονται με τη στήλη απορρόφησης που εμφαίνεται στο σχήμα 2 (βλ. παράρτημα 3).

([1]) Υπολογισμός της αρχικής συγκέντρωσης στη βάση περιοχής χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

$$C_{soil}[mg/kg_{soil}] = \frac{A[kg/ha] \cdot 10^6[mg/kg]}{I[m] \cdot 10^4[m^2/ha] \cdot d[kg_{soil}/m^3]}$$

C_{soil} = Αρχική συγκέντρωση στο έδαφος [$mg.kg^{-1}$]
A = Ποσοστό εφαρμογής [$kg.ha^{-1}$]; 1 = πάχος εδαφικής στιβάδος τόπου [m]; α = ξηρά φαινόμενη πυκνότητα εδάφους [$kg.m^{-3}$].
Κατά κανόνα, ποσοστό εφαρμογής 1 $kg.ha^{-1}$ οδηγεί σε συγκέντρωση εδάφους περίπου 1 $mg.kg^{-1}$ σε στιβάδα 10 cm (για τιμή φαινόμενης πυκνότητας 1 $g \cdot cm^{-3}$).

▼B

1.9.3 **Δειγματοληψία και μέτρηση**

Σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα, λαμβάνονται διπλές φιάλες επωάσεως και τα εδαφικά δείγματα εκχυλίζονται με κατάλληλους διαλύτες διαφορετικής πολικότητας και αναλύονται όσον αφορά την ουσία δοκιμής και/ή προϊόντα μετατροπής. Σε μια καλοσχεδιασμένη μελέτη, πρέπει να υπάρχει ικανός αριθμός φιαλών έτσι ώστε σε κάθε δειγματοληψία να αναλίσκονται δύο φιάλες. Επίσης, σε διάφορα χρονικά διαστήματα (ανά 7 ημέρες κατά τη διάρκεια του πρώτου μήνα και ανά 17 ημέρες μετά τον πρώτο μήνα), κατά τη διάρκεια και στο τέλος της επώασης κάθε εδαφικού δείγματος, λαμβάνονται απορροφητικά διαλύματα ή στερεά υλικά απορρόφησης και αναλύονται για πτητικά προϊόντα. Επιπλέον, θα πρέπει να περιλαμβάνεται και δείγμα εδάφους λαμβανόμενο απευθείας μετά την εφαρμογή (δείγμα ημέρας 0) από 5 τουλάχιστον πρόσθετα σημεία δειγματοληψίας. Τα χρονικά διαστήματα θα πρέπει να επιλέγονται με τέτοιο τρόπο ώστε να μπορεί να διαμορφώνεται πρότυπο μείωσης της ουσίας δοκιμής και πρότυπα σχηματισμού και απομάκρυνσης των προϊόντων μετατροπής (π.χ. 0, 1, 3, 7 ημέρες 2, 3 εβδομάδες 1, 2, 3 μήνες, κλπ.).

Όταν χρησιμοποιείται ουσία δοκιμής επισημασμένη με ^{14}C, θα προσδιορίζεται ποσοτικά με καύση η μη εκχυλίσιμη ραδιενέργεια και θα υπολογίζεται για κάθε χρονική στιγμή δειγματοληψίας ένα ισοζύγιο μάζας.

Στην περίπτωση αναερόβιας και επώασης υπό συνθήκες αναπτυσσόμενης όρυζας, η εδαφική και υδατική φάση αναλύονται μαζί για την ουσία δοκιμής και τα προϊόντα μετατροπής ή διαχωρίζονται με διήθηση ή φυγοκέντρηση πρίν από την εκχύλιση και ανάλυση.

1.9.4 **Προαιρετικές δοκιμές**

Αερόβιες, μη στείρες μελέτες σε διάφορες πρόσθετες θερμοκρασίες και με διάφορα ποσοστά υγρασίας εδάφους μπορεί να είναι χρήσιμες για την εκτίμηση της επίδρασης της θερμοκρασίας και της υγρασίας των εδαφών στους ρυθμούς μετατροπής μιας ουσίας δοκιμής και/ή των προϊόντων της μετατροπής στο έδαφος.

Μπορεί να επιχειρηθεί ένας πρόσθετος χαρακτηρισμός μη εκχυλίσιμης ραδιενέργειας χρησιμοποιώντας, π.χ, τη μέθοδο της υπέρ το κρίσιμο σημείο εκχύλισης ρευστού.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Οι ποσότητες της ουσίας δοκιμής, των προϊόντων μετατροπής, των πτητικών ουσιών (μόνον %) και των μη εκχυλισίμων θα πρέπει να δίδονται ως % της εφαρμοζόμενης αρχικής συγκέντρωσης και, όπου είναι σκόπιμο, ως $mg.kg^{-1}$ εδάφους (επί ξηρού βάρους) για κάθε χρονική στιγμή δειγματοληψίας. Για κάθε χρονική στιγμή δειγματοληψίας θα πρέπει να δίδεται ως ποσοστό της εφαρμοζόμενης αρχικής συγκέντρωσης ένα ισοζύγιο μάζας. Μέσω γραφικής παράστασης των συγκεντρώσεων της ουσίας δοκιμής συναρτήσει του χρόνου μπορεί να γίνει εκτίμηση του χρόνου ημιζωής ή του DT_{50} στη μετατροπή. Βασικά προϊόντα μετατροπής θα πρέπει να ταυτοποιούνται και οι συγκεντρώσεις τους θα πρέπει να παρίστανται επίσης γραφικώς συναρτήσει του χρόνου για ανεύρεση των ρυθμών σχηματισμού και απομάκρυνσης. Βασικό προϊόν μετατροπής είναι κάθε προϊόν που αντιπροσωπεύει > 10 % της εφαρμοζόμενης δόσεως σε κάθε χρονική στιγμή κατά τη διάρκεια της μελέτης.

Τα παγιδευόμενα πτητικά προϊόντα δίνουν μια ένδειξη του βαθμού πτητικότητας μιας ουσίας δοκιμής και των προϊόντων μετατροπής της από το έδαφος.

▼B

Με την εφαρμογή υπολογισμών στη βάση κατάλληλου μοντέλου κινητικής, θα πρέπει να λαμβάνονται ακριβέστεροι προσδιορισμοί τιμών χρόνου ημιζωής ή DT_{50} και, αν είναι σκόπιμο, DT_{75} και DT_{90}. Οι τιμές ημιζωής και DT_{50} θα πρέπει να αναφέρονται μαζί με την περιγραφή του χρησιμοποιηθέντος μοντέλου, της τάξης κινητικής και του συντελεστή προσδιορισμού (r^2). Ευνοείται κινητική πρώτης τάξεως εκτός αν $\Gamma < 0.7$. Εάν είναι σκόπιμο, οι υπολογισμοί θα πρέπει να αφορούν και τα βασικά προϊόντα μετατροπής. Παραδείγματα κατάλληλων μοντέλων περιγράφονται στις παραπομπές 31 έως 35.

Στην περίπτωση μελετών ρυθμού σε διάφορες θερμοκρασίες, οι ρυθμοί μετατροπής θα πρέπει να περιγράφονται ως συνάρτηση της θερμοκρασίας στην περιοχή των πειραματικών θερμοκρασιών χρησιμοποιώντας τη σχέση Arrhenius του τύπου:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ ή } \ln k = 1nA - \frac{B}{T},$$

όπου ln A και B είναι σταθερές αναγωγής από την τομή και κλίση, αντίστοιχα, γραμμής άριστης εφαρμογής προερχόμενης από τη γραμμική αναγωγή του ln k συναρτήσει της 1/T, k είναι η σταθερά ρυθμού στη θερμοκρασία T και T είναι η θερμοκρασία σε Kelvin. Θα πρέπει να δίδεται προσοχή στο περιορισμένο εύρος θερμοκρασιών στο οποίο ισχύει η σχέση Arrhenius σε περίπτωση όπου η μετατροπή διέπεται από μικροβιακή δράση.

2.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αν και οι μελέτες διεξάγονται σε τεχνητό εργαστηριακό σύστημα, τα αποτελέσματα παρέχουν τη δυνατότητα εκτίμησης του ρυθμού μετατροπής της ουσίας δοκιμής και του ρυθμού σχηματισμού και απομάκρυνσης των προϊόντων μετατροπής υπό συνθήκες επιτόπιας εφαρμογής (36)(37).

Μελέτη της πορείας μετατροπής ουσίας δοκιμής παρέχει πληροφορίες για τον τρόπο με τον οποίο η εφαρμοζόμενη ουσία υφίσταται δομικές μετατροπές στο έδαφος από χημικές και μικροβιακές αντιδράσεις.

3. **ΑΝΑΦΟΡΑ**

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα εξής:

Ουσία δοκιμής:

— συνήθης ονομασία, χημική ονομασία, αριθμός CAS, συντακτικός τύπος (με υπόδειξη της θέσεως του ή των ιχνηθετών; όταν χρησιμοποιείται ραδιοεπισημασμένο υλικό) και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες (βλ, ενότητα 1.5)

— καθαρότητα (προσμείξεις) της ουσίας δοκιμής

— ραδιοχημική καθαρότητα της επισημασμένης χημικής ουσίας και ειδική ενεργότητα (όπου αυτό κρίνεται απαραίτητο.

Ουσία αναφοράς:

— χημική ονομασία και δομή των ουσιών αναφοράς που χρησιμοποιούνται για το χαρακτηρισμό ή/και την ταυτοποίηση των προϊόντων μετατροπής

Εδάφη δοκιμής:

— στοιχεία για τον τόπο συλλογής,

— ημερομηνία και διαδικασία δειγματοληψίας του εδάφους,

▼B

— ιδιότητες των εδαφών, όπως pH, περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, υφή (% άμμος, % ιλύς, % άργιλος), κατιοανταλλακτική ικανότητα, φαινόμενη πυκνότητα, χαρακτηριστικά κατακράτησης νερού και μικροβιακή βιομάζα,

— χρόνος αποθήκευσης και συνθήκες αποθήκευσης (αν προηγήθηκε αποθήκευση)

Συνθήκες δοκιμής:

— ημερομηνίες εκτέλεσης των μελετών,

— ποσότητα της ουσίας δοκιμής,

— χρησιμοποιηθέντες διαλύτες και μέθοδος εφαρμογής της ουσίας δοκιμής,

— βάρος αρχικώς υποβληθέντος σε κατεργασία εδάφους και του οποίου η δειγματοληψία γινόταν σε κάθε χρονική στιγμή για ανάλυση

— περιγραφή του χρησιμοποιηθέντος συστήματος επώασης,

— ταχύτητες ροής αέρα (μόνο για συστήματα διέλευσης ροής)

— θερμοκρασία πειράματος,

— υγρασία εδάφους κατά την επώαση,

— μικροβιακή βιομάζα αρχικώς, κατά τη διάρκεια και στο τέλος των αερόβιων μελετών,

— pH, συγκέντρωση οξυγόνου και οξειδοαναγωνικό δυναμικό αρχικά, κατά τη διάρκεια και στο τέλος των αναερόβιων και υπό συνθήκες ορυζώνα μελετών,

— μέθοδος(οι) εκχύλισης,

— μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού και ταυτοποίησης της ουσίας δοκιμής και βασικών προϊόντων μετατροπής στο έδαφος και σε υλικά απορροφήσεως,

— αριθμός επαναληπτικών δειγμάτων και αριθμός μαρτύρων.

Αποτελέσματα:

— αποτέλεσμα προσδιορισμού μικροβιακής δραστικότητας,

— επαναληψιμότητα και ευαισθησία των χρησιμοποιουμένων αναλυτικών μεθόδων,

— ποσοστά ανάκτησης (τιμές % για μια έγκυρη μελέτη δίδονται στο 1.7.1),

— πίνακες αποτελεσμάτων εκφρασμένων ως % της αρχικά εφαρμοζόμενης δόσεως και, όπου κρίνεται σκόπιμο, ως $mg.kg-^{1}$ εδάφους (επί ξηρού βάρους),

— ισοζύγιο μάζας κατά τη διάρκεια και στο τέλος των μελετών,

— χαρακτηρισμός μη εκχυλίσιμης (δεσμευμένης) ραδιενέργειας ή υπολειμμάτων στο έδαφος,

— ποσοτικός προσδιορισμός απελευθερωθέντος $C0_2$ και άλλων πτητικών ενώσεων,

— γραφικές παραστάσεις συγκεντρώσεων στο έδαφος συναρτήσει του χρόνου για την ουσία δοκιμής και, όπου κρίνεται σκόπιμο, για βασικά προϊόντα μετατροπής,

— χρόνος ημιζωής ή DT_{50}, DT_{75} και DT_{90} για την ουσία δοκιμής και, όπου κρίνεται σκόπιμο, για βασικά προϊόντα μετατροπής, συμπεριλαμβανομένων και ορίων εμπιστοσύνης,

▼B

— εκτίμηση της ταχύτητας αβιοτικής αποικοδόμησης υπό στείρες συνθήκες,

— εκτίμηση της κινητικής μετατροπής για την ουσία δοκιμής και, όπου κρίνεται σκόπιμο, για βασικά προϊόντα μετατροπής,

— προτεινόμενες πορείες μετατροπής, όπου κρίνεται σκόπιμο,

— συζήτηση και ερμηνεία αποτελεσμάτων,

— μη επεξεργασμένα δεδομένα (δηλ. χρωματογραφήματα δειγμάτων, υπολογισμοί ρυθμών μετατροπής και μέσα που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση προϊόντων μετατροπής).

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) US- Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(3) European Union (EU) (Γ995). Commission Directive 95/36/EC of 14 July 1995 amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex II, Part A and Annex HI, Part A: Fate and Behaviour in the Environment.

(4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(5) BBA (1986). Richtlinie fur die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden — Abbau, Umwandlung und Metabolismus. -

(6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality -Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil — Part 1: Aerobic conditions.

(7) ISO 14239 (1997). Soil Quality — Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(9) MAFF — Japan 2000 — Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil — Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).

(10) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.

(12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley — VCH (1998).

(13) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (TUPAC 1984)

(14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

▼B

(15) ISO 10381-6 (1993). Soil Quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(16) Annex V to Dir. 67/548/EEC

(17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.

(18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

(19) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

(20) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds. Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

(21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

(22) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

(23) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol. Biochem. 10, 215-221.

(25) ISO 14240-1 and 2 (1997). Soil Quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method.

(26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In Pesticide Effects on Soil Microflora. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45-60.

(27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and biotransformation of pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide, 105-120.

(28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 59-63 (SETAC-Europe).

(29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjödahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 68-69 (SETAC-Europe).

(30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. Plant and Soil 102, 197-200.

(31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.

▼B

(32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, 181-199.

(33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In «Environmental Dynamics of Pesticides». R. Haque and V.H. Freed, Eds., 135-172.

(34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 39, 188-204.

(35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 33, 47-60.

(36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, 1032-1041.

(37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83-122.

▼B

Παραρτημα 1

ΤΑΣΗ ΝΕΡΟΥ, ΕΠΙΤΟΠΙΑ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ (FC) ΚΑΙ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΣΥΓΚΡΑΤΗΣΗΣ ΝΕΡΟΥ (WHC) [1]

Ύψος στήλης ύδατος [cm]	pF [α]	bar [β]	Παρατηρήσεις
10^7	7	10^4	Ξηρό έδαφος
$1{,}6 \cdot 10^4$	4,2	16	Σημείο μαρασμού
10^4	4	10	
10^3	3	1	
$6 \cdot 10^2$	2,8	0,6	
$3{,}3.10^2$	2,5	0,33 [γ]	Εύρος Επιτόπια ικανότητα [δ]
10^2	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	WHC (κατά προσέγγιση)
1	0	0,001	Κορεσμένο υδατικώς έδαφος

[α] pF = log της στήλης ύδατος σε cm.
[β] 1 bar = 10^5 Pa.
[γ] Αντιστοιχεί σε κατά προσέγγιση συγκέντρωση νερού 10 % σε άμμο, 35 % σε αργιλώδες έδαφος (loam) και 45 % σε άργιλο.
[δ] Η επιτόπια ικανότητα δεν είναι σταθερή αλλά ποικίλει ανάλογα με τον τύπο του εδάφους μεταξύ pF 1,5 και 2,5.

Η τάση νερού μετριέται σε cm στήλης ύδατος ή σε bar. Λόγω του μεγάλου εύρους ρόφησης, η τάση εκφράζεται απλώς ως τιμή pF που ισοδυναμεί με το λογάριθμο της σε cm στήλης νερού.

Η επιτόπια ικανότητα ορίζεται ως η ποσότητα του νερού που μπορεί να αποθηκευτεί παρά τη βαρύτητα από ένα φυσικό έδαφος 2 ημέρες μετά από μεγαλύτερη περίοδο βροχόπτωσης ή μετά ικανή άρδευση. Προσδιορίζεται σε αδιατάρακτο έδαφος επί του πεδίου. Η μέτρηση δεν εφαρμόζεται συνεπώς σε εργαστηριακά δείγματα διαταραγμένου εδάφους. Οι προσδιοριζόμενες σε διαταραγμένα εδάφη τιμές FC μπορεί να εμφανίζουν μεγάλες συστηματικές διακυμάνσεις.

Η ικανότητα συγκράτησης νερού (WHC) προσδιορίζεται στο εργαστήριο με αδιατάρακτο και διαταραγμένο έδαφος με κορεσμό στήλης εδάφους από νερό μέσω τριχοειδικής μεταφοράς. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για διαταραγμένα εδάφη και μπορεί να είναι μέχρι 30 % μεγαλύτερη από την επιτόπια ικανότητα (1). Είναι επίσης ευκολότερο να προσδιοριστεί πειραματικώς σε σχέση με τον προσδιορισμό αξιόπιστων τιμών FC.

Σημειώσεις

[1] Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

▼B

Παραρτημα 2

ΥΓΡΑΣΙΕΣ (g νερού ανά 100 g ξηρού εδάφους) ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΤΥΠΩΝ ΕΔΑΦΩΝ ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΧΩΡΕΣ

Τύπος εδάφους	Χώρα	Υγρασία εδάφους σε		
		WHC ([1])	pF=1,8	pF = 2,5
Άμμος	Γερμανία	28,7	8,8	3,9
Αργ. άμμος (Loamy sand)	Γερμανία	50,4	17,9	12,1
Αργ. άμμος (Loamy sand)	Ελβετία	44,0	35,3	9,2
Λασπώδες (Silt loam)	Ελβετία	72,8	56,6	28,4
Αργ. άργιλος (Clay loam)	Βραζιλία	69,7	38,4	27,3
Αργ. άργιλος (Clay loam)	Ιαπωνία	74,4	57,8	31,4
Αμμώδης άργ. (Sandy loam)	Ιαπωνία	82,4	59,2	36,0
Λασπώδες (Silt loam)	ΗΠΑ	47,2	33,2	18,8
Αμμώδης άργ. (Sandy loam)	ΗΠΑ	40,4	25,2	13,3

([1]) Ικανότητα συγκράτησης νερού.

▼B

Παραρτημα 3

Σχήμα 1

Παράδειγμα συσκευής διελεύσεως ροής για τη μελέτη της μετατροπής χημικών σε εδάφη ([1]) ([2])

1: βελονοειδής βαλβίδα

2: φιάλη με νερό για την έκπλυση αερίων

3: υπερμεμβράνη (στείρες συνθήκες μόνο), μέγεθος πόρων 0.2 μm

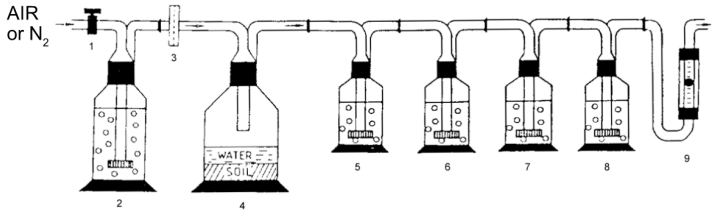
4: φιάλη μεταβολισμού εδάφους (με επικαλυπτική στιβάδα νερού μόνο για αναερόβιες και συνθήκες ορυζώνα)

5: παγίδα αιθυλενογλυκόλης για οργανικές πτητικές ενώσεις

6: παγίδα θειικού οξέος για αλκαλικές πτητικές ενώσεις

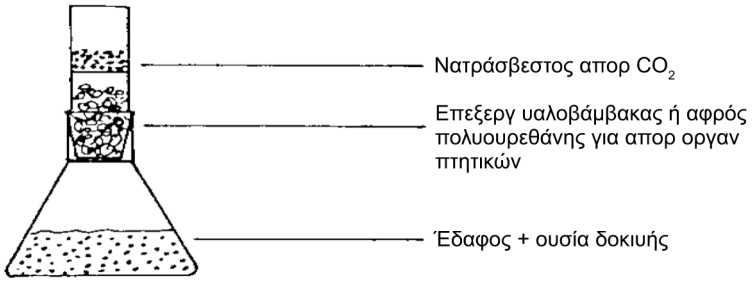
7, 8: παγίδα υδροξειδίου του νατρίου γιαfor CO_2 & άλλα όξινα πτητικά

9: ροόμετρο



Σχήμα 2

Παράδειγμα βιομετρικής φιάλης για τη μελέτη της μετατροπής χημικών σε εδάφη ([3])



([1]) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.

([2]) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.

([3]) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.

▼B

Γ.24. ΑΕΡΟΒΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ ΣΕ ΥΔΑΤΙΚΑ ΙΖΗΜΑΤΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμής είναι αναχαραγωή της OECD TG 308 (2002).

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο χημικές ουσίες μπορούν να εισέλθουν σε ρήχά ή βαθέα ύδατα επιφανείας με διάφορους τρόπους όπως απ ευθείας εισαγωγή, παρασυρόμινες ως ψεκάδες, απορροή, αποστράγγιση, διάθεση αποβλήτων, μέοω βιομηχανικών, αστικών ή αγροτικών επροών και ατμοσφαιρική απόθεση. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμής περτγράφεται εργαστηριακή μέθοδος εκαμήσεως της αεδβιας και αναερόβιας μετατροπής οργανικών χημικών ουσιών σε υδατικά, ιζηματικά συστήματα, βασιζεται σε υπάρχουατς καιτυθυντήριες οδηγίες (1)(2)(3)(4)(5)(6).Σς συνάντηση ανταλλαγής απόψεων του ΟΟΣΑ σχετικά με την επιλσγή εδαρών/ιζημάτων, η οποία έλαβε χώρα στην Belgirale στην Ιταλία το 1995 επήλθε συμφωία ειδικότερα, για τον αριθμό και τύπο των προς χρήση υζημάτων στην παρούσα δοκιμή. Διαορφώθηκαν επίσης συστάσεις σχετικά με τη συλλογή, χειριομό και αποθήκευση δειγμάτων ιζημάτων, βασιζδμενες σης οδηγίες ISO (8). Τέτοιου είδους μελέτες είναι απαραίτητες για χημικές ουσίες οι οποίες προστίθενται στο νερό ή που είναι πιθανόν να φθάσουν στο υδατικό περιβάλλον μέσω των οδών πον περιγράφιηκαν ανωτέρω.

Οι συνθήκες στα φυσικά, υδατικά ιζηματικά συστήματα είναι συγνά αερόβιες στην άνω υδατική φάση. Η επιφανειακή στιβάδα του ιζήματος μπορει να είναι είτε αερόβια είτε αναερόβια ενώ στο εοωτέρικό του ιζήματος οι συνθήκες είναι συνήθως αναερόβιες. Στο παρόν περιγράφονται τόσο αερόβιες, όσο και αναερόβιες δοκιμές, ώστε να σομπεριληφθούν όλες αυτέ οι πιθανότητες. Η αερόβιος δοκιμή αποτελεί προσομοίωση αερόβιας υδατικής στήλης κάνω από αερόβια ιζηματική στιβάδα, κάτω από την οποία βρίσκεται αναερόβια βαθμίβα. Η αναερόβια δοκιμή από αερόβια ιζηματική σηβάδα, κάτω από την οποία βρίσκεται αναερόβια βαθμίδα. Η αναερόβια δοκιμή αποτελει προσομοίωση πλήρως αναερόβιου συστήματός νερού-ιζήματος. Αν, λόγω περιστάσεων, πρέπει να υπάρξουν σημαντικές αποκλισεις από αυίες ης συστάσεις, π.χ. λόγω χσήσεως αθικτων ιζηματικων πυρήνων που μπορεί να έχουν εκτεθει στην οτην ουσία της δσκιμής, υπάρχουν για αυτό του σκοπό αλλες διαθέσιμες μεθοδοι (9).

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

Σε κάθε περίπιωση θα πρέπει να χρησιμοποιοίνται οι μονάδες του Διεθνούς Συστήματος (SI).

Ουεία δοκιμής: καθε ουσία, αρχετικά προιδντα μετατροκής.

Προϊόντα μεταροπής: δλες οι ουσίες που προκίπουν από αναδράσδις βιοτικής ή αβιοπκής μετατροπής της ουσίας δοκιμής συμπεριλαμβανομένου του CO_2 και δεσμευμένων υπαλειμμάτων.

Δτσμετμένα απολείμματα: Ως«δεσμευμένα υπολείμματα» χαρακτηρίζονται ενώαεις οτο εδαφος οε φυτά ή οε ζώα, οι οποίες παραμένουν οτο υπόσιρωμα με τη μορφή της αρχικής ουσίας ή μεταβολιτών της μετά τις εκχυλίσεις. Η μέθοδος εκχυλίσεως δεν πρέπει να μεταβάλλει ουσιαδτικώφ αυτές καθ αυτές τις ενώσεις ή τη δομή του υποστρώματος. Η φύση του δεσμού μπορει να προσδιοπιστεί εν μέρει με τη Βοήθεια μεθόδων εκχυλίσεως που μεταβάλλουν το υπόστρωμα και εζειδικευμένες αναλωιικές τεχνικές. Μέχρι σήμερα, για παράδειγμα, έχουν ταυτοποιηθεί με τον τρόπο αυτό ομοιοπολικοί, ιονικοί και προφητικοί δεαμοι, λυθώς επίσης και παγιδεύαεις. Γενικά, ο σχηαπομός δεσμευμένων, υπαλειμμάτων μειώει σημανπκώς τη Βισπροαβασιμότητα και βιοδιαθτσιμότητα (10) [τροποποίηση από IUPAC 1984 (11)].

▼B

Αερόβια μετατροπή: (οξειδωτική): ανπδράσεις που λαμβάνουν χώρα παρονσία μοριακού οξυγόνου (12).

Αναερόβια μετατροπή: (αναγωγική): ανπδράσεις που λαμβάνουν χώρα παρονσία μοριακού οξυγόνου (12).

Φυσικά ύδατα: επιφανειακά ύδατα από λίμνες ποταμούς, ρέματα, κλπ.

Ίξημα: μίγμα ανοργάνων και οργανιπών χημικών συσιατικών, εκ των οπσιων τα οργανικά συσιαπκά περιέχουν ευώσεις με υψηλή περιεπτικότητα σε άνθρακα και άζωρο, ενώ ταυιχρόνως διαθέτουν και υψηλή μοριακή μάζα. Αποτιθεται από φυσικά ύδατα και σχηματίζει επιφάνεια επαφής (διεπαφή) με τα εν λόγω ύδατα.

Ανοργανοποίηση: η πλήρης αποικοδόμηση μιας οργανικής ενώσεως σε CO_2, H_20 υπό αερόβιες συνθήκες και CH4, $C0_2$ και H_20 υπό αναερόβιες συνθήκες. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμής, όταν χρησιμοποιείται ραδιενεργώς επισημασμένη ένωση, ως ανοργανοποίηση ορίζεται η εκτεταμένη αποικοδόμηση ενός μορίου, κατά την οποία επισημασμένο άτομο άνθρακα οξειδώνεται ή ανάγεται ποσοτικώς με απελευθέρωση αντίστοιχης ποσότητας $^{14}CO_2$ ή $^{14}CH_4$.

Χρόνος ημιζωής, $t_{0,5}$, είναι ο χρόνος που απαιτείται για την κατά 50 % μετατροπή της ουσίας δοκιμής, όταν η κινητική της αντιδράσεως μετατροπής είναι πρώτης τάξεως είναι ανεξάρτητη της αρχικής συγκέντρωσης.

DT_{50} (Χρόνος μειώσεως 50): είναι το χρονικό διάστημα στο οποίο η αρχική συγκέντρωση της ουσίας δοκιμής μειώνεται κατά 50 %.

DT_{75} (Χρόνος μειώσεως 75): είναι το χρονικό διάστημα στο οποίο η αρχική συγκέντρωση της ουσίας δοκιμής μειώνεται κατά 75 %.

DT_{90} (Χρόνος μειώσεως 90): είναι το χρονικό διάστημα στο οποίο η αρχική συγκέντρωση της ουσίας δοκιμής μειώνεται κατά 90 %.

1.3 ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Για την ταυτοποίηση και ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων μετατροπής με τη βοήθεια φασματοσκοπικών και χρωματογραφικών μεθόδων, πρέπει να χρησιμοποιούνται ουσίες αναφοράς.

1.4 ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΥΣΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

Για τη μέτρηση της ταχύτητας μετατροπής μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε μη επισημασμένη, είτε επισημασμένη με ισότοπα ουσία δοκιμής. Ωστόσο, προτιμάται η επισημασμένη με ισότοπα ουσία. Η επισημασμένη ουσία είναι απαραίτητη για τη μελέτη της πορείας μετατροπής και τον προσδιορισμό του ισοζυγίου μάζας. Συνιστάται η επισήμανση με ^{14}C, ωστόσο μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμη και η χρήση άλλων ισοτόπων όπως ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P. Η επισήμανση θα πρέπει να γίνεται στο σταθερότερο ή σταθερότερα μέρη του μορίου ([1]), όσο αυτό είναι δυνατόν. Η χημική ή/και ραδιοχημική καθαρότητα της ουσίας δοκιμής πρέπει να είναι τουλάχιστον 95 %.

Πριν από τη διεξαγωγή μιας δοκιμής, θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμα τα ακόλουθα στοιχεία σχετικά με την ουσία δοκιμής:

(α) διαλυτότητα σε νερό (Μέθοδος Α.6)

(β) διαλυτότητα σε οργανικούς διαλύτες

(γ) τάση ατμών (Μέθοδος Α.4) και η σταθερά του νόμου του Henry

([1]) Για παράδειγμα, αν η ουσία περιέχει έναν δακτύλιο, απαιτείται επισήμανση στον δακτύλιο αυτό αν η ουσία δοκιμής περιέχει δύο ή περισσοτέρους δακτυλίους, ίσως χρειαστεί η διεξαγωγή ξεχωριστών μελετών για την αξιολόγηση της τύχης κάθε επισημασμένου δακτυλίου και για τη λήψη καταλλήλων πληροφοριών για το σχηματισμό προϊόντων μετατροπής.

▼B

(δ) συντελεστής κατανομής σε n-οκτανόλη/νερό (Μέθοδος Α.8)

(ε) σταθερά προσροφήσεως (K_d, K_f ή K_{oc}, ανάλογα με την περίπτωση) (Μέθοδος C. 18)

(στ) υδρόλυση (Μέθοδος C.7)

(ζ) σταθερά διαστάσεως (pK_a) [Οδηγία ΟΟΣΑ 112] (13)

(η) χημική δομή της ουσίας δοκιμής και θέση του ή των ισοτόπων επισημάνσεως, εφόσον υπάρχουν.

Σημείωση: Πρέπει να αναφέρεται η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιήθηκαν οι εν λόγων μετρήσεις.

Άλλες χρήσιμες πληροφορίες μπορεί να είναι δεδομένα για την τοξικότητα της ουσίας δοκιμής στους μικροοργανισμούς, δεδομένα σχετικά με την άμεση ή/και εγγενή βιοαποικοδομησιμότητα και δεδομένα αερόβιας και αναερόβιας μετατροπής στο έδαφος.

Θα πρέπει επίσης να υπάρχουν διαθέσιμες αναλυτικές μέθοδοι (συμπεριλαμβανομένων και μεθόδων εκχυλίσεως και καθαρισμού) για την ταυτοποίηση και ποσοτικό προσδιορισμό της ουσίας δοκιμής και των προϊόντων μετατροπής της στο νερό και στα ιζήματα (βλ. παράγραφο 1.7.2).

1.5 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Στην περιγραφόμενη στην παρούσα δοκιμή μέθοδο χρησιμοποιείται αερόβιο και αναερόβιο υδατικό ιζηματικό σύστημα (βλ. παράρτημα 1), το οποίο παρέχει τη δυνατότητα:

i) μετρήσεως της ταχύτητας μετατροπής της ουσίας δοκιμής σε υδατικό ιζηματικό σύστημα,

ii) μετρήσεως της ταχύτητας μετατροπής της ουσίας δοκιμής στο ίζημα,

iii) μετρήσεως της ταχύτητας ανοργανοποιήσεως της ουσίας δοκιμής ή/και των προϊόντων μετατροπής της (όταν χρησιμοποιείται ουσία δοκιμής επισημασμένη με ^{14}C),

iv) ταυτοποιήσεως και ποσοτικού προσδιορισμού των προϊόντων μετατροπής στην υδατική και ιζηματική φάση, συμπεριλαμβανομένου και του ισοζυγίου μάζας (όταν χρησιμοποιείται επισημασμένη ουσία),

v) μετρήσεως της κατανομής της ουσίας δοκιμής και των προϊόντων μετατροπής της μεταξύ των δύο φάσεων, κατά τη διάρκεια περιόδου επωάσεως στο σκοτάδι (για την αποφυγή π.χ. υπερβολικής αύξησης αλγών) σε σταθερή θερμοκρασία. Οι τιμές του χρόνου ημιζωής, DT_{50}, DT_{75} και DT_{90} προσδιορίζονται όπου το δικαιολογούν τα δεδομένα, δεν θα πρέπει όμως να χρησιμοποιούνται στην εξαγωγή συμπερασμάτων για χρονικές περιόδους, οι οποίες απέχουν πολύ από το χρονικό διάστημα διεξαγωγής του πειράματος (βλέπε παράγραφο 1.2).

Τόσο για την αερόβια όσο και για την αναερόβια μελέτη είναι απαραίτητα τουλάχιστον δύο ιζήματα και τα αντίστοιχα ύδατά τους (7). Ωστόσο, μπορεί να υπάρξουν περιπτώσεις όπου να πρέπει να χρησιμοποιηθούν περισσότερα από δύο υδατικά ιζήματα, παραδείγματος χάριν για μια χημική ουσία που μπορεί να εμφανίζεται σε περιβάλλον τόσο γλυκού, όσο και θαλασσίου ύδατος.

▼B

1.6 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η μέθοδος εφαρμόζεται γενικά σε χημικές ουσίες (επισημασμένες ή μη) για τις οποίες υπάρχει διαθέσιμη αναλυτική μέθοδος ικανοποιητικής ακριβείας και ευαισθησίας. Εφαρμόζεται σε μη πτητικές ενώσεις, ελαφρώς πτητικές ενώσεις, υδατοδιαλυτές ενώσεις ή και σε ενώσεις με χαμηλή υδατοδιαλυτότητα. Η δοκιμή δεν θα πρέπει να εφαρμόζεται σε ιδιαιτέρως πτητικές από το νερό χημικές ουσίες (π.χ. ατμίζουσες, οργανικοί διαλύτες), οι οποίες δεν μπορούν έτσι να διατηρηθούν στο νερό ή/και στο ίζημα υπό τις πειραματικές συνθήκες της παρούσας δοκιμής.

Η μέθοδος εφαρμόζεται μέχρι στιγμής για τη μελέτη της μετατροπής χημικών ουσιών σε γλυκά ύδατα και ιζήματα, μπορεί όμως να εφαρμοσθεί κατ' αρχή και σε θαλάσσια συστήματα ή συστήματα υδάτων εκβολών ποταμών. Δεν είναι κατάλληλη για την προσομοίωση συνθηκών σε ρέοντα ύδατα (π.χ. ποταμοί) ή στην ανοιχτή θάλασσα.

1.7 ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΟΣ

1.7.1 **Ανάκτηση**

Από την εκχύλιση και ανάλυση διπλών, τουλάχιστον, δειγμάτων ύδατος και ιζήματος αμέσως μετά την προσθήκη της ουσίας δοκιμής, προκύπτει μια πρώτη ένδειξη της επαναληψιμότητας της αναλυτικής μεθόδου και της ομοιομορφίας της διαδικασίας εφαρμογής για την ουσία δοκιμής. Οι τιμές ανάκτησης σε μεταγενέστερα στάδια των πειραμάτων προκύπτουν από τα αντίστοιχα ισοζύγια μάζας (όταν χρησιμοποιείται επισημασμένη ουσία). Τα ποσοστά ανάκτησης θα πρέπει να κυμαίνονται από 90 έως 110 % για επισημασμένες χημικές ουσίες (6) και από 70 έως 110 % για μη επισημασμένες χημικές ουσίες.

1.7.2 **Επαναληψιμότητα και ευαισθησία της αναλυτικής μεθόδου**

Η επαναληψιμότητα της αναλυτικής μεθόδου (μη συμπεριλαμβανομένης της αποδοτικότητας της αρχικής εκχυλίσεως), όσον αφορά τον ποσοτικό προσδιορισμό της ουσίας δοκιμής και των προϊόντων μετατροπής, μπορεί να ελεγχθεί με τη βοήθεια διπλής αναλύσεως του ίδιου εκχυλίσματος των δειγμάτων νερού ή ιζήματος, τα οποία έχουν επωαστεί για ικανό χρονικό διάστημα για το σχηματισμό προϊόντων μετατροπής.

Το όριο ανιχνεύσεως (LOD) της αναλυτικής μεθόδου για την ουσία δοκιμής και για τα προϊόντα μετατροπής θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 0,01 $mg.kg^{-1}$ στο νερό ή στο ίζημα (ως ουσία δοκιμής) ή 1 % της αρχικής ποσότητας που χρησιμοποιήθηκε στο σύστημα δοκιμής, όποια τιμή από τις δύο είναι χαμηλότερη. Θα πρέπει επίσης να προσδιορίζεται και το όριο του ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ).

1.7.3 **Ακρίβεια δεδομένων μετατροπής**

Από την ανάλυση αναγωγής των συγκεντρώσεων της ουσίας δοκιμής ως συνάρτησης του χρόνου, προκύπτουν τα σχετικά στοιχεία για την ακρίβεια της καμπύλης μετατροπής και είναι δυνατός ο υπολογισμός των ορίων εμπιστοσύνης για τους χρόνους ημιζωής (αν ισχύει κινητική ψευδο-πρώτης τάξως) ή τις τιμές DT_{50} και, όπου κρίνεται σκόπιμο, DT_{75} και DT_{90}.

1.8 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.8.1 **Σύστημα δοκιμής και εξοπλισμός**

Η μελέτη πρέπει να διεξάγεται σε υάλινους περιέκτες (π.χ. φιάλες, σωλήνες φυγοκεντρήσεως), εκτός και αν από προγενέστερα στοιχεία (όπως π.χ. σταθερά κατανομής σε n-οκτανόλη/νερό, δεδομένα ροφήσεως, κλπ.) προκύπτει ότι η ουσία δοκιμής μπορεί να κολλήσει στο γυαλί, οπότε και χρησιμοποιείται εναλλακτικό υλικό (π.χ. Teflon). Όταν είναι γνωστό ότι η ουσία δοκιμής κολλά στο γυαλί, το πρόβλημα μπορεί να επιλυθεί με χρήση μιας ή περισσοτέρων από τις ακόλουθες μεθόδους:

▼B

— προσδιορισμός της μάζας της ουσίας δοκιμής και των προϊόντων μετατροπής της που ροφώνται στο γυαλί·

— διεξοδική έκπλυση με διαλύτη όλων των υάλινων σκευών μετά το πέρας της δοκιμής·

— χρήση τυποποιημένων από πλευράς συστάσεως προϊόντων (βλ. επίσης παράγραφο 1.9.2)·

— χρήση αυξημένης ποσότητας συνδιαλύτη για την προσθήκη της ουσίας δοκιμής στο σύστημα· αν χρησιμοποιείται συνδιαλύτης, θα πρέπει να είναι τέτοιος ώστε να μην αντιδρά με την ουσία δοκιμής.

Παραδείγματα συνήθους εξοπλισμού δοκιμής, δηλ. συστημάτων διελεύσεως ροής και τύπου βιομέτρου, παρουσιάζονται στα παραρτήματα 2 και 3, αντιστοίχως (14). Άλλα χρήσιμα συστήματα επωάσεως περιγράφονται στη βιβλιογραφική αναφορά 15. Η σχεδίαση του πειραματικού εξοπλισμού θα πρέπει να είναι τέτοια που να επιτρέπει την ανταλλαγή αέρα ή αζώτου και την παγίδευση των πτητικών προϊόντων. Οι διαστάσεις του εξοπλισμού πρέπει να είναι τέτοιες ώστε να είναι συμβατές με τις απαιτήσεις της δοκιμής (βλέπε παράγραφο 1.9.1). Ο αερισμός μπορεί να γίνεται είτε με ήπια παραγωγή φυσαλίδων, είτε με διοχέτευση αέρα ή αζώτου πάνω από την επιφάνεια του ύδατος. Στην τελευταία περίπτωση, μπορεί να είναι σκόπιμη η ήπια ανάδευση του ύδατος από πάνω για καλύτερη διανομή του οξυγόνου ή του αζώτου σε αυτό. Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται απηλλαγμένος $C0_2$ αέρας, καθώς αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα αύξηση του pH του νερού. Ασχέτως περιπτώσεως, η διατάραξη του ιζήματος είναι ανεπιθύμητη και θα πρέπει κατά το δυνατόν να αποφεύγεται. Οι ελαφρώς πτητικές χημικές ουσίες θα πρέπει να δοκιμάζονται σε σύστημα τύπου βιομέτρου με ήπια ανάδευση της επιφανείας του ύδατος. Για την παγίδευση των πτητικών προϊόντων, μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν κλειστά δοχεία με ατμοσφαιρικό αέρα ή άζωτο στο πάνω μέρος και εσωτερικά φιαλίδια (16). Κατά την αερόβια δοκιμή είναι απαραίτητη η τακτική ανανέωση του υπερκειμένου αερίου, ώστε να αντισταθμίζεται η κατανάλωση οξυγόνου από τη βιομάζα.

Στις κατάλληλες παγίδες για τη συλλογή πτητικών προϊόντων μετατροπής περιλαμβάνονται, χωρίς η παράθεση αυτή να είναι περιοριστική, διαλύματα υδροξειδίου του καλίου ή υδροξειδίου του νατρίου 1 $mol.dm^{-3}$ για το διοξείδιο του άνθρακα ([1]) και αιθυλενογλυκόλης, αιθανολαμίνης ή παραφίνης 2 % σε ξυλόλιο για οργανικές ενώσεις. Τα πτητικά προϊόντα που σχηματίζονται υπό αναερόβιες συνθήκες, όπως μεθάνιο, μπορούν να συλλέγονται για παράδειγμα με μοριακά κόσκινα. Τα εν λόγω πτητικά προϊόντα μπορούν να καίγονται προς, π.χ., CO_2, με διοχέτευση του αερίου μέσα από σωλήνα χαλαζία πλήρη CuO σε θερμοκρασία 900 °C και παγίδευση του σχηματιζόμενου $C0_2$ σε απορροφητικό μέσο με άλκαλι (17).

Απαιτείται, επίσης, εργαστηριακός εξοπλισμός για τη χημική ανάλυση της ουσίας δοκιμής και των προϊόντων μετατροπής (π.χ. αέρια υγρή χρωματογραφία (GLC), υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), χρωματογραφία λεπτής στιβάδος (TLC), φασματοσκοπία μάζας (MS), αέρια χρωματογραφία-φασματοσκοπία μάζας (GS-MS), υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC-MS), πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR) κλπ.), ενώ απαιτούνται, κατά περίπτωση, και συστήματα ανιχνεύσεως ραδιοεπισημασμένων ή μή χημικών ουσιών. Όταν χρησιμοποιείται ραδιοεπισημασμένη ουσία, απαιτείται επίσης υγρός απαριθμητής σπινθηρισμών και οξειδωτής δια καύσεως (για την καύση ιζηματικών δειγμάτων πριν από τον προσδιορισμό της ραδιενέργειας).

Απαιτείται και άλλος συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός για φυσικοχημικούς και βιολογικούς προσδιορισμούς (βλ. Πίνακα 1, παράγραφος 1.8.2.2), γυάλινα σκεύη, χημικές ουσίες και αντιδραστήρια, κατά περίπτωση.

([1]) Επειδή τα αλκαλικά αυτά διαλύματα απορροφήσεως απορροφούν και το διοξείδιο του άνθρακα που προέρχεται από τον αερισμό, καθώς και εκείνο που σχηματίζεται από την αναπνοή στα αερόβια πειράματα, πρέπει να αλλάζονται σε τακτά χρονικά διαστήματα για να αποφεύγεται ο κορεσμός τους και κατά συνέπεια η απώλεια της απορροφητικής τους ικανότητας.

▼B

1.8.2 **Επιλογή και αριθμός των υδατικών ιζημάτων**

Οι τοποθεσίες δειγματοληψίας πρέπει να επιλέγονται σύμφωνα με το σκοπό της δοκιμής στην εκάστοτε περίπτωση. Κατά την επιλογή τόπων δειγματοληψίας, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη το πιθανώς υπάρχον ιστορικό γεωργικών, βιομηχανικών ή αστικών εισροών στο υδροφόρο στρώμα και τις πηγές του νερού. Δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ιζήματα αν αυτά έχουν προηγουμένως επιμολυνθεί με την ουσία δοκιμής ή με δομικά της ανάλογα μέσα στα προηγούμενα 4 χρόνια.

1.8.2.1 Ειτιλογή ιζήματος

Για τις αερόβιες μελέτες χρησιμοποιούνται συνήθως δύο ιζήματα (7). Τα δύο επιλεγόμενα ιζήματα θα πρέπει να διαφέρουν στην περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα και στην υφή. Το ένα ίζημα θα πρέπει να έχει υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (2,5-7,5 %) και λεπτή υφή ενώ το άλλο θα πρέπει να έχει χαμηλή περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα (0,5-2,5 %) και τραχεία υφή. Η διαφορά μεταξύ περιεκτικοτήτων σε οργανικό άνθρακα θα πρέπει κανονικά να είναι τουλάχιστον 2 %. «Λεπτή υφή» θεωρείται όταν η περιεκτικότητα σε [άργιλο + ιλύ] [1] είναι μεγαλύτερη του 50 %, ενώ «τραχεία δομή» όταν η περιεκτικότητα σε [άργιλο + ιλύ] είναι μικρότερη του 50 %. Η διαφορά μεταξύ περιεκτικοτήτων σε [άργιλο + ιλύ] των δύο ιζημάτων πρέπει κανονικά να είναι τουλάχιστον 20 %. Στις περιπτώσεις όπου μια χημική ουσία είναι δυνατόν να φθάσει και σε θαλάσσια ύδατα, τουλάχιστον ένα εκ των συστημάτων νερού-ιζήματος θα πρέπει να προέρχεται από τη θάλασσα.

Για την αυστηρώς αναερόβια μελέτη, θα πρέπει να γίνεται δειγματοληψία δύο ιζημάτων (συμπεριλαμβανομένων και των αντιστοίχων υδάτων) από τις αναερόβιες ζώνες επιφανειακών υδάτων (7). Ο χειρισμός και μεταφορά της ιζηματικής και υδατικής φάσεως θα πρέπει να γίνεται προσεκτικά, απουσία οξυγόνου.

Υπάρχουν και άλλες παράμετροι που μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιλογή των ιζημάτων και οι οποίες θα πρέπει να εξετάζονται κατά περίπτωση. Για παράδειγμα, το εύρος του pH των ιζημάτων παίζει σημαντικό ρόλο στη δοκιμή χημικών ουσιών η μετατροπή ή/και ρόφηση των οποίων μπορεί να εξαρτάται από το pH. Η εξάρτηση της ροφήσεως από το pH μπορεί να αντικατοπτρίζεται από την pK_a της ουσίας δοκιμής.

1.8.2.2 Χαρακτηρισμός δειγμάτων νερού — ιζήματος

Στον πίνακα που ακολουθεί, παρατίθενται καίριες παράμετροι που πρέπει να μετρούνται και να αναφέρονται (σχετικώς με τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο) τόσο για το νερό, όσο και για το ίζημα, καθώς και το στάδιο της δοκιμής κατά το οποίο πρέπει οι παράμετροι αυτοί να προσδιορίζονται. Μέθοδοι προσδιορισμού των εν λόγω παραμέτρων μπορεί κανείς να βρεί στις βιβλιογραφικές αναφορές (18)(19)(20)(21).

Επιπροσθέτως, μπορεί κατά περίπτωση να είναι απαραίτητη η μέτρηση και αναφορά και άλλων παραμέτρων (π.χ. για γλυκά ύδατα: σωματίδια, αλκαλικότητα, σκληρότητα, αγωγιμότητα, NO_3/PO_4 (λόγος συγκεντρώσεων και επιμέρους τιμές) για ιζήματα: κατιοανταλλακτική ικανότητα, ικανότητα κατακράτησης ύδατος, ανθρακικά, ολικό άζωτο και φωσφόρος και για θαλάσσια συστήματα: αλατότητα). Η ανάλυση ιζημάτων και υδάτων για νιτρικά, θειϊκά, βιοδιαθέσιμο σίδηρο και πιθανώς και άλλους υποδοχείς ηλεκτρονίων, μπορεί να αποδειχθεί επίσης χρήσιμη, στον προσδιορισμό οξειδοαναγωγικών συνθηκών, ιδιαιτέρως όσον αφορά την αναερόβια μετατροπή.

(1) [Άργιλος + ιλύς] είναι το ανόργανο κλάσμα του ιζήματος με μέγεθος σωματιδίων μικρότερο από 50 μm.

▼B

Μέτρηση παραμέτρων για το χαρακτηρισμό.δειγμάτων νερού-ιζήματος (7)(22)(23)

Παράμετρος	Στάδιο διαδικασίας δοκιμής					
	Τόπος δειγματοληψίας	Χειρισμός μετά τη δειγματοληψία	Ι Έναρξη έγκλιματισμού	Έναρξη της δοκιμής	Κατά τη διάρκεια της δοκιμής	Τέλος δοκιμής
Ύδωρ						
Πηγή/προέλευση	x					
Θερμοκρασία	x					
PH	x		x	x	x	x
TOC			x	x		x
Συγκέντρωση 0_2*	x		x	x	x	x
Δυναμικό οξειδοαναγωγής*			x	x	x	x
Τζημα						
Πηγή/προέλευση	x					
Βάθος στιβάδας	x					
PH		x	x	x	x	x
Κατανομή μεγέθους σωματιδίων		x				
TOC		x	x	x		x
Μικροβιακή Ι βιομάζα (*)		x		x		x
Δυναμικό οξειδοαναγωγής (**)	Παρατήρηση (χρώμα/οσμή)		x	x	x	x

(*) Από πρόσφατα αποτελέσματα ερευνών προέκυψε ότι οι τιμές των μετρήσεων συγκεντρώσεως οξυγόνου στο νερό και των δυναμικών οξειδοαναγωγής δεν έχουν ούτε μηχανιστική ούτε προβλεπτική αξία όσον αφορά την αύξηση και ανάπτυξη μικροβιακών πληθυσμών σε επιφανειακά ύδατα. (24)(25). Ο προσδιορισμός του βιοχημικώς απαιτουμένου οξυγόνου (BOD, κατά τη δειγματοληψία, την έναρξη και τη λήξη της δοκιμής) και των συγκεντρώσεων μικρο/μακρο θρεπτικών στοιχείων Ca, Mg και Mn (κατά την έναρξη και τη λήξη της δοκιμής) στο νερό και η μέτρηση του συνολικού N και συνολικού P στα ιζήματα (κατά τη δειγματοληψία και τη λήξη της δοκιμής) μπορεί να αποτελούν καλύτερα εργαλεία ερμηνείας και αξιολογήσεως της ταχύτητας και των οδών της αεροβίου βιομετατροπής.

(**) Μέθοδος ταχύτητας μικροβιακής αναπνοής (26), μέθοδος καπνισμού (27) ή μετρήσεις αποικιών σε τρυβλίο (π.χ. βακτήρια, ακτινομήκυτες, μήκυτες και συνολικές αποικίες) για αερόβιες μελέτες ταχύτητα μεθανογενέσεως για αναερόβιες μελέτες.

1.8.3 **Συλλογή, χειρισμός και αποθήκευση**

1.8.3.1 *Συλλογή*

Για τη δειγματοληψία ιζημάτων θα πρέπει να χρησιμοποιείται το σχέδιο της κατευθυντήριας οδηγίας ISO για τη δειγματοληψία ιζημάτων του πυθμένα (8). Τα δείγματα ιζήματος θα πρέπει να λαμβάνονται από την όλη πάχους 5-10 cm άνω ιζηματική στιβάδα. Εκτός του ιζήματος, από την ίδια τοποθεσία ή σημείο και κατά τον ίδιο χρόνο θα πρέπει να συλλέγονται δείγματα του σχετικού με το ίζημα ύδατος. Για την αναερόβια μελέτη, η δειγματοληψία και η μεταφορά των ιζημάτων και αντιστοίχων υδάτων πρέπει να γίνεται απουσία οξυγόνου (28)(βλέπε παράγραφο 1.8.2.1). Στη βιβλιογραφία περιγράφονται μερικές συσκευές δειγματοληψίας (8)(23).

▼B

1.8.3.2 *Χειρισμός*

Το ίζημα διαχωρίζεται με διήθηση από τα ύδατα και διέρχεται σε υγρή κατάσταση από κόσκινο 2 mm με τη βοήθεια περίσσειας ύδατος της αντιστοίχου τοποθεσίας, το οποίο στη συνέχεια απορρίπτεται. Εν συνεχεία αναμιγνύονται γνωστές ποσότητες ιζήματος και ύδατος στην επιθυμητή αναλογία (βλ. παράγραφο 1.9.1) σε φιάλες επωάσεως και προετοιμάζονται για την περίοδο εγκλιματισμού (βλ. παράγραφο 1.8.4). Στην περίπτωση της αναεροβίου μελέτης, όλα τα στάδια του χειρισμού πρέπει να διεξάγονται απουσία οξυγόνου (29)(30)(31)(32)(33).

1.8.3.3 *Αποθήκευση*

Συνιστάται έντονα η χρήση δειγμάτων ιζήματος και ύδατος που έχουν συλλεγεί πρόσφατα, αν ωστόσο είναι απαραίτητη η αποθήκευση, τότε ίζημα και νερό θα πρέπει να διέρχονται από κόσκινο ως περιγράφεται ανωτέρω και να αποθηκεύονται μαζί, υπό κατάκλυση με νερό (υδατική στιβάδα πάχους 6-10 cm), στο σκοτάδι, στους 4 ± 2 ^{o}C[4] για χρονικό διάστημα το πολύ μέχρι 4 εβδομάδες (7)(8)(23). Τα δείγματα που θα χρησιμοποιηθούν για αερόβια μελέτη θα πρέπει να αποθηκεύονται έτσι ώστε να επιτρέπεται η ελεύθερη δίοδος του αέρα (π.χ. σε ανοιχτούς περιέκτες), ενώ τα αντίστοιχα δείγματα που θα χρησιμοποιηθούν για αναερόβια μελέτη, πρέπει να αποθηκεύονται απουσία οξυγόνου. Κατά τη διάρκεια της μεταφοράς και αποθηκεύσεως των δειγμάτων, δεν πρέπει τα δείγματα ιζήματος και νερού να καταψύχονται και το ίζημα να ξηραίνεται.

1.8.4 **Προετοιμασία των δειγμάτων ιζήματος/ύδατος για τη δοκιμή**

Πριν από την προσθήκη της ουσίας δοκιμής, πρέπει να προηγείται μια περίοδος εγκλιματισμού, όπου κάθε δείγμα ιζήματος/ύδατος τοποθετείται στο δοχείο επωάσεως που θα χρησιμοποιηθεί στην κυρίως δοκιμή και ο εγκλιματισμός πραγματοποιείται υπό τις ίδιες ακριβώς συνθήκες όπως και στην επώαση (βλ. παράγραφο 1.9.1). Η περίοδος εγκλιματισμού είναι ο χρόνος που απαιτείται για την επίτευξη λογικής σταθερότητας στο σύστημα, όσον αφορά το pH, τη συγκέντρωση οξυγόνου στο νερό, το δυναμικό οξειδοαναγωγής του ύδατος και του ιζήματος και το μακροσκοπικό διαχωρισμό των φάσεων. Η περίοδος εγκλιματισμού διαρκεί κανονικά από μια έως δύο εβδομάδες και δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τις τέσσερις εβδομάδες. Αποτελέσματα προσδιορισμών που διεξήχθησαν κατά τη διάρκεια της εν λόγω περιόδου πρέπει να αναφέρονται.

1.9 ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.9.1 **Συνθήκες δοκιμής**

Η δοκιμή θα πρέπει να εκτελείται στη συσκευή επωάσεως (βλ παράγραφο 1.8.1) με λόγο όγκων ύδατος/ιζήματος μεταξύ 3:1 και 4:1 και πάχος στιβάδας ιζήματος 2,5 cm (± ± 0,5 cm) ([1]) Η ελάχιστη ποσότητα ιζήματος (σε ξηρή κατάσταση) που συνιστάται για κάθε δοχείο επωάσεως είναι τα 50 γρ.

Η δοκιμή θα πρέπει να διεξάγεται στο σκοτάδι υπό σταθερή θερμοκρασία στην περιοχή από 10 έως 30 ^{o}C. Ενδείκνυται θερμοκρασία της τάξεως των (20 ± 2) ^{o}C. Εφόσον κριθεί σκόπιμο, μπορεί να εξεταστεί κατά περίπτωση και μια πρόσθετη χαμηλότερη θερμοκρασία (π.χ. 10 C), ανάλογα με τις πληροφορίες που απαιτούνται από τη δοκιμή. Η θερμοκρασία επωάσεως θα πρέπει να παρακολουθείται και να αναφέρεται στην έκθεση.

([1]) Από πρόσφατες μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η αποθήκευση στους 4 ^{o}C μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα του ιζήματος, με πιθανή συνέπεια ελάττωση της μικροβιακής δράσεως (34).

▼B

1.9.2 **Επεξεργασία και εφαρμογή της ουσίας δοκιμής**

Χρησιμοποιείται μία συγκέντρωση δοκιμής της χημικής ουσίας ([1]). Για χημικές ουσίες προστασίας καλλιεργειών που χρησιμοποιούνται απ' ευθείας σε υδάτινα περιβάλλοντα, ως μέγιστο ποσοστό εφαρμογής θα πρέπει να λαμβάνεται η μέγιστη δόση που αναφέρεται στην ετικέτα, υπολογιζόμενο βάσει του εμβαδού της επιφανείας του ύδατος στο δοχείο δοκιμής. Σε όλες τις υπόλοιπες περιπτώσεις, η προς χρήση συγκέντρωση θα πρέπει να βασίζεται σε προβλέψεις από περιβαλλοντικές εκπομπές. Πρέπει επίσης να λαμβάνεται μέριμνα, ώστε να διασφαλίζεται η εφαρμογή μιας ενδεδειγμένης συγκέντρωσης της ουσίας δοκιμής, που να χαρακτηρίζει την οδό μετατροπής και τον σχηματισμό και αποσύνθεση των προϊόντων μετατροπής. Μπορεί να είναι αναγκαία η χρήση μεγαλυτέρων δόσεων (π.χ. 10 φορές) σε περιπτώσεις όπου οι συγκεντρώσεις της ουσίας δοκιμής είναι πολύ κοντά στα όρια ανιχνεύσεως κατά την έναρξη της μελέτης ή/και όπου βασικά προϊόντα μετατροπής δεν μπορούν να ανιχνευθούν εύκολα όταν είναι παρόντα σε ποσοστό 10 % του ποσοστού εφαρμογής της ουσίας δοκιμής. Ωστόσο αν χρησιμοποιηθούν υψηλότερες συγκεντρώσεις δοκιμής, αυτό δεν θα πρέπει να επιδρά αρνητικά στη μικροβιακή δραστικότητα του συστήματος νερό-ίζημα. Για να επιτευχθεί σταθερή συγκέντρωση της ουσίας δοκιμής σε δοχεία με διαφορετικές διαστάσεις, μπορεί να κριθεί σκόπιμη κάποια προσαρμογή της ποσότητας της εφαρμοζόμενης ουσίας, με βάση το βάθος της υδάτινης στήλης στο δοχείο σε σχέση με το βάθος του ύδατος στην τοποθεσία δειγματοληψίας (που υποτίθεται ότι είναι 100 cm, μπορούν όμως να χρησιμοποιηθούν και άλλα βάθη). Για ένα παράδειγμα υπολογισμού, βλ. παράρτημα 4.

Θεωρητικώς, η ουσία δοκιμής θα πρέπει να εφαρμόζεται ως υδατικό διάλυμα στην υδατική φάση του συστήματος δοκιμής. Αν δεν μπορεί να γίνει διαφορετικά, επιτρέπεται η χρήση μικρή ποσοτήτων αναμίξιμων με το νερό διαλυτών (όπως ακετόνη, αιθανόλη) για την εφαρμογή και κατανομή της ουσίας δοκιμής, δεν πρέπει όμως να υπερβαίνουν το 1 % κ.ο. ενώ δεν πρέπει να έχουν αρνητικές επιπτώσεις στη μικροβιακή δραστικότητα του συστήματος δοκιμής. Πρέπει να δίδεται ιδιαίτερη προσοχή στη δημιουργία του υδατικού διαλύματος της ουσίας δοκιμής — για τη διασφάλιση πλήρους ομοιογένειας, μπορεί να είναι σκόπιμη η χρήση στηλών παραγωγής και προανάμειξη. Μετά την προσθήκη του υδατικού διαλύματος στο σύστημα δοκιμής, συνιστάται ήπια ανάδευση της υδατικής φάσεως, με την ελάχιστη δυνατή ανατάραξη του ιζήματος.

Η χρήση τυποποιημένων προϊόντων δεν συνιστάται συνήθως καθώς τα συστατικά του παρασκευάσματος μπορεί να επηρεάζουν την κατανομή της ουσίας δοκιμής ή/και των προϊόντων μετατροπής μεταξύ υδατικής και ιζηματικής φάσεως. Ωστόσο, για ουσίες δοκιμής με μικρή διαλυτότητα στο νερό, η χρήση τυποποιημένου υλικού μπορεί να αποτελέσει μια κατάλληλη εναλλακτική λύση.

Ο αριθμός των δοχείων επωάσεως εξαρτάται από τον αριθμό των χρόνων δειγματοληψίας (βλ. παράγραφο 1.9.3). Πρέπει να χρησιμοποιείται ικανός αριθμός συστημάτων δοκιμής, έτσι ώστε για κάθε χρόνο δειγματοληψίας να μπορούν να αναλίσκονται δύο συστήματα δοκιμής. Όπου χρησιμοποιούνται μονάδες ελέγχου του κάθε υδατικού ιζηματικού συστήματος, αυτές δεν θα πρέπει να έχουν κατεργαστεί με την ουσία δοκιμής. Οι μονάδες ελέγχου μπορούν να χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της μικροβιακής βιομάζας του ιζήματος και του συνολικού οργανικού άνθρακα του ύδατος και του ιζήματος κατά τη λήξη της μελέτης. Δύο από τις μονάδες ελέγχου (δηλ. μια μονάδα ελέγχου από κάθε υδατικό ίζημα) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρακολούθηση των απαιτουμένων παραμέτρων στο ίζημα και στο νερό κατά τη διάρκεια της περιόδου εγκλιματισμού (βλ. πίνακα στην παράγραφο 1.8.2.2). Στην περίπτωση όπου η ουσία δοκιμής εφαρμόζεται με τη βοήθεια διαλύτη, πρέπει να περιλαμβάνονται δύο ακόμη μονάδες ελέγχου για την μέτρηση τυχόν δυσμενών επιδράσεων στη μικροβιακή δραστικότητα του συστήματος δοκιμής.

([1]) Η δοκιμή με δεύτερη συγκέντρωση μπορεί να είναι χρήσιμη για χημικές ουσίες που φθάνουν τα επιφανειακά ύδατα μέσω διαφορετικών οδών εισαγωγής, με αποτέλεσμα σημαντικώς διαφορετικές συγκεντρώσεις, εφ' όσον βέβαια η μικρότερη συγκέντρωση μπορεί να αναλυθεί με ικανοποιητική ακρίβεια.

▼B

1.9.3 **Διάρκεια δοκιμής και δειγματοληψία**

Η διάρκεια του πειράματος δεν θα πρέπει κανονικά να υπερβαίνει τις 100 ημέρες (6) και θα πρέπει να συνεχίζεται μέχρις ότου είτε να εξακριβωθεί η πορεία αποικοδομήσεως και ο τρόπος κατανομής ύδατος/ιζήματος, είτε να έχει αναλωθεί λόγω μετατροπής ή/και απομάκρυνσης λόγω πτητικότητας το 90 % της ουσίας δοκιμής. Ο αριθμός των χρόνων δειγματοληψίας πρέπει να είναι τουλάχιστον έξι (συμπεριλαμβανομένου και του χρόνου μηδέν), χρησιμοποιώντας ενδεχομένως για τον καθορισμό του ενδεδειγμένου καθεστώτος δειγματοληψίας και της διάρκειας της δοκιμής μια προαιρετική προκαταρκτική μελέτη (βλ. παράγραφο 1.9.4), εκτός και αν υπάρχουν διαθέσιμα επαρκή δεδομένα από προηγούμενες μελέτες. Για υδρόφοβες ουσίες δοκιμής, μπορεί να χρειάζονται πρόσθετα σημεία δειγματοληψίας κατά τη διάρκεια της αρχικής περιόδου της μελέτης, προκειμένου να προσδιοριστεί ο λόγος κατανομής μεταξύ των φάσεων του νερού και του ιζήματος.

Σε κατάλληλα χρονικά σημεία δειγματοληψίας, ολόκληρα δοχεία επωάσεως (επαναληπτικά) απομακρύνονται προς ανάλυση. Το ίζημα και το υπερκείμενο νερό αναλύονται ξεχωριστά ([1]). Το υπερκείμενο νερό θα πρέπει να απομακρύνεται προσεκτικά, με την ελάχιστη δυνατή ανατάραξη του ιζήματος. Η εκχύλιση και ο χαρακτηρισμός της ουσίας δοκιμής και των προϊόντων μετατροπής πρέπει να γίνονται με κατάλληλες αναλυτικές μεθόδους. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για την απομάκρυνση τυχόν υλικού που μπορεί να έχει προσροφηθεί στο δοχείο επωάσεως ή σε σωληνώσεις διασύνδεσης που χρησιμοποιούνται για την . παγίδευση των πτητικών ουσιών.

1.9.4 **Προαιρετική προκαταρκτική δοκιμή**

Αν από άλλες σχετικές μελέτες δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστεί διάρκεια και καθεστώς δειγματοληψίας για την ουσία δοκιμής, μπορεί να κριθεί σκόπιμη η διεξαγωγή προαιρετικής προκαταρκτικής δοκιμής, η οποία θα πρέπει να διεξάγεται υπό τις ίδιες συνθήκες δοκιμής που προτείνονται για την οριστική μελέτη. Οι σχετικές πειραματικές συνθήκες και τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής δοκιμής, εφόσον γίνει, πρέπει να αναφέρονται εν συντομία στην έκθεση.

1.9.5 **Μετρήσεις και ανάλυση**

Σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας στο νερό και το ίζημα, θα πρέπει να μετριέται και να αναφέρεται στην έκθεση η συγκέντρωση της ουσίας δοκιμής και των προϊόντων μετατροπής (ως συγκέντρωση και ως ποσοστό της εφαρμοζόμενης). Γενικά, προϊόντα μετατροπής που ανιχνεύονται ως ποσοστό άνω του 10 % της εφαρμοζομένης ραδιενέργειας στο σύνολο του συστήματος ύδατος-ιζήματος σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας, θα πρέπει να ταυτοποιούνται, εκτός και αν υπάρχει λογική αιτιολόγηση περί του αντιθέτου. Προϊόντα μετατροπής των οποίων οι συγκεντρώσεις αυξάνονται συνεχώς κατά τη διάρκεια της μελέτης, θα πρέπει και αυτά να λαμβάνονται υπ' όψη για ταυτοποίηση, ακόμη και αν οι συγκεντρώσεις τους δεν υπερβαίνουν τα ανωτέρω δοθέντα όρια, καθώς αυτό μπορεί να δείχνει την ύπαρξη ανθεκτικότητας. Τα θέματα αυτά πρέπει να εξετάζονται κατά περίπτωση και στην έκθεση να καταγράφονται οι αντίστοιχες αιτιολογίες.

Για κάθε χρόνο δειγματοληψίας, θα πρέπει να αναφέρονται τα αποτελέσματα από τα συστήματα παγιδεύσεως αερίων/πτητικών ενώσεων ($C0_2$ και άλλα, δηλ. πτητικές οργανικές ενώσεις). Επίσης, θα πρέπει να αναφέρονται και τα ποσοστά ανοργανοποίησης. Τέλος, θα πρέπει να αναφέρονται για κάθε σημείο δειγματοληψίας τα μη εκχυλίσιμα (δεσμευμένα) υπολείμματα στο ίζημα.

([1]) Στις περιπτώσεις όπου μπορεί να συμβεί γρήγορη επανοξείδωση των προϊόντων αναεροβίου μετατροπής, οι αναερόβιες συνθήκες πρέπει να διατηρούνται κατά τη διάρκεια του δειγματοληψίας και της αναλύσεως.

▼B

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας, πρέπει να υπολογίζεται το συνολικό ισοζύγιο μάζας ή ανάκτηση (βλ. παράγραφος 1.7.1) της προστεθείσας ραδιενέργειας. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να αναφέρονται ως ποσοστό της προστεθείσας ραδιενέργειας. Για κάθε χρόνο δειγματοληψίας, θα πρέπει επίσης να αναφέρεται η κατανομή της ραδιενέργειας μεταξύ νερού και ιζήματος ως συγκεντρώσεις και ποσοστά.

Πρέπει να υπολογίζονται ο χρόνος ημιζωής, ο DT_{50} και, αν χρειάζεται, οι DT_{75} και DT_{90} της ουσίας δοκιμής, μαζί με τα όρια εμπιστοσύνης τους (βλ. παράγραφος 1.7.3). Πληροφορίες για την ταχύτητα ανάλωσης της ουσίας δοκιμής στο νερό και το ίζημα μπορούν να ληφθούν με τη χρήση καταλλήλων εργαλείων εκτίμησης. Σε αυτά περιλαμβάνονται η εφαρμογή κινητικής αντιδράσεως ψευδο-πρώτης τάξεως, εμπειρικές τεχνικές προσαρμογής καμπυλών, στις οποίες χρησιμοποιούνται γραφικές ή αριθμητικές λύσεις καθώς και περισσότερο περίπλοκες εκτιμήσεις που χρησιμοποιούν, για παράδειγμα, μοντέλα απλού ή πολλαπλών χώρων (compartment). Περισσότερες λεπτομέρειες μπορεί κανείς να βρεί στην αντίστοιχη δημοσιευμένη βιβλιογραφία (35)(36)(37).

Όλες οι προσεγγίσεις έχουν τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά τους και διαφέρουν σημαντικά από πλευράς πολυπλοκότητας. Η υπόθεση της κινητικής πρώτης τάξεως μπορεί να θεωρηθεί ως υπεραπλούστευση των διαδικασιών αποικοδομήσεως και κατανομής, όμως όπου είναι δυνατή παρέχει έναν όρο (τη σταθερά ταχύτητας ή τον χρόνο ημιζωής), ο οποίος είναι εύκολα κατανοητός και με ιδιαίτερη αξία σε μοντέλα προσομοιώσεως και σε υπολογισμούς προβλεπομένων περιβαλλοντικών συγκεντρώσεων. Οι εμπειρικές προσεγγίσεις ή οι γραμμικοί μετασχηματισμοί μπορεί να οδηγήσουν σε καλύτερα αποτελέσματα από πλευράς προσαρμογής των καμπυλών στα δεδομένα και, κατά συνέπεια, δίνουν μια καλύτερη εκτίμηση του χρόνου ημιζωής, του DT_{50} και, αν χρειάζεται, των DT_{75} και DT_{90}. Η χρήση των παραγώγων σταθερών είναι, ωστόσο, περιορισμένη. Τα μοντέλα χώρου (compartment models) μπορούν να δημιουργήσουν μια σειρά από χρήσιμες σταθερές, σημαντικές στην αξιολόγηση του κινδύνου, που περιγράφουν την ταχύτητα αποικοδομήσεως στους διάφορους χώρους και την κατανομή της χημικής ουσίας. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση σταθερών ταχύτητας σχηματισμού και αποικοδομήσεως κυρίων προϊόντων μετατροπής. Σε όλες τις περιπτώσεις, η επιλεγόμενη μέθοδος πρέπει να αιτιολογείται και ο ερευνητής πρέπει να αποδεικνύει γραφικώς ή/και στατιστικώς την καταλληλότητα της προσαρμογής.

3. **ΑΝΑΦΟΡΑ**

3.1 ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Ουσία δοκιμής:

— συνήθης ονομασία, χημική ονομασία, αριθμός CAS, συντακτικός τύπος (με υπόδειξη της θέσεως του ή των ιχνηθετών, όταν χρησιμοποιείται ραδιοεπισημασμένο υλικό) και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες

— καθαρότητα (προσμείξεις) της ουσίας δοκιμής

— ραδιοχημική καθαρότητα της επισημασμένης χημικής ουσίας και μοριακή ενεργότητα (όπου αυτό κρίνεται απαραίτητο).

▼B

Ουσίες αναφοράς:

— χημική ονομασία και δομή των ουσιών αναφοράς που χρησιμοποιούνται για το χαρακτηρισμό ή/και την ταυτοποίηση των προϊόντων μετατροπής

Δοκιμή ιζημάτων και υδάτων:

— θέση και περιγραφή της ή των τόπων δειγματοληψίας του υδατικού ιζήματος συμπεριλαμβανομένου, αν αυτό είναι δυνατό, και του ιστορικού τυχόν μολύνσεως·

— όλες οι πληροφορίες που σχετίζονται με τη συλλογή, αποθήκευση (αν χρειάστηκε) και εγκλιματισμό των συστημάτων ύδατος-ιζήματος·

— χαρακτηριστικά των δειγμάτων ύδατος-ιζήματος, όπως καθορίζονται στον πίνακα στην παράγραφο 1.8.2.2.

Συνθήκες δοκιμής:

— χρησιμοποιηθέν σύστημα δοκιμής (π.χ. διελεύσεως ροής, βιόμετρο, τρόπος αερισμού, μέθοδος αναδεύσεως, όγκος νερού,. μάζα ιζήματος, πάχος στιβάδας ύδατος και ιζήματος, διαστάσεις δοχείων δοκιμής κλπ.)

— εφαρμογή της ουσίας δοκιμής στο σύστημα δοκιμής: χρησιμοποιηθείσα συγκέντρωση δοκιμής, αριθμός επαναληπτικών δειγμάτων και μαρτύρων, τρόπος εφαρμογής της ουσίας δοκιμής (π.χ. τυχόν χρήση διαλύτη), κλπ.

— θερμοκρασία επωάσεως·

— χρόνοι δειγματοληψίας·

— μέθοδοι εκχυλίσεως και αποδόσεις, αναλυτικές μέθοδοι και όρια ανιχνεύσεως·

— μέθοδοι χαρακτηρισμού/ταυτοποιήσεως των προϊόντων μετατροπής·

— αποκλίσεις από το πρωτόκολλο ή τις συνθήκες δοκιμής κατά τη διάρκεια της μελέτης.

Αποτελέσματα:

— ανεπεξέργαστα αριθμητικά δεδομένα αντιπροσωπευτικών αναλύσεων (όλα τα ανεπεξέργαστα δεδομένα πρέπει να φυλάσσονται στο αρχείο ΟΕΠ)

— επαναληψιμότητα και ευαισθησία των χρησιμοποιούμενων αναλυτικών μεθόδων·

— Ποσοστά ανακτήσεως (% τιμές για μια έγκυρη μελέτη δίνονται στην παράγραφο 1.7.1)·

— πίνακες αποτελεσμάτων εκφραζομένων ως ποσοστό % της εφαρμοζόμενης δόσεως και σε $mg.kg^{-1}$ σε νερό, ίζημα και συνολικό σύστημα (μόνο %) για την ουσία δοκιμής και, αν κρίνεται απαραίτητο, για τα προϊόντα μετατροπής και τη μη εκχυλισθείσα ραδιενέργεια.·

— ισοζύγιο μάζας κατά τη διάρκεια και κατά τη λήξη των μελετών·

— γραφική αναπαράσταση της μετατροπής στα κλάσματα ύδατος και ιζήματος και στο όλο σύστημα (συμπεριλαμβανομένης και της ανοργανοποιήσεως)·

— Ποσοστά ανοργανοποιήσεως·

▼B

— χρόνος ημιζωής, DT_{50} και, αν είναι απαραίτητο, DT_{75} και DT_{90} για την ουσία δοκιμής και, όπου είναι απαραίτητο, για κύρια προϊόντα μετασχηματισμού, συμπεριλαμβανομένων και των ορίων εμπιστοσύνης στο νερό, ίζημα και σε όλο το σύστημα·

— εκτίμηση της κινητικής μετατροπής της ουσίας δοκιμής και, όπου είναι απαραίτητο, των κυρίων προϊόντων μετατροπής·

— προτιμώμενη οδός μετατροπής, όπου κρίνεται απαραίτητο·

— συζήτηση των αποτελεσμάτων.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.

(2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2..1 (a). The Netherlands.

(3) MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. United-Kingdom.

(4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) — Anaerobic and aerobic. Canada, pp 35-37.

(5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.

(6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.

(7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality — Sampling — Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.

(9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.

(10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).

(11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

(12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

(13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

(14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC — Pests and Diseases, 3B-4, 149-158.

▼B

(15) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds.), Vol. 1, 85-114. J. Wiley & Sons.

(16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16, 631-637.

(17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ^{14}C-labelled model surfactants. Water Research 21, 661-667.

(18) Black, C.A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.

(19) APHA (1989). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17th edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.

(20) Rowell, D.L. (1994). Soil Science Methods and Applications. Longman.

(21) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, 1038-1039.

(22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop «A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests», 3-4 July 1991.

(23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8-10 November 1993. Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.

(24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 31, 2858-2868.

(25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol, 329-338.

(26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under *in-situ* conditions. Soil Biol. Biochem. 17, 197-203.

(27) ISO-14240-2. (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

(28) Beelen, P. Van and F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. Hydrobiol. Bull. 24 (1), 13-21.

(29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, 850-857.

(30) Birch, R.R., Biver, C, Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, WJ. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527-1550.

(31) Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. Chemoshpere 27, 1499-1509.

▼B

(32) Nuck, B.A. and Federle, T.W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of ^{14}C-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. Environ. Sci. Technol. 30, 3597-3603.

(33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.

(34) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. Bulletin Environ. Contam. Toxicol. 58, 961-968.

(35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer, 39, 187 — 203.

(36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic ″representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer, 33, 47 — 60.

(37) Carlton, R.R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference — Pest and Diseases, pp 1349-1354:

▼B

Παραρτημα 1

ΚΑΤΕΥΘΥΝΤΗΡΙΑ ΟΔΗΓΙΑ ΓΙΑ ΤΑ ΑΕΡΟΒΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

Αερόβιο σύστημα δοκιμής

Το αερόβιο σύστημα δοκιμής που περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο αποτελείται από μια αερόβια στιβάδα ύδατος (συνήθης συγκεντρώσεις οξυγόνου από 7 έως 10 $mg.l^{-1}$) και στιβάδα ιζήματος, αερόβια στην επιφάνεια και αναερόβια κάτω από την επιφάνεια (σύνηθες μέσο δυναμικό οξειδοαναγωγής (E_h) στην αναερόβια ζώνη του ιζήματος από - 80 έως - 190 mV). Υγρός αέρας διέρχεται πάνω από την επιφάνεια του νερού σε κάθε μονάδα επωάσεως για να διατηρηθεί επαρκής ποσότητα οξυγόνου στον υπερκείμενο χώρο.

Αναερόβιο σύστημα δοκιμής

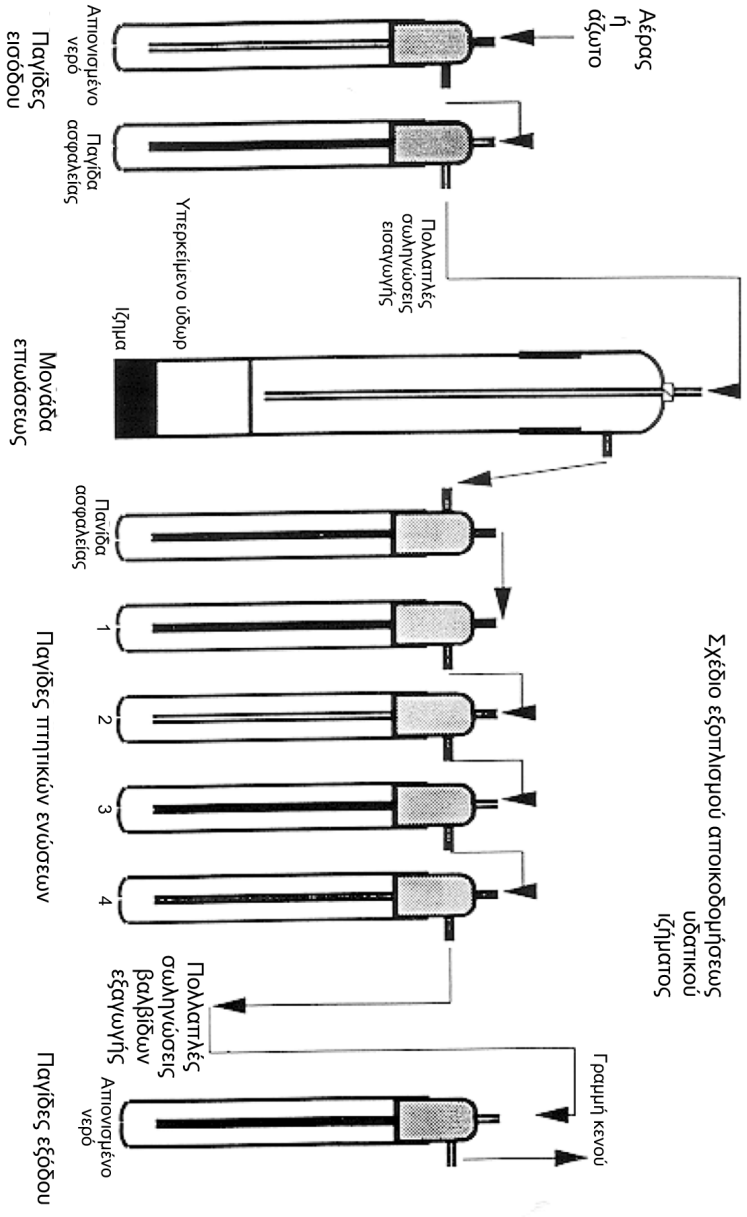
Για το αναερόβιο σύστημα δοκιμής η διαδικασία δοκιμής είναι ουσιαστικώς η ίδια με την περιγραφείσα στο αερόβιο σύστημα, εκτός του ότι πάνω από την επιφάνεια του νερού διοχετεύεται ένυγρο αέριο άζωτο, σε κάθε μονάδα επωάσεως, ώστε να διατηρείται υπερκείμενος χώρος πλήρης αζώτου. Το ίζημα και το νερό θεωρούνται ως αναερόβια εφόσον το δυναμικό οξειδοαναγωγής (E_h) είναι μικρότερο από -100 mV.

Στην αναερόβια δοκιμή, η εκτίμηση της ανοργανοποιήσεως συμπεριλαμβάνει και μέτρηση του εκλυόμενου διοξειδίου του άνθρακα και μεθανίου.

▼B

Παραρτημα 2

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΔΙΑΤΑΞΕΩΣ ΔΙΕΔΕΥΣΕΩΣ ΡΟΗΣ

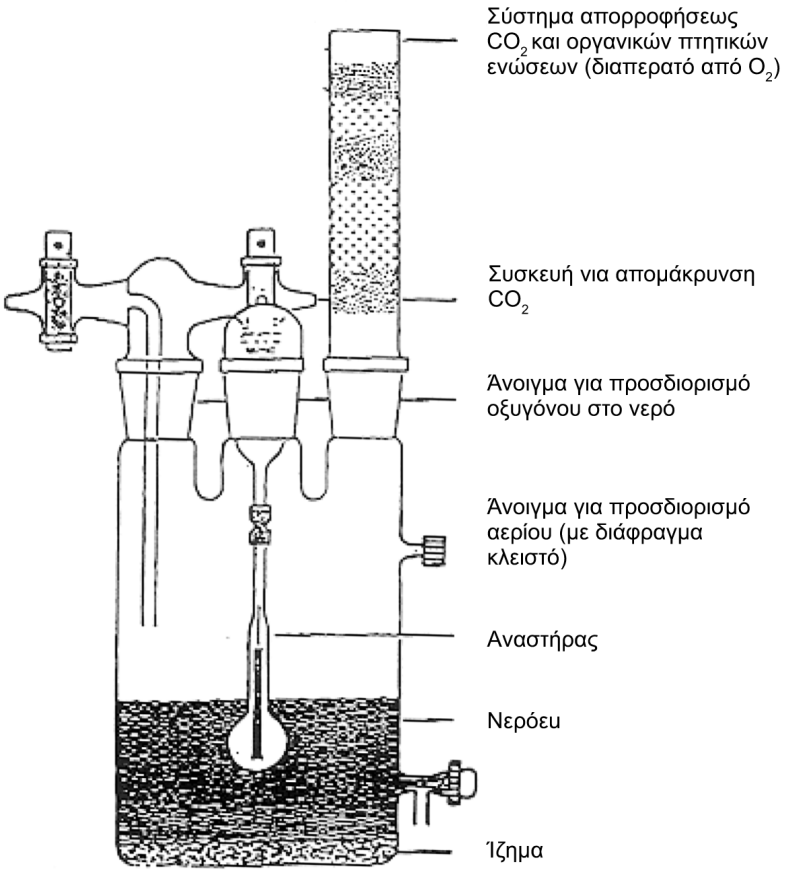


Παγίδα ασφαλείας άδεια
Παγίδα 1:
αιθυλενογλυκόλη για την παγίδευση πτητικών οργανικών ενώσεων
Παγίδα 2:
θειικό οξύ 0.1 M για την παγίδευση αλκαλικών πτητικών ενώσεων
Παγίδες 3 & 4:
υδροξείδιο του νατρίου 2M για την παγίδευση CO_2 και άλλων όξινων πτητικών ενώσεων

▼B

Παραρτημα 3

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΔΙΑΤΑΞΕΩΣ ΒΙΟΜΕΤΡΟΥ



▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ ΔΟΣΕΩΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΣΕ ΔΟΧΕΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

Εσωτερική διάμετρος κυλίνδρου:	= 8 cm
Βάθος στήλης ύδατος μη περιλαμβανομένου του ιζήματος:	= 12 cm
Εμβαδόν επιφανείας: $3,142 \times 4^2$	= 50,3 cm^2
Ποσοστό εφαρμογής: 500 g ουσίας δοκιμής/ha αντιστοιχεί σε 5 μg/cm^2	
Σύνολο μg: $5 \times 50,3$	= 251,5 μg
Ρύθμιση ποσότητας σύμφωνα με βάθος 100 cm: $12 \times 251,5 \div 100$	= 30,18 μg
Όγκος στήλης ύδατος: $50,3 \times 12$	= 603 ml
Συγκέντρωση στο νερό: $30,18 \div 603$	= 0,050 μg/ml ή 50 μg/l

▼M1

Γ.25. ΑΕΡΟΒΙΑ ΑΝΟΡΓΑΝΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΑ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΑ ΥΔΑΤΑ — ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΤΙΚΗ ΔΟΚΙΜΗ ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή TG 309 (2004) του ΟΟΣΑ (1)

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα δοκιμή αποσκοπεί στον προσδιορισμό της χρονικής πορείας της βιοαποικοδόμησης ελεγχόμενης ουσίας σε χαμηλή συγκέντρωση σε αερόβια φυσικά ύδατα και στην ποσοτικοποίηση των παρατηρήσεων υπό μορφή εκφράσεων κινητικής. Η προσομοιωτική αυτή δοκιμή είναι μια εργαστηριακή δοκιμή διαλείποντος έργου (ασυνεχής), με ανακινούμενες φιάλες, η οποία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ταχύτητας της αερόβιας αποικοδόμησης οργανικών ουσιών σε δείγματα φυσικών επιφανειακών υδάτων (γλυκά, υφάλμυρα ή θαλάσσια). Βασίζεται στο πρότυπο ISO/DIS 14592-1 (2) και περιλαμβάνει επίσης στοιχεία από τις μεθόδους δοκιμής Γ.23 και Γ.24 (3)(4). Σε περίπτωση δοκιμής μεγάλης διάρκειας, η διαδικασία διαλείποντος έργου μπορεί να αντικατασταθεί από ημισυνεχή διαδικασία, ώστε να αποφευχθεί η αλλοίωση του μικροκόσμου της δοκιμής. Ο κύριος στόχος της προσομοιωτικής δοκιμής είναι ο προσδιορισμός της ανοργανοποίησης της ελεγχόμενης ουσίας στα επιφανειακά ύδατα, η δε ανοργανοποίηση χρησιμεύει ως βάση για την έκφραση της κινητικής της αποικοδόμησης. Η δοκιμή αυτή έχει ωστόσο και έναν δεύτερο, προαιρετικό στόχο, ο οποίος συνίσταται στην άντληση πληροφοριών σχετικά με την πρωταρχική αποικοδόμηση και τον σχηματισμό σημαντικών προϊόντων μετατροπής. Η ταυτοποίηση των προϊόντων μετατροπής και, εφόσον είναι δυνατόν, ο ποσοτικός προσδιορισμός των συγκεντρώσεών τους έχουν ιδιαίτερη σημασία για τις ουσίες πολύ βραδείας ανοργανοποίησης (π.χ. με χρόνο υποδιπλασιασμού του ολικού υπολειμματικού ^{14}C μεγαλύτερο των 60 ημερών). Λόγω αναλυτικών περιορισμών, για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των σημαντικών προϊόντων μετατροπής απαιτούνται συνήθως υψηλότερες συγκεντρώσεις ελεγχόμενης ουσίας (π.χ. > 100 μg/l).

Ως χαμηλή συγκέντρωση, στη συγκεκριμένη δοκιμή, νοείται μια συγκέντρωση αρκούντως χαμηλή (π.χ. μικρότερη από 1 μg/l έως 100 μg/l), ώστε να εξασφαλίζεται ότι η κινητική βιοαποικοδόμησης που θα προκύψει από τη δοκιμή θα αντικατοπτρίζει την κινητική που αναμένεται να παρατηρηθεί στο περιβάλλον. Σε σύγκριση με τη συνολική μάζα των βιοαποικοδομήσιμων ανθρακούχων υποστρωμάτων που υπάρχουν στο χρησιμοποιούμενο για τη δοκιμή φυσικό νερό, η ελεγχόμενη ουσία σε χαμηλή συγκέντρωση θα χρησιμεύσει ως δευτερεύον υπόστρωμα. Αυτό προϋποθέτει ότι η προβλεπόμενη κινητική βιοαποικοδόμησης είναι πρώτης τάξεως («μη αυξητική» κινητική) και ότι η ελεγχόμενη ουσία μπορεί να αποικοδομηθεί με «συμμεταβολισμό». Η κινητική πρώτης τάξεως υποδηλώνει ότι η ταχύτητα αποικοδόμησης (mg/L/ημέρα) είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος, η οποία ελαττώνεται με την πάροδο του χρόνου. Στις πραγματικές αντιδράσεις πρώτης τάξεως, η ειδική σταθερά ταχύτητας αποικοδόμησης, k, δεν εξαρτάται από τον χρόνο και τη συγκέντρωση. Η σταθερά k, δηλαδή, δεν παρουσιάζει σημαντική διακύμανση στη διάρκεια ενός πειράματος και δεν μεταβάλλεται με την αύξηση της συγκέντρωσης μεταξύ των πειραμάτων. Εξ ορισμού, η ειδική σταθερά ταχύτητας αποικοδόμησης ισούται προς τη σχετική μεταβολή της συγκέντρωσης ανά μονάδα χρόνου: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Αν και υπό τις οριζόμενες συνθήκες αναμένεται κανονικά κινητική πρώτης τάξεως, ενδέχεται να υπάρξουν περιστάσεις υπό τις οποίες είναι καταλληλότερη μια κινητική άλλης τάξεως. Παρεκκλίσεις από την κινητική πρώτης τάξεως μπορούν να παρατηρηθούν, επί παραδείγματι, σε περίπτωση που φαινόμενα μεταφοράς μάζας, όπως η ταχύτητα διάχυσης και όχι η ταχύτητα βιολογικής αντίδρασης, ελαττώνουν την ταχύτητα βιομετατροπής. Ωστόσο, σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις, τα δεδομένα είναι δυνατόν να περιγραφούν με κινητική ψευδοπρώτης τάξεως με την παραδοχή σταθεράς ταχύτητας εξαρτώμενης από τη συγκέντρωση.

▼M1

Πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμής, είναι σκόπιμο να διατίθενται πληροφορίες σχετικά με τη βιοαποικοδομησιμότητα της ελεγχόμενης ουσίας σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (επί παραδείγματι, από συνήθεις δοκιμές διαλογής — screening tests), καθώς και στοιχεία για την αβιοτική αποικοδομησιμότητα, τα προϊόντα μετατροπής και τις σημαντικές φυσικοχημικές ιδιότητες, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για τον προγραμματισμό του πειράματος και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Η χρήση ελεγχόμενων ουσιών σημασμένων με ^{14}C και ο προσδιορισμός της κατανομής του ^{14}C μεταξύ των φάσεων στο τέλος της δοκιμής επιτρέπουν τον προσδιορισμό της τελικής βιοαποικοδόμησης. Σε περίπτωση χρησιμοποίησης μη σημασμένης ελεγχόμενης ουσίας, για να είναι δυνατή η εκτίμηση της τελικής βιοαποικοδόμησης πρέπει απαραιτήτως να διεξαχθεί η δοκιμή με υψηλότερη συγκέντρωση και να είναι γνωστά όλα τα σημαντικά προϊόντα μετατροπής.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Πρωταρχική βιοαποικοδόμηση: Η μεταβολή της δομής (μετατροπή) χημικής ουσίας που προκαλείται από μικροοργανισμούς, με αποτέλεσμα την απώλεια της χημικής ταυτότητάς της.

Λειτουργική βιοαποικοδόμηση: Η μεταβολή της δομής (μετατροπή) χημικής ουσίας που προκαλείται από μικροοργανισμούς, με αποτέλεσμα την απώλεια συγκεκριμένης ιδιότητας.

Τελική αερόβια βιοαποικοδόμηση: Η διάσπαση χημικής ουσίας από μικροοργανισμούς, παρουσία οξυγόνου, προς διοξείδιο του άνθρακα, νερό και ανόργανα άλατα άλλων τυχόν συνυπαρχόντων στοιχείων (ανοργανοποίηση) και η παραγωγή νέας βιομάζας και οργανικών προϊόντων μικροβιακής βιοσύνθεσης.

Ανοργανοποίηση: Η διάσπαση χημικής ουσίας ή οργανικής ύλης από μικροοργανισμούς, παρουσία οξυγόνου, προς διοξείδιο του άνθρακα, νερό και ανόργανα άλατα άλλων τυχόν συνυπαρχόντων στοιχείων.

Λανθάνουσα φάση: Ο χρόνος που μεσολαβεί από την έναρξη μιας δοκιμής έως ότου προσαρμοστεί ο διασπών μικροοργανισμός και αυξηθεί ο βαθμός βιοαποικοδόμησης χημικής ουσίας ή οργανικής ύλης σε ανιχνεύσιμο επίπεδο (π.χ. 10 % της μέγιστης θεωρητικής βιοαποικοδόμησης ή μικρότερο ποσοστό, ανάλογα με την ακρίβεια της μεθόδου μέτρησης).

Μέγιστο επίπεδο βιοαποικοδόμησης: Ο βαθμός βιοαποικοδόμησης χημικής ουσίας ή οργανικής ύλης σε μια δοκιμή, καταγραφόμενος σε ποσοστό επί τοις εκατό, άνω του οποίου δεν σημειώνεται περαιτέρω βιοαποικοδόμηση στη διάρκεια της δοκιμής.

Πρωταρχικό υπόστρωμα: Σύνολο φυσικών πηγών άνθρακα και ενέργειας που εξασφαλίζουν την ανάπτυξη και διατήρηση της μικροβιακής βιομάζας.

Δευτερεύον υπόστρωμα: Συστατικό υποστρώματος, του οποίου η συγκέντρωση είναι τόσο χαμηλή, ώστε η αποικοδόμησή του να εξασφαλίζει ασήμαντες ποσότητες άνθρακα και ενέργειας για τους σχετικούς μικροοργανισμούς, σε σύγκριση με τον άνθρακα και την ενέργεια που εξασφαλίζονται μέσω της αποικοδόμησης των βασικών συστατικών του υποστρώματος (πρωτεύοντα υποστρώματα).

Σταθερά ταχύτητας αποικοδόμησης: Σταθερά ταχύτητας κινητικής πρώτης τάξεως ή ψευδοπρώτης τάξεως, k (d^{-1}), η οποία δηλώνει την ταχύτητα των διεργασιών αποικοδόμησης. Σε μια δοκιμή διαλείποντος έργου, η σταθερά k υπολογίζεται από το πρώτο τμήμα της καμπύλης αποικοδόμησης μετά το τέλος της λανθάνουσας φάσης.

▼M1

Χρόνος υποδιπλασιασμού, $t_{1/2}$ (d): Όρος που χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό της ταχύτητας μιας αντίδρασης πρώτης τάξεως. Είναι ο χρόνος που απαιτείται για να μειωθεί η συγκέντρωση στο ήμισυ. Η σχέση του χρόνου υποδιπλασιασμού με τη σταθερά ταχύτητας αποικοδόμησης παρίσταται από την εξίσωση $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Ημιπερίοδος αποικοδόμησης, DT_{50} (d): Όρος που χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση του αποτελέσματος των δοκιμών βιοαποικοδόμησης. Είναι ο χρόνος, συμπεριλαμβανομένης της λανθάνουσας φάσης, που απαιτείται για να επιτευχθεί βιοαποικοδόμηση κατά 50 %.

Όριο ανίχνευσης (LOD) και όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ): Το όριο ανίχνευσης (LOD) είναι η συγκέντρωση μιας ουσίας κάτω από την οποία δεν είναι δυνατόν να γίνει διάκριση της ταυτότητας της ουσίας από τις αναλυτικές τεχνητές ενδείξεις. Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) είναι η συγκέντρωση μιας ουσίας κάτω από την δεν είναι δυνατός ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης με αποδεκτή ακρίβεια.

Διαλελυμένος οργανικός άνθρακας (DOC): Το μέρος του οργανικού άνθρακα σε ένα δείγμα νερού που δεν μπορεί να απομακρυνθεί με καθορισμένη τεχνική διαχωρισμού φάσεων, όπως επί παραδείγματι με φυγοκέντριση σε 40 000 ms^{-2} επί 15 min ή με διήθηση μέσω μεμβρανών με πόρους διαμέτρου 0,2 μm-0,45 μm.

Συνολική ραδιενέργεια οργανικού ^{14}C (TOA): Η συνολική ραδιενέργεια ^{14}C που συσχετίζεται με οργανικό άνθρακα.

Ραδιενέργεια διαλελυμένου οργανικού ^{14}C (DOA): Η συνολική ραδιενέργεια ^{14}C που συσχετίζεται με διαλελυμένο οργανικό άνθρακα.

Ραδιενέργεια σωματιδιακού οργανικού ^{14}C (POA): Η συνολική ραδιενέργεια ^{14}C που συσχετίζεται με οργανικό άνθρακα σε σωματίδια.

1.3. ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η παρούσα προσομοιωτική δοκιμή εφαρμόζεται σε μη πτητικές ή ελαφρώς πτητικές οργανικές ουσίες που ελέγχονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Εφόσον χρησιμοποιούνται φιάλες που επικοινωνούν με τον ατμοσφαιρικό αέρα (π.χ. πωματισμένες με βύσμα υαλοβάμβακα), ουσίες με σταθερά του νόμου του Henry μικρότερη από 1 $Pa \cdot m^3/mol$ περίπου (της τάξεως των 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$) μπορούν να θεωρηθούν, στην πράξη, ως μη πτητικές. Χρησιμοποιώντας κλειστές φιάλες με διάκενο, είναι δυνατόν να ελεγχθούν ελαφρώς πτητικές ουσίες (με σταθερά του νόμου του Henry < 100 $Pa \cdot m^3/mol$ ή < 10^{-3} $atm \cdot m^3/mol$), χωρίς να υπάρξουν απώλειες από το σύστημα δοκιμής. Εάν δεν ληφθούν οι απαιτούμενες προφυλάξεις κατά την απομάκρυνση του CO_2 μπορεί να σημειωθεί απώλεια ουσιών σημασμένων με ^{14}C. Σε τέτοιου είδους καταστάσεις, ενδέχεται να χρειαστεί παγίδευση του CO_2 σε έναν εσωτερικό σύστημα απορρόφησης που περιέχει άλκαλι, ή χρησιμοποίηση εξωτερικού συστήματος απορρόφησης του CO_2 (άμεσος προσδιορισμός του $^{14}CO_2$, βλέπε παράρτημα 3). Για τον προσδιορισμό της κινητικής της βιοαποικοδόμησης, οι συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να είναι χαμηλότερες από τη διαλυτότητά της στο νερό. Αξίζει, ωστόσο, να σημειωθεί ότι οι τιμές υδατοδιαλυτότητας που αναφέρονται στη βιβλιογραφία ενδέχεται να είναι αρκετά υψηλότερες από τη διαλυτότητα της ελεγχόμενης ουσίας στο φυσικό νερό. Εναλλακτικά, η διαλυτότητα των ιδιαίτερα δυσδιάλυτων στο νερό ελεγχόμενων ουσιών μπορεί να προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας το φυσικό νερό της δοκιμής.

Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την προσομοίωση της βιοαποικοδόμησης σε επιφανειακά ύδατα απαλλαγμένα αδρομερών σωματιδίων («πελαγική δοκιμή») ή σε θολερά επιφανειακά ύδατα τα οποία ενδέχεται να απαντούν, επί παραδείγματι, κοντά σε διεπαφή νερού/ιζημάτων («δοκιμή με εναιώρημα ιζήματος»).

▼**M1**

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η δοκιμή διεξάγεται με διαδικασία διαλείποντος έργου. Η ελεγχόμενη ουσία επωάζεται είτε μόνο σε επιφανειακά ύδατα («πελαγική δοκιμή») ή σε επιφανειακά ύδατα, στα οποία έχει προστεθεί εναιώρημα στερεών/ιζήματος σε συγκέντρωση από 0,01 έως 1 g/L ξηρού βάρους («δοκιμή με εναιώρημα ιζήματος»), με σκοπό την προσομοίωση υδάτινου όγκου με αιωρούμενα στερεά ή ιζήματα σε επαναιώρηση. Η συγκέντρωση των αιωρούμενων στερεών/ιζημάτων στα περισσότερα επιφανειακά ύδατα αντιστοιχεί στο κατώτερο άκρο της ανωτέρω περιοχής τιμών. Οι δοκιμαστικές φιάλες επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, υπό αερόβιες συνθήκες και ανακίνηση. Για τον προσδιορισμό της κινητικής της αποικοδόμησης πρέπει να χρησιμοποιηθούν δύο τουλάχιστον διαφορετικές συγκεντρώσεις ελεγχόμενης ουσίας, η καθεμία από τις οποίες θα είναι πενταπλάσια έως δεκαπλάσια της προηγούμενης. Οι συγκεντρώσεις αυτές πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικές του εύρους των αναμενόμενων συγκεντρώσεων της ελεγχόμενης ουσίας στο περιβάλλον. Η μέγιστη συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 100 μg/L, προτιμώνται ωστόσο μέγιστες συγκεντρώσεις δοκιμής κάτω των 10 μg/L ή μικρότερες, ώστε να εξασφαλίζεται ότι η κινητική της βιοαποικοδόμησης είναι πρώτης τάξεως. Η χαμηλότερη συγκέντρωση δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 10 μg/L, αλλά είναι προτιμότερο οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις να είναι της τάξεως των 1-2 μg/L ή μικρότερες από 1 μg/L. Κατά κανόνα, επαρκής ανάλυση τόσο χαμηλών συγκεντρώσεων μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση διαθέσιμων στο εμπόριο ουσιών σημασμένων με ^{14}C. Λόγω αναλυτικών περιορισμών, είναι συχνά αδύνατο να μετρηθεί η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας με την απαιτούμενη ακρίβεια, όταν η ουσία αυτή χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση ≤ 100 μg/L (βλέπε παράγραφο 1.7.2 δεύτερο εδάφιο). Για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό σημαντικών προϊόντων μετατροπής ή σε περίπτωση που δεν διατίθεται ειδική αναλυτική μέθοδος με χαμηλό όριο ανίχνευσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν υψηλότερες συγκεντρώσεις ελεγχόμενης ουσίας (> 100 μg/L και ορισμένες φορές > 1 mg/L). Όταν όμως η δοκιμή διεξάγεται με υψηλές συγκεντρώσεις ελεγχόμενης ουσίας, τα αποτελέσματα ενδέχεται να μη μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό της σταθεράς αποικοδόμησης πρώτης τάξεως και του χρόνου υποδιπλασιασμού, δεδομένου ότι, πιθανότατα, η κινητική της αποικοδόμησης δεν θα είναι πρώτης τάξεως.

Η αποικοδόμηση παρακολουθείται σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα με μέτρηση είτε του υπολειμματικού άνθρακα ^{14}C ή της υπολειμματικής συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας, όταν εφαρμόζεται ειδική μέθοδος χημικής ανάλυσης. Η σήμανση με ^{14}C του σταθερότερου τμήματος του μορίου επιτρέπει τον προσδιορισμό της συνολικής ανοργανοποίησης, ενώ η σήμανση με ^{14}C ενός λιγότερο σταθερού τμήματος του μορίου, καθώς και η εφαρμογή ειδικής αναλυτικής μεθόδου, επιτρέπουν την εκτίμηση μόνο της πρωταρχικής βιοαποικοδόμησης. Το σταθερότερο τμήμα του μορίου, ωστόσο, δεν περιλαμβάνει αναγκαστικά τη σημαντική λειτουργική ομάδα του (η οποία μπορεί να συνδέεται με μία ειδική ιδιότητα, όπως η τοξικότητα, η βιοσυσώρευση, κλπ.). Στην περίπτωση αυτή, είναι ενδεχομένως σκόπιμο να χρησιμοποιηθεί ελεγχόμενη ουσία σημασμένη με ^{14}C στη λειτουργική ομάδα, ώστε να είναι δυνατή η παρακολούθηση της εξάλειψης της συγκεκριμένης ιδιότητας.

1.5. ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ

Στην παρούσα δοκιμή μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο ραδιοσημασμένες, όσο και μη σημασμένες ελεγχόμενες ουσίες. Συνιστάται η σήμανση με ^{14}C, κατά κανόνα του ή των σταθερότερων τμημάτων του μορίου (βλέπε επίσης παράγραφο 1.4). Για τις ουσίες που περιέχουν περισσότερους του ενός αρωματικούς δακτυλίους, είναι προτιμότερο να σημαίνονται με ^{14}C ένα ή περισσότερα άτομα άνθρακα σε κάθε δακτύλιο. Επιπλέον, πρέπει κατά προτίμηση να σημαίνονται με ^{14}C ένα ή περισσότερα άτομα άνθρακα και στις δύο πλευρές των ευκόλως αποικοδομήσιμων δεσμών. Η χημική ή/και ραδιοχημική καθαρότητα της ελεγχόμενης ουσίας απαιτείται να είναι > 95 %. Για τις ραδιοσημασμένες ουσίες, προκειμένου να διευκολυνθεί η μέτρηση του ^{14}C σε δοκιμές που διεξάγονται με χαμηλές αρχικές συγκεντρώσεις, προτιμάται η ειδική ραδιενέργεια να είναι της τάξεως των 50 μCi/mg (1,85 MBq) ή μεγαλύτερη. Πρέπει να διατίθενται οι ακόλουθες πληροφορίες σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία:

▼M1

— διαλυτότητα στο νερό [μέθοδος Α.6],

— διαλυτότητα σε οργανικό(ούς) διαλύτη(ες) (ουσίες χρησιμοποιούμενες με διαλύτη ή δυσδιάλυτες στο νερό),

— σταθερά διαστάσεως (pKa), εφόσον η ουσία ελευθερώνει ή προσλαμβάνει πρωτόνια [κατευθυντήρια γραμμή TG 112 του ΟΟΣΑ] (5),

— τάση ατμών [μέθοδος Α.4] και σταθερά του νόμου του Henry,

— χημική σταθερότητα στο νερό και στο σκοτάδι (υδρόλυση) [μέθοδος Γ.7].

Όταν διεξάγονται δοκιμές δυσδιάλυτων στο νερό ουσιών σε θαλασσινό νερό, μπορεί να είναι χρήσιμο να είναι γνωστή η σταθερά εξαλάτωσης (ή «σταθερά Setschenow») K^s, η οποία ορίζεται ως εξής: $\log (S/S') = K^s C_m$, όπου S και S' είναι η διαλυτότητα της ουσίας σε γλυκό νερό και θαλασσινό νερό, αντιστοίχως, ενώ C_m είναι η μοριακή συγκέντρωση του άλατος.

Εάν διεξάγεται «δοκιμή με εναιώρημα ιζήματος», θα πρέπει να διατίθενται επιπλέον οι ακόλουθες πληροφορίες:

— συντελεστής κατανομής σε μίγμα n-οκτανόλης/νερού [μέθοδος Α.8],

— συντελεστής προσρόφησης [μέθοδος Γ.18].

Άλλες χρήσιμες πληροφορίες είναι οι εξής:

— συγκέντρωση στο περιβάλλον, εφόσον είναι γνωστή ή έχει εκτιμηθεί,

— τοξικότητα της ελεγχόμενης ουσίας για τους μικροοργανισμούς [μέθοδος Γ.11],

— άμεση ή/και εγγενής βιοαποικοδομησιμότητα [μέθοδοι Γ.4 Α-ΣΤ, Γ.12, Γ.9, κατευθυντήρια γραμμή TG 302 του ΟΟΣΑ (5)],

— αερόβια ή αναερόβια βιοαποικοδομησιμότητα στο έδαφος και μελέτες μετατροπής στη διεπαφή ιζήματος/νερού [μέθοδοι Γ.23, Γ.24].

1.6. ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως ουσία αναφοράς μία ουσία η οποία κατά κανόνα αποικοδομείται εύκολα υπό αερόβιες συνθήκες (π.χ. ανιλίνη ή βενζοϊκό νάτριο). Ο αναμενόμενος χρόνος αποικοδόμησης της ανιλίνης και του βενζοϊκού νατρίου είναι συνήθως μικρότερος από 2 εβδομάδες. Η ουσία αναφοράς χρησιμοποιείται με σκοπό να εξασφαλιστεί ότι η μικροβιακή δραστικότητα του νερού δοκιμής περικλείεται εντός ορισμένων ορίων, δηλαδή ότι το νερό περιέχει ενεργή μικροβιακή χλωρίδα.

▼M1

1.7. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

1.7.1. **Ανάκτηση**

Αμέσως μετά την προσθήκη της ελεγχόμενης ουσίας, κάθε αρχική συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να επαληθεύεται με μέτρηση της ραδιενέργειας του ^{14}C, η με χημική ανάλυση εφόσον πρόκειται για μη σημασμένη ουσία, τουλάχιστον σε διπλά δείγματα. Με τον τρόπο αυτό συγκεντρώνονται πληροφορίες για τη δυνατότητα εφαρμογής και την επαναληπτικότητα της αναλυτικής μεθόδου, καθώς και για την ομοιογενή κατανομή της ελεγχόμενης ουσίας. Κατά κανόνα, στη μετέπειτα ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιείται η μετρούμενη αρχική ραδιενέργεια του ^{14}C ή η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας και όχι η ονομαστική συγκέντρωση, καθώς με τον τρόπο αυτό αντισταθμίζονται οι απώλειες λόγω ρόφησης και τα σφάλματα δοσολογίας. Για τις σημασμένες με ^{14}C ελεγχόμενες ουσίες, ο βαθμός ανάκτησης στο τέλος του πειράματος προκύπτει από το ισοζύγιο μάζας (βλέπε παράγραφο 1.8.9.4 τελευταίο εδάφιο). Στην ιδανική περίπτωση, το ισοζύγιο της ραδιοσημασμένης μάζας πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 90 % και 110 % ενώ, για τις μη σημασμένες ελεγχόμενες ουσίες, η αναλυτική ακρίβεια θα πρέπει να συνεπάγεται αρχική ανάκτηση μεταξύ 70 % και 110 %. Τα εν λόγω πεδία τιμών πρέπει να ερμηνεύονται ως στόχοι και να μην χρησιμοποιούνται ως κριτήρια αποδοχής της δοκιμής. Εναλλακτικά, μπορεί να προσδιορίζεται η αναλυτική ακρίβεια για την ελεγχόμενη ουσία σε συγκέντρωση μικρότερη από την αρχική, καθώς και για τα σημαντικά προϊόντα μετατροπής.

1.7.2. **Επαναληπτικότητα και ευαισθησία της αναλυτικής μεθόδου**

Η επαναληπτικότητα της αναλυτικής μεθόδου (συμπεριλαμβανομένης της αποδοτικότητας της αρχικής συλλογής), όσον αφορά τον ποσοτικό προσδιορισμό της ελεγχόμενης ουσίας, καθώς και των προϊόντων μετατροπής, κατά περίπτωση, θα πρέπει να ελέγχεται με πενταπλή ανάλυση των επιμέρους δειγμάτων των επιφανειακών υδάτων.

Το όριο ανίχνευσης (LOD) της αναλυτικής μεθόδου για την ελεγχόμενη ουσία και για τα προϊόντα μετατροπής θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 1 % της αρχικής ποσότητας που χρησιμοποιήθηκε στο σύστημα δοκιμής, εφόσον αυτό είναι δυνατόν. Το όριο του ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) θα πρέπει να είναι ίσο ή μικρότερο από 10 % της χρησιμοποιηθείσας συγκέντρωσης. Οι χημικές αναλύσεις πολλών οργανικών ουσιών και των προϊόντων μετατροπής τους απαιτούν συχνά η ελεγχόμενη ουσία να χρησιμοποιείται σε σχετικά υψηλή συγκέντρωση, δηλαδή > 100 μg/L.

1.8. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.8.1. **Εξοπλισμός**

Για την εκτέλεση της δοκιμής μπορούν να χρησιμοποιηθούν κωνικές ή κυλινδρικές φιάλες κατάλληλης χωρητικότητας (π.χ. 0,5 ή 1 λίτρου), πωματισμένες με πώματα από σιλικόνη ή καουτσούκ, ή φιάλες ορού με αδιαπέραστα από το CO_2 καλύμματα (π.χ. με διαφράγματα από βουτυλοκαουτσούκ). Μία άλλη δυνατότητα είναι να χρησιμοποιηθούν πολλές φιάλες και να λαμβάνεται ως δείγμα ολόκληρο το περιεχόμενο μιας φιάλης, τουλάχιστον εις διπλούν, σε κάθε χρονικό διάστημα δειγματοληψίας (βλέπε παράγραφο 1.8.9.1 τελευταίο εδάφιο). Για μη πτητικές μη ραδιοσημασμένες ελεγχόμενες ουσίες, δεν απαιτούνται αεροστεγή πώματα ή καλύμματα• μπορούν να χρησιμοποιηθούν χαλαρά βύσματα βάμβακα που εμποδίζουν τη μόλυνση από τον αέρα (βλέπε παράγραφο 1.8.9.1 δεύτερο εδάφιο). Οι ελαφρά πτητικές ουσίες πρέπει να ελέγχονται σε σύστημα βιομετρικού τύπου με ήπια ανάδευση της επιφάνειας του νερού. Προκειμένου να αποκλειστεί κάθε ενδεχόμενο βακτηριακής μόλυνσης, τα δοχεία μπορούν να αποστειρωθούν με θέρμανση ή σε αυτόκλειστο πριν από τη χρήση τους. Χρησιμοποιείται επίσης ο ακόλουθος συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός:

— συσκευή ανατάραξης ή μαγνητικοί αναδευτήρες για συνεχή ανακίνηση των δοκιμαστικών φιαλών,

▼**M1**

— φυγόκεντρος,

— πεχάμετρο,

— θολοσίμετρο για νεφελομετρικές μετρήσεις της θολερότητας,

— πυριατήριο ή φούρνος μικροκυμάτων για προσδιορισμούς ξηρού βάρους,

— συσκευή διήθησης με μεμβράνη,

— αυτόκλειστο ή κλίβανος για την αποστείρωση των γυάλινων σκευών,

— εγκαταστάσεις για τον χειρισμό σημασμένων με ^{14}C ουσιών,

— εξοπλισμός για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ραδιενέργειας του ^{14}C σε δείγματα διαλυμάτων που παγιδεύουν το CO_2 και, εφόσον απαιτείται, σε δείγματα ιζημάτων,

— αναλυτικός εξοπλισμός για τον προσδιορισμό της ελεγχόμενης ουσίας (και της ουσίας αναφοράς), σε περίπτωση ειδικής χημικής ανάλυσης (π.χ. αέριος χρωματογράφος, υγρός χρωματογράφος υψηλής πίεσης).

1.8.2. **Μητρικά διαλύματα της ελεγχόμενης ουσίας**

Για την παρασκευή των μητρικών διαλυμάτων της ελεγχόμενης ουσίας και της ουσίας αναφοράς χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό (βλέπε παράγραφο 1.8.7 πρώτο εδάφιο). Το απιονισμένο νερό δεν πρέπει να περιέχει ουσίες ενδεχομένως τοξικές για τους μικροοργανισμούς, ενώ η περιεκτικότητά του σε διαλελυμένο οργανικό άνθρακα (DOC) δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1 mg/L (6).

1.8.3. **Συλλογή και μεταφορά των επιφανειακών υδάτων**

Ο χώρος της δειγματοληψίας από τα επιφανειακά ύδατα πρέπει να επιλέγεται ανάλογα με το σκοπό της δοκιμής στην εκάστοτε περίπτωση. Κατά την επιλογή των χώρων δειγματοληψίας, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το πιθανό ιστορικό γεωργικών, βιομηχανικών ή αστικών εισροών. Υδάτινο περιβάλλον για το οποίο είναι γνωστό ότι έχει ρυπανθεί από την ελεγχόμενη ουσία ή από ουσίες ανάλογης δομής κατά την προηγούμενη τετραετία, δεν πρέπει να χρησιμοποιείται για τη συλλογή νερού δοκιμής, εκτός εάν ρητός σκοπός του αναλυτή είναι να διερευνήσει την ταχύτητα αποικοδόμησης σε χώρους εκτεθέντες στο παρελθόν στην ελεγχόμενη ουσία. Θα πρέπει να μετράται το pH και η θερμοκρασία του νερού στον χώρο δειγματοληψίας. Επίσης, πρέπει να σημειώνεται το βάθος από το οποίο συλλέγεται το δείγμα, καθώς και η όψη του δείγματος του νερού (π.χ. χρώμα και θολερότητα) (βλέπε παράγραφο 3). Απαιτείται μέτρηση της συγκέντρωσης του οξυγόνου ή/και του οξειδοαναγωγικού δυναμικού στο νερό και στην επιφανειακή στιβάδα του ιζήματος, προκειμένου να αποδειχθεί ότι επικρατούν αερόβιες συνθήκες, εκτός εάν αυτό προκύπτει σαφώς από την εμφάνιση και το ιστορικό του χώρου δειγματοληψίας. Τα επιφανειακά ύδατα πρέπει να μεταφέρονται σε απόλυτα καθαρό δοχείο. Η θερμοκρασία του δείγματος κατά τη διάρκεια της μεταφοράς δεν πρέπει να υπερβαίνει σημαντικά τη θερμοκρασία στην οποία εκτελείται η δοκιμή. Εάν η μεταφορά διαρκεί περισσότερο από 2 έως 3 ώρες, συνιστάται ψύξη στους 4 °C. Το δείγμα νερού δεν πρέπει να καταψύχεται.

▼M1

1.8.4. **Αποθήκευση και προετοιμασία των επιφανειακών υδάτων**

Η δοκιμή θα πρέπει να αρχίζει κατά προτίμηση εντός εικοσιτετραώρου από τη δειγματοληψία. Ο χρόνος αποθήκευσης του νερού, εφόσον αυτή είναι αναγκαία, πρέπει να περιορίζεται στο ελάχιστο και να μην υπερβαίνει σε καμία περίπτωση, τις 4 εβδομάδες. Το δείγμα του νερού πρέπει να φυλάσσεται στους 4 °C και να αερίζεται έως ότου χρησιμοποιηθεί. Πριν από τη χρήση του δείγματος, πρέπει να απομακρύνονται τα αδρομερή σωματίδια, επί παραδείγματι με διήθηση μέσω ηθμού νάιλον με βροχίδες διαμέτρου 100 μm περίπου ή μέσω αδρού χάρτινου ηθμού ή με καθίζηση.

1.8.5. **Παρασκευή του τροποποιημένου με ίζημα νερού (προαιρετικό)**

Για τη δοκιμή με εναιώρημα ιζήματος, προστίθεται επιφανειακό ίζημα στις φιάλες που περιέχουν φυσικό νερό (από το οποίο έχουν απομακρυνθεί με διήθηση τα αδρομερή σωματίδια, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 1.8.4), ώστε να σχηματιστεί εναιώρημα. Η συγκέντρωση των αιωρούμενων στερεών πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 0,01 και 1 g/L. Το επιφανειακό ίζημα πρέπει να προέρχεται από το χώρο από τον οποίο ελήφθη το δείγμα νερού. Ανάλογα με το συγκεκριμένο υδάτινο περιβάλλον, το επιφανειακό ίζημα μπορεί να χαρακτηρίζεται είτε από υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (2,5-7,5 %) και λεπτή υφή είτε από χαμηλή περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (0,5-2,5 %) και αδρή υφή (3). Το επιφανειακό ίζημα παρασκευάζεται ως εξής: με τη βοήθεια διαφανούς πλαστικού σωλήνα εξάγονται πολλά καρότα από το ίζημα, αποκόβονται τα ανώτερα αερόβια στρώματα (από την επιφάνεια μέχρι βάθους 5 mm κατ' ανώτατο όριο) αμέσως μετά τη δειγματοληψία και συνενώνονται. Το προκύπτον δείγμα ιζήματος μεταφέρεται σε δοχείο με μεγάλο διάκενο, ώστε το ίζημα να διατηρείται σε αερόβιες συνθήκες (εάν η μεταφορά διαρκεί περισσότερο από 2-3 ώρες, το δείγμα ψύχεται στους 4 °C). Παρασκευάζεται εναιώρημα του δείγματος ιζήματος στο νερό της δοκιμής σε αναλογία 1:10 και φυλάσσεται αεριζόμενο στους 4 °C μέχρι τη χρήση του. Ο χρόνος αποθήκευσης του ιζήματος, εφόσον αυτή είναι αναγκαία, πρέπει να περιορίζεται στο ελάχιστο και να μην υπερβαίνει σε καμία περίπτωση, τις 4 εβδομάδες.

1.8.6. **Ημισυνεχής διαδικασία (προαιρετική)**

Σε περίπτωση που η διάρκεια της λανθάνουσας φάσης, έως ότου καταστεί δυνατή η μέτρηση σημαντικής αποικοδόμησης της ελεγχόμενης ουσίας, είναι μεγάλη, μπορεί να χρειαστεί παρατεταμένη επώαση (επί πολλούς μήνες). Εάν αυτό είναι γνωστό από προηγούμενες δοκιμές με την εν λόγω ουσία, η δοκιμή μπορεί να αρχίσει με μία ημισυνεχή διαδικασία, η οποία παρέχει τη δυνατότητα περιοδικής ανανέωσης μέρους του νερού ή του εναιωρήματος (βλέπε παράρτημα 2). Εναλλακτικά, η κανονική δοκιμή διαλείποντος έργου μπορεί να μετατραπεί σε ημισυνεχή δοκιμή, εφόσον δεν έχει παρατηρηθεί αποικοδόμηση της ελεγχόμενης ουσίας μετά την πάροδο 60 περίπου ημερών από την έναρξη της διαδικασίας διαλείποντος έργου (βλέπε παράγραφο 1.8.8.3 δεύτερο εδάφιο).

1.8.7. **Προσθήκη της ελεγχόμενης ουσίας (ή της ουσίας αναφοράς)**

Για τις ευδιάλυτες στο νερό ουσίες (> 1 mg/L) χαμηλής πτητικότητας (σταθερά του νόμου του Henry < 1 $Pa•m^3/mol$ ή < 10^{-5} $atm•m^3/mol$), μπορεί να παρασκευαστεί μητρικό διάλυμα σε απιονισμένο νερό (βλέπε παράγραφο 1.8.2). Προστίθεται ο κατάλληλος όγκος μητρικού διαλύματος στα δοκιμαστικά δοχεία, ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση. Ο όγκος του τυχόν προστιθέμενου μητρικού διαλύματος πρέπει να περιορίζεται στον ελάχιστο πρακτικά εφικτό (< 10 % του όγκου του τελικού υγρού, εφόσον είναι δυνατόν). Μία άλλη διαδικασία συνίσταται στη διάλυση της ελεγχόμενης ουσίας σε μεγαλύτερο όγκο νερού δοκιμής, αντί της χρήσης οργανικών διαλυτών.

▼M1

Εφόσον δεν υπάρχει άλλη λύση, για την παρασκευή των μητρικών διαλυμάτων μη πτητικών δυσδιάλυτων στο νερό ουσιών χρησιμοποιείται πτητικός οργανικός διαλύτης. Ωστόσο, η ποσότητα του προστιθέμενου στο σύστημα δοκιμής διαλύτη δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1 % v/v ούτε να έχει δυσμενή επίδραση στη μικροβιακή δραστικότητα. Ο διαλύτης δεν πρέπει να επηρεάζει τη σταθερότητα της ελεγχόμενης ουσίας στο νερό. Θα πρέπει να απομακρύνεται μέχρι να παραμείνει μία ελάχιστη ποσότητα, ώστε να μην αυξάνει σημαντικά τη συγκέντρωση DOC στο νερό ή στο εναιώρημα δοκιμής. Αυτό ελέγχεται με ειδική για τη συγκεκριμένη ουσία ανάλυση ή, εφόσον είναι δυνατόν, με ανάλυση του DOC (6). Λαμβάνεται μέριμνα ώστε η ποσότητα του μεταφερόμενου διαλύτη να περιορίζεται στην απολύτως αναγκαία και να εξασφαλίζεται ότι η ποσότητα της ελεγχόμενης ουσίας μπορεί να διαλυθεί στον τελικό όγκο του νερού της δοκιμής. Για την εισαγωγή της ελεγχόμενης ουσίας στα δοκιμαστικά δοχεία μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες τεχνικές, όπως περιγράφεται στην αναφερόμενη υπό (7) και (8) βιβλιογραφία. Όταν η ελεγχόμενη ουσία χρησιμοποιείται με φορέα οργανικό διαλύτη, οι μάρτυρες για το διαλύτη, που περιέχουν το νερό δοκιμής (χωρίς καμία προσθήκη) και το νερό της δοκιμής στο οποίο έχει προστεθεί ουσία αναφοράς, πρέπει να υποβάλλονται στην ίδια αγωγή όπως τα ενεργά δοκιμαστικά δοχεία που περιέχουν την ελεγχόμενη ουσία σε φορέα διαλύτη. Οι μάρτυρες για το διαλύτη χρησιμοποιούνται με σκοπό να εξεταστούν οι τυχόν δυσμενείς επιδράσεις του διαλύτη στη μικροβιακή χλωρίδα, όπως προκύπτουν από την αποικοδόμηση της ουσίας αναφοράς.

1.8.8. **Συνθήκες δοκιμής**

1.8.8.1. *Θερμοκρασία δοκιμής*

Η επώαση πρέπει να λαμβάνει χώρα στο σκοτάδι (κατά προτίμηση) ή σε διάχυτο φως σε ελεγχόμενη (± 2 °C) θερμοκρασία, η οποία μπορεί να είναι η επιτόπια θερμοκρασία ή μία πρότυπη θερμοκρασία 20-25 °C. Η επιτόπια θερμοκρασία αντιστοιχεί είτε στην πραγματική θερμοκρασία του δείγματος τη στιγμή της δειγματοληψίας ή στη μέση επιτόπια θερμοκρασία στο χώρο δειγματοληψίας.

1.8.8.2. *Ανακίνηση*

Απαιτείται συνεχής ανατάραξη ή ανάδευση, ώστε τα σωματίδια και οι μικροοργανισμοί να διατηρούνται σε εναιώρημα. Η ανακίνηση διευκολύνει επίσης τη μεταφορά οξυγόνου από το διάκενο στο υγρό, ούτως ώστε να επικρατούν συνεχώς αερόβιες συνθήκες. Οι φιάλες τοποθετούνται σε συσκευή ανατάραξης (περίπου στις 100 rpm) ή σε μαγνητικό ανάδευτήρα. Η ανακίνηση πρέπει να είναι συνεχής. Ωστόσο, η ανατάραξη ή η ανάδευση πρέπει να είναι όσο το δυνατόν πιο ήπια, αλλά να διατηρεί συνεχώς την ομοιογένεια του εναιωρήματος.

1.8.8.3. *Διάρκεια της δοκιμής*

Κατά κανόνα, η διάρκεια της δοκιμής δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 60 ημέρες, εκτός εάν εφαρμόζεται η ημισυνεχής διαδικασία με περιοδική ανανέωση του εναιωρήματος (βλέπε παράγραφο 1.8.6 και παράρτημα 2). Στη διαδικασία διαλείποντος έργου, ωστόσο, ο χρόνος της δοκιμής μπορεί να παραταθεί σε 90 ημέρες κατ' ανώτατο όριο, εφόσον η αποικοδόμηση της ελεγχόμενης ουσίας έχει αρχίσει εντός των πρώτων 60 ημερών. Η αποικοδόμηση παρακολουθείται σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα με προσδιορισμό της υπολειμματικής ραδιενέργειας του ^{14}C ή του εκλυόμενου $^{14}CO_2$ (βλέπε παράγραφο 1.8.9.4) ή/και με χημική ανάλυση (παράγραφος 1.8.9.5). Η διάρκεια της επώασης πρέπει να επαρκεί για την αξιολόγηση της διαδικασίας αποικοδόμησης. Κατά προτίμηση, ο βαθμός αποικοδόμησης πρέπει να υπερβαίνει το 50 %. Για τις βραδέως αποικοδομούμενες ουσίες, ο βαθμός αυτός πρέπει να είναι αρκούντως υψηλός (συνήθως μεγαλύτερος από 20 %), ώστε να μπορεί να υπολογιστεί η σταθερά ταχύτητας αποικοδόμησης.

▼M1

Απαιτούνται περιοδικές μετρήσεις του pH και της συγκέντρωσης οξυγόνου στο σύστημα δοκιμής, εκτός εάν αυτές καθίστανται περιττές λόγω της κτηθείσας πείρας από ανάλογες δοκιμές με δείγματα νερού και ιζημάτων που συλλέχθηκαν στον ίδιο χώρο δειγματοληψίας. Υπό ορισμένες συνθήκες, ο μεταβολισμός πρωτευόντων υποστρωμάτων που απαντούν σε πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις στο νερό ή στο ίζημα ενδέχεται να προκαλέσει έκλυση CO_2 και μείωση του οξυγόνου σε βαθμό που να μεταβάλλονται σημαντικά οι πειραματικές συνθήκες κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

1.8.9. **Διαδικασία**

1.8.9.1. *Προετοιμασία των φιαλών για την πελαγική δοκιμή*

Κατάλληλος όγκος νερού δοκιμής (όχι μικρότερος από 100 ml περίπου) μεταφέρεται στις δοκιμαστικές φιάλες ώστε αυτές να πληρούνται κατά το ένα τρίτο περίπου. Εάν χρησιμοποιούνται πολλαπλές φιάλες (ώστε να λαμβάνεται ως δείγμα ολόκληρο το περιεχόμενο μίας φιάλης σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας), ο κατάλληλος όγκος νερού δοκιμής είναι επίσης 100 ml περίπου, δεδομένου ότι μικροί όγκοι δειγμάτων ενδέχεται να επηρεάσουν τη διάρκεια της λανθάνουσας φάσης. Προστίθεται η ελεγχόμενη ουσία, η οποία λαμβάνεται από μητρικό διάλυμα, όπως περιγράφεται στις παραγράφους 1.8.2 και 1.8.7. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις ελεγχόμενης ουσίας, η μία πενταπλάσια έως δεκαπλάσια της άλλης, για τον προσδιορισμό της κινητικής της αποικοδόμησης και τον υπολογισμό της σταθεράς ταχύτητας αποικοδόμησης. Και οι δύο συγκεντρώσεις που επιλέγονται πρέπει να είναι χαμηλότερες των 100 μg/L και να κυμαίνονται, κατά προτίμηση, στην περιοχή < 1-10 μg/L.

Οι φιάλες πωματίζονται με πώματα ή καλύμματα αδιαπέραστα από τον ατμοσφαιρικό αέρα και το CO_2. Οι φιάλες που περιέχουν μη σημασμένες με ^{14}C μη πτητικές ελεγχόμενες ουσίες, μπορούν να πωματίζονται με χαλαρά βύσματα από υαλοβάμβακα που εμποδίζουν τη μόλυνση από τον ατμοσφαιρικό αέρα (βλέπε παράγραφο 1.8.1), υπό τον όρο ότι είναι γνωστή η μη πτητικότητα τυχόν σημαντικών προϊόντων αποικοδόμησης και ότι εκτελείται έμμεσος προσδιορισμός του CO_2 (βλέπε παράρτημα 3).

Οι φιάλες επωάζονται στη θερμοκρασία που έχει επιλεγεί (βλέπε παράγραφο 1.8.8.1). Λαμβάνονται δείγματα για χημική ανάλυση ή για μετρήσεις του ^{14}C κατά την έναρξη της δοκιμής (δηλαδή πριν αρχίσει η βιοαποικοδόμηση• βλέπε παράγραφο 1.7.1) και σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα κατά την πορεία της δοκιμής. Η δειγματοληψία μπορεί να συνίσταται στη λήψη επιμέρους δειγμάτων (π.χ. ποσοτήτων 5 ml) από καθεμία από τις πολλαπλές φιάλες ή στη λήψη ολοκλήρου του περιεχομένου μιας φιάλης σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας. Η ανοργανοποίηση της ελεγχόμενης ουσίας προσδιορίζεται είτε έμμεσα είτε άμεσα (βλέπε παράρτημα 3). Για τον υπολογισμό αξιόπιστης σταθεράς ταχύτητας απαιτούνται συνήθως τουλάχιστον πέντε σημεία δειγματοληψίας κατά τη διάρκεια της φάσης αποικοδόμησης (δηλαδή μετά το τέλος της λανθάνουσας φάσης), εκτός εάν είναι δυνατόν να τεκμηριωθεί ότι για τις ταχέως αποικοδομήσιμες ουσίες αρκούν τρία σημεία δειγματοληψίας. Για βραδέως αποικοδομούμενες ουσίες, μπορούν να διενεργηθούν άνετα περισσότερες μετρήσεις κατά τη διάρκεια της αποικοδόμησης και, στην περίπτωση αυτή, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται περισσότερα σημεία δεδομένων για τον υπολογισμό της σταθεράς k. Δεν είναι δυνατόν να καθοριστεί πάγιο χρονοδιάγραμμα για τη δειγματοληψία, δεδομένου ότι η ταχύτητα βιοαποικοδόμησης ποικίλλει. Ωστόσο, σε περίπτωση βραδείας αποικοδόμησης, συνιστάται μία δειγματοληψία εβδομαδιαίως. Εάν η αποικοδόμηση της ελεγχόμενης ουσίας είναι ταχεία, θα πρέπει να διενεργείται μία δειγματοληψία ημερησίως κατά τις τρεις πρώτες ημέρες και, στη συνέχεια, μία ανά δύο ή τρεις ημέρες. Υπό ορισμένες περιστάσεις, όταν επί παραδείγματι η ουσία υδρολύεται ταχύτατα, ενδέχεται να χρειαστεί ωριαία δειγματοληψία. Συνιστάται η διεξαγωγή προκαταρκτικής μελέτης πριν από τη δοκιμή, προκειμένου να προσδιοριστούν τα ενδεδειγμένα διαστήματα δειγματοληψίας. Εάν πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμα δείγματα για περαιτέρω ειδική ανάλυση, είναι σκόπιμο να λαμβάνονται περισσότερα δείγματα και, στη συνέχεια, να επιλέγονται εκείνα που θα αναλυθούν στο τέλος του πειράματος, ακολουθώντας μία στρατηγική της αντίστροφης σειράς, δηλαδή τα τελευταία δείγματα αναλύονται πρώτα (οδηγίες σχετικά με τη σταθερότητα των δειγμάτων κατά την αποθήκευση παρέχονται στην παράγραφο 1.8.9.5 δεύτερο εδάφιο).

▼M1

1.8.9.2. *Αριθμός φιαλών και δειγμάτων*

Ετοιμάζεται επαρκής αριθμός δοκιμαστικών φιαλών ως εξής:

— δοκιμαστικές φιάλες• διπλές τουλάχιστον φιάλες για κάθε συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας (κατά προτίμηση, τουλάχιστον 3) ή μία σειρά δοκιμαστικών φιαλών για κάθε συγκέντρωση, σε περίπτωση που συλλέγεται ολόκληρο το περιεχόμενο των φιαλών σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας (συμβολίζονται ως F_T),

— δοκιμαστικές φιάλες για τον υπολογισμό του ισοζυγίου της μάζας• διπλές τουλάχιστον φιάλες για κάθε ελεγχόμενη συγκέντρωση (συμβολίζονται ως F_M),

— τυφλός μάρτυρας, χωρίς ελεγχόμενη ουσία• τουλάχιστον μία φιάλη για την τυφλή δοκιμή, η οποία περιέχει μόνο το νερό δοκιμής (συμβολίζεται ως F_B),

— μάρτυρας αναφοράς• διπλές φιάλες που περιέχουν την ουσία αναφοράς (π.χ. ανιλίνη ή βενζοϊκό νάτριο, σε συγκέντρωση 10 μg/l) (συμβολίζονται ως F_C). Ο μάρτυρας αναφοράς χρησιμοποιείται για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη ελάχιστης μικροβιακής δραστικότητας. Εφόσον εξυπηρετεί, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ραδιοσημασμένη ουσία αναφοράς. Αυτό ισχύει και στην περίπτωση που η αποικοδόμηση της ελεγχόμενης ουσίας παρακολουθείται με χημικές αναλύσεις,

— στείρος μάρτυρας• μία ή δύο φιάλες που περιέχουν αποστειρωμένο νερό δοκιμής για την εξέταση τυχόν αβιοτικής αποικοδόμησης ή άλλης μη βιολογικής εξάλειψης της ελεγχόμενης ουσίας (συμβολίζονται ως F_S). Η παύση της βιολογικής δραστηριότητας μπορεί να επιτευχθεί με τη θέρμανση του νερού δοκιμής σε αυτόκλειστο (121 °C, 20 λεπτά) ή με την προσθήκη τοξικού παράγοντα (π.χ. νατραζίδιο (NaN_3), 10-20 g/l, χλωριούχος υδράργυρος ($HgCl_2$), 100 mg/l, ή φορμαλδεΰδη, 100 mg/l) ή με ακτινοβόληση με ακτίνες γ. Σε περίπτωση που χρησιμοποιείται $HgCl_2$, μετά τη χρήση του θα πρέπει να αντιμετωπίζεται ως τοξικό απόβλητο. Η αποστείρωση νερού στο οποίο έχουν προστεθεί μεγάλες ποσότητες ιζήματος δεν είναι εύκολη και γι'αυτό συνιστάται επανειλημμένη θέρμανση σε αυτόκλειστο (π.χ. τρεις φορές). Θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η αποστείρωση σε αυτόκλειστο μπορεί να προκαλέσει αλλοίωση των σχετικών με τη ρόφηση χαρακτηριστικών του ιζήματος,

— μάρτυρες για το διαλύτη, που περιέχουν νερό δοκιμής και νερό δοκιμής στο οποίο έχει προστεθεί ουσία αναφοράς• διπλές φιάλες που περιέχουν την ίδια ποσότητα διαλύτη και υποβάλλονται στην ίδια διαδικασία με εκείνη που εφαρμόστηκε για την ελεγχόμενη ουσία. Σκοπός των μαρτύρων αυτών είναι να εξεταστούν οι τυχόν δυσμενείς επιδράσεις του διαλύτη με βάση την αποικοδόμηση της ουσίας αναφοράς.

Κατά το σχεδιασμό της δοκιμής, ο αναλυτής θα πρέπει να εξετάσει κατά πόσον είναι προτιμότερο να αυξηθεί το πλήθος των πειραμάτων ή η συχνότητα της δειγματοληψίας. Ο ακριβής αριθμός των απαιτούμενων φιαλών θα εξαρτηθεί από την εφαρμοζόμενη μέθοδο προσδιορισμού της αποικοδόμησης (βλέπε παράγραφο 1.8.9.1 τρίτο εδάφιο, παράγραφο 1.8.9.4 και παράρτημα 3).

▼M1

Από κάθε δοκιμαστική φιάλη πρέπει να λαμβάνονται δύο επιμέρους δείγματα (π.χ. ποσότητες 5 ml) σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας. Όταν χρησιμοποιούνται πολλαπλές φιάλες, ώστε να λαμβάνεται ως δείγμα ολόκληρο το περιεχόμενο της φιάλης, αυτές θα πρέπει να είναι τουλάχιστον δύο σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας (βλέπε παράγραφο 1.8.9.1 πρώτο εδάφιο).

1.8.9.3. *Προετοιμασία των φιαλών για τη δοκιμή με εναιώρημα ιζήματος [προαιρετική]*

Στα δοκιμαστικά δοχεία προστίθενται οι απαιτούμενοι όγκοι νερού δοκιμής και ιζήματος, εφόσον είναι αναγκαίο (βλέπε παράγραφο 1.8.5). Ο τρόπος προετοιμασίας των φιαλών για τη δοκιμή με εναιώρημα ιζήματος είναι ο ίδιος με την πελαγική δοκιμή (βλέπε παραγράφους 1.8.9.1 και 1.8.9.2). Χρησιμοποιούνται κατά προτίμηση φιάλες ορού ή φιάλες αναλόγου σχήματος. Οι πωματισμένες φιάλες τοποθετούνται οριζόντια σε συσκευή ανατάραξης. Οι ανοικτές φιάλες που περιέχουν μη σημασμένες με ^{14}C μη πτητικές ουσίες τοποθετούνται προφανώς όρθιες — στην περίπτωση αυτή συνιστάται μαγνητική ανάδευση και χρήση μαγνητικών ράβδων επικαλυμμένων με γυαλί. Εφόσον είναι αναγκαίο, οι φιάλες αερίζονται, ώστε να εξασφαλίζονται κατάλληλες αερόβιες συνθήκες.

1.8.9.4. *Ραδιοχημικοί προσδιορισμοί*

Εκτελείται έμμεση και άμεση μέτρηση του εκλυόμενου $^{14}CO_2$ (βλέπε παράρτημα 3). Το $^{14}CO_2$ προσδιορίζεται έμμεσα από τη διαφορά μεταξύ της αρχικής ραδιενέργειας του ^{14}C στο νερό ή στο εναιώρημα δοκιμής και της συνολικής υπολειμματικής ραδιενέργειας κατά το χρόνο δειγματοληψίας, όπως μετράται μετά την οξίνιση του δείγματος μέχρι να επιτευχθεί pH 2-3 και την απομάκρυνση του CO_2. Δεδομένου ότι ο ανόργανος άνθρακας έχει απομακρυνθεί, η μετρούμενη υπολειμματική ραδιενέργεια οφείλεται στην οργανική ύλη. Ο έμμεσος προσδιορισμός του $^{14}CO_2$ δεν πρέπει να εκτελείται όταν μεταξύ των σημαντικών προϊόντων μετατροπής της ελεγχόμενης ουσίας περιλαμβάνονται πτητικές ενώσεις (βλέπε παράρτημα 3). Εφόσον είναι δυνατόν, το εκλυόμενο $^{14}CO_2$ θα πρέπει να μετράται άμεσα (βλέπε παράρτημα 3) σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας και σε μία τουλάχιστον δοκιμαστική φιάλη. Η διαδικασία αυτή επιτρέπει τον έλεγχο τόσο του ισοζυγίου μάζας όσο και της διαδικασίας βιοαποικοδόμησης, αλλά εφαρμόζεται μόνο στις δοκιμές που διεξάγονται με πωματισμένες φιάλες.

Σε περίπτωση άμεσης μέτρησης του εκλυόμενου $^{14}CO_2$ κατά τη διάρκεια της δοκιμής, θα πρέπει να προβλεφθούν περισσότερες φιάλες για το σκοπό αυτό κατά την έναρξη της δοκιμής. Ο άμεσος προσδιορισμός του $^{14}CO_2$ συνιστάται όταν μεταξύ των σημαντικών προϊόντων μετατροπής της ελεγχόμενης ουσίας περιλαμβάνονται πτητικές ενώσεις. Σε κάθε σημείο μέτρησης, οι επιπλέον δοκιμαστικές φιάλες οξινίζονται έως ότου επιτευχθεί pH 2-3 και το $^{14}CO_2$ συλλέγεται σε εσωτερικό ή εξωτερικό σύστημα απορρόφησης (βλέπε παράρτημα 3).

Εναλλακτικά, οι συγκεντρώσεις της σημασμένης με ^{14}C ελεγχόμενης ουσίας και των σημαντικότερων προϊόντων μετατροπής μπορούν να προσδιορισθούν με ραδιοχρωματογραφία (π.χ. χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, RAD–TLC) ή με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) με ραδιοχημική ανίχνευση.

Επίσης, μπορούν να προσδιοριστούν η κατανομή της υπολειμματικής ραδιενέργειας μεταξύ των φάσεων (βλέπε παράρτημα 1), καθώς και η υπολειμματική ελεγχόμενη ουσία και τα εναπομένοντα προϊόντα μετατροπής.

▼**M1**

Στο τέλος της δοκιμής θα πρέπει να προσδιορίζεται το ισοζύγιο μάζας με άμεση μέτρηση του $^{14}CO_2$, χρησιμοποιώντας χωριστές δοκιμαστικές φιάλες, από τις οποίες δεν λαμβάνεται κανένα δείγμα κατά την πορεία της δοκιμής (βλέπε παράρτημα 3).

1.8.9.5. *Ειδική χημική ανάλυση*

Σε περίπτωση που διατίθεται ευαίσθητη ειδική αναλυτική μέθοδος, η πρωταρχική βιοαποικοδόμηση μπορεί να εκτιμηθεί μετρώντας τη συνολική υπολειμματική συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας, αντί να χρησιμοποιηθούν τεχνικές ραδιοσήμανσης. Εφόσον χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένη ελεγχόμενη ουσία (για τη μέτρηση της συνολικής ανοργανοποίησης), είναι δυνατόν να διενεργηθούν παράλληλα ειδικές χημικές αναλύσεις, με σκοπό την άντληση χρήσιμων συμπληρωματικών πληροφοριών και τον έλεγχο της διαδικασίας. Ειδικές χημικές αναλύσεις μπορούν να εκτελούνται επίσης για τη μέτρηση των προϊόντων μετατροπής που σχηματίζονται κατά την αποικοδόμηση της ελεγχόμενης ουσίας, συνιστώνται δε για ουσίες των οποίων η ημιπερίοδος ανοργανοποίησης υπερβαίνει τις 60 ημέρες. Θα πρέπει να μετράται και να αναφέρεται (ως συγκέντρωση και ως εκατοστιαία αναλογία της χρησιμοποιηθείσας ποσότητας) η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας και των προϊόντων μετατροπής σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας. Κατά κανόνα, τα προϊόντα μετατροπής που ανιχνεύονται σε ποσοστό ≥ 10 % της χρησιμοποιηθείσας συγκέντρωσης στον εκάστοτε χρόνο δειγματοληψίας πρέπει να ταυτοποιούνται, εκτός εάν αυτό είναι εύλογα περιττό. Θα πρέπει επίσης να εξετάζεται το ενδεχόμενο ταυτοποίησης προϊόντων μετατροπής των οποίων οι συγκεντρώσεις αυξάνονται συνεχώς κατά τη διάρκεια της μελέτης, έστω και αν οι συγκεντρώσεις τους δεν υπερβαίνουν το ανωτέρω όριο, δεδομένου ότι αυτό μπορεί να αποτελεί ένδειξη εμμονής. Σε περίπτωση που θεωρείται πιθανή η ταχεία αβιοτική μετατροπή της ελεγχόμενης ουσίας (π.χ. υδρόλυση), θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο ανάλυσης των προϊόντων μετατροπής σε στείρους μάρτυρες. Η ανάγκη ποσοτικού προσδιορισμού και ταυτοποίησης των προϊόντων μετατροπής πρέπει να εξετάζεται κατά περίπτωση, η δε σχετική αιτιολόγηση να παρέχεται στην έκθεση της δοκιμής. Οι τεχνικές εκχύλισης με οργανικό διαλύτη πρέπει να εφαρμόζονται σύμφωνα με τις οδηγίες που παρέχονται στην αντίστοιχη μέθοδο ανάλυσης.

Όλα τα δείγματα πρέπει να φυλάσσονται σε αεροστεγή δοχεία και σε θερμοκρασία 2 έως 4 °C, εφόσον η ανάλυση εκτελείται εντός 24 ώρου (κατά προτίμηση). Όταν τα δείγματα αποθηκεύονται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, θα πρέπει να καταψύχονται σε θερμοκρασία χαμηλότερη από – 18 °C ή να διατηρούνται με χημικά συντηρητικά. Η μέθοδος της οξίνισης δεν συνιστάται για τη διατήρηση των δειγμάτων, διότι τα όξινα δείγματα ενδέχεται να είναι ασταθή. Σε περίπτωση που η ανάλυση δεν εκτελεστεί εντός 24 ώρου και απαιτηθεί μακρύτερος χρόνος αποθήκευσης, θα πρέπει να διεξαχθεί μελέτη σταθερότητας κατά την αποθήκευση, ώστε να αποδειχθεί η σταθερότητα των σημαντικών χημικών ουσιών υπό συνθήκες αποθήκευσης στους – 18 °C ή διατήρησης με συντηρητικά. Εάν η αναλυτική μέθοδος απαιτεί εκχύλιση με διαλύτη ή παραλαβή σε στερεά φάση, αυτή θα πρέπει να διενεργηθεί αμέσως μετά τη δειγματοληψία ή μετά την αποθήκευση του δείγματος υπό ψύξη επί 24 ώρες κατ' ανώτατο όριο.

Ανάλογα με την ευαισθησία της μεθόδου ανάλυσης, ενδέχεται να απαιτηθούν δείγματα μεγαλύτερου όγκου από εκείνους που αναφέρονται στην παράγραφο 1.8.1. Η δοκιμή μπορεί να διεξαχθεί άνετα με όγκους ενός λίτρου σε φιάλες χωρητικότητας 2-3 λίτρων, όγκος που επιτρέπει τη συλλογή δειγμάτων των 100 ml περίπου.

▼M1

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ**

2.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

2.1.1. **Γραφική παράσταση των δεδομένων**

Οι χρόνοι δειγματοληψίας στρογγυλοποιούνται σε ακέραιο αριθμό ωρών (εκτός εάν η ουσία αποικοδομείται σε σημαντικό βαθμό εντός λεπτών ή ωρών), αλλά όχι σε ακέραιο αριθμό ημερών. Σχεδιάζεται γραμμικό και ημιλογαριθμικό διάγραμμα των τιμών της υπολειμματικής ραδιενέργειας της ελεγχόμενης ουσίας (για τις σημασμένες με ^{14}C ουσίες) ή της υπολειμματικής συγκέντρωσης (για τις μη σημασμένες ουσίες), ως προς το χρόνο, (βλέπε σχήματα 1α, 1β). Εφόσον υπήρξε αποικοδόμηση, συγκρίνονται τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από τις φιάλες F_T με εκείνα που λαμβάνονται από τις φιάλες F_S. Εάν η απόκλιση μεταξύ των μέσων όρων των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται από τις φιάλες με ελεγχόμενη ουσία (F_T) και εκείνων που λαμβάνονται από τις στείρες φιάλες (F_S) είναι μικρότερη από 10 %, μπορεί να υποτεθεί ότι η παρατηρούμενη αποικοδόμηση είναι κατά κύριο λόγο αβιοτική. Σε περίπτωση που η αποικοδόμηση στις φιάλες F_S είναι μικρότερη, οι σχετικές τιμές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διόρθωση των τιμών που λαμβάνονται από τις φιάλες F_T (με αφαίρεση), προκειμένου να εκτιμηθεί ο βαθμός βιοαποικοδόμησης. Εφόσον διενεργούνται προαιρετικές αναλύσεις για τα σημαντικά προϊόντα μετατροπής, θα πρέπει να παρέχονται τα διαγράμματα του σχηματισμού και της ελάττωσης των προϊόντων αυτών επιπλέον του διαγράμματος της ελάττωσης της ελεγχόμενης ουσίας.

Υπολογίζεται η διάρκεια της λανθάνουσας φάσης t_L με τη βοήθεια της καμπύλης αποικοδόμησης (ημιλογαριθμικό διάγραμμα) με παρεκβολή του ευθύγραμμου τμήματος σε μηδενική αποικοδόμηση ή, εναλλακτικά, με προσδιορισμό του χρόνου αποικοδόμησης κατά 10 % περίπου (βλέπε σχήματα 1α και 1β). Με τη βοήθεια του ημιλογαριθμικού διαγράμματος, υπολογίζεται η σταθερά ταχύτητας πρώτης τάξεως, k, καθώς και το τυπικό σφάλμα της, με γραμμική παλινδρόμηση του ln (υπολειμματική ραδιενέργεια του ^{14}C ή συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας) προς το χρόνο. Όσον αφορά ειδικότερα τις μετρήσεις του ^{14}C, πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο δεδομένα από το αρχικό ευθύγραμμο τμήμα της καμπύλης μετά το τέλος της λανθάνουσας φάσης, επιλέγοντας κατά προτίμηση λίγα και αντιπροσωπευτικά δεδομένα και όχι περισσότερα αλλά αβέβαια. Η αβεβαιότητα, στην περίπτωση αυτή, περιλαμβάνει σφάλματα που είναι συνυφασμένα με τη συνιστώμενη άμεση χρήση των μετρούμενων τιμών υπολειμματικής ραδιενέργειας του ^{14}C (βλέπε κατωτέρω). Σε ορισμένες περιπτώσεις, όταν η αποικοδόμηση ακολουθεί διφασικό σχήμα, είναι δυνατόν να ενδείκνυται ο υπολογισμός δύο διαφορετικών σταθερών ταχύτητας. Για το σκοπό αυτό, οριοθετούνται δύο διαφορετικές φάσεις της καμπύλης αποικοδόμησης. Η σταθερά ταχύτητας k και ο χρόνος υποδιπλασιασμού $t_{½} = \ln 2/k$ πρέπει να υπολογίζονται για καθεμία από τις πολλαπλές φιάλες, σε περίπτωση που λαμβάνονται επιμέρους δείγματα από την ίδια φιάλη, ή χρησιμοποιώντας μέσες τιμές, όταν συλλέγεται ολόκληρο το περιεχόμενο μίας φιάλης σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας (βλέπε παράγραφο 1.8.9.2 τελευταίο εδάφιο). Εφόσον εφαρμόζεται η πρώτη από τις προαναφερόμενες διαδικασίες, η σταθερά ταχύτητας και ο χρόνος υποδιπλασιασμού θα πρέπει να αναφέρονται για καθεμία από τις επιμέρους πολλαπλές φιάλες και ως μέση τιμή με τυπικό σφάλμα. Εάν έχουν χρησιμοποιηθεί υψηλές συγκεντρώσεις ελεγχόμενης ουσίας, η καμπύλη αποικοδόμησης είναι δυνατόν να αποκλίνει σημαντικά από την ευθεία γραμμή (ημιλογαριθμικό διάγραμμα) και να μην ισχύει η κινητική πρώτης τάξεως. Στην περίπτωση αυτή, ο προσδιορισμός του χρόνου υποδιπλασιασμού είναι επομένως άσκοπος. Ωστόσο, για μια περιορισμένη περιοχή δεδομένων, είναι δυνατόν να εφαρμοστεί κινητική ψευδοπρώτης τάξεως και να υπολογιστεί η ημιπερίοδος αποικοδόμησης DT_{50} (χρόνος αποικοδόμησης κατά 50 %). Θα πρέπει να λαμβάνεται ωστόσο υπόψη ότι η χρονική πορεία της αποικοδόμησης πέρα από την επιλεγείσα περιοχή δεδομένων δεν μπορεί να προβλεφθεί βάσει της DT_{50}, η οποία περιγράφει μόνο ένα συγκεκριμένο σύνολο δεδομένων. Υπάρχουν προσιτά αναλυτικά εργαλεία που διευκολύνουν τους στατιστικούς υπολογισμούς και την προσαρμογή των καμπυλών και συνιστάται η χρήση λογισμικού του είδους αυτού.

▼M1

Σε περίπτωση που εκτελούνται ειδικές χημικές αναλύσεις, οι σταθερές ταχύτητας και οι χρόνοι υποδιπλασιασμού για την πρωταρχικήαποικοδόμηση υπολογίζονται όπως περιγράφεται ανωτέρω για τη συνολική ανοργανοποίηση. Εάν η πρωταρχική αποικοδόμηση είναι το περιοριστικό στάδιο, μπορούν ορισμένες φορές να χρησιμοποιηθούν σημεία δεδομένων από ολόκληρη την πορεία της αποικοδόμησης, διότι πρόκειται για άμεσες μετρήσεις, σε αντίθεση με τις μετρήσεις της ραδιενέργειας του ^{14}C.

Όταν χρησιμοποιούνται ουσίες σημασμένες με ^{14}C, το ισοζύγιο μάζας θα πρέπει να εκφράζεται σε ποσοστό επί τοις εκατό της χρησιμοποιηθείσας αρχικής συγκέντρωσης, τουλάχιστον στο τέλος της δοκιμής.

2.1.2. **Υπολειμματική ραδιενέργεια**

Κατά τη βιοαποικοδόμηση του σημασμένου με ^{14}C τμήματος μιας οργανικής ουσίας, το μεγαλύτερο μέρος του ^{14}C μετατρέπεται σε $^{14}CO_2$, ενώ ένα άλλο μέρος καταναλώνεται για την ανάπτυξη της βιομάζας ή/και τη σύνθεση εξωκυτταρικών μεταβολιτών. Επομένως, η πλήρης «τελική» βιοαποικοδόμηση μιας ουσίας δεν συνεπάγεται 100 % μετατροπή του άνθρακά της σε $^{14}CO_2$. Ο ^{14}C που είναι ενσωματωμένος στα σχηματιζόμενα με βιοσύνθεση προϊόντα αποδεσμεύεται στη συνέχεια βραδέως ως $^{14}CO_2$, ως αποτέλεσμα «δευτερογενούς ανοργανοποίησης». Για τους λόγους αυτούς, τα διαγράμματα της υπολειμματικής ραδιενέργειας του οργανικού ^{14}C (που μετράται μετά την απομάκρυνση του CO_2) ή του παραγόμενου $^{14}CO_2$ ως προς το χρόνο εμφανίζουν «ουρά» μετά την ολοκλήρωση της αποικοδόμησης. Αυτό δυσχεραίνει την κινητική ερμηνεία των δεδομένων και, ως εκ τούτου, για τον υπολογισμό της σταθεράς ταχύτητας αποικοδόμησης θα πρέπει κανονικά να χρησιμοποιείται μόνο το αρχικό τμήμα της καμπύλης (μετά το τέλος της λανθάνουσας φάσης και πριν επιτευχθεί αποικοδόμηση κατά 50 % περίπου). Όταν η ελεγχόμενη ουσία αποικοδομείται, η συνολική υπολειμματική ραδιενέργεια του οργανικού ^{14}C είναι πάντα υψηλότερη από τη ραδιενέργεια του ^{14}C που σχετίζεται με την εναπομένουσα ανέπαφη ελεγχόμενη ουσία. Εάν η αποικοδόμηση της ελεγχόμενης ουσίας αποτελεί αντίδραση πρώτης τάξεως και ένα σταθερό κλάσμα α ανοργανοποιείται σε CO_2, η αρχική κλίση της καμπύλης εξαφάνισης του ^{14}C (ολικός οργανικός άνθρακας ^{14}C ως προς το χρόνο) θα είναι απλάσια της κλίσης της αντίστοιχης καμπύλης για τη συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας (ή, ακριβέστερα, του τμήματος της ελεγχόμενης ουσίας που είναι σημασμένο με ^{14}C). Η χρησιμοποίηση των μετρήσεων της συνολικής ραδιενέργειας του οργανικού ^{14}C, χωρίς διόρθωση, συνεπάγεται ότι η υπολογιζόμενη σταθερά ταχύτητας αποικοδόμησης θα είναι χαμηλότερη. Στην βιβλιογραφία υπό (2)(9)(10)(11) περιγράφονται διαδικασίες για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων της ελεγχόμενης ουσίας από τις μετρηθείσες ραδιοχημικές δραστικότητες με βάση διάφορες απλουστευτικές υποθέσεις. Οι διαδικασίες αυτές εφαρμόζονται με ιδιαίτερη ευκολία στην περίπτωση των ταχέως αποικοδομήσιμων ουσιών.

2.2. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Εφόσον προκύψει ότι η σταθερά k δεν εξαρτάται από την προστιθέμενη συγκέντρωση (δηλαδή όταν η υπολογισθείσα σταθερά k είναι περίπου η ίδια για τις διάφορες συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας), μπορεί να υποτεθεί ότι η σταθερά ταχύτητας πρώτης τάξεως είναι αντιπροσωπευτική των συνθηκών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη δοκιμή δηλαδή της ελεγχόμενης ουσίας, του δείγματος νερού και της θερμοκρασίας της δοκιμής. Ένας εμπειρογνώμονας θα πρέπει να κρίνει κατά πόσον είναι δυνατή η γενίκευση ή παρεκβολή των αποτελεσμάτων της δοκιμής σε άλλα συστήματα. Σε περίπτωση που η ελεγχόμενη ουσία χρησιμοποιείται σε υψηλές συγκεντρώσεις και για τον λόγο αυτό η αποικοδόμηση δεν ακολουθεί κινητική πρώτης τάξεως, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν για τον απευθείας υπολογισμό της σταθεράς ταχύτητας πρώτης τάξεως ή του αντίστοιχου χρόνου υποδιπλασιασμού. Ωστόσο, τα δεδομένα που προκύπτουν από δοκιμή στην οποία έχουν χρησιμοποιηθεί υψηλές συγκεντρώσεις ελεγχόμενης ουσίας, μπορούν να χρησιμεύσουν για την εκτίμηση του βαθμού της συνολικής ανοργανοποίησης ή/και για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων μετατροπής.

▼M1

Οι ταχύτητες άλλων διεργασιών απώλειας της ουσίας πέραν της βιοαποικοδόμησης (π.χ. υδρόλυση ή εξάτμιση), εφόσον είναι γνωστές, μπορούν να αφαιρεθούν από την ταχύτητα καθαρής απώλειας που καταγράφηκε κατά τη διάρκεια της δοκιμής, ώστε να ληφθεί μία κατά προσέγγιση εκτίμηση της ταχύτητας βιοαποικοδόμησης. Τα σχετικά με την υδρόλυση δεδομένα, επί παραδείγματι, μπορούν να προκύψουν από τον στείρο μάρτυρα ή από παράλληλη δοκιμή, στην οποία χρησιμοποιούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας.

Ο έμμεσος και άμεσος προσδιορισμός του $^{14}CO_2$ (παράγραφος 1.8.9.4 και παράρτημα 3) μπορούν να χρησιμεύσουν μόνο για τον υπολογισμό του βαθμού ανοργανοποίησης της ελεγχόμενης ουσίας σε CO_2. Η ραδιοχρωματογραφία (RAD-TLC) ή η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ποσοτική ανάλυση της σημασμένης με ^{14}C ελεγχόμενης ουσίας και του σχηματισμού σημαντικών προϊόντων μετατροπής (παράγραφος 1.8.9.4 τρίτο εδάφιο). Για τον άμεσο υπολογισμό του χρόνου υποδιπλασιασμού είναι απαραίτητο να μην συνυπάρχουν σημαντικά προϊόντα μετατροπής (οριζόμενα με βάση τη συγκέντρωσή τους, η οποία είναι ≥ 10 % της χρησιμοποιηθείσας ποσότητας ελεγχόμενης ουσίας). Σε περίπτωση παρουσίας σημαντικών προϊόντων μετατροπής, όπως ορίζονται ανωτέρω, απαιτείται λεπτομερής αξιολόγηση των δεδομένων. Αυτή μπορεί να περιλαμβάνει επανάληψη της δοκιμής ή/και ταυτοποίηση των προϊόντων μετατροπής (βλέπε παράγραφο 1.8.9.5 πρώτο εδάφιο), εκτός εάν η πορεία των προϊόντων μετατροπής μπορεί να εκτιμηθεί ευλόγως βάσει προηγούμενης εμπειρίας (π.χ. πληροφοριών για την οδό της αποικοδόμησης). Δεδομένου ότι η αναλογία του άνθρακα της ελεγχόμενης ουσίας που μετατρέπεται σε CO_2 ποικίλλει (εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας και από τα άλλα διαθέσιμα υποστρώματα, τις συνθήκες της δοκιμής και τη μικροβιακή χλωρίδα), η παρούσα δοκιμή δεν επιτρέπει την απευθείας εκτίμηση της τελικής βιοαποικοδόμησης, όπως στην περίπτωση της δοκιμής ελάττωσης του DOC. Το αποτέλεσμα όμως είναι ανάλογο εκείνου που λαμβάνεται με τη δοκιμή αναπνευσιομετρίας. Ο βαθμός ανοργανοποίησης θα είναι επομένως μικρότερος ή ίσος με τον ελάχιστο βαθμό τελικής βιοαποικοδόμησης. Για να ληφθεί πληρέστερη εικόνα της τελικής βιοαποικοδόμησης (ανοργανοποίηση και ενσωμάτωση στη βιομάζα), θα πρέπει να αναλυθεί η κατανομή του ^{14}C μεταξύ των φάσεων στο τέλος της δοκιμής (βλέπε παράρτημα 1). Ο ^{14}C στο σωματιδιακό υλικό θα συνίσταται στον ^{14}C που είναι ενσωματωμένος στη βακτηριακή βιομάζα και στον ^{14}C που έχουν ροφήσει τα οργανικά σωματίδια.

2.3. ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Εάν η ουσία αναφοράς δεν αποικοδομείται εντός του αναμενόμενου χρονικού διαστήματος (το οποίο για την ανιλίνη και το βενζοϊκό νάτριο είναι συνήθως μικρότερο από δύο εβδομάδες), η εγκυρότητα της δοκιμής είναι αμφισβητήσιμη και πρέπει να ελεγχθεί περαιτέρω, ή, εναλλακτικά, θα πρέπει να επαναληφθεί η δοκιμή με νέο δείγμα νερού. Σε μία κυκλική δοκιμή (ring-test) ISO της μεθόδου, στην οποία συμμετείχαν επτά ευρωπαϊκά εργαστήρια, οι προσαρμοσμένες σταθερές ταχύτητας της αποικοδόμησης της ανιλίνης κυμάνθηκαν από 0,3 έως 1,7 ημέρες^{-1} με μέσο όρο 0,8 ημέρες^{-1} στους 20 °C και τυπικό σφάλμα ± 0,4 ημέρες^{-1} ($t_{½}$ = 0,9 ημέρες). Η διάρκεια της λανθάνουσας φάσης ήταν συνήθως 1 έως 7 ημέρες. Τα ύδατα που εξετάστηκαν είχε αναφερθεί ότι περιείχαν βακτηριακή βιομάζα η οποία αντιστοιχούσε σε 10^3 — 10^4 μονάδες σχηματισμού αποικιών (CFU) ανά ml. Οι ταχύτητες αποικοδόμησης στα πλούσια σε θρεπτικά στοιχεία ύδατα της κεντρικής Ευρώπης ήταν μεγαλύτερες εκείνων που παρατηρήθηκαν στα ολιγοτροφικά ύδατα της βόρειας Ευρώπης. Το γεγονός αυτό είναι δυνατόν να οφείλεται στη διαφορετική τροφική κατάσταση των εν λόγω υδάτων ή σε προηγούμενη έκθεση σε χημικές ουσίες.

Η συνολική ανάκτηση (ισοζύγιο μάζας) στο τέλος του πειράματος θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 90 % και 110 % για τις ραδιοσημασμένες ουσίες, ενώ, για τις μη σημασμένες ουσίες, η αρχική ανάκτηση κατά την έναρξη του πειράματος θα πρέπει να είναι 70 % έως 110 %. Ωστόσο, οι αναφερόμενες περιοχές τιμών είναι ενδεικτικές και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ως κριτήρια για την αποδοχή της δοκιμής.

▼M1

3. **ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ**

Στην έκθεση της δοκιμής πρέπει να αναφέρεται σαφώς ο τύπος της μελέτης — πελαγική δοκιμή ή δοκιμή με εναιώρημα ιζήματος — και να περιλαμβάνονται τουλάχιστον τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη ουσία και ουσία(ες) αναφοράς:

— κοινές ονομασίες, χημικές ονομασίες (κατά IUPAC ή/και ονομασίες CAS), αριθμοί CAS, συντακτικοί τύποι (με ένδειξη της θέσης του ^{14}C σε περίπτωση που χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένη ουσία) και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης ουσίας και της ουσίας αναφοράς (βλέπε παραγράφους 1.5 και 1.6),

— χημικές ονομασίες, αριθμοί CAS, συντακτικοί τύποι (με ένδειξη της θέσης του ^{14}C σε περίπτωση που χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένη ουσία) και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων μετατροπής,

— καθαρότητα (προσμείξεις) της ελεγχόμενης ουσίας και της ή των ουσιών αναφοράς,

— ραδιοχημική καθαρότητα της σημασμένης χημικής ουσίας και ειδική ραδιενέργεια (κατά περίπτωση).

Επιφανειακά ύδατα:

Πρέπει να παρέχονται τουλάχιστον τα ακόλουθα στοιχεία σχετικά με το ληφθέν δείγμα νερού:

— θέση και περιγραφή του χώρου δειγματοληψίας συμπεριλαμβανομένου, εφόσον είναι δυνατόν, του ιστορικού της μόλυνσης,

— ημερομηνία και χρόνος δειγματοληψίας,

— θρεπτικά στοιχεία (ολικό N, αμμώνιο, νιτρώδη, νιτρικά, ολικός P, διαλελυμένα ορθοφωσφορικά),

— βάθος από το οποίο έχει συλλεγεί το δείγμα,

— εμφάνιση του δείγματος (π.χ. χρώμα και θολερότητα),

— διαλελυμένος οργανικός άνθρακας (DOC) και ολικός οργανικός άνθρακας (TOC),

— βιολογικώς απαιτούμενο οξυγόνο (BOD),

— θερμοκρασία και pH στον τόπο και χρόνο δειγματοληψίας,

— οξυγόνο ή οξειδοαναγωγικό δυναμικό (υποχρεωτικό μόνο εφόσον οι αερόβιες συνθήκες δεν είναι προφανείς),

— αλατότητα ή αγωγιμότητα (για τα θαλάσσια και τα υφάλμυρα ύδατα),

— αιωρούμενα στερεά (σε περίπτωση θολερού δείγματος),

— ενδεχομένως, άλλες σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τον τόπο της δειγματοληψίας κατά το χρόνο διενέργειάς της (π.χ. τρέχοντα ή ιστορικά δεδομένα για την ταχύτητα ροής ποταμών ή θαλάσσιων ρευμάτων, για σημαντικές απορρίψεις στην περιοχή και τα είδη των απορρίψεων αυτών, τις καιρικές συνθήκες πριν από το χρόνο δειγματοληψίας),

και προαιρετικά:

— μικροβιακή βιομάζα (π.χ. άμεση καταμέτρηση με πορτοκαλί της ακριδίνης ή μονάδες σχηματισμού αποικιών),

▼M1

— ανόργανος άνθρακας,

— συγκέντρωση χλωροφύλλης-α ως ειδικό μέτρο της βιομάζας φυκών.

Εάν διενεργείται δοκιμή με εναιώρημα ιζήματος, θα πρέπει να παρέχονται επιπλέον τα ακόλουθα στοιχεία:

— βάθος από το οποίο έχει συλλεγεί το ίζημα,

— εμφάνιση του ιζήματος (π.χ. χρωματισμένο, λασπώδες, αργιλώδες ή αμμώδες),

— υφή (π.χ. ποσοστό επί τοις εκατό αδρομερούς άμμου, λεπτής άμμου, ιλύος και αργίλου),

— ξηρό βάρος, σε g/l, των αιωρούμενων στερεών, συγκέντρωση ολικού οργανικού άνθρακα (TOC) ή απώλεια βάρους κατά την ανάφλεξη, ως μέτρο της περιεχόμενης οργανικής ύλης,

— pH,

— οξυγόνο ή οξειδοαναγωγικό δυναμικό (υποχρεωτικό μόνον εφόσον οι αερόβιες συνθήκες δεν είναι προφανείς),

Συνθήκες δοκιμής:

— χρόνος που μεσολάβησε από τη δειγματοληψία μέχρι τη χρήση του δείγματος στην εργαστηριακή δοκιμή, αποθήκευση και προκατεργασία του δείγματος, ημερομηνίες διεξαγωγής των μελετών,

— ποσότητα χρησιμοποιηθείσας ελεγχόμενης ουσίας, συγκέντρωση δοκιμής και ουσία αναφοράς,

— τεχνική εισαγωγής της ελεγχόμενης ουσίας, συμπεριλαμβανομένης της τυχόν χρήσης διαλυτών,

— όγκος των χρησιμοποιηθέντων επιφανειακών υδάτων και του ιζήματος (εφόσον χρησιμοποιήθηκε) και όγκος του δείγματος που ελήφθη για ανάλυση σε κάθε διάστημα,

— περιγραφή του χρησιμοποιηθέντος συστήματος δοκιμής,

εφόσον δεν επιβάλλεται να διατηρούνται συνθήκες σκότους, πληροφορίες για το «διάχυτο φως»,

— πληροφορίες σχετικά με την ή τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των στείρων μαρτύρων (π.χ. θερμοκρασία, χρόνος και αριθμός κατεργασιών σε αυτόκλειστο),

— θερμοκρασία επώασης,

— πληροφορίες σχετικά με τις τεχνικές ανάλυσης και την ή τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για τις ραδιοχημικές μετρήσεις, καθώς και για τον έλεγχο του ισοζυγίου μάζας και τον προσδιορισμό της κατανομής μεταξύ των φάσεων (εφόσον διενεργήθηκε),

— πλήθος προσδιορισμών (replicates).

Αποτελέσματα:

— ποσοστά ανάκτησης (βλέπε παράγραφο 1.7.1),

— επαναληπτικότητα και ευαισθησία των μεθόδων ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν, συμπεριλαμβανομένων του ορίου ανίχνευσης (LOD) και του ορίου ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) (βλέπε παράγραφο 1.7.2),

▼M1

— όλα τα μετρηθέντα δεδομένα (συμπεριλαμβανομένων των χρονικών σημείων δειγματοληψίας) και οι υπολογισθείσες τιμές, υπό μορφή πίνακα, καθώς και οι καμπύλες αποικοδόμησης• αναφέρεται για κάθε συγκέντρωση δοκιμής και για καθεμία από τις πολλαπλές φιάλες, ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης της κλίσης του λογαριθμικού διαγράμματος, η εκτιμηθείσα λανθάνουσα φάση και μία σταθερά ταχύτητας πρώτης τάξεως ή ψευδο-πρώτης τάξεως (εφόσον είναι δυνατόν), καθώς και η αντίστοιχη ημιπερίοδος αποικοδόμησης (ή ο χρόνος υποδιπλασιασμού, t_{50}),

— οι σημαντικές τιμές ως μέσοι όροι των αποτελεσμάτων που προέκυψαν για καθεμία από τις πολλαπλές φιάλες, π.χ. διάρκεια της λανθάνουσας φάσης, σταθερά ταχύτητας αποικοδόμησης και ημιπερίοδος αποικοδόμησης (ή t_{50}),

— χαρακτηρισμός του συστήματος ως κατάλληλου ή μη, με κριτήρια την όψη της καμπύλης αποικοδόμησης και την ενδεχόμενη επίδραση της συγκέντρωσης δοκιμής,

— τα αποτελέσματα του τελικού ελέγχου του ισοζυγίου μάζας και τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της κατανομής μεταξύ των φάσεων (εφόσον διατίθενται),

— το κλάσμα του ανοργανοποιημένου ^{14}C και, εφόσον εκτελούνται ειδικές αναλύσεις, ο τελικός βαθμός πρωταρχικής αποικοδόμησης,

— ταυτοποίηση, μοριακή συγκέντρωση και ποσοστό επί τοις εκατό των προϊόντων που χρησιμοποιήθηκαν και των σημαντικών προϊόντων μετατροπής (βλέπε παράγραφο 1.8.9.5 πρώτο εδάφιο), κατά περίπτωση,

— προτεινόμενη πορεία μετατροπής, κατά περίπτωση,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water — Simulation Biodegradation Test

2. ISO/DIS 14592-1 (1999) Water quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations — Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

3. Μέθοδος δοκιμής Γ.23. Αερόβια και αναερόβια μετατροπή στο έδαφος.

4. Μέθοδος δοκιμής Γ.24. Αερόβια και αναερόβια μετατροπή σε υδατικά ιζηματικά συστήματα.

5. OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Paris.

6. ISO 8245 (1999). Water quality — Guidelines on the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC).

7. ISO 10634 (1995). Ποιότητα νερού — Κατευθυντήριες οδηγίες για την παρασκευή και την επεξεργασία των ελάχιστα υδατοδιαλυτών οργανικών ενώσεων με προοπτική την αξιολόγηση της βιοδιασπασιμότητά τους σε υδατικό περιβάλλον.

8. OECD draft (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No 22 (to be published summer 2000).

▼**M1**

9. Simkins, S. and Alexander, M. (1984). Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. Appl. Environ. Microbiol.47, 394-401.

10. Ingerslev, F. and N. Nyholm. (2000). Shake-flask test for determination of biodegradation rates of ^{14}C-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45, 274-283.

11. ISO/CD 14592-1 (1999). Ring test report: Water Quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations part 1 — report of 1998/1999 ring-test. Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

▼M1

Προσάρτημα 1

Κατανομή του ^{14}C μεταξύ των φάσεων

Προκειμένου να ελεγχθεί η εφαρμοσθείσα διαδικασία, οι συνήθεις μετρήσεις της υπολειμματικής συνολικής ραδιενέργειας του οργανικού ^{14}C (TOA) θα πρέπει να συμπληρωθούν με μετρήσεις του ισοζυγίου μάζας, όπου συμπεριλαμβάνεται ο άμεσος προσδιορισμός του εκλυόμενου $^{14}CO_2$ μετά την παγίδευσή του σε σύστημα απορρόφησης (βλέπε παράρτημα 3). Ο σχηματισμός $^{14}CO_2$ συνιστά, καθευατόν, άμεση απόδειξη βιοαποικοδόμησης, σε αντιδιαστολή με την αβιοτική αποικοδόμηση ή με άλλους μηχανισμούς απώλειας, όπως η εξάτμιση και η ρόφηση. Πρόσθετες χρήσιμες πληροφορίες, χαρακτηριστικές της βιοαποικοδομησιμότητας, μπορούν να ληφθούν από τον προσδιορισμό της κατανομής της TOA μεταξύ της διαλελυμένης φάσης (ραδιενέργεια διαλελυμένου οργανικού ^{14}C, DOA) και της σωματιδιακής φάσης (ραδιενέργεια σωματιδιακού οργανικού ^{14}C, POA), μετά τον διαχωρισμό των σωματιδίων με διήθηση μέσω μεμβράνης ή φυγοκέντρηση. Η POA περιλαμβάνει την ελεγχόμενη ουσία που έχει ροφηθεί στη μικροβιακή βιομάζα ή σε άλλα σωματίδια, καθώς και τον άνθρακα της ελεγχόμενης ουσίας που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση νέου κυτταρικού υλικού και, επομένως, ενσωματώθηκε στο σωματιδιακό κλάσμα της βιομάζας. Ο σχηματιζόμενος διαλελυμένος οργανικός ^{14}C μπορεί να υπολογισθεί με βάση τη DOA στο τέλος της βιοαποικοδόμησης (οριζόντιο τμήμα της καμπύλης της αποικοδόμησης ως προς το χρόνο).

Για την εκτίμηση της κατανομής του υπολειμματικού ^{14}C μεταξύ των φάσεων σε επιλεγμένα δείγματα, τα δείγματα διηθούνται μέσω μεμβράνης από υλικό που δεν προσροφά σημαντικές ποσότητες ελεγχόμενης ουσίας (οι πολυανθρακικοί ηθμοί θεωρούνται κατάλληλοι), με πόρους διαμέτρου 0,22 μm ή 0,45 μm. Εάν η ρόφηση της ελεγχόμενης ουσίας στον ηθμό είναι τόσο σημαντική ώστε να μην μπορεί να αγνοηθεί (πρέπει να ελέγχεται πριν από την έναρξη της δοκιμής), η διήθηση μπορεί να αντικατασταθεί από φυγοκέντρηση σε υψηλή ταχύτητα (2 000 g x 10 min).

Το διήθημα ή το υπερκείμενο υγρό της φυγοκέντρησης υποβάλλεται στη διαδικασία που περιγράφεται στο παράρτημα 3 για τα μη διηθημένα δείγματα. Οι διηθητικές μεμβράνες διαλύονται σε κατάλληλο υγρό σπινθηρισμού και ακολουθεί καταμέτρηση, ως συνήθως, χρησιμοποιώντας, κατά κανόνα, μόνο τη μέθοδο του εξωτερικού προτύπου για να διορθωθεί η αναχαίτιση (quenching) ή μέσο οξείδωσης του δείγματος. Εάν διενεργήθηκε φυγοκέντρηση, παρασκευάζεται εναιώρημα του σβωλοποιημένου σωματιδιακού κλάσματος σε 1-2 ml απεσταγμένου νερού, το οποίο μεταφέρεται στη συνέχεια σε φιαλίδιο σπινθηρισμού. Ακολουθούν δύο εκπλύσεις με 1 ml απεσταγμένου νερού και τα εκπλύματα μεταφέρονται στο φιαλίδιο. Εφόσον χρειάζεται, το εναιώρημα μπορεί να ενσωματωθεί σε πηκτή για καταμέτρηση με υγρό σπινθηρισμό.

▼M1

Προσάρτημα 2

Ημισυνεχής διαδικασία

Για την επαρκή αποικοδόμηση των έμμονων ουσιών ενδέχεται να χρειαστεί παρατεταμένη επώαση επί πολλούς μήνες. Κανονικά, η διάρκεια της δοκιμής δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 60 ημέρες, εκτός εάν τα χαρακτηριστικά του αρχικού δείγματος νερού διατηρούνται με ανανέωση του εναιωρήματος της δοκιμής. Ωστόσο, μπορεί να παραταθεί έως 90 ημέρες, κατ' ανώτατο όριο, χωρίς ανανέωση του εναιωρήματος δοκιμής, εάν η αποικοδόμηση της ελεγχόμενης ουσίας έχει αρχίσει εντός των πρώτων 60 ημερών.

Στη μακράς διαρκείας επώαση, είναι δυνατόν να παρατηρηθεί μείωση της ποικιλίας της μικροβιακής χλωρίδας, εξαιτίας διαφόρων μηχανισμών απώλειας και της ενδεχόμενης εξάντλησης των βασικών θρεπτικών στοιχείων και των πρωτευόντων ανθρακούχων υποστρωμάτων από το δείγμα νερού. Για τον ορθό προσδιορισμό της ταχύτητας αποικοδόμησης των βραδέως αποικοδομούμενων ουσιών συνιστάται, επομένως, η διεξαγωγή ημισυνεχούς δοκιμής. Η δοκιμή θα πρέπει να αρχίζει με ημισυνεχή διαδικασία εφόσον, βάσει προηγούμενης εμπειρίας, αναμένεται ότι θα απαιτηθεί τρίμηνη επώαση για την αποικοδόμηση της ουσίας κατά 20 %. Εναλλακτικά, η κανονική δοκιμή διαλείποντος έργου μπορεί να μετατραπεί σε ημισυνεχή δοκιμή εάν δεν παρατηρηθεί αποικοδόμηση της ελεγχόμενης ουσίας εντός 60 περίπου ημερών δοκιμής με τη διαδικασία διαλείποντος έργου. Η ημισυνεχής διαδικασία μπορεί να διακοπεί και η δοκιμή να συνεχιστεί με τη διαδικασία διαλείποντος έργου, εφόσον καταγραφεί σημαντική αποικοδόμηση (π.χ. > 20 %).

Στην ημισυνεχή δοκιμή, περίπου το ένα τρίτο του όγκου του εναιωρήματος δοκιμής αντικαθίσταται ανά δύο εβδομάδες από νερό που έχει συλλεγεί πρόσφατα, στο οποίο προστίθεται η ελεγχόμενη ουσία στην αρχική της συγκέντρωση. Ομοίως, εφόσον διεξάγεται η προαιρετική δοκιμή με εναιώρημα ιζήματος, προστίθεται στο νερό αναπλήρωσης ίζημα στην αρχική συγκέντρωση (μεταξύ 0,01 και 1 g/l). Κατά τη διεξαγωγή της δοκιμής με εναιώρημα στερεών ιζήματος, έχει σημασία να διατηρείται το σύστημα σε πλήρη διασπορά και κατά τη διάρκεια της ανανέωσης του νερού και ο χρόνος παραμονής να είναι ο ίδιος για τα στερεά και για το νερό, διότι, στην αντίθετη περίπτωση, δεν θα υφίσταται πλέον η επιδιωκόμενη ομοιότητα με ομοιογενές υδατικό σύστημα χωρίς καθορισμένες φάσεις. Για το λόγο αυτό, όταν εφαρμόζεται η ημισυνεχής διαδικασία, είναι προτιμότερο να επιλέγεται αρχική συγκέντρωση εναιωρούμενου ιζήματος στο χαμηλότερο άκρο της καθορισμένης περιοχής.

Η προδιαγραφή για την προσθήκη ελεγχόμενης ουσίας συνεπάγεται ότι δεν σημειώνεται υπέρβαση της αρχικής συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας με τη μερική ανανέωση του εναιωρήματος δοκιμής και, ως εκ τούτου, αποφεύγεται η προσαρμογή που διαπιστώνεται συχνά με υψηλές συγκεντρώσεις ελεγχόμενης ουσίας. Δεδομένου ότι η διαδικασία περιλαμβάνει και επανεποφθαλμισμό και συμπλήρωση των εξαντληθέντων θρεπτικών στοιχείων και πρωτευόντων υποστρωμάτων, η μικροβιακή ποικιλότητα αποκαθίσταται και η διάρκεια της δοκιμής μπορεί να παραταθεί θεωρητικά επ'άπειρον. Αξίζει να σημειωθεί ότι, όταν εφαρμόζεται η ημισυνεχής διαδικασία, η υπολειμματική συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να διορθωθεί για να ληφθούν υπόψη οι προστιθέμενες και αφαιρούμενες ποσότητες ελεγχόμενης ουσίας σε κάθε ανανέωση. Στις περιπτώσεις ελάχιστης ρόφησης της ένωσης, μπορεί να χρησιμοποιείται αδιακρίτως είτε η συνολική συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας είτε η συγκέντρωση της διαλελυμένης ουσίας. Η ρόφηση είναι αμελητέα (< 5 %) υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες (0,1-1 g στερεών/l) για ουσίες με log Kow < 3 (ισχύει για υδρόβιες, λιπόφιλες ενώσεις). Αυτό επεξηγείται με το ακόλουθο παράδειγμα υπολογισμού. Χονδρικά, 0,1 g/l στερεών αντιστοιχεί σε 10 mg άνθρακα ανά λίτρο (κλάσμα άνθρακα, $f_C = 0,01$). Εάν:

Log K_{ow} (της ελεγχόμενης ουσίας) = 3

$K_{oc} = 0,42 \times K_{ow}$

Συντελεστής κατανομής, $K_d = f_C \times K_{oc}$,

τότε, το διαλελυμένο κλάσμα της συνολικής συγκέντρωσης (C-νερού (C_w)/C-συνολικό (C_t) ισούται με:

$C_w/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1(1 + K_{oc} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0,42 \times 10^3 \times 0,01 \times 0,1 \times 10^{-3}) = 0,999$

▼M1

Προσάρτημα 3

Προσδιορισμός του $^{14}CO_2$

Έμμεσος προσδιορισμός του $^{14}CO_2$

Για μετρήσεις καθημερινής πρακτικής και εφόσον η ελεγχόμενη ουσία δεν είναι πτητική και δεν μετατρέπεται σε πτητικά προϊόντα μετατροπής, η άμεση μέθοδος αποτελεί, κατά κανόνα, την ταχύτερη και ακριβέστερη μέθοδο προσδιορισμού. Αδιήθητα δείγματα όγκου 5 ml, επί παραδείγματι, μεταφέρονται σε φιαλίδια σπινθηρισμού. Η ενδεδειγμένη αρχική ραδιενέργεια των δειγμάτων κυμαίνεται μεταξύ 5 000 dpm και 10 000 dpm (80-170 Bq), ενώ η ελάχιστη αρχική ραδιενέργεια είναι περίπου 1 000 dpm. Το CO_2 θα πρέπει να απομακρυνθεί μετά από οξίνιση έως pH 2-3 με 1-2 σταγόνες πυκνού H_3PO_4 ή HCl. Η απομάκρυνση του CO_2 μπορεί να επιτευχθεί με διοχέτευση φυσαλίδων αέρα επί μισή έως μία ώρα περίπου. Άλλος τρόπος είναι η ζωηρή ανατάραξη των φιαλιδίων επί 1-2 ώρες (επί παραδείγματι στη συσκευή ανατάραξης μικροτριβιλίων) ή ηπιότερη ανατάραξη επί μία νύκτα. Η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας απομάκρυνσης του CO_2 πρέπει να ελέγχεται (παρατείνοντας τη διάρκεια του αερισμού ή της ανατάραξης). Στη συνέχεια, προστίθεται υγρό σπινθηρισμού, κατάλληλο για την απαρίθμηση σε υδάτινα δείγματα, το δείγμα ομοιογενοποιείται σε αναδευτήρα περιδίνισης και η ραδιενέργεια προσδιορίζεται με απαρίθμηση υγρού σπινθηρισμού, αφού αφαιρεθεί η ραδιενέργεια υποβάθρου που διαπιστώθηκε κατά τη δοκιμή με τυφλούς μάρτυρες (F_B). Εφόσον το νερό δοκιμής δεν έχει ιδιαίτερα έντονο χρώμα ή υψηλή συγκέντρωση σωματιδίων, τα δείγματα παρουσιάζουν κανονικά ομοιόμορφη αναχαίτιση και αρκεί η διόρθωση για την αναχαίτιση με τη μέθοδο του εξωτερικού προτύπου. Σε περίπτωση που το νερό δοκιμής έχει έντονο χρώμα, μπορεί να χρειαστεί διόρθωση για την αναχαίτιση με χρήση εσωτερικού προτύπου. Εάν η συγκέντρωση των σωματιδίων είναι υψηλή, ενδέχεται να μην είναι δυνατόν να επιτευχθεί ομοιογένεια του διαλύματος ή της πηκτής ή να υπάρχει μεγάλη διαφορά αναχαίτισης μεταξύ των δειγμάτων. Στην περίπτωση αυτή, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος απαρίθμησης που περιγράφεται κατωτέρω για τους πολτούς δοκιμής. Όταν πρόκειται για δοκιμή με εναιώρημα ιζήματος, μπορεί να διενεργηθεί έμμεση μέτρηση του $^{14}CO_2$, λαμβάνοντας ομοιογενές δείγμα όγκου 10 ml από το υδατικό εναιώρημα δοκιμής και διαχωρίζοντας τις φάσεις με φυγοκέντριση σε κατάλληλη ταχύτητα (π.χ. 40 000 m/s^2 επί 15 λεπτά). Η υδατική φάση υποβάλλεται κατόπιν στη διαδικασία που περιγράφεται ανωτέρω. Η ραδιενέργεια του ^{14}C στη σωματιδιακή φάση (POA) προσδιορίζεται σχηματίζοντας νέο εναιώρημα του ιζήματος σε μικρό όγκο απεσταγμένου νερού, το οποίο μεταφέρεται σε φιαλίδια σπινθηρισμού, όπου προστίθεται υγρό σπινθηρισμού ώστε να σχηματιστεί πηκτή (διατίθενται για το σκοπό αυτό ειδικά υγρά σπινθηρισμού). Ανάλογα με το είδος των σωματιδίων (π.χ. περιεκτικότητα σε οργανικό υλικό), μπορεί να είναι εφικτή η διάσπαση του δείγματος με διαλύτη ιστών επί μία νύχτα και, στη συνέχεια, η ομοιογενοποίησή του με τη βοήθεια αναδευτήρα περιδίνισης πριν προστεθεί το υγρό σπινθηρισμού. Εναλλακτικά, η POA μπορεί να προσδιοριστεί με καύση σε περίσσεια οξυγόνου χρησιμοποιώντας ένα μέσο οξείδωσης του δείγματος. Κατά την απαρίθμηση, πρέπει να περιλαμβάνονται πάντα εσωτερικά πρότυπα, ενώ ενδέχεται να χρειαστούν διορθώσεις για την αναχαίτιση με την προσθήκη εσωτερικού προτύπου για κάθε επιμέρους δείγμα.

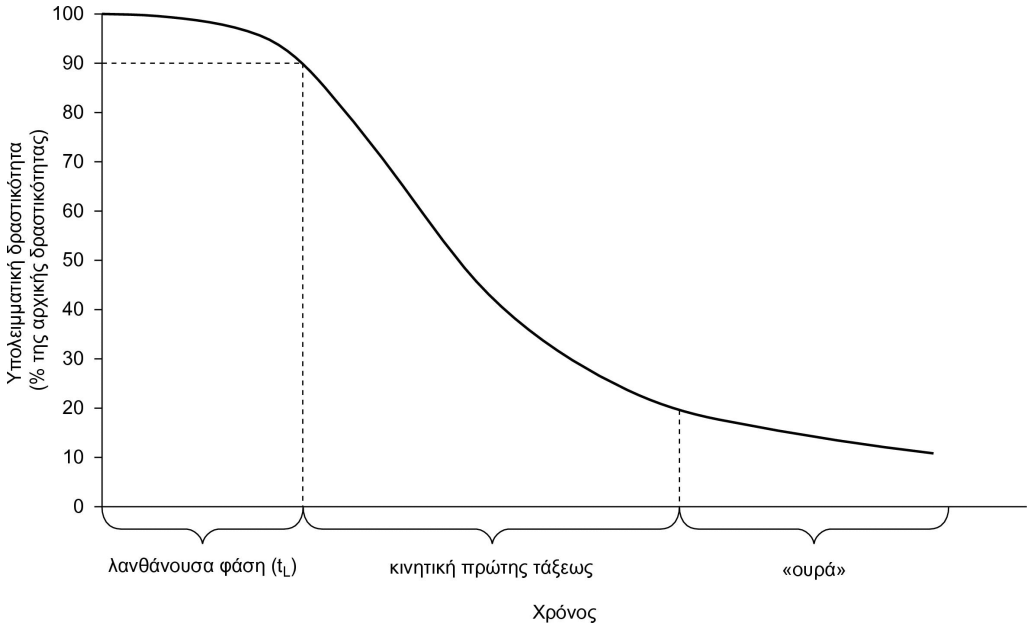
Άμεσος προσδιορισμός του $^{14}CO_2$

Εάν εκτελείται άμεση μέτρηση του εκλυόμενου $^{14}CO_2$, απαιτείται προετοιμασία περισσοτέρων φιαλών στην αρχή της δοκιμής, συλλογή του περιεχομένου των δοκιμαστικών φιαλών σε κάθε σημείο μέτρησης μετά από οξίνισή του έως pH 2-3 και συλλογή του $^{14}CO_2$ σε εσωτερικό (τοποθετούμενο σε κάθε δοκιμαστική φιάλη στην αρχή της δοκιμής) ή εξωτερικό σύστημα απορρόφησης. Για τον σκοπό αυτό είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν άλκαλι (π.χ. διάλυμα NaOH 1 N, ή σφαιρίδιο NaOH), αιθανολαμίνη ή αιθανολαμινούχο υλικό, καθώς και τα διαθέσιμα στο εμπόριο απορροφητικά υλικά. Οι χρησιμοποιούμενες για τον άμεσο προσδιορισμό του $^{14}CO_2$ φιάλες πρέπει να είναι πωματισμένες, επί παραδείγματι, με διαφράγματα από βουτυλοκαουτσούκ.

▼**M1**

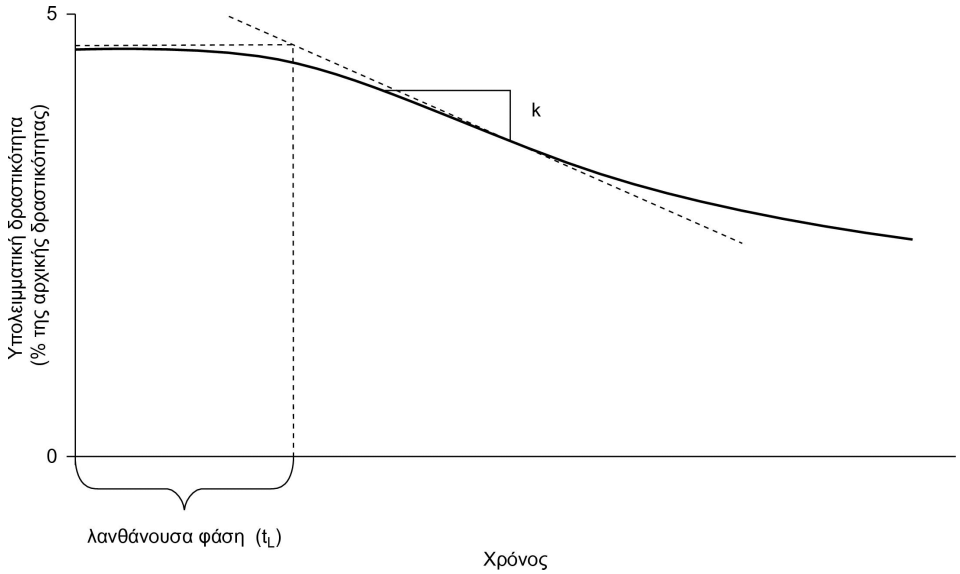
Σχήμα 1α

Παράδειγμα αριθμητικού διαγράμματος δεδομένων (υπολειμματική δραστικότητα ως προς το χρόνο)



Σχήμα 1β

Παράδειγμα ημιλογαριθμικού διαγράμματος δεδομένων (λογάριθμος της υπολειμματικής δραστικότητας ως προς το χρόνο)



▼M6

Γ.26. ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ LEMNA

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 221 του ΟΟΣΑ (2006). Έχει σχεδιαστεί με σκοπό την εκτίμηση της τοξικότητας χημικών ουσιών στα υδρόβια φυτά των γλυκών υδάτων του γένους *Lemna* (κοινώς, λέμνα ή φακή του νερού). Βασίζεται σε υφιστάμενες μεθόδους (1)(2)(3)(4)(5)(6), αλλά περιλαμβάνει τροποποιήσεις αυτών των μεθόδων, οι οποίες αποτυπώνουν τα αποτελέσματα πρόσφατων ερευνητικών εργασιών και διαβουλεύσεων για ορισμένα ζητήματα καίριας σημασίας. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών επικυρώθηκε με διεθνή δοκιμή δακτυλίου (ring test) (7).

2. Στην παρούσα μέθοδο περιγράφεται η διεξαγωγή δοκιμών τοξικότητας με χρήση των ειδών *Lemna gibba* και *Lemna minor*, που έχουν αμφότερα μελετηθεί εκτενώς και αποτελούν το αντικείμενο των προαναφερόμενων προτύπων. Η συστηματική κατάταξη του *Lemna spp.* είναι δύσκολη, γιατί περιπλέκεται από την ύπαρξη πληθώρας φαινοτύπων. Παρόλο που μπορεί να παρουσιαστεί γενετική μεταβλητότητα στην απόκριση της λέμνας σε τοξικούς παράγοντες, τα σχετικά με αυτό το αίτιο μεταβλητότητας δεδομένα δεν επαρκούν, προς το παρόν, ώστε να υποδειχθεί η χρήση συγκεκριμένου κλώνου κατά την εφαρμογή της παρούσας μεθόδου δοκιμών. Σημειωτέον ότι η δοκιμή δεν διεξάγεται με αξενικές καλλιέργειες, λαμβάνονται όμως μέτρα σε διάφορα στάδια της διαδικασίας δοκιμής ώστε να ελαχιστοποιείται η μόλυνση από άλλους οργανισμούς.

3. Περιγράφεται λεπτομερώς η διεξαγωγή δοκιμών με ανανέωση (ημιστατικό και συνεχούς ροής σύστημα) και χωρίς ανανέωση (στατικό σύστημα) του διαλύματος δοκιμής. Ανάλογα με τους στόχους της δοκιμής και τις απαιτήσεις των κανονιστικών ρυθμίσεων, συνιστάται να εξετάζεται το ενδεχόμενο εφαρμογής των ημιστατικών και των συνεχών τεχνικών, π.χ. στην περίπτωση των χημικών ουσιών που χάνονται ταχέως από το διάλυμα, λόγω εξάτμισης, φωτοαποικοδόμησης, καθίζησης ή βιοαποικοδόμησης. Περαιτέρω καθοδήγηση παρέχεται στη δημοσίευση (8).

4. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

5. Εκθετικές καλλιέργειες φυτών του γένους *Lemna* αφήνονται να αναπτυχθούν ως μονοκαλλιέργειες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας για περίοδο επτά ημερών. Σκοπός της δοκιμής είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός των επιδράσεων της χημικής ουσίας στη βλαστητική αύξηση κατά την ανωτέρω περίοδο, με βάση εκτιμήσεις των επιλεγμένων μετρούμενων μεταβλητών. Ο αριθμός θαλλών είναι η πρωταρχική μετρούμενη μεταβλητή. Μετράται επίσης τουλάχιστον μία ακόμη μεταβλητή (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος), επειδή ορισμένες χημικές ουσίες είναι δυνατόν να έχουν πολύ μεγαλύτερη επίδραση σε άλλες μετρούμενες μεταβλητές απ' όση στον αριθμό θαλλών. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιδράσεων της χημικής ουσίας, συγκρίνεται η ανάπτυξη στα διαλύματα δοκιμής με εκείνη των μαρτύρων και προσδιορίζεται η συγκέντρωση που προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης κατά συγκεκριμένο ποσοστό x % (π.χ. 50 %), η οποία εκφράζεται ως EC_x (π.χ. EC_{50}).

6. Το τελικό σημείο της δοκιμής είναι η αναστολή της ανάπτυξης, εκφραζόμενη ως λογαριθμική αύξηση της μετρούμενης μεταβλητής (μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης) κατά τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης. Από τους μέσους ειδικούς ρυθμούς ανάπτυξης που καταγράφονται για μια σειρά διαλυμάτων δοκιμής, προσδιορίζεται η συγκέντρωση που προκαλεί αναστολή του ρυθμού ανάπτυξης κατά συγκεκριμένο ποσοστό x % (π.χ. 50 %) και εκφράζεται ως E_rC_x (π.χ. E_rC_{50}).

7. Μία επιπλέον μεταβλητή απόκρισης που χρησιμοποιείται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών είναι η απόδοση, η οποία ενδέχεται να απαιτείται για τη συμμόρφωση με ειδικές κανονιστικές απαιτήσεις σε ορισμένες χώρες. Η απόδοση ορίζεται ως η διαφορά των μετρούμενων μεταβλητών στο τέλος της περιόδου έκθεσης μείον τις μετρούμενες μεταβλητές στην αρχή της περιόδου έκθεσης. Από την απόδοση που καταγράφεται για μια σειρά διαλυμάτων δοκιμής, προσδιορίζεται η συγκέντρωση που προκαλεί αναστολή της απόδοσης κατά συγκεκριμένο ποσοστό x % (π.χ. 50 %) και εκφράζεται ως E_yC_x (π.χ. E_yC_{50}).

▼M6

8. Επιπροσθέτως, μπορούν να προσδιοριστούν στατιστικά η κατώτατη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης (LOEC) και η συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC).

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

9. Θα πρέπει να υπάρχει αναλυτική μέθοδος επαρκούς ευαισθησίας για τον ποσοτικό προσδιορισμό της χημικής ουσίας στο θρεπτικό μέσο δοκιμής.

10. Στις σχετικές με την υπό δοκιμή χημική ουσία πληροφορίες που μπορεί να είναι χρήσιμες για τον καθορισμό των συνθηκών δοκιμής περιλαμβάνονται ο συντακτικός τύπος, η καθαρότητα, η υδατοδιαλυτότητα, η σταθερότητα στο νερό και στο φως, οι σταθερές pK_a και K_{ow}, η τάση ατμών και η βιοαποικοδομησιμότητα. Η υδατοδιαλυτότητα και η τάση ατμών μπορούν να χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της σταθεράς του νόμου του Henry, η οποία δείχνει αν είναι πιθανόν να σημειωθούν σημαντικές απώλειες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στη διάρκεια της δοκιμής. Με τον τρόπο αυτό κρίνεται ευκολότερα αν πρέπει να ληφθούν ιδιαίτερα μέτρα για τον έλεγχο των εν λόγω απωλειών. Σε περίπτωση που τα στοιχεία για τη διαλυτότητα και τη σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας είναι αβέβαια, συνιστάται να εκτιμώνται οι ιδιότητες αυτές υπό τις συνθήκες της δοκιμής, δηλαδή με το θρεπτικό μέσο και σε συνθήκες θερμοκρασίας και φωτισμού που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή.

11. Όταν ο έλεγχος του pH του θρεπτικού μέσου δοκιμής έχει ιδιαίτερη σημασία, π.χ. στις δοκιμές μετάλλων ή ασταθών στην υδρόλυση χημικών ουσιών, συνιστάται η προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος στο θρεπτικό μέσο (βλ. σημείο 21). Περαιτέρω καθοδήγηση για τον έλεγχο χημικών ουσιών που οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες δυσχεραίνουν τη δοκιμή τους παρέχονται στη δημοσίευση (8).

ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

12. Για να είναι έγκυρη η δοκιμή, ο χρόνος διπλασιασμού του αριθμού θαλλών στον μάρτυρα πρέπει να είναι μικρότερος από 2,5 ημέρες (60 ώρες), τιμή που αντιστοιχεί περίπου σε επταπλασιασμό εντός επτά ημερών και σε μέσο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης 0,275 ημέρα^{-1}. Με τα θρεπτικά μέσα και τις συνθήκες δοκιμής που περιγράφονται στη παρούσα μέθοδο, το κριτήριο αυτό είναι δυνατόν να πληρούται σε στατικό σύστημα δοκιμής (5). Προβλέπεται επίσης ότι αυτό το κριτήριο θα πληρούται υπό συνθήκες ημιστατικής και συνεχούς δοκιμής. Ο υπολογισμός του χρόνου διπλασιασμού παρατίθεται στο σημείο 49.

ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

13. Είναι δυνατόν να υποβληθούν σε δοκιμή μία ή περισσότερες ουσίες αναφοράς, όπως η 3,5-διχλωροφαινόλη που χρησιμοποιήθηκε στη διεθνή δοκιμή δακτυλίου (ring test) (7), προκειμένου να ελεγχθεί η διαδικασία δοκιμής. Είναι σκόπιμο η ουσία αναφοράς να υποβάλλεται σε δοκιμές τουλάχιστον δύο φορές ετησίως ή, σε περίπτωση δοκιμών που διεξάγονται με μικρότερη συχνότητα, παράλληλα με τον προσδιορισμό της τοξικότητας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Εργαστηριακός εξοπλισμός

14. Όλα τα τεμάχια εξοπλισμού που έρχονται σε επαφή με τα θρεπτικά μέσα δοκιμής πρέπει να είναι κατασκευασμένα από γυαλί ή άλλο χημικώς αδρανές υλικό. Τα γυάλινα σκεύη που χρησιμοποιούνται για καλλιέργεια και δοκιμές θα πρέπει να καθαρίζονται, ώστε να απομακρύνονται οι ξένες χημικές ουσίες που θα μπορούσαν να διεισδύσουν στο θρεπτικό μέσο δοκιμής, και να είναι αποστειρωμένα. Τα δοχεία δοκιμής θα πρέπει να έχουν ικανό πλάτος, ώστε οι θαλλοί των διαφόρων αποικιών στα δοχεία ελέγχου να μπορούν να αναπτυχθούν χωρίς να αλληλεπικαλύπτονται στο τέλος της δοκιμής. Δεν έχει σημασία αν οι ρίζες αγγίζουν τον πυθμένα των δοχείων δοκιμής· συνιστάται όμως κάθε δοχείο δοκιμής να έχει ελάχιστο βάθος 20 mm και ελάχιστο όγκο 100 ml. Η επιλογή του τύπου του δοχείου δοκιμής δεν έχει κρίσιμη σημασία, εφόσον πληρούνται οι απαιτήσεις αυτές. Τα γυάλινα ποτήρια ζέσεως, τα δοχεία κρυστάλλωσης ή τα γυάλινα τρυβλία Petri ενδεδειγμένων διαστάσεων έχουν αποδειχθεί όλα κατάλληλα. Τα δοχεία δοκιμής πρέπει να καλύπτονται, ώστε να ελαχιστοποιούνται η εξάτμιση και η τυχαία επιμόλυνση, και, παράλληλα, να

▼M6

είναι δυνατή η αναγκαία ανταλλαγή αέρα. Τα κατάλληλα δοχεία δοκιμής, και ιδίως τα καλύμματα, πρέπει να αποτρέπουν τη σκίαση και τις αλλαγές στα φασματικά χαρακτηριστικά του φωτός.

15. Οι καλλιέργειες και τα δοχεία δοκιμής δεν θα πρέπει να φυλάσσονται μαζί. Ο καλύτερος τρόπος για να επιτευχθεί αυτό είναι η χρήση χωριστών θαλάμων, επωαστήρων ή δωματίων ανάπτυξης σε συνθήκες περιβάλλοντος. Ο φωτισμός και η θερμοκρασία πρέπει να μπορούν να ρυθμίζονται και να διατηρούνται σταθερά (βλ. σημεία 35-36).

Οργανισμός δοκιμής

16. Ο οργανισμός που χρησιμοποιείται στην παρούσα δοκιμή είναι είτε ο *Lemna gibba* είτε ο *Lemna minor*. Σύντομες περιγραφές των ειδών λέμνας που έχουν χρησιμοποιηθεί σε δοκιμές τοξικότητας παρατίθενται στο προσάρτημα 2. Το φυτικό υλικό μπορεί να λαμβάνεται από συλλογή καλλιεργειών, από άλλο εργαστήριο ή από τον αγρό. Εάν τα φυτά συλλέγονται στον αγρό, θα πρέπει να διατηρούνται σε καλλιέργεια στο ίδιο θρεπτικό μέσο με εκείνο που χρησιμοποιείται στη δοκιμή, τουλάχιστον για οκτώ εβδομάδες πριν από τη χρήση τους. Οι αγροί από τους οποίους συλλέγονται τα φυτά των αρχικών καλιεργειών πρέπει να είναι απαλλαγμένοι από εμφανείς πηγές μόλυνσης. Εάν τα φυτά λαμβάνονται από άλλο εργαστήριο ή από συλλογή καλλιεργειών, θα πρέπει να διατηρούνται υπό ανάλογες συνθήκες για χρονικό διάστημα τουλάχιστον τριών εβδομάδων. Θα πρέπει πάντα να αναφέρονται η πηγή του φυτικού υλικού, καθώς και το είδος και ο κλώνος (εφόσον είναι γνωστός) που χρησιμοποιήθηκαν στη δοκιμή.

17. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μονοκαλλιέργειες εμφανώς απαλλαγμένες από επιμόλυνση από άλλους οργανισμούς, όπως φύκη και πρωτόζωα. Τα υγιή φυτά του είδους *L. minor* συνίστανται σε αποικίες που περιλαμβάνουν δύο έως πέντε θαλλούς, ενώ οι υγιείς αποικίες του *L. gibba* είναι δυνατόν να περιλαμβάνουν έως επτά θαλλούς.

18. Η ποιότητα και η ομοιομορφία των φυτών που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή επηρεάζουν σημαντικά την έκβασή της και, συνεπώς, πρέπει να επιλέγονται επιμελώς. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται νεαρά, ταχέως αναπτυσσόμενα φυτά, χωρίς ορατές αλλοιώσεις ή αποχρωματισμό (χλώρωση). Οι καλλιέργειες καλής ποιότητας χαρακτηρίζονται από υψηλή συχνότητα εμφάνισης αποικιών με δύο τουλάχιστον θαλλούς. Ο μεγάλος αριθμός μεμονωμένων θαλλών αποτελεί ένδειξη περιβαλλοντικής καταπόνησης, π.χ. περιορισμός θρεπτικών στοιχείων, και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται στη δοκιμή φυτικό υλικό από τέτοιες καλλιέργειες.

Καλλιέργεια

19. Για να μειωθεί η συχνότητα διατήρησης της καλλιέργειας (π.χ. όταν δεν έχουν προγραμματιστεί δοκιμές σε λέμνα για κάποιο διάστημα), οι καλλιέργειες μπορούν να διατηρούνται σε συνθήκες ελαττωμένου φωτισμού και ελαττωμένης θερμοκρασίας (4-10 °C). Λεπτομέρειες σχετικά με την καλλιέργεια παρέχονται στο προσάρτημα 3. Τα εμφανή σημεία επιμόλυνσης από φύκη ή άλλους οργανισμούς μπορεί να επιβάλλουν την επιφανειακή αποστείρωση ενός επιμέρους δείγματος θαλλών λέμνας, ακολουθούμενη από μεταφορά σε πρόσφατα παρασκευασμένο θρεπτικό μέσο (βλ. προσάρτημα 3). Στην περίπτωση αυτή, η υπόλοιπη επιμολυσμένη καλλιέργεια θα πρέπει να απορρίπτεται.

20. Τουλάχιστον επτά ημέρες πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμής, επαρκής αριθμός αποικιών μεταφέρεται ασηπτικά σε στείρο θρεπτικό μέσο πρόσφατης παρασκευής και καλλιεργείται για 7-10 ημέρες υπό τις συνθήκες της δοκιμής.

Θρεπτικό μέσο δοκιμής

21. Συνιστώνται διαφορετικά θρεπτικά μέσα για το *Lemna minor* και το *Lemna gibba*, τα οποία περιγράφονται κατωτέρω. Θα πρέπει να μελετάται με προσοχή η προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος στο θρεπτικό μέσο δοκιμής [4-μορφολινοπροπανοσουλφονικό οξύ (MOPS, αριθ. CAS: 1132-61-2) στο θρεπτικό μέσο για το *L. minor* και $NaHCO_3$ στο θρεπτικό μέσο για το *L. gibba*], εάν υπάρχουν υπόνοιες ότι ενδέχεται να αντιδράσει με την υπό δοκιμή χημική ουσία και να επηρεάσει την έκφραση της τοξικότητάς της. Αποδεκτό είναι επίσης το θρεπτικό μέσο Steinberg (9), εφόσον πληρούνται τα κριτήρια εγκυρότητας.

▼M6

22. Για την καλλιέργεια και τις δοκιμές σε *L. minor* συνιστάται τροποποιημένη έκδοση του θρεπτικού μέσου για τη λέμνα του Σουηδικού Ινστιτούτου Προτύπων (SIS). Η σύνθεση αυτού του θρεπτικού μέσου παρατίθεται στο προσάρτημα 4.

23. Για την καλλιέργεια και τις δοκιμές σε *L. gibba* συνιστάται το θρεπτικό μέσο 20X — AAP, που περιγράφεται στο προσάρτημα 4.

24. Κατάλληλο για το είδος *L. minor* είναι και το περιγραφόμενο στο προσάρτημα 4 θρεπτικό μέσο Steinberg, το οποίο, ωστόσο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για το *L. gibba*, εφόσον πληρούνται τα κριτήρια εγκυρότητας.

Διαλύματα δοκιμής

25. Τα διαλύματα δοκιμής παρασκευάζονται συνήθως με αραίωση διαλυμάτων παρακαταθήκης. Τα διαλύματα παρακαταθήκης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας παρασκευάζονται, κατά κανόνα, με διάλυση της χημικής ουσίας στο θρεπτικό μέσο.

26. Η υψηλότερη συγκέντρωση δοκιμής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει κανονικά να μην υπερβαίνει την υδατοδιαλυτότητα της χημικής ουσίας υπό τις συνθήκες της δοκιμής. Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα φυτά *Lemna* spp. επιπλέουν στην επιφάνεια και είναι δυνατόν να εκτεθούν σε χημικές ουσίες που συσσωρεύονται στη μεσεπιφάνεια νερού-αέρα (π.χ. δυσδιάλυτες στο νερό ή υδρόφοβες ή επιφανειοδραστικές χημικές ουσίες). Στις περιπτώσεις αυτές, η έκθεση θα οφείλεται σε υλικό που δεν είναι διαλυμένο, οι δε συγκεντρώσεις δοκιμής μπορεί να υπερβαίνουν την υδατοδιαλυτότητα, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Σε περίπτωση υπό δοκιμή χημικών ουσιών χαμηλής υδατοδιαλυτότητας, ενδέχεται να είναι απαραίτητο να παρασκευάζεται πυκνό διάλυμα παρακαταθήκης ή διασπορά της χημικής ουσίας με τη βοήθεια οργανικού διαλύτη ή μέσου διασποράς, ώστε να διευκολύνεται η προσθήκη ακριβών ποσοτήτων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο θρεπτικό μέσο δοκιμής και να υποβοηθούνται η διασπορά και η διάλυσή της. Θα πρέπει να καταβάλλεται κάθε δυνατή προσπάθεια για την αποφυγή της χρήσης τέτοιων υλικών. Η χρήση βοηθητικών διαλυτών ή μέσων διασποράς δεν θα πρέπει να προκαλεί φυτοτοξικότητα. Για παράδειγμα, μεταξύ των διαλυτών ευρείας χρήσης που δεν προκαλούν φυτοτοξικότητα σε συγκεντρώσεις έως 100 μLl/l περιλαμβάνονται η ακετόνη και το διμεθυλοφορμαμίδιο. Εάν χρησιμοποιείται διαλύτης ή μέσο διασποράς, η τελική του συγκέντρωση θα πρέπει να αναφέρεται, να διατηρείται στο ελάχιστο επίπεδο (≤ 100 μl/l) και να είναι η ίδια σε κάθε αγωγή και μάρτυρα. Περαιτέρω καθοδήγηση για τη χρήση μέσων διασποράς παρέχεται στη δημοσίευση (8).

Ομάδες δοκιμής και ελέγχου

27. Η προηγούμενη γνώση της τοξικότητας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας για τη λέμνα, π.χ. μέσω δοκιμής προσδιορισμού του εύρους τιμών, διευκολύνει την επιλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων δοκιμής. Στην οριστική δοκιμή τοξικότητας θα πρέπει κανονικά να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις δοκιμής, διατεταγμένες σε γεωμετρική πρόοδο. Κατά προτίμηση, ο λόγος προόδου θα πρέπει να μην υπερβαίνει το 3,2, αλλά επιτρέπεται να χρησιμοποιείται υψηλότερη τιμή, εάν η καμπύλη συγκέντρωσης-απόκρισης είναι επίπεδη. Εάν χρησιμοποιούνται λιγότερες από πέντε συγκεντρώσεις, η επιλογή αυτή θα πρέπει να αιτιολογείται. Σε κάθε συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να διενεργούνται τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις.

28. Για τον καθορισμό του εύρους των συγκεντρώσεων δοκιμής (για τη δοκιμή προσδιορισμού του εύρους τιμών και/ή για την οριστική δοκιμή τοξικότητας), θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα εξής:

— Για τον προσδιορισμό της EC_x, η τιμή της θα πρέπει να περικλείεται από τις συγκεντρώσεις δοκιμής, ώστε να εξασφαλίζεται το ενδεδειγμένο επίπεδο εμπιστοσύνης. Για παράδειγμα, εάν πρόκειται να εκτιμηθεί η EC_{50}, η υψηλότερη συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να υπερβαίνει την τιμή EC_{50}. Εάν η τιμή EC_{50} βρίσκεται εκτός του εύρους των συγκεντρώσεων δοκιμής, τα σχετικά διαστήματα εμπιστοσύνης θα είναι μεγάλα, με αποτέλεσμα να καθίσταται ενδεχομένως αδύνατη η ορθή αξιολόγηση της στατιστικής προσαρμογής του μοντέλου.

— Εάν το ζητούμενο είναι η εκτίμηση των LOEC/NOEC, η χαμηλότερη συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να είναι αρκούντως χαμηλή, ώστε η ανάπτυξη να μην είναι σημαντικά μικρότερη από την ανάπτυξη του μάρτυρα. Επιπλέον, η υψηλότερη συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να

▼M6

είναι αρκούντως υψηλή, ώστε η ανάπτυξη να είναι σημαντικά μικρότερη από την ανάπτυξη του μάρτυρα. Σε αντίθετη περίπτωση, η δοκιμή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται με διαφορετικό εύρος συγκεντρώσεων (εκτός εάν η υψηλότερη συγκέντρωση βρίσκεται στο όριο διαλυτότητας ή το μέγιστο απαιτούμενο όριο συγκέντρωσης, π.χ. 100 mg/l).

29. Κάθε δοκιμή θα πρέπει να περιλαμβάνει μάρτυρες που συνίστανται σε θρεπτικό μέσο, αριθμό θαλλών και αποικιών, συνθήκες περιβάλλοντος και διαδικασίες ίδια με εκείνα των δοχείων δοκιμής, αλλά χωρίς την υπό δοκιμή χημική ουσία. Εάν χρησιμοποιείται βοηθητικός διαλύτης ή μέσο διασποράς, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται πρόσθετη αγωγή ελέγχου με τον διαλύτη/μέσο διασποράς στην ίδια συγκέντρωση με τη χρησιμοποιούμενη στα δοχεία που περιέχουν την υπό δοκιμή χημική ουσία. Ο αριθμός των πανομοιότυπων δοχείων ελέγχου (και, κατά περίπτωση, των δοχείων με τον διαλύτη) θα πρέπει να είναι τουλάχιστον ίσος και, στην ιδανική περίπτωση, διπλάσιος από τον αριθμό των δοχείων που χρησιμοποιούνται για κάθε συγκέντρωση δοκιμής.

30. Εάν δεν απαιτείται προσδιορισμός της NOEC, ο σχεδιασμός της δοκιμής είναι δυνατόν να τροποποιηθεί, ώστε να αυξηθεί ο αριθμός των συγκεντρώσεων και να μειωθεί ο αριθμός των δοχείων ανά συγκέντρωση. Ωστόσο, τα δοχεία ελέγχου πρέπει να είναι τουλάχιστον τρία.

Έκθεση

31. Αποικίες αποτελούμενες από 2 έως 4 ορατούς θαλλούς μεταφέρονται από την καλλιέργεια του ενοφθαλμίσματος ασηπτικά και με τυχαιοποιημένη κατανομή μεταξύ των δοχείων δοκιμής. Κάθε δοχείο δοκιμής θα πρέπει να περιέχει συνολικά 9 έως 12 θαλλούς. Ο αριθμός των θαλλών και των αποικιών θα πρέπει να είναι ο ίδιος σε κάθε δοχείο δοκιμής. Η εμπειρία από την παρούσα μέθοδο και τα δεδομένα της δοκιμής δακτυλίου δείχνουν ότι η διεξαγωγή τριών επαναλήψεων ανά αγωγή, κατά την οποία κάθε δοχείο περιέχει αρχικά 9 έως 12 θαλλούς, αρκεί για την ανίχνευση διαφορών στην ανάπτυξη περίπου της τάξης του 4 έως 7 %, όταν η αναστολή υπολογίζεται με βάση τον ρυθμό ανάπτυξης (10 έως 15 %, όταν υπολογίζεται με βάση την απόδοση) μεταξύ των ομάδων αγωγής (7).

32. Απαιτείται τυχαιοποιημένος σχεδιασμός για τη θέση των δοχείων δοκιμής στον επωαστήρα, ώστε να ελαχιστοποιείται η επιρροή των χωρικών διαφορών ως προς τη φωτεινή ένταση ή τη θερμοκρασία. Απαιτείται επίσης σχεδιασμός κατά συστάδες ή τυχαιοποιημένη επανατοποθέτηση των δοχείων μετά τις παρατηρήσεις (ή συχνότερη αλλαγή θέσης).

33. Εάν από προκαταρτική δοκιμή σταθερότητας προκύπτει ότι δεν είναι δυνατόν να διατηρηθεί η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (δηλ. η μετρούμενη συγκέντρωση μειώνεται κάτω του 80 % της μετρηθείσας αρχικής συγκέντρωσης) σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής (7 ημέρες), συνιστάται ημιστατικό σύστημα δοκιμής. Στην περίπτωση αυτή, οι αποικίες θα πρέπει να εκτίθενται σε πρόσφατα παρασκευασμένα διαλύματα δοκιμής και ελέγχου τουλάχιστον δύο φορές κατά τη δοκιμή (π.χ. την 3η και την 5η ημέρα). Η συχνότητα έκθεσης στο πρόσφατα παρασκευασμένο θρεπτικό μέσο θα εξαρτάται από τη σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας· ενδέχεται να χρειαστεί μεγαλύτερη συχνότητα για τη διατήρηση σχεδόν σταθερών συγκεντρώσεων εξαιρετικά ασταθών ή πτητικών χημικών ουσιών. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ενδέχεται να απαιτείται συνεχής διαδικασία (8)(10).

34. Το σενάριο έκθεσης μέσω εφαρμογής στο φύλλωμα (ψεκασμός) δεν καλύπτεται από την παρούσα μέθοδο δοκιμών· βλ. αντ' αυτής δημοσίευση (11).

Συνθήκες επώασης

35. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται συνεχής φωτισμός με θερμό ή ψυχρό λευκό φως φθορισμού, ώστε να εξασφαλίζεται φωτεινή ένταση η οποία επιλέγεται από το πεδίο τιμών 85-135 μE · $m^{-2}s^{-1}$ (ισοδύναμο με 6 500-10 000 lux), μετρούμενη σε φωτοσυνθετικά ενεργό μήκος κύματος της ακτινοβολίας (400-700 nm), σε σημεία που βρίσκονται στην ίδια απόσταση από τη φωτεινή πηγή όπως οι θαλλοί της λέμνας. Οι τυχόν διαφορές από την επιλεγμένη φωτεινή ένταση στην επιφάνεια όπου διεξάγεται η δοκιμή δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν το ± 15 %. Η μέθοδος ανίχνευσης και μέτρησης του φωτός, ιδίως δε ο τύπος του αισθητήρα, επηρεάζουν τη μετρούμενη τιμή. Οι σφαιρικοί αισθητήρες (που αποκρίνονται στο φως το οποίο

▼M6

εκπέμπεται από όλες τις γωνίες επάνω και κάτω από το επίπεδο μέτρησης) και οι αισθητήρες συνημιτόνου (που αποκρίνονται στο φως το οποίο εκπέμπεται από όλες τις γωνίες επάνω από το επίπεδο μέτρησης) προτιμώνται έναντι των αισθητήρων μονής κατεύθυνσης και παρέχουν μεγαλύτερες ενδείξεις για τις πολυσημειακές φωτεινές πηγές του είδους που περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο.

36. Η θερμοκρασία στα δοχεία δοκιμής θα πρέπει να είναι 24 ± 2 °C. Το pH του θρεπτικού μέσου ελέγχου δεν θα πρέπει να αυξάνεται κατά περισσότερο από 1,5 μονάδες στη διάρκεια της δοκιμής. Ωστόσο, οι αποκλίσεις πέραν της 1,5 μονάδας δεν ακυρώνουν τη δοκιμή, εάν είναι δυνατόν να αποδειχθεί ότι πληρούνται τα κριτήρια εγκυρότητας. Πρέπει να αποδίδεται μεγαλύτερη προσοχή στη μεταβολή του pH σε ειδικές περιπτώσεις, όπως κατά τη δοκιμή ασταθών χημικών ουσιών ή μετάλλων. Περαιτέρω καθοδήγηση παρέχεται στη δημοσίευση (8).

Διάρκεια

37. Η δοκιμή τερματίζεται 7 ημέρες μετά τη μεταφορά των φυτών στα δοχεία δοκιμής.

Μετρήσεις και αναλυτικοί προσδιορισμοί

38. Στην αρχή της δοκιμής μετράται και καταγράφεται ο αριθμός θαλλών στα δοχεία δοκιμής, με μέριμνα ώστε να καταμετρώνται οι προεξέχοντες ευδιάκριτοι θαλλοί. Οι αριθμοί θαλλών που φαίνονται φυσιολογικοί ή αφύσικοι πρέπει να προσδιορίζονται στην αρχή της δοκιμής, τουλάχιστον μία φορά ανά 3 ημέρες κατά την περίοδο έκθεσης (δηλ. τουλάχιστον 2 φορές στη διάρκεια της επταήμερης περιόδου) και στο τέλος της δοκιμής. Θα πρέπει να σημειώνονται οι αλλαγές στην ανάπτυξη των φυτών (π.χ. μεταβολή του μεγέθους και της εμφάνισης των θαλλών, ενδείξεις νέκρωσης, χλώρωσης ή κυφότητας, θραύση ή απώλεια πλευστότητας των αποικιών), καθώς και στο μήκος και στην όψη των ριζών. Θα πρέπει επίσης να σημειώνονται τα σημαντικά χαρακτηριστικά του θρεπτικού μέσου δοκιμής (π.χ. παρουσία αδιάλυτων υλικών, ανάπτυξη φυκών στο δοχείο δοκιμής).

39. Εκτός από την καταμέτρηση των θαλλών κατά τη δοκιμή, εκτιμώνται και οι επιδράσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και σε μία (ή περισσότερες) από τις ακόλουθες μετρούμενες μεταβλητές:

i) συνολική θαλλική επιφάνεια·

ii) ξηρό βάρος·

iii) υγρό βάρος.

40. Η συνολική θαλλική επιφάνεια παρουσιάζει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να προσδιορίζεται σε κάθε δοχείο δοκιμής και ελέγχου στην αρχή, στη διάρκεια και στο τέλος της δοκιμής. Το ξηρό ή το υγρό βάρος θα πρέπει να προσδιορίζεται στην αρχή της δοκιμής, σε δείγμα της καλλιέργειας του ενοφθαλμίσματος το οποίο είναι αντιπροσωπευτικό του υλικού που χρησιμοποιήθηκε για την εκκίνηση της δοκιμής, καθώς και στο τέλος της δοκιμής στο φυτικό υλικό κάθε δοχείου δοκιμής και ελέγχου. Εάν δεν μετράται η θαλλική επιφάνεια, προτιμάται το ξηρό βάρος έναντι του υγρού βάρους.

41. Η συνολική θαλλική επιφάνεια, το ξηρό βάρος και το υγρό βάρος μπορούν να προσδιορίζονται ως εξής:

i) *Συνολική θαλλική επιφάνεια:* Η συνολική θαλλική επιφάνεια όλων των αποικιών μπορεί να προσδιορίζεται με ανάλυση εικόνων. Είναι δυνατόν να αποτυπώνεται το περίγραμμα του δοχείου δοκιμής και των φυτών με βιντεοκάμερα (δηλ. με τοποθέτηση του δοχείου σε φωτοτράπεζα) και να ψηφιοποιείται η προκύπτουσα εικόνα. Στη συνέχεια, μπορεί να προσδιορίζεται η συνολική θαλλική επιφάνεια σε δοχείο δοκιμής με βαθμονόμηση με επίπεδα σχήματα γνωστού εμβαδού. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για τον αποκλεισμό παρεμβολών που οφείλονται στο χείλος του δοχείου. Εναλλακτική αλλά πιο επίπονη προσέγγιση είναι η λήψη φωτοτυπιών των δοχείων δοκιμής και των φυτών, η αποκοπή του προκύπτοντος περιγράμματος των αποικιών και ο προσδιορισμός της επιφάνειάς τους με αναλυτή φυλλικής επιφάνειας ή χαρτί γραφημάτων. Κατάλληλες μπορεί να είναι και άλλες τεχνικές (π.χ. αναλογία βάρους χαρτιού μεταξύ της επιφάνειας του περιγράμματος των αποικιών και της μοναδιαίας επιφάνειας).

▼M6

ii) *Ξηρό βάρος*: Από κάθε δοχείο δοκιμής συλλέγονται όλες οι αποικίες και εκπλύνονται με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό. Στυπώνονται για την απομάκρυνση της περίσσειας νερού και, κατόπιν, ξηραίνονται στους 60 °C μέχρι σταθερού βάρους. Τα ενδεχόμενα θραύσματα ριζών θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται. Το ξηρό βάρος θα πρέπει να εκφράζεται με ακρίβεια τουλάχιστον 0,1 mg.

iii) *Υγρό βάρος*: Όλες οι αποικίες μεταφέρονται σε προζυγισμένους σωλήνες κατασκευασμένους από πολυστυρόλιο (ή άλλο αδρανές υλικό), με στρογγυλό πυθμένα που φέρει μικρές οπές (1 mm). Στη συνέχεια, οι σωλήνες φυγοκεντρούνται στις 3 000 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Οι σωλήνες, που περιέχουν τις στεγνές πλέον αποικίες, επαναζυγίζονται και υπολογίζεται το υγρό βάρος με αφαίρεση του βάρους του κενού σωλήνα.

Συχνότητα των μετρήσεων και των αναλυτικών προσδιορισμών

42. Εάν εφαρμόζεται σχεδιασμός στατικής δοκιμής, θα πρέπει να μετράται το pH κάθε αγωγής στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής. Εάν εφαρμόζεται σχεδιασμός ημιστατικής δοκιμής, το pH θα πρέπει να μετράται σε κάθε παρτίδα «πρόσφατου» διαλύματος δοκιμής, πριν από κάθε ανανέωση, καθώς και στα αντίστοιχα «εξαντλημένα» διαλύματα.

43. Η φωτεινή ένταση θα πρέπει να μετράται στον θάλαμο ανάπτυξης, τον επωαστήρα ή το δωμάτιο, σε σημεία που βρίσκονται στην ίδια απόσταση από τη φωτεινή πηγή όπως οι θαλλοί της λέμνας. Οι μετρήσεις θα πρέπει να εκτελούνται τουλάχιστον μία φορά στη διάρκεια της δοκιμής. Θα πρέπει να καταγράφεται, τουλάχιστον ημερησίως, η θερμοκρασία του θρεπτικού μέσου σε υποκατάστατο δοχείο, το οποίο διατηρείται υπό τις ίδιες συνθήκες στον θάλαμο ανάπτυξης, τον επωαστήρα ή το δωμάτιο.

44. Στη διάρκεια της δοκιμής, οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας προσδιορίζονται σε κατάλληλα διαστήματα. Η ελάχιστη απαίτηση για τις στατικές δοκιμές είναι ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής.

45. Στις ημιστατικές δοκιμές, κατά τις οποίες η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας αναμένεται ότι δεν θα παραμείνει εντός των ορίων της ονομαστικής συγκέντρωσης ± 20 %, είναι απαραίτητο να υποβάλλονται σε ανάλυση όλα τα πρόσφατα παρασκευασμένα διαλύματα δοκιμής, καθώς και τα ίδια διαλύματα σε κάθε ανανέωση (βλ. σημείο 33). Ωστόσο, στην περίπτωση των δοκιμών κατά τις οποίες η μετρηθείσα αρχική συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας διαφέρει περισσότερο από ± 20 % από την ονομαστική συγκέντρωση, αλλά μπορούν να προσκομιστούν επαρκή στοιχεία από τα οποία να προκύπτει ότι οι αρχικές συγκεντρώσεις είναι επαναλήψιμες και σταθερές (δηλ. κυμαίνονται μεταξύ 80 και 120 % της αρχικής συγκέντρωσης), είναι δυνατόν να εκτελείται χημικός προσδιορισμός μόνο για την υψηλότερη και τη χαμηλότερη συγκέντρωση δοκιμής. Σε κάθε περίπτωση, οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας πριν από την ανανέωση είναι αναγκαίο να προσδιορίζονται μόνο σε ένα από τα δοχεία επανάληψης για κάθε συγκέντρωση δοκιμής (ή στο συνενωμένο περιεχόμενο των δοχείων ανά επανάληψη).

46. Εάν χρησιμοποιείται συνεχής δοκιμή, ενδείκνυται σύστημα δειγματοληψίας ανάλογο με το περιγραφόμενο για τις ημιστατικές δοκιμές, το οποίο περιλαμβάνει ανάλυση στην αρχή, στη μέση και στο τέλος της δοκιμής, χωρίς όμως μετρήσεις στα «εξαντλημένα» διαλύματα, που δεν ενδείκνυνται στην προκειμένη περίπτωση. Στον συγκεκριμένο τύπο δοκιμής, θα πρέπει να ελέγχεται ημερησίως η ταχύτητα ροής του μέσου αραίωσης και της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ή του διαλύματος παρακαταθήκης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

47. Εάν υπάρχουν στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας διατηρήθηκε ικανοποιητικά εντός των ορίων της ονομαστικής ή μετρηθείσας αρχικής συγκέντρωσης ± 20 % σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής, η ανάλυση των αποτελεσμάτων μπορεί να βασιστεί στις ονομαστικές ή μετρηθείσες αρχικές τιμές. Εάν η απόκλιση από την ονομαστική ή τη μετρηθείσα αρχική συγκέντρωση δεν βρίσκεται εντός του ± 20 %, η ανάλυση των αποτελεσμάτων θα πρέπει να βασίζεται στον γεωμετρικό μέσο όρο των συγκεντρώσεων κατά την έκθεση ή σε μοντέλα που περιγράφουν τη μείωση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (8).

▼M6

Οριακή δοκιμή

48. Σε ορισμένες περιπτώσεις, π.χ. όταν από προκαταρκτική δοκιμή προκύπτει ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν έχει τοξικές επιδράσεις σε συγκεντρώσεις έως 100 mg/l ή έως το όριο διαλυτότητάς της στο θρεπτικό μέσο δοκιμής (αναλόγως του ποια είναι μικρότερη), είναι δυνατόν να διεξάγεται οριακή δοκιμή, η οποία να συνίσταται σε σύγκριση των αποκρίσεων μιας ομάδας ελέγχου και μιας ομάδας αγωγής (συγκέντρωση ίση με 100 mg/l ή με το όριο διαλυτότητας). Συνιστάται ένθερμα να τεκμηριώνεται αυτό με ανάλυση της συγκέντρωσης έκθεσης. Η οριακή δοκιμή υπόκειται σε όλες τις συνθήκες δοκιμής και όλα τα κριτήρια εγκυρότητας που περιγράφονται ανωτέρω, με εξαίρεση τον αριθμό των επαναλήψεων αγωγής, ο οποίος θα πρέπει να είναι διπλάσιος. Η ανάπτυξη στην ομάδα ελέγχου και στην ομάδα αγωγής είναι δυνατόν να υποβληθεί σε στατιστική ανάλυση με δοκιμή σύγκρισης μέσων όρων, π.χ. δοκιμασία t του Student.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΕΙΣ

Χρόνος διπλασιασμού

49. Για τον προσδιορισμό του χρόνου διπλασιασμού (T_d) του αριθμού θαλλών και την τήρηση αυτού του κριτηρίου εγκυρότητας στη μελέτη (σημείο 12), εφαρμόζεται ο ακόλουθος τύπος στα δεδομένα που προκύπτουν από τα δοχεία ελέγχου:

$$T_d = \ln 2/\mu$$

όπου μ είναι ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, ο οποίος προσδιορίζεται όπως περιγράφεται στα σημεία 54-55.

Μεταβλητές απόκρισης

50. Η δοκιμή αποσκοπεί στον προσδιορισμό των επιδράσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στη βλαστητική ανάπτυξη της λέμνας. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών περιγράφονται δύο μεταβλητές απόκρισης, δεδομένου ότι διαφορετικές δικαιοδοσίες έχουν διαφορετικές προτιμήσεις και κανονιστικές ανάγκες. Για να είναι τα αποτελέσματα των δοκιμών αποδεκτά σε όλα τα κράτη μέλη, οι επιδράσεις θα πρέπει να αξιολογούνται με τη χρήση και των δύο μεταβλητών απόκρισης α) και β) που περιγράφονται κατωτέρω.

α) *Μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης*: Αυτή η μεταβλητή απόκρισης υπολογίζεται με βάση τις μεταβολές του λογαρίθμου του αριθμού θαλλών και, επιπλέον, τις μεταβολές του λογαρίθμου μιας άλλης μετρούμενης παραμέτρου (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος) με την πάροδο του χρόνου (εκφραζόμενες ανά ημέρα) στους μάρτυρες και σε κάθε ομάδα αγωγής. Η εν λόγω μεταβλητή αναφέρεται μερικές φορές ως σχετικός ρυθμός ανάπτυξης (12).

β) *Απόδοση*: Αυτή η μεταβλητή απόκρισης υπολογίζεται με βάση τις μεταβολές του αριθμού θαλλών και, επιπλέον, τις μεταβολές μίας άλλης μετρούμενης παραμέτρου (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος) στους μάρτυρες και σε κάθε ομάδα αγωγής μέχρι το τέλος της δοκιμής.

51. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι τιμές τοξικότητας που υπολογίζονται με χρήση των ανωτέρω δύο μεταβλητών απόκρισης δεν είναι συγκρίσιμες και η διαφορά αυτή πρέπει να αναγνωρίζεται, όταν χρησιμοποιούνται τα αποτελέσματα της δοκιμής. Εάν τηρούνται οι συνθήκες δοκιμής που καθορίζονται στην παρούσα μέθοδο, οι τιμές EC_x που προκύπτουν από τον μέσο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (E_rC_x) είναι γενικά υψηλότερες από τα βασιζόμενα στην απόδοση αποτελέσματα (E_yC_x), λόγω της μαθηματικής βάσης της αντίστοιχης προσέγγισης. Αυτό δεν θα πρέπει να ερμηνεύεται ως διαφορά ευαισθησίας μεταξύ των δύο μεταβλητών απόκρισης· πρόκειται απλώς για μαθηματική διαφορά τιμών. Η έννοια του μέσου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης βασίζεται στον γενικό εκθετικό τύπο ανάπτυξης των ειδών λέμνας σε απεριόριστες καλλιέργειες, όπου η τοξικότητα εκτιμάται με βάση τις επιδράσεις στον ρυθμό ανάπτυξης, χωρίς να εξαρτάται από την απόλυτη τιμή του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του μάρτυρα ούτε από την κλίση της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης ούτε από τη διάρκεια της δοκιμής. Αντίθετα, τα αποτελέσματα που βασίζονται στην απόδοση ως μεταβλητή απόκρισης εξαρτώνται από όλες τις άλλες προαναφερόμενες μεταβλητές. Η E_yC_x εξαρτάται από τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του είδους λέμνας που χρησιμοποιείται σε κάθε δοκιμή, καθώς και από τον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης, ο οποίος μπορεί να διαφέρει μεταξύ των ειδών ή ακόμη και μεταξύ διαφορετικών

▼M6

κλώνων. Η συγκεκριμένη μεταβλητή απόκρισης δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τη σύγκριση της ευαισθησίας σε τοξικούς παράγοντες μεταξύ ειδών λέμνας ή ακόμα και διαφορετικών κλώνων. Μολονότι είναι προτιμότερο, από επιστημονική άποψη, να χρησιμοποιείται ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για την εκτίμηση της τοξικότητας, η παρούσα μέθοδος δοκιμών περιλαμβάνει και εκτιμήσεις της τοξικότητας με βάση την απόδοση, προκειμένου να καλυφθούν οι κανονιστικές απαιτήσεις που ισχύουν σήμερα σε ορισμένες χώρες.

52. Οι εκτιμήσεις της τοξικότητας θα πρέπει να βασίζονται στον αριθμό θαλλών και σε μία πρόσθετη μετρούμενη παράμετρο (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος), επειδή ορισμένες χημικές ουσίες ενδέχεται να έχουν πολύ μεγαλύτερη επίδραση σε άλλες μετρούμενες μεταβλητές απ' ό,τι στον αριθμό θαλλών. Η επίδραση αυτή δεν ανιχνεύεται με τον υπολογισμό μόνο του αριθμού θαλλών.

53. Ο αριθμός θαλλών και κάθε άλλη μετρούμενη μεταβλητή που έχει καταγραφεί, δηλ. η συνολική θαλλική επιφάνεια, το ξηρό βάρος ή το υγρό βάρος, καταχωρίζονται σε πίνακα μαζί με τις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας για κάθε χρόνο μέτρησης. Η μετέπειτα ανάλυση δεδομένων, π.χ. για την εκτίμηση της LOEC, της NOEC ή της EC_x, θα πρέπει να βασίζεται στις τιμές κάθε επανάληψης και όχι στις μέσες τιμές που έχουν υπολογιστεί για κάθε ομάδα αγωγής.

Μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης

54. Ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για συγκεκριμένη χρονική περίοδο υπολογίζεται ως η λογαριθμική αύξηση των μεταβλητών ανάπτυξης — αριθμός θαλλών και μία ακόμη μετρούμενη μεταβλητή (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος) — από τον ακόλουθο τύπο, ο οποίος εφαρμόζεται για κάθε επανάληψη ελέγχου και αγωγής:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln (N_j) - \ln (N_i)}{t}$$

όπου:

— μ_{i-j}: ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης κατά το χρονικό διάστημα i έως j,

— N_i: η μετρούμενη μεταβλητή στο δοχείο δοκιμής ή ελέγχου κατά τη χρονική στιγμή i,

— N_j: η μετρούμενη μεταβλητή στο δοχείο δοκιμής ή ελέγχου κατά τη χρονική στιγμή j,

— t: το χρονικό διάστημα i έως j.

Για κάθε ομάδα αγωγής και ομάδα ελέγχου υπολογίζεται η μέση τιμή του ρυθμού ανάπτυξης, συνοδευόμενη από εκτίμηση της διασποράς.

55. Θα πρέπει να υπολογίζεται ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για τη συνολική διάρκεια της δοκιμής (η χρονική στιγμή «i» στον ανωτέρω τύπο είναι η αρχή της δοκιμής και η χρονική στιγμή «j» το τέλος της). Για κάθε συγκέντρωση δοκιμής και για κάθε μάρτυρα, υπολογίζεται η μέση τιμή του μέσου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης, συνοδευόμενη από εκτίμηση της διακύμανσης. Επιπλέον, θα πρέπει να υπολογίζεται ο τμηματικός ρυθμός ανάπτυξης με σκοπό την αξιολόγηση των επιδράσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στη διάρκεια της περιόδου έκθεσης (π.χ. με εξέταση των λογαριθμικά μετασχηματισμένων καμπυλών ανάπτυξης). Οι ουσιώδεις διαφορές μεταξύ του τμηματικού και του μέσου ρυθμού ανάπτυξης υποδηλώνουν απόκλιση από τη σταθερή εκθετική ανάπτυξη και δικαιολογούν την ενδελεχή εξέταση των καμπυλών ανάπτυξης. Μια συντηρητική προσέγγιση στην περίπτωση αυτή θα ήταν η σύγκριση των ειδικών ρυθμών ανάπτυξης κατά το χρονικό διάστημα μέγιστης αναστολής μεταξύ των καλλιεργειών που έχουν υποβληθεί σε αγωγή και των καλλιεργειών ελέγχου.

56. Στη συνέχεια, είναι δυνατόν να υπολογιστεί η εκατοστιαία αναστολή του ρυθμού ανάπτυξης (I_r) για κάθε συγκέντρωση δοκιμής (ομάδα αγωγής) από τον ακόλουθο τύπο:

▼M6

$$\%\ I_r = \frac{(\mu C - \mu T)}{\mu C} \times 100$$

όπου:

— % I_r: η εκατοστιαία αναστολή του μέσου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης,

— μ_C: η μέση τιμή του μ στον μάρτυρα,

— μ_T: η μέση τιμή του μ στην ομάδα αγωγής.

Απόδοση

57. Οι επιδράσεις στην απόδοση προσδιορίζονται με βάση δύο μετρούμενες μεταβλητές –τον αριθμό θαλλών και μία ακόμη μετρούμενη μεταβλητή (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος)– των οποίων η παρουσία διαπιστώνεται σε κάθε δοχείο δοκιμής στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής. Στην περίπτωση του ξηρού ή του υγρού βάρους, η αρχική βιομάζα προσδιορίζεται σε δείγμα θαλλών που λαμβάνεται από την ίδια παρτίδα που χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό των δοκιμαστικών δοχείων (βλ. σημείο 20). Για κάθε συγκέντρωση δοκιμής και για κάθε μάρτυρα υπολογίζεται η μέση τιμή της απόδοσης, συνοδευόμενη από εκτίμηση της διασποράς. Η μέση εκατοστιαία αναστολή της απόδοσης (%I_y) μπορεί να υπολογιστεί για κάθε ομάδα αγωγής με τον ακόλουθο τύπο:

$$\%\ I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c} \times 100$$

όπου:

— % I_y : η εκατοστιαία μείωση της απόδοσης,

— b_C : η τελική βιομάζα μείον την αρχική βιομάζα στην ομάδα ελέγχου,

— b_T : η τελική βιομάζα μείον την αρχική βιομάζα στην ομάδα αγωγής.

Χάραξη των καμπυλών συγκέντρωσης-απόκρισης

58. Θα πρέπει να χαράσσονται καμπύλες συγκέντρωσης-απόκρισης που να συνδέουν τη μέση τιμή της εκατοστιαίας αναστολής της μεταβλητής απόκρισης (I_r ή I_y, υπολογιζόμενη όπως υποδεικνύεται στο σημείο 56 ή 57) με τον λογάριθμο της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Εκτίμηση της EC_x

59. Οι εκτιμήσεις της EC_x (π.χ. της EC_{50}) θα πρέπει να βασίζονται τόσο στον μέσο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (E_rC_x), όσο και στην απόδοση (E_yC_x). Καθεμία από τις μεταβλητές αυτές θα πρέπει να βασίζεται στον αριθμό θαλλών και σε μία πρόσθετη μετρούμενη μεταβλητή (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος), επειδή υπάρχουν υπό δοκιμή χημικές ουσίες που επιδρούν διαφορετικά στον αριθμό θαλλών απ' ό,τι σε άλλες μετρούμενες μεταβλητές. Επομένως, οι επιθυμητές παράμετροι τοξικότητας είναι τέσσερις τιμές EC_x για κάθε βαθμό αναστολής x που έχει υπολογιστεί: E_rC_x (αριθμός θαλλών)· E_rC_x (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος)· E_yC_x (αριθμός θαλλών)· και E_yC_x (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος).

Στατιστικές διαδικασίες

60. Το ζητούμενο είναι να ληφθεί ποσοτική σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης με ανάλυση παλινδρόμησης. Είναι δυνατόν να εφαρμοστεί σταθμισμένη γραμμική παλινδρόμηση, έπειτα από γραμμικό μετασχηματισμό των δεδομένων απόκρισης –π.χ. σε μονάδες probit ή logit ή Weibull (13)–, αλλά προτιμώνται οι τεχνικές μη γραμμικής παλινδρόμησης, με τις οποίες αντιμετωπίζονται καλύτερα οι αναπόφευκτες ανωμαλίες των δεδομένων και οι αποκλίσεις τους από τις ομαλές κατανομές. Κοντά στις περιοχές είτε της μηδενικής είτε της πλήρους αναστολής, οι ανωμαλίες αυτές ενδέχεται να μεγεθυνθούν από τον μετασχηματισμό και να αλλοιώσουν την ανάλυση (13). Σημειωτέον ότι οι συνήθεις μέθοδοι ανάλυσης με χρήση αποτελεσμάτων μετασχηματισμού probit, logit ή Weibull προορίζονται για δεδομένα που δέχονται μόνο δύο

▼M6

τιμές (π.χ. θνησιμότητα ή επιβίωση) και πρέπει να τροποποιούνται για να καλύψουν δεδομένα ανάπτυξης ή απόδοσης. Ειδικές διαδικασίες για τον προσδιορισμό των τιμών EC_x από συνεχή δεδομένα παρατίθενται στις δημοσιεύσεις (14), (15) και (16).

61. Για κάθε μεταβλητή απόκρισης που πρόκειται να αναλυθεί, χρησιμοποιείται η σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης για να υπολογιστούν σημειακές εκτιμήσεις των τιμών EC_x. Όπου είναι δυνατόν, θα πρέπει να προσδιορίζονται, για κάθε εκτίμηση, τα όρια εμπιστοσύνης 95 %. Η καλή προσαρμογή των δεδομένων απόκρισης στο μοντέλο παλινδρόμησης θα πρέπει να αξιολογείται με γραφική ή στατιστική μέθοδο. Η ανάλυση παλινδρόμησης θα πρέπει να εκτελείται με τη χρήση των αποκρίσεων της κάθε επανάληψης και όχι των μέσων όρων των ομάδων αγωγής.

62. Εάν τα διαθέσιμα μοντέλα/μέθοδοι παλινδρόμησης είναι ακατάλληλα για τα δεδομένα, μπορούν επίσης να λαμβάνονται εκτιμήσεις και όρια εμπιστοσύνης για την EC_{50} με γραμμική παρεμβολή με τη μέθοδο bootstrap (17).

63. Για την εκτίμηση της LOEC και, κατ' επέκταση, της NOEC, είναι αναγκαία η σύγκριση των μέσων όρων των ομάδων αγωγής με την εφαρμογή τεχνικών ανάλυσης της διακύμανσης (ANOVA). Στη συνέχεια, ο μέσος όρος για κάθε συγκέντρωση πρέπει να συγκρίνεται με τον μέσο όρο του μάρτυρα με κατάλληλη μέθοδο πολλαπλής σύγκρισης ή δοκιμής τάσης. Χρήσιμη για τον σκοπό αυτό μπορεί να είναι η δοκιμασία Dunnett ή η δοκιμασία Williams (18)(19)(20)(21). Είναι απαραίτητο να κρίνεται αν ευσταθεί η παραδοχή της ANOVA για ομοιογενή διασπορά. Η εκτίμηση αυτή μπορεί να διενεργηθεί γραφικά ή με επίσημη δοκιμή (22). Κατάλληλες δοκιμασίες είναι η δοκιμασία Levene και η δοκιμασία Bartlett. Εάν δεν ισχύει η παραδοχή της ομοιογένειας της διασποράς, αυτό είναι μερικές φορές δυνατόν να διορθωθεί με λογαριθμικό μετασχηματισμό των δεδομένων. Στις περιπτώσεις ακραίας ετερογένειας της διασποράς η οποία δεν είναι δυνατόν να διορθωθεί με μετασχηματισμό, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο ανάλυσης με μεθόδους όπως ο έλεγχος φθίνουσας τάσης κατά Jonckheere. Πρόσθετη καθοδήγηση σχετικά με τον προσδιορισμό της NOEC παρέχεται στη δημοσίευση (16).

64. Οι πρόσφατες επιστημονικές εξελίξεις υπαγόρευσαν τη σύσταση να εγκαταλειφθεί η έννοια της NOEC και να αντικατασταθεί από σημειακές εκτιμήσεις των τιμών EC_x βάσει παλινδρόμησης. Δεν έχει καθοριστεί κατάλληλη τιμή του x για την παρούσα δοκιμή σε λέμνα. Ωστόσο, φαίνεται να ενδείκνυται ένα εύρος 10 έως 20 % (ανάλογα με την επιλεγμένη μεταβλητή απόκρισης) και, κατά προτίμηση, θα πρέπει να αναφέρονται τόσο η EC_{10} όσο και η EC_{20}.

Υποβολή εκθέσεων

65. Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

— φυσική κατάσταση και φυσικοχημικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένου του ορίου υδατοδιαλυτότητας·

— δεδομένα χημικής ταυτοποίησης (π.χ. αριθ. CAS), συμπεριλαμβανομένης της καθαρότητας (προσμείξεις).

Υπό δοκιμή είδος:

— επιστημονική ονομασία, κλώνος (εάν είναι γνωστός) και πηγή.

Συνθήκες δοκιμής:

— εφαρμοζόμενη διαδικασία δοκιμής (στατική, ημιστατική ή συνεχής)·

— ημερομηνία έναρξης της δοκιμής και διάρκεια της δοκιμής·

— θρεπτικό μέσο δοκιμής·

— περιγραφή του πειραματικού σχεδιασμού: δοχεία δοκιμής και καλύμματα, όγκοι διαλυμάτων, αριθμός αποικιών και θαλλών ανά δοχείο δοκιμής στην αρχή της δοκιμής·

— συγκεντρώσεις δοκιμής (ονομαστικές και μετρηθείσες, κατά περίπτωση) και αριθμός επαναλήψεων ανά συγκέντρωση·

▼M6

— μέθοδοι παρασκευής των διαλυμάτων παρακαταθήκης και των διαλυμάτων δοκιμής, συμπεριλαμβανομένης της ενδεχόμενης χρήσης διαλυτών ή μέσων διασποράς·

— θερμοκρασία κατά τη δοκιμή·

— φωτεινή πηγή, ένταση και ομοιογένεια·

— τιμές pH των θρεπτικών μέσων δοκιμής και ελέγχου·

— συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και μέθοδος ανάλυσης, με τα κατάλληλα δεδομένα αξιολόγησης της ποιότητας (μελέτες επικύρωσης, τυπικές αποκλίσεις ή όρια εμπιστοσύνης των αναλύσεων)·

— μέθοδοι προσδιορισμού του αριθμού θαλλών και των τιμών άλλων μετρούμενων μεταβλητών, π.χ. ξηρό βάρος, υγρό βάρος ή θαλλική επιφάνεια·

— όλες οι παρεκκλίσεις από την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

Αποτελέσματα:

— ανεπεξέργαστα δεδομένα: αριθμός θαλλών και τιμές άλλων μετρούμενων μεταβλητών για κάθε δοχείο δοκιμής και ελέγχου σε κάθε παρατήρηση και χρόνο ανάλυσης·

— μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις για κάθε μετρούμενη μεταβλητή·

— καμπύλες ανάπτυξης για κάθε συγκέντρωση (συνιστάται να χαράσσονται με λογαριθμικό μετασχηματισμό των μετρούμενων μεταβλητών, βλ. σημείο 55)·

— χρόνος διπλασιασμού / ρυθμός ανάπτυξης στον μάρτυρα, με βάση τον αριθμό θαλλών·

— υπολογισθείσες μεταβλητές απόκρισης για κάθε επανάληψη αγωγής, συνοδευόμενες από τους μέσους όρους και τον συντελεστή μεταβολής για τις επαναλήψεις·

— γραφική παράσταση της σχέσης συγκέντρωσης-επίδρασης·

— εκτιμήσεις των τοξικών τελικών σημείων για τις μεταβλητές απόκρισης, π.χ. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20} και τα αντίστοιχα διαστήματα εμπιστοσύνης. Τιμές LOEC και/ή NOEC, εάν έχουν υπολογιστεί, και στατιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό τους·

— εάν έχει χρησιμοποιηθεί τεχνική ANOVA, το ανιχνεύσιμο μέγεθος της επίδρασης (π.χ. η ελάχιστη σημαντική διαφορά)·

— διέγερση της ανάπτυξης που ενδεχομένως διαπιστώθηκε σε οποιοδήποτε δοχείο αγωγής·

— τυχόν ορατά σημεία φυτοτοξικότητας, καθώς και παρατηρήσεις των διαλυμάτων δοκιμής·

— συζήτηση των αποτελεσμάτων, συμπεριλαμβανομένης της επίδρασης τυχόν αποκλίσεων από την παρούσα μέθοδο στην έκβαση της δοκιμής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). σ. 733-742. In, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.

(2) US EPA — United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., «Public draft». EPA 712-C-96-156. 8 σελίδες.

(3) AFNOR — Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 σελίδες.

(4) SSI — Swedish Standards Institute. (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15 σελίδες (στα σουηδικά).

▼M6

(5) Environment Canada. (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37 — 120 σελίδες.

(6) Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.

(7) Sims I., Whitehouse P. and Lacey R. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency.

(8) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Παρίσι.

(9) International Organisation for Standardisation. ISO DIS 20079. Water Quality — Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) — Duckweed Growth Inhibition Test.

(10) Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.). Environmental Research Laboratory — Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 108. September 1977.

(11) Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. *Hydrobiologia*, 118/119, 353 — 359.

(12) Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 481-483.

(13) Christensen, E.R.,, Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol*. 19, 713-718.

(14) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem*. 11, 157-167.

(15) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 1485-1494.

(16) ΟΟΣΑ. (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Οργανισμός Οικονομικής Συνεργασίας και Ανάπτυξης, Παρίσι.

(17) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

(18) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096-1121.

(19) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482-491.

(20) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.

(21) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 519-531.

(22) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

▼M6

Προσάρτημα 1

Ορισμοί

Για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου δοκιμών, χρησιμοποιούνται οι ακόλουθοι ορισμοί και συντμήσεις:

Βιομάζα: το ξηρό βάρος της ζώσας ύλης την οποία περιέχει ένας πληθυσμός. Στην παρούσα δοκιμή, μετρώνται συνήθως υποκατάστατα της βιομάζας, όπως ο αριθμός θαλλών ή η θαλλική επιφάνεια. Ως εκ τούτου, ο όρος βιομάζα αναφέρεται και σε αυτά τα υποκατάστατα μέτρα.

Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Χλώρωση: ο κίτρινος χρωματισμός του θαλλικού ιστού.

Κλώνος: οργανισμός ή κύτταρο που δημιουργείται με αγενή αναπαραγωγή από ένα μόνο άτομο. Συνεπώς, τα μέλη του ίδιου κλώνου είναι γενετικώς πανομοιότυπα.

Αποικία: συσσωμάτωμα μητρικών και θυγατρικών θαλλών (συνήθως 2 έως 4), συνδεδεμένων μεταξύ τους. Μερικές φορές, αναφέρεται ως φυτό.

EC_x: η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, διαλυμένης στο θρεπτικό μέσο δοκιμής, η οποία προκαλεί μείωση της ανάπτυξης της λέμνας κατά x % (π.χ. 50 %) εντός της δηλούμενης περιόδου έκθεσης (πρέπει να αναφέρεται επακριβώς, εάν διαφέρει από την πλήρη ή κανονική διάρκεια της δοκιμής). Για να δηλώνεται σαφώς αν η τιμή EC έχει προκύψει από τον ρυθμό ανάπτυξης ή από την απόδοση, χρησιμοποιούνται, αντίστοιχα, τα σύμβολα «E_rC» και «E_yC», ακολουθούμενα από τη μεταβλητή που μετρήθηκε, π.χ. E_rC (αριθμός θαλλών).

Συνεχής δοκιμή: η δοκιμή στην οποία τα διαλύματα δοκιμής αντικαθίστανται συνεχώς.

Θαλλός: ατομική/μεμονωμένη «φυλλοειδής» δομή του φυτού λέμνα. Πρόκειται για τη μικρότερη μονάδα, δηλ. άτομο, με ικανότητα αναπαραγωγής.

Κυφότητα: οι θαλλοί που εμφανίζουν εξόγκωμα ή διόγκωση.

Ανάπτυξη: η αύξηση της μετρούμενης μεταβλητής –π.χ. αριθμός θαλλών, ξηρό βάρος, υγρό βάρος ή θαλλική επιφάνεια– στη διάρκεια της δοκιμής.

Ρυθμός ανάπτυξης (μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης): η λογαριθμική αύξηση της βιομάζας κατά την περίοδο έκθεσης.

Κατώτατη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης (LOEC): η χαμηλότερη ελεγχθείσα συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση της ανάπτυξης (με $p < 0,05$) υπό την επίδραση της χημικής ουσίας, σε σύγκριση με τον μάρτυρα, εντός δεδομένου χρόνου έκθεσης. Ωστόσο, όλες οι συγκεντρώσεις δοκιμής που υπερβαίνουν τη LOEC πρέπει να έχουν βλαβερή επίδραση ίση ή μεγαλύτερη από εκείνη που παρατηρείται στη LOEC. Σε περίπτωση που δεν είναι δυνατόν να πληρούνται οι δύο αυτοί όροι, πρέπει να εξηγείται πλήρως ο τρόπος επιλογής της LOEC (και, κατ' επέκταση, της NOEC).

Μετρούμενες μεταβλητές: κάθε είδους μεταβλητή που μετράται, προκειμένου να εκφραστεί το τελικό σημείο της δοκιμής με χρήση μίας ή περισσότερων διαφορετικών μεταβλητών απόκρισης. Στην παρούσα μέθοδο, μετρούμενες μεταβλητές είναι ο αριθμός θαλλών, η θαλλική επιφάνεια, το υγρό βάρος και το ξηρό βάρος.

Μονοκαλλιέργεια: καλλιέργεια με ένα μόνο είδος φυτού.

Νέκρωση: νεκρός (δηλ. λευκός ή διαποτισμένος με νερό) θαλλικός ιστός.

Συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC): η συγκέντρωση δοκιμής που είναι αμέσως μικρότερη από τη LOEC.

Φαινότυπος: τα αντιληπτά χαρακτηριστικά ενός οργανισμού τα οποία καθορίζονται από την αλληλεπίδραση των γονιδίων του με το περιβάλλον του.

Μεταβλητές απόκρισης: μεταβλητές για την εκτίμηση της τοξικότητας, οι οποίες προκύπτουν, με διάφορες μεθόδους υπολογισμού, από τις μετρούμενες μεταβλητές που περιγράφουν τη βιομάζα. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, ο ρυθμός ανάπτυξης και η απόδοση είναι μεταβλητές απόκρισης που προκύπτουν από μετρούμενες μεταβλητές, όπως ο αριθμός θαλλών, η θαλλική επιφάνεια, το υγρό βάρος ή το ξηρό βάρος.

▼**M6**

Ημιστατική δοκιμή (ανανέωσης): η δοκιμή στη διάρκεια της οποίας το διάλυμα δοκιμής αντικαθίσταται ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα.

Στατική δοκιμή: η δοκιμή στη διάρκεια της οποίας δεν ανανεώνεται το διάλυμα δοκιμής.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Τελικό σημείο της δοκιμής: περιγράφει, ως στόχο της δοκιμής, τον γενικό παράγοντα που θα μεταβληθεί υπό την επίδραση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε σχέση με τον μάρτυρα. Στην παρούσα μέθοδο, το τελικό σημείο της δοκιμής είναι η αναστολή της ανάπτυξης, η οποία μπορεί να εκφραστεί με διάφορες μεταβλητές απόκρισης, οι οποίες βασίζονται σε μία ή περισσότερες μετρούμενες μεταβλητές.

Θρεπτικό μέσο δοκιμής: το πλήρες συνθετικό θρεπτικό υλικό, στο οποίο αναπτύσσονται τα φυτά της δοκιμής, όταν εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία. Η υπό δοκιμή χημική ουσία διαλύεται, κατά κανόνα, στο θρεπτικό μέσο δοκιμής.

Απόδοση: ισούται με την τιμή της μετρούμενης μεταβλητής που εκφράζει τη βιομάζα στο τέλος της περιόδου έκθεσης μείον την τιμή της ίδιας μεταβλητής στην αρχή της περιόδου έκθεσης.

▼M6

Προσάρτημα 2

Περιγραφή του φυτού *Lemna* spp.

Το υδρόβιο φυτό *Lemna* spp., κοινώς λέμνα ή φακή του νερού, ανήκει στην οικογένεια των λεμνιδών (Lemnaceae), που περιλαμβάνει ορισμένα κοσμοπολίτικα είδη, ταξινομημένα σε τέσσερα γένη. Οι διαφορές τους ως προς την εμφάνιση και τη συστηματική κατάταξη έχουν περιγραφεί εκτενώς (1)(2). Τα είδη *Lemna gibba* και *Lemna minor* είναι αντιπροσωπευτικά των εύκρατων περιοχών και χρησιμοποιούνται ευρέως σε δοκιμές τοξικότητας. Και τα δύο αυτά είδη έχουν έναν επιπλέοντα ή βυθισμένο δισκοειδή βλαστό (θαλλό), ενώ από το κέντρο της κάτω επιφάνειας κάθε θαλλού εξέρχεται μια λεπτότατη ρίζα. Η *Lemna* spp. σπάνια παράγει άνθη και τα φυτά πολλαπλασιάζονται με βλαστητική αναπαραγωγή, παράγοντας νέους θαλλούς (3). Σε σύγκριση με τα φυτά μεγαλύτερης ηλικίας, τα νεαρότερα έχουν ασθενέστερο χρώμα και βραχύτερες ρίζες και αποτελούνται από δύο έως τρεις θαλλούς διαφορετικών μεγεθών. Το μικρό μέγεθος της λέμνας, η απλή δομή της, η αγενής αναπαραγωγή της και ο μικρός χρόνος γενεάς καθιστούν τα φυτά του γένους αυτού ιδιαίτερα κατάλληλα για εργαστηριακές δοκιμές (4)(5).

Λόγω πιθανών διειδικών διαφορών ως προς την ευαισθησία, μόνο οι συγκρίσεις ευαισθησίας εντός του ίδιου είδους είναι έγκυρες.

Παραδείγματα ειδών λέμνας που έχουν χρησιμοποιηθεί σε δοκιμές: αναφορά των ειδών στη βιβλιογραφία

Lemna aequinoctialis: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinoctialis* in aquatic ecotoxicological bioassays. Licentiate in Philosophy Thesis 1996:2. Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.

Lemna major: Clark, N. A. (1925). The rate of reproduction of *Lemna major* as a function of intensity and duration of light. J. phys. Chem., 29: 935-941.

Lemna minor: United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., «Public draft». EPA 712-C-96-156. 8 σελίδες.

Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 σελίδες.

Swedish Standards Institute (SIS). (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15 σελίδες (στα σουηδικά).

Lemna gibba: ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). σ. 733-742.

United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., «Public draft». EPA 712-C-96-156. 8 σελίδες.

Lemna paucicostata: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959-1969.

Lemna perpusilla: Clark, J. R. et al. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla)*. Ecotoxicol. Environ. Saf., 5:87-96.

Lemna trisulca: Huebert, D. B., Shay, J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. and Chem., 12:481- 483.

Lemna valdiviana: Hutchinson, T.C., Czyrska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. Verh.-Int. Ver. Limnol., 19:2102-2111.

Πηγές ειδών λέμνας

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Τορόντο, Οντάριο, Καναδάς, M5S 3 B2
Τηλ.: +1-416-978-3641
Φαξ: +1-416-978-5878
Ηλ. ταχ.: jacreman@botany.utoronto.ca

▼**M6**

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695-8002
ΗΠΑ
Τηλ.: 001 (919) 515-7572
astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91
Στοκχόλμη
ΣΟΥΗΔΙΑ
Τηλ.: +46 8 674 7240
Φαξ: +46 8 674 7636

Federal Environmental Agency (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Βερολίνο
ΓΕΡΜΑΝΙΑ
Ηλ. ταχ.: lemna@uba.de

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Hillman, W.S. (1961). The Lemnaceae or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. The Botanical Review, 27:221-287.

(2) Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*). Vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Ελβετία.

(3) Björndahl, G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds (*Lemnaceae* family). ISBN 82-991150-0-0. The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo.

(4) Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. Environmental Pollution, Ser B, 11:1-14.

(5) Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. Environmental Research, 52:7-22.

▼**M6**

Προσάρτημα 3

Διατήρηση της μητρικής καλλιέργειας

Οι μητρικές καλλιέργειες μπορούν να διατηρούνται σε χαμηλότερη θερμοκρασία (4-10 °C) για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, χωρίς να χρειάζεται να παρασκευαστούν εκ νέου. Το θρεπτικό μέσο για τη λέμνα μπορεί να είναι ίδιο με το θρεπτικό μέσο της δοκιμής, αλλά για τις μητρικές καλλιέργειες μπορούν να χρησιμοποιούνται άλλα πλούσια σε θρεπτικά στοιχεία μέσα.

Κατά διαστήματα, μερικά νεαρά φυτά χρώματος ανοικτού πράσινου μεταφέρονται με τεχνική ασηψίας σε νέα δοχεία καλλιέργειας τα οποία περιέχουν πρόσφατα παρασκευασμένο θρεπτικό μέσο. Στις συνθήκες χαμηλότερης θερμοκρασίας που υποδεικνύονται στη παρούσα μέθοδο, η υποκαλλιέργεια μπορεί να πραγματοποιείται ανά τρίμηνο κατ' ανώτατο όριο.

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται χημικώς καθαρά (εκπλυμένα με οξέα) και στείρα γυάλινα δοχεία καλλιέργειας και να εφαρμόζονται τεχνικές εργασίας σε συνθήκες ασηψίας. Εάν μολυνθεί η μητρική καλλιέργεια, π.χ. από φύκη ή μύκητες, απαιτούνται μέτρα για την εξάλειψη των επιμολυντικών οργανισμών. Στην περίπτωση των φυκών και των περισσότερων άλλων επιμολυντικών οργανισμών, αυτό μπορεί να επιτευχθεί με επιφανειακή αποστείρωση. Λαμβάνεται δείγμα του μολυσμένου φυτικού υλικού και κόβονται οι ρίζες. Στη συνέχεια, το υλικό αυτό αναταράσσεται ζωηρά μέσα σε καθαρό νερό και εμβαπτίζεται σε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 0,5 % (v/v) για χρονικό διάστημα μεταξύ 30 δευτερολέπτων και 5 λεπτών. Κατόπιν, το φυτικό υλικό εκπλύνεται με στείρο νερό και κατανέμεται σε έναν ορισμένο αριθμό δοχείων καλλιέργειας που περιέχουν πρόσφατα παρασκευασμένο θρεπτικό μέσο (παρτίδες). Η κατεργασία αυτή έχει ως επακόλουθο τον θάνατο πολλών θαλλών, ιδίως όταν η έκθεση διαρκεί περισσότερο χρόνο, αλλά ορισμένοι από τους επιζώντες είναι συνήθως απαλλαγμένοι από μόλυνση. Οι τελευταίοι μπορούν έπειτα να χρησιμοποιηθούν για τον επανεμβολιασμό νέων καλλιεργειών.

▼M6

Προσάρτημα 4

Θρεπτικά μέσα

Συνιστώνται διαφορετικά θρεπτικά μέσα για τα είδη *L. minor* και *L. gibba*. Για το *L. minor* συνιστάται τροποποιημένη έκδοση του θρεπτικού μέσου του Σουηδικού Ινστιτούτου Τυποποίησης (SIS), ενώ για το *L. gibba*, συνιστάται το θρεπτικό μέσο 20X AAP. Η σύνθεση των δύο μέσων παρατίθεται κατωτέρω. Κατά την παρασκευή των ανωτέρω θρεπτικών μέσων πρέπει να χρησιμοποιούνται χημικές ουσίες καθαρότητας αντιδραστηρίου ή αναλυτικής καθαρότητας και απιονισμένο νερό.

Θρεπτικό μέσο του Σουηδικού Ινστιτούτου Τυποποίησης (SIS) για τη λέμνα

— Τα διαλύματα παρακαταθήκης I — V αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο (120 °C, 15 λεπτά) ή με διήθηση μέσω μεμβράνης (διάμετρος πόρων 0,2 μm περίπου).

— Τα διαλύματα παρακαταθήκης VI και (προαιρετικά) VII αποστειρώνονται μόνο με διήθηση μέσω μεμβράνης και δεν πρέπει να θερμαίνονται σε αυτόκαυστο.

— Τα στείρα διαλύματα παρακαταθήκης θα πρέπει να φυλάσσονται σε συνθήκες ψύχους και σκότους. Τα διαλύματα παρακαταθήκης I - V θα πρέπει να απορρίπτονται έπειτα από έξι μήνες, ενώ η διάρκεια αποθήκευσης των διαλυμάτων παρακαταθήκης VI και (προαιρετικά) VII είναι ένας μήνας.

Αριθ. διαλύματος παρακαταθήκης	Ουσία	Συγκέντρωση στο διάλυμα παρακαταθήκης (g/l)	Συγκέντρωση στο παρασκευαζόμενο θρεπτικό μέσο (mg/•l)	Παρασκευαζόμενο θρεπτικό μέσο	
				Στοιχείο	Συγκέντρωση (mg/•l)
I	$NaNO_3$	8,50	85	Na· N	32· 14
	KH_2PO_4	1,34	13,4	K· P	6,0· 2,4
II	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	75	Mg· S	7,4· 9,8
III	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7,2	36	Ca· Cl	9,8· 17,5
IV	Na_2CO_3	4,0	20	C	2,3
V	H_3BO_3	1,0	1,00	B	0,17
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,20	0,20	Mn	0,056
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,010	0,010	Mo	0,0040
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,050	0,050	Zn	0,011
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na_2-EDTA $2H_2O$	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (ρυθμιστικό διάλυμα)	490	490	—	—

Για την παρασκευή 1 λίτρου θρεπτικού μέσου SIS προστίθενται σε 900 ml απιονισμένου νερού τα ακόλουθα:

▼**M6**

— 10 ml διαλύματος παρακαταθήκης I

— 5 ml διαλύματος παρακαταθήκης II

— 5 ml διαλύματος παρακαταθήκης III

— 5 ml διαλύματος παρακαταθήκης IV

— 1 ml διαλύματος παρακαταθήκης V

— 5 ml διαλύματος παρακαταθήκης VI

— 1 ml διαλύματος παρακαταθήκης VII (προαιρετικά)

Σημείωση: Για ορισμένες υπό δοκιμή χημικές ουσίες ενδέχεται να χρειάζεται ένα επιπλέον διάλυμα παρακαταθήκης VII [ρυθμιστικό διάλυμα MOPS (μορφολινο-προπανοσουλφονικό οξύ) — βλ. σημείο 11].

Ρυθμίζεται το pH στην τιμή 6,5 ± 0,2 με 0,1 ή 1 mol HCl ή NaOH, και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι το 1 λίτρο με απιονισμένο νερό.

Θρεπτικό μέσο 20X AAP

Τα διαλύματα παρακαταθήκης παρασκευάζονται με στείρο απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό.

Τα στείρα διαλύματα παρακαταθήκης θα πρέπει να φυλάσσονται σε συνθήκες ψύχους και σκότους. Στις συνθήκες αυτές, η διάρκεια αποθήκευσης των διαλυμάτων παρακαταθήκης είναι τουλάχιστον 6-8 εβδομάδες.

Για το θρεπτικό μέσο 20X AAP παρασκευάζονται πέντε διαλύματα παρακαταθήκης θρεπτικών στοιχείων (A1, A2, A3, B και Γ), με χρήση χημικών ουσιών καθαρότητας αντιδραστηρίου. Λαμβάνονται 20 ml από κάθε διάλυμα παρακαταθήκης θρεπτικών στοιχείων και προστίθενται σε περίπου 850 ml απιονισμένου νερού για να προκύψει το θρεπτικό μέσο. Ρυθμίζεται το pH στην τιμή 7,5 ± 0,1 με 0,1 ή 1 mol HCl ή NaOH, και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι το 1 λίτρο με απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, το θρεπτικό μέσο διηθείται μέσω διηθητικής μεμβράνης των 0,2 μm (περίπου) σε στείρο υποδοχέα.

Το θρεπτικό μέσο που προορίζεται για τη διεξαγωγή δοκιμών θα πρέπει να παρασκευάζεται 1-2 ημέρες πριν χρησιμοποιηθεί, ώστε να είναι δυνατόν να σταθεροποιηθεί το pH. Το pH του θρεπτικού μέσου θα πρέπει να ελέγχεται πριν από τη χρήση του και, εάν είναι απαραίτητο, να ρυθμίζεται εκ νέου με την προσθήκη διαλύματος NaOH ή HCl 0,1 ή 1 M, όπως περιγράφεται ανωτέρω.

Αριθ. διαλύματος παρακαταθήκης	Ουσία	Συγκέντρωση στο διάλυμα παρακαταθήκης (g/•l) (*)	Συγκέντρωση στο παρασκευαζόμενο θρεπτικό μέσο (mg/•l) (*)	Παρασκευαζόμενο θρεπτικό μέσο	
				Στοιχείο	Συγκέντρωση (mg/•l) (*)
A1	$NaNO_3$	26	510	Na· N	190· 84
	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12	240	Mg	58,08
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	290	S	38,22
A3	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2 \cdot O$	1,4	30	K· P	9,4· 3,7
B	H_3BO_3	0,19	3,7	B	0,65
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,42	8,3	Mn	2,3
	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,16	3,2	Fe	0,66

▼**M6**

Αριθ. διαλύματος παρακαταθήκης	Ουσία	Συγκέντρωση στο διάλυμα παρακαταθήκης (g/•l) (*)	Συγκέντρωση στο παρασκευαζόμενο θρεπτικό μέσο (mg/•l) (*)	Παρασκευαζόμενο θρεπτικό μέσο	
				Στοιχείο	Συγκέντρωση (mg/•l) (*)
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0,30	6,0	—	—
	$ZnCl_2$	3,3 mg/l	66 μg/l	Zn	31 μg/l
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,4 mg/l	29 μg/l	Co	7,1 μg/l
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7,3 mg/l	145 μg/l	Mo	58 μg/l
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,012 mg/l	0,24 μg/l	Cu	0,080 μg/l
C	$NaHCO_3$	15	300	Na· C	220· 43

(*) εκτός αντίθετης μνείας

Σημείωση: Η θεωρητικώς ενδεδειγμένη τελική συγκέντρωση όξινων ανθρακικών ιόντων (η οποία αποτρέπει την αισθητή ρύθμιση του pH) είναι 15 mg/L και όχι 300 mg/L. Ωστόσο, η χρήση του θρεπτικού μέσου 20X AAP στο παρελθόν, συμπεριλαμβανομένης της δοκιμής δακτυλίου για την παρούσα μέθοδο, έχει βασιστεί σε 300 mg/L. [I. Sims, P. Whitehouse και R. Lacey. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency.]

Θρεπτικό μέσο Steinberg (κατά το πρότυπο ISO 20079)

Συγκεντρώσεις και διαλύματα παρακαταθήκης

Κατά το πρότυπο ISO 20079, το τροποποιημένο θρεπτικό μέσο Steinberg χρησιμοποιείται μόνο για το είδος *Lemna minor* (δεδομένου ότι μόνο το *Lemna minor* επιτρέπεται)· ωστόσο, δοκιμές έχουν αποδείξει ότι είναι δυνατόν να επιτευχθούν ικανοποιητικά αποτελέσματα με τη χρήση του και για το είδος *Lemna gibba*.

Κατά την παρασκευή του εν λόγω μέσου, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται χημικές ουσίες καθαρότητας αντιδραστηρίου ή αναλυτικής καθαρότητας και απιονισμένο νερό.

Παρασκευάζεται το θρεπτικό μέσο από διαλύματα παρακαταθήκης ή από το πυκνό υλικό δεκαπλάσιας συγκέντρωσης, το οποίο παρέχει τη δυνατότητα επίτευξης μέγιστης συγκέντρωσης χωρίς καθίζηση.

Πίνακας 1

Θρεπτικό μέσο Steinberg σταθερού pH (τροποποιημένο κατά Altenburger)

Συστατικό		Θρεπτικό μέσο	
Μακροθρεπτικά στοιχεία	Μοριακό βάρος	mg/l	mmol/l
KNO_3	101,12	350,00	3,46
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	236,15	295,00	1,25
KH_2PO_4	136,09	90,00	0,66
K_2HPO_4	174,18	12,60	0,072
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,37	100,00	0,41

▼**M6**

Συστατικό		Θρεπτικό μέσο	
Μικροθρεπτικά στοιχεία	Μοριακό βάρος	0,1 μg/l	μmol/l
H_3BO_3	61,83	120,00	1,94
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287,43	180,00	0,63
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	241,92	44,00	0,18
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	197,84	180,00	0,91
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270,21	760,00	2,81
EDTA, διένυδρο άλας με νάτριο	372,24	1 500,00	4,03

Πίνακας 2

Διαλύματα παρακαταθήκης (Μακροθρεπτικά στοιχεία)

1. Μακροθρεπτικά στοιχεία (σε 50πλάσια συγκέντρωση)	**g/l**
Διάλυμα παρακαταθήκης 1:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
Διάλυμα παρακαταθήκης 2:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
Διάλυμα παρακαταθήκης 3:	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

Πίνακας 3

Διαλύματα παρακαταθήκης (Μικροθρεπτικά στοιχεία)

2. Μικροθρεπτικά στοιχεία (σε 1 000πλάσια συγκέντρωση)	**mg/l**
Διάλυμα παρακαταθήκης 4:	
H_3BO_3	120,0
Διάλυμα παρακαταθήκης 5:	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
Διάλυμα παρακαταθήκης 6:	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0
Διάλυμα παρακαταθήκης 7:	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
Διάλυμα παρακαταθήκης 8:	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	760,00
EDTA, διένυδρο άλας με νάτριο	1 500,00

— Τα διαλύματα παρακαταθήκης 2 και 3, και χωριστά διαλύματα παρακαταθήκης 4 έως 7 είναι δυνατόν να ενωθούν (λαμβανομένων υπόψη των απαιτούμενων συγκεντρώσεων).

▼**M6**

— Για να παραταθεί η διάρκεια αποθήκευσης, τα διαλύματα παρακαταθήκης θερμαίνονται σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 20 λεπτά ή, εναλλακτικά, υποβάλλονται σε αποστειρωτική διήθηση (ηθμός των 0,2 μm). Στην περίπτωση του διαλύματος παρακαταθήκης 8, συνιστάται ένθερμα η αποστειρωτική διήθηση (ηθμός των 0,2 μm).

Παρασκευή του (τροποποιημένου) θρεπτικού μέσου Steinberg με την τελική συγκέντρωση

— Σε περίπου 900 ml απιονισμένου νερού προστίθενται 20 ml από τα διαλύματα παρακαταθήκης 1, 2 και 3 (βλ. πίνακα 2), ώστε να αποφεύγεται η καθίζηση.

— Προστίθεται 1,0 ml από τα διαλύματα παρακαταθήκης 4, 5, 6, 7 και 8 (βλ. πίνακα 3).

— Το pH θα πρέπει να είναι 5,5 +/- 0,2 (ρυθμίζεται με την προσθήκη του ελάχιστου δυνατού όγκου διαλύματος NaOH ή HCl).

— Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 1 000 ml με νερό.

— Εάν τα διαλύματα παρακαταθήκης είναι αποστειρωμένα και χρησιμοποιείται το ενδεδειγμένο νερό, δεν απαιτείται περαιτέρω αποστείρωση. Εάν αποστειρώνεται το τελικό θρεπτικό μέσο, το διάλυμα παρακαταθήκης 8 θα πρέπει να προστίθεται μετά τη θέρμανση σε αυτόκαυστο (στους 121 °C για 20 λεπτά).

Παρασκευή του πυκνού (τροποποιημένου) θρεπτικού μέσου Steinberg με δεκαπλάσια συγκέντρωση για ενδιάμεση αποθήκευση

— Σε περίπου 30 ml απιονισμένου νερού προστίθενται 20 ml από τα διαλύματα παρακαταθήκης 1, 2 και 3 (βλ. πίνακα 2), ώστε να αποφεύγεται η καθίζηση.

— Προστίθεται 1,0 ml από τα διαλύματα παρακαταθήκης 4, 5, 6, 7 και 8 (βλ. πίνακα 3). Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 100 ml με νερό.

— Εάν τα διαλύματα παρακαταθήκης είναι αποστειρωμένα και χρησιμοποιείται το ενδεδειγμένο νερό, δεν απαιτείται περαιτέρω αποστείρωση. Εάν αποστειρώνεται το τελικό θρεπτικό μέσο, το διάλυμα παρακαταθήκης 8 θα πρέπει να προστίθεται μετά τη θέρμανση σε αυτόκαυστο (στους 121 °C για 20 λεπτά).

— Το pH του θρεπτικού μέσου (τελική συγκέντρωση) θα πρέπει να είναι 5,5 ± 0,2.

▼M4

Γ.27 ΔΟΚΙΜΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΧΕΙΡΟΝΟΜΙΔΕΣ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑ ΙΖΗΜΑΤΟΣ- ΝΕΡΟΥ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΟΥ ΙΖΗΜΑΤΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 218 του ΟΟΣΑ (2004). Σκοπός της παρούσας μεθόδου δοκιμών είναι η εκτίμηση των επιδράσεων της παρατεταμένης έκθεσης χημικών ουσιών στις προνύμφες των ειδών δίπτερων Chironomus sp. των γλυκών υδάτων, οι οποίες διαβιούν σε ιζήματα. Βασίζεται στα υπάρχοντα πρωτόκολλα δοκιμών τοξικότητας για τα είδη *Chironomus riparius* και *Chironomus tentans*, που έχουν καταρτιστεί στην Ευρώπη (1)(2)(3) και στη Βόρεια Αμερική (4)(5)(6)(7)(8) και έχουν υποβληθεί σε κυκλική δοκιμή επικύρωσης (1)(6)(9). Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη χειρονομίδων για τα οποία υπάρχει επαρκής τεκμηρίωση, π.χ. *Chironomus yoshimatsui* (10)(11).

2. Το σενάριο έκθεσης που εφαρμόζεται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών είναι ο εμβολιασμός του ιζήματος με την ελεγχόμενη χημική ουσία. Η επιλογή του κατάλληλου σεναρίου έκθεσης εξαρτάται από την επιδιωκόμενη εφαρμογή της δοκιμής. Το σενάριο του εμβολιασμού ιζήματος αποσκοπεί στην προσομοίωση συσσωρευμένων επιπέδων χημικών ουσιών που παραμένουν στο ίζημα. Αυτό το σύστημα έκθεσης περιλαμβάνει τον εμβολιασμό του ιζήματος ενός δοκιμαστικού συστήματος ιζήματος-νερού.

3. Οι ουσίες που πρέπει να ελέγχονται έναντι οργανισμών που διαβιούν σε ιζήματα συνήθως παραμένουν σε αυτό το διαμέρισμα για μεγάλες χρονικές περιόδους. Οι οργανισμοί που διαβιούν σε ιζήματα ενδέχεται να εκτίθενται μέσω διαφόρων οδών. Η σχετική σημασία κάθε οδού έκθεσης, καθώς και ο χρόνος που απαιτείται για να συμβάλει η καθεμία στις συνολικές τοξικές επιδράσεις, εξαρτώνται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της εκάστοτε χημικής ουσίας. Για ουσίες με ισχυρή προσρόφηση (π.χ. με $\log K_{ow} > 5$) ή για ουσίες που συνδέονται με ομοιοπολικούς δεσμούς με ιζήματα, η πρόσληψη μολυσμένων τροφών μπορεί να αποτελεί σημαντική οδό έκθεσης. Προκειμένου να μην υποτιμάται η τοξικότητα των εξαιρετικά λιπόφιλων ουσιών, μπορεί να εξετάζεται η χρήση τροφής που έχει προστεθεί στο ίζημα πριν από την εφαρμογή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Για να λαμβάνονται υπόψη όλες οι δυνητικές οδοί έκθεσης, η παρούσα μέθοδος δοκιμών εστιάζει στη μακροχρόνια έκθεση. Η διάρκεια της δοκιμής κυμαίνεται μεταξύ 20 και 28 ημερών για τα είδη *C. riparius* και *C. yoshimatsui*, και από 28 έως 65 ημέρες για το *C. tentans*. Εάν απαιτούνται βραχυπρόθεσμα δεδομένα για συγκεκριμένο σκοπό, π.χ. για τη διευρεύνηση των επιδράσεων μιας ασταθούς χημικής ουσίας, τα πρόσθετα δείγματα πολλαπλού προσδιορισμού (replicates) μπορούν να αποσύρονται μετά από μια περίοδο δέκα ημερών.

4. Τα μετρούμενα καταληκτικά σημεία είναι ο συνολικός αριθμός εμφανιζόμενων ενηλίκων ατόμων και ο χρόνος μέχρι την εμφάνιση. Εάν απαιτούνται επιπλέον βραχυπρόθεσμα δεδομένα, συνιστάται να μετράται η επιβίωση και η ανάπτυξη των προνυμφών μόνο μετά από ένα δεκαήμερο, με τη χρήση των κατάλληλων πρόσθετων δειγμάτων πολλαπλού προσδιορισμού.

5. Συνιστάται η χρήση μορφοποιημένου ιζήματος, το οποίο παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα φυσικά ιζήματα:

   — η πειραματική μεταβλητότητα μειώνεται, επειδή το εν λόγω ίζημα σχηματίζει μια αναπαραγόμενη «τυποποιημένη μήτρα» και εκλείπει η ανάγκη εξεύρεσης πηγών αμόλυντου και καθαρού ιζήματος,

   — οι δοκιμές μπορούν να αρχίζουν ανά πάσα στιγμή χωρίς να αντιμετωπίζουν τις εποχιακές διακυμάνσεις του ιζήματος δοκιμής και δεν απαιτείται προκατεργασία του ιζήματος για την απομάκρυνση της αυτόχθονης πανίδας. Με τη χρήση μορφοποιημένων ιζημάτων μειώνεται επίσης το κόστος που συνεπάγεται η επιτόπια συλλογή επαρκών ποσοτήτων ιζημάτων για δοκιμές ρουτίνας,

   — η χρήση μορφοποιημένων ιζημάτων παρέχει τη δυνατότητα συγκρίσεων της τοξικότητας και κατάταξης των ουσιών αναλόγως.

6. Οι χρησιμοποιούμενοι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

▼M4

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

7. Προνύμφες χειρονομίδων πρώτου σταδίου εκτίθενται σε ένα εύρος συγκεντρώσεων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε συστήματα ιζήματος-νερού. Η ελεγχόμενη χημική ουσία εμβολιάζεται στο ίζημα και, στη συνέχεια, οι προνύμφες πρώτου σταδίου εισάγονται σε ποτήρια ζέσεως στα οποία έχουν σταθεροποιηθεί οι συγκεντρώσεις του ιζήματος και του νερού. Στο τέλος της δοκιμής μετρώνται η εμφάνιση χειρονομίδων και ο ρυθμός ανάπτυξής τους. Η επιβίωση και το βάρος των προνυμφών μπορούν επίσης να μετρηθούν μετά από 10 ημέρες, εάν απαιτείται (με τη χρήση των κατάλληλων πρόσθετων δειγμάτων πολλαπλού προσδιορισμού). Αυτά τα δεδομένα αναλύονται με τη χρήση είτε μοντέλου παλινδρόμησης, ώστε να εκτιμάται η συγκέντρωση που μπορεί να προκαλέσει × % μείωση της εμφάνισης προνυμφών ή της επιβίωσης ή ανάπτυξής τους (π.χ. EC_{15}, EC_{50} κ.λπ.), είτε δοκιμασίας στατιστικής υπόθεσης για τον προσδιορισμό NOEC (συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρούνται επιδράσεις)/LOEC (κατώτατη συγκέντρωση παρατηρούμενων επιδράσεων). Στη δεύτερη περίπτωση, απαιτείται σύγκριση μεταξύ των τιμών επίδρασης και των τιμών-μαρτύρων με στατιστικές δοκιμασίες.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ

8. Θα πρέπει να είναι γνωστές η υδατοδιαλυτότητα και η τάση ατμών της ελεγχόμενης ουσίας, η μετρούμενη ή υπολογιζόμενη κατανομή της στο ίζημα και η σταθερότητά της στο νερό και το ίζημα. Θα πρέπει να διατίθεται αξιόπιστη μέθοδος ανάλυσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ελεγχόμενης ουσίας στο υπερκείμενο νερό, στο ενδοπορικό νερό και στα ιζήματα, με γνωστή και δημοσιευμένη ορθότητα (accuracy) και όριο ανίχνευσης. Στις χρήσιμες πληροφορίες συγκαταλέγονται ο συντακτικός τύπος και η καθαρότητα της ελεγχόμενης ουσίας. Χρήσιμο στοιχείο είναι επίσης η χημική πορεία της ελεγχόμενης ουσίας (π.χ. διασπορά, βιοτική και αβιοτική αποικοδόμηση κ.λπ.). Περαιτέρω καθοδήγηση για τις δοκιμές ουσιών με φυσικοχημικές ιδιότητες που δυσχεραίνουν τη διεξαγωγή της δοκιμής παρέχεται στη βιβλιογραφική παραπομπή (12).

ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

9. Μπορούν να ελέγχονται κατά περιόδους χημικές ουσίες αναφοράς για τη διασφάλιση της αξιοπιστίας του πρωτοκόλλου και των συνθηκών της δοκιμής. Μερικές από τις τοξικές ουσίες αναφοράς που χρησιμοποιούνται με επιτυχία σε κυκλικές δοκιμές και μελέτες επικύρωσης είναι το λινδάνιο, η τριφλουραλίνη, η πενταχλωροφαινόλη, το χλωριούχο κάδμιο και το χλωριούχο κάλιο (1)(2)(5)(6)(13).

ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

10. Για να θεωρηθεί έγκυρη η δοκιμή, πρέπει να πληρούνται οι ακόλουθες προϋποθέσεις:

— το ποσοστό εμφάνισης στους μάρτυρες πρέπει να ανέρχεται σε τουλάχιστον 70 % στο τέλος της δοκιμής (1)(6),

— η εμφάνιση ενηλίκων *C. riparius* και *C. yoshimatsui* στα δοχεία-μάρτυρες θα πρέπει να παρατηρείται μεταξύ 12ης και 23ης ημέρας από την εισαγωγή τους στα δοχεία, ενώ για το *C. tentans* απαιτείται περίοδος 20 έως 65 ημερών,

— στο τέλος της δοκιμής, θα πρέπει να μετρώνται το pH και η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου σε κάθε δοχείο. Η συγκέντρωση οξυγόνου πρέπει να είναι τουλάχιστον 60 % της τιμής κορεσμού του αέρα (ASV) στη χρησιμοποιούμενη θερμοκρασία και το pH του υπερκείμενου νερού να είναι της τάξης του 6-9 σε όλα τα δοχεία δοκιμής,

— η θερμοκρασία του νερού δεν πρέπει να διαφέρει κατά περισσότερο από ± 1,0 °C. Μπορεί να ελέγχεται με τη χρήση ισοθερμικής αίθουσας και, στην περίπτωση αυτή, η θερμοκρασία δωματίου πρέπει να επιβεβαιώνεται ανά κατάλληλα χρονικά διαστήματα.

▼M4

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Δοχεία δοκιμής

11. Η μελέτη διεξάγεται σε γυάλινα ποτήρια ζέσεως των 600 ml με διάμετρο 8 cm. Κατάλληλα είναι και άλλα δοχεία, αλλά θα πρέπει να εξασφαλίζουν ένα κατάλληλο βάθος υπερκείμενου νερού και ιζήματος. Η επιφάνεια του ιζήματος θα πρέπει να επαρκεί για την παροχή 2 έως 3 cm^2 ανά προνύμφη. Η αναλογία του βάθους του ιζήματος προς το βάθος του υπερκείμενου νερού θα πρέπει να είναι 1:4. Τα δοχεία δοκιμής και ο λοιπός εξοπλισμός που θα έρχονται σε επαφή με το σύστημα δοκιμής θα πρέπει να είναι κατασκευασμένα εξ ολοκλήρου από γυαλί ή άλλο χημικώς αδρανές υλικό (π.χ. Teflon).

Επιλογή είδους

12. Το είδος που χρησιμοποιείται στη δοκιμή είναι κατά προτίμηση το *Chironomus riparius*. Κατάλληλο είναι και το *Chironomus tentans*, αλλά είναι πιο δύσκολο στη μεταχείριση και απαιτεί μεγαλύτερη διάρκεια δοκιμής. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί το *Chironomus yohimatsui*. Οι λεπτομέρειες των μεθόδων καλλιέργειας του *Chironomus riparius* παρατίθενται στο προσάρτημα 2. Πληροφορίες για τις συνθήκες καλλιέργειας είναι επίσης διαθέσιμες για άλλα είδη, δηλαδή για τα *Chironomus tentans* (4) και *Chironomus yoshimatsui* (11). Η ταυτοποίηση των ειδών πρέπει να επιβεβαιώνεται πριν από τη δοκιμή, ενώ δεν απαιτείται πριν από κάθε δοκιμή, εάν οι οργανισμοί προέρχονται από εσωτερική καλλιέργεια.

Ίζημα

13. Κατά προτίμηση, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μορφοποιημένα ιζήματα (που ονομάζονται επίσης ανασυσταθέντα, τεχνητά ή συνθετικά ιζήματα). Ωστόσο, εάν χρησιμοποιείται φυσικό ίζημα, θα πρέπει να έχει χαρακτηριστεί (τουλάχιστον το pH και η περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, ενώ συνιστάται επίσης ο προσδιορισμός άλλων παραμέτρων, όπως η αναλογία C/N και η κοκκομετρία), και να είναι απαλλαγμένο από μόλυνση και από άλλους οργανισμούς που θα μπορούσαν να ανταγωνιστούν ή να καταναλώσουν τις χειρονομίδες. Επίσης, πριν από τη χρήση του φυσικού ιζήματος σε δοκιμή τοξικότητας σε χειρονομίδες, συνιστάται ο εγκλιματισμός του για επτά ημέρες στις συνθήκες που θα επικρατούν στη μετέπειτα δοκιμή. Συνιστάται να χρησιμοποιείται στην παρούσα δοκιμή το ακόλουθο μορφοποιημένο ίζημα (1)(15)(16), το οποίο βασίζεται στο τεχνητό έδαφος που χρησιμοποιείται στη μέθοδο δοκιμών Γ.8 (14):

α) 4-5 % (ξηρό βάρος) τύρφης: pH όσο το δυνατόν πλησιέστερο στην τιμή 5,5 έως 6,0. Είναι σημαντικό να χρησιμοποιείται τύρφη σε σκόνη, λεπτοαλεσμένη (μέγεθος σωματιδίων≤ 1 mm) και μόνο αερόξηρη·

β) 20 % (ξηρό βάρος) καολινιτικής αργίλου (περιεκτικότητα σε καολινίτη κατά προτίμηση άνω του 30 %)·

γ) 75-76 % (ξηρό βάρος) χαλαζιακής άμμου (θα πρέπει να επικρατεί η λεπτή άμμος με ποσοστό σωματιδίων μεγέθους μεταξύ 50 και 200 μm πάνω από 50 %)·

δ) προστίθεται απιονισμένο νερό για να επιτευχθεί υγρασία του τελικού μείγματος της τάξης του 30-50 %·

ε) προστίθεται ανθρακικό ασβέστιο χημικώς καθαρό ($CaCO_3$) για τη ρύθμιση του pH του τελικού μείγματος του ιζήματος στην τιμή 7,0 ± 0,5. Η περιεκτικότητα του τελικού μείγματος σε οργανικό άνθρακα θα πρέπει να είναι 2 % (± 0,5 %) και να ρυθμίζεται με τη χρήση κατάλληλων ποσοτήτων τύρφης και άμμου, σύμφωνα με τα στοιχεία α) και γ).

14. Η πηγή της τύρφης, καολινιτικής αργίλου και της άμμου θα πρέπει να είναι γνωστή. Τα συστατικά του ιζήματος θα πρέπει να ελέγχονται για απουσία χημικής μόλυνσης (π.χ. βαρέα μέταλλα, οργανοχλωριούχες ενώσεις, οργανοφωσφορικές ενώσεις κ.λπ.). Στο προσάρτημα 3 παρατίθεται παράδειγμα της παρασκευής μορφοποιημένου ιζήματος. Επίσης, επιτρέπεται η ανάμειξη των ξηρών συστατικών, εάν καταδεικνύεται ότι μετά την προσθήκη υπερκείμενου νερού δεν διαχωρίζονται τα συστατικά του ιζήματος (π.χ. επίπλευση σωματιδίων τύρφης) και ότι η τύρφη ή το ίζημα είναι επαρκώς εγκλιματισμένα.

▼M4

Νερό

15. Κάθε νερό που είναι σύμφωνο με τα χημικά χαρακτηριστικά του αποδεκτού νερού αραίωσης, που απαριθμούνται στα προσαρτήματα 2 και 4, είναι κατάλληλο ως νερό δοκιμής. Οποιοδήποτε κατάλληλο νερό, φυσικό (επιφανειακά ή υπόγεια ύδατα), ανασυσταθέν (βλέπε προσάρτημα 2) ή αποχλωριωμένο νερό βρύσης είναι αποδεκτό ως νερό καλλιέργειας και δοκιμής, εάν οι χειρονομίδες επιβιώνουν σε αυτό καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας και των δοκιμών, χωρίς να επιδείξουν σημεία πίεσης. Κατά την έναρξη της δοκιμής, το pH του νερού δοκιμής θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 6 και 9 και η ολική σκληρότητα να μην υπερβαίνει τα 400 mg/l ως $CaCO_3$. Ωστόσο, εάν υπάρχουν υπόνοιες για αλληλεπίδραση μεταξύ των ιόντων σκληρότητας και της ελεγχόμενης ουσίας, θα πρέπει να χρησιμοποιείται νερό χαμηλότερης σκληρότητας (και ως εκ τούτου, δεν πρέπει να χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό Elendt M4 στην περίπτωση αυτή). Το ίδιο είδος νερού θα πρέπει να χρησιμοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης. Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του νερού, που απαριθμούνται στο προσάρτημα 4, πρέπει να μετρώνται τουλάχιστον δύο φορές ετησίως ή όταν υπάρχουν υπόνοιες για σημαντική μεταβολή τους.

Διαλύματα παρακαταθήκης — Εμβολιασμένα ιζήματα

16. Τα εμβολιασμένα ιζήματα με την επιλεγμένη συγκέντρωση παρασκευάζονται συνήθως με την απευθείας προσθήκη διαλύματος της ελεγχόμενης ουσίας στο ίζημα. Διάλυμα παρακαταθήκης της ελεγχόμενης ουσίας που έχει διαλυθεί σε απιονισμένο νερό αναμειγνύεται με το μορφοποιημένο ίζημα με τη βοήθεια πρέσας, αναμείκτη τροφών ή χειρωνακτικά. Εάν η ελεγχόμενη ουσία είναι δυσδιάλυτη στο νερό, μπορεί να διαλυθεί σε όσο το δυνατόν μικρότερο όγκο κατάλληλου οργανικού διαλύτη (π.χ. εξάνιο, ακετόνη ή χλωροφόρμιο). Στη συνέχεια το διάλυμα αυτό αναμειγνύεται με 10 g λεπτής χαλαζιακής άμμου για κάθε δοχείο δοκιμής. Ο διαλύτης αφήνεται να εξατμιστεί και πρέπει να απομακρύνεται εντελώς από την άμμο. Στη συνέχεια, η άμμος αναμειγνύεται με την κατάλληλη ποσότητα ιζήματος ανά ποτήρι δοκιμής. Για τη διαλυτοποίηση, τη διασπορά ή τη γαλακτωματοποίηση της ελεγχόμενης ουσίας μπορούν να χρησιμοποιούνται μόνο μέσα που εξατμίζονται εύκολα. Υπενθυμίζεται ότι, κατά την παρασκευή του ιζήματος, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η άμμος που παρέχεται από το μείγμα ελεγχόμενης ουσίας και άμμου (δηλαδή το ίζημα θα πρέπει επομένως να παρασκευάζεται με λιγότερη άμμο). Πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να εξασφαλίζεται ότι η ελεγχόμενη ουσία που προστίθεται στο ίζημα είναι πλήρως και ομοιογενώς κατανεμημένη μέσα στο ίζημα. Εάν είναι απαραίτητο, μπορούν να αναλύονται επιμέρους δείγματα για τον προσδιορισμό του βαθμού ομοιογένειας.

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

17. Ο σχεδιασμός της δοκιμής αφορά την επιλογή του αριθμού και της κλιμάκωσης των συγκεντρώσεων δοκιμής, του αριθμού των δοχείων για κάθε συγκέντρωση και του αριθμού των προνυμφών ανά δοχείο. Περιγράφονται σχεδιασμοί για την εκτίμηση του σημείου EC, την εκτίμηση της NOEC και τη διεξαγωγή οριακής δοκιμής.

Σχεδιασμός για την ανάλυση παλινδρόμησης

18. Η συγκέντρωση επίδρασης (π.χ. EC_{15}, EC_{50}) και το εύρος συγκεντρώσεων που ενδιαφέρουν σε σχέση με την επίδραση της ελεγχόμενης ουσίας θα πρέπει να καλύπτονται από τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή. Γενικώς, η ορθότητα και ιδίως η εγκυρότητα, με την οποία μπορούν να εκτιμηθούν οι συγκεντρώσεις επίδρασης (EC_x), βελτιώνονται όταν η συγκέντρωση επίδρασης περικλείεται στο εύρος των συγκεντρώσεων δοκιμής. Θα πρέπει να αποφεύγεται η παρέκταση πολύ χαμηλότερα από την κατώτατη θετική συγκέντρωση ή πάνω από την ανώτατη συγκέντρωση. Για την επιλογή του πεδίου τιμών των συγκεντρώσεων που θα χρησιμοποιηθούν, χρήσιμη είναι η προκαταρκτική δοκιμή καθορισμού εύρους (βλέπε παράγραφο 27).

▼M4

19. Εάν πρόκειται να εκτιμηθεί η EC_x, θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις και τρεις επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση. Σε κάθε περίπτωση, συνιστάται η χρησιμοποίηση επαρκών συγκεντρώσεων για την ικανοποιητική εκτίμηση βάσει μοντέλου. Ο συντελεστής μεταξύ των συγκεντρώσεων δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 2 (εξαίρεση θα μπορούσε να γίνει σε περιπτώσεις που η καμπύλη δόσης-απόκρισης έχει μικρή κλίση). Ο αριθμός των επαναλήψεων σε κάθε αγωγή μπορεί να μειωθεί, εάν αυξάνεται ο αριθμός των συγκεντρώσεων δοκιμής με διαφορετικές αποκρίσεις. Η αύξηση του αριθμού των επαναλήψεων ή η μείωση του μεγέθους των διαστημάτων ανάμεσα στις συγκεντρώσεις δοκιμής τείνει να οδηγεί σε στενότερα διαστήματα εμπιστοσύνης για τη δοκιμή. Σε περίπτωση που πρέπει να εκτιμηθεί η δεκαήμερη επιβίωση και ανάπτυξη των προνυμφών, απαιτούνται πρόσθετα δείγματα επανάληψης.

Σχεδιασμός για την εκτίμηση NOEC/LOEC

20. Εάν πρόκειται να εκτιμηθεί η LOEC ή NOEC, πρέπει να χρησιμοποιούνται πέντε συγκεντρώσεις δοκιμής με τουλάχιστον τέσσερις επαναλήψεις και ο συντελεστής μεταξύ των συγκεντρώσεων δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 2. Ο αριθμός των επαναλήψεων θα πρέπει να είναι επαρκής ώστε να εξασφαλίζεται κατάλληλη στατιστική ισχύς για τον εντοπισμό διαφοράς 20 % από τον μάρτυρα με επίπεδο σημαντικότητας 5 % (p = 0,05). Για τον ρυθμό ανάπτυξης είναι συνήθως κατάλληλη μια ανάλυση της διασποράς (ANOVA), όπως οι δοκιμασίες Dunnett και Williams (17)(18)(19)(20). Για τον λόγο εμφάνισης, μπορούν να χρησιμοποιούνται οι δοκιμασίες Cochran-Armitage, Fisher exact (με διόρθωση κατά Bonferroni) ή Mantel-Haenszel.

Οριακή δοκιμή

21. Εάν δεν έχει παρατηρηθεί καμία επίδραση στην προκαταρκτική δοκιμή καθορισμού εύρους, είναι δυνατόν να διεξαχθεί οριακή δοκιμή (μία συγκέντρωση δοκιμής και ένας μάρτυρας). Σκοπός της οριακής δοκιμής είναι η δοκιμή σε συγκέντρωση αρκετά υψηλή ώστε να επιτρέπει στους ιθύνοντες να αποκλείσουν πιθανές τοξικές επιδράσεις της ελεγχόμενης ουσίας, ενώ το όριο τίθεται σε συγκέντρωση η οποία δεν αναμένεται να εμφανιστεί σε καμία περίπτωση. Συνιστάται η συγκέντρωση 1 000 mg/kg (ξηρό βάρος). Συνήθως, χρειάζονται τουλάχιστον έξι επαναλήψεις, τόσο για την αγωγή όσο και για τον μάρτυρα. Θα πρέπει να καταδεικνύεται επαρκής στατιστική ισχύς για τον εντοπισμό διαφοράς 20 % από τον μάρτυρα με επίπεδο σημαντικότητας 5 % (p = 0,05). Με μετρική απόκριση (ρυθμός ανάπτυξης και βάρος), η δοκιμασία t είναι κατάλληλη στατιστική μέθοδος, εάν τα δεδομένα πληρούν τις απαιτήσεις της (κανονικότητα, ομοιογενείς διασπορές). Εάν δεν πληρούνται οι απαιτήσεις αυτές, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η δοκιμασία t άνισης διασποράς ή μια μη παραμετρική δοκιμασία, όπως η Wilcoxon-Mann-Whithey. Για τον λόγο εμφάνισης, είναι κατάλληλη η δοκιμασία Fisher exact.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Συνθήκες έκθεσης

Ετοιμασία του συστήματος εμβολιασμένου ιζήματος-νερού

22. Για την εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας συνιστάται η διαδικασία εμβολιασμού που περιγράφεται στη μέθοδο δοκιμών Γ.8 «Τοξικότητα για τους γαιοσκώληκες» (14). Τα εμβολιασμένα ιζήματα τοποθετούνται στα δοχεία και προστίθεται υπερκείμενο νερό για να επιτευχθεί αναλογία όγκων ιζήματος-νερού 1:4 (βλέπε παραγράφους 11 και 15). Το βάθος του στρώματος ιζήματος θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 1,5 και 3 cm. Για να αποφεύγεται ο διαχωρισμός των συστατικών του ιζήματος και η επαναιώρηση του λεπτόκοκκου υλικού κατά τη διάρκεια της προσθήκης νερού δοκιμής στη στήλη ύδατος, μπορεί να καλύπτεται το ίζημα με πλαστικό δίσκο, ενώ το νερό χύνεται επάνω σε αυτό, και αμέσως μετά να αφαιρείται ο δίσκος. Κατάλληλες μπορεί να είναι και άλλες συσκευές.

23. Τα δοχεία δοκιμής πρέπει να καλύπτονται (π.χ. με γυάλινες πλάκες). Εάν είναι απαραίτητο, κατά τη διάρκεια της μελέτης θα πρέπει να συμπληρώνεται το νερό μέχρι τον αρχικό όγκο ώστε να αναπληρώνεται η εξάτμιση του νερού. Αυτό θα πρέπει να γίνεται με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό για να αποτρέπεται η συσσώρευση αλάτων.

▼M4

Σταθεροποίηση

24. Μετά την ετοιμασία του εμβολιασμένου ιζήματος με το υπερκείμενο νερό, είναι σκόπιμο να παρέχεται ένα χρονικό περιθώριο για την κατανομή της ελεγχόμενης ουσίας μεταξύ υδατικής φάσης και ιζήματος (3)(4)(6)(13). Αυτό θα πρέπει να γίνεται κατά προτίμηση υπό τις συνθήκες θερμοκρασίας και αερισμού που εφαρμόζονται στη δοκιμή. Ο κατάλληλος χρόνος εξισορρόπησης είναι ειδικός για τα ιζήματα και τις χημικές ενώσεις και μπορεί να κυμαίνεται από ώρες έως ημέρες και, σε σπάνιες περιπτώσεις, έως αρκετές εβδομάδες (4-5 εβδομάδες). Δεδομένου οι χρόνοι αυτοί επιτρέπουν την αποικοδόμηση πολλών χημικών ουσιών, δεν αναμένεται η επίτευξη ισορροπίας, αλλά συνιστάται 48ωρη περίοδος εξισορρόπησης. Στο τέλος αυτής της νέας περιόδου εξισορρόπησης, θα πρέπει να μετράται η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας στο υπερκείμενο νερό, το ενδοπορικό νερό και στο ίζημα, τουλάχιστον στα δοχεία με την υψηλότερη και τη χαμηλότερη συγκέντρωση (βλέπε παράγραφο 38). Οι εν λόγω αναλυτικοί προσδιορισμοί της ελεγχόμενης ουσίας επιτρέπουν τον υπολογισμό του ισοζυγίου μάζας και την έκφραση των αποτελεσμάτων με βάση τις μετρούμενες συγκεντρώσεις.

Προσθήκη των οργανισμών δοκιμής

25. Τέσσερις έως πέντε ημέρες πριν από την προσθήκη των οργανισμών δοκιμής στα δοχεία δοκιμής, θα πρέπει να λαμβάνονται μάζες αυγών από τις καλλιέργειες και να τοποθετούνται σε μικρά δοχεία με μέσο καλλιέργειας. Μπορεί να χρησιμοποιείται παλαιό μέσο από την αρχική καλλιέργεια ή προσφάτως παρασκευασμένο. Στη δεύτερη περίπτωση, πρέπει να προστίθεται στο μέσο καλλιέργειας μια μικρή ποσότητα τροφής π.χ. πράσινα φύκη και/ή λίγες σταγόνες διηθήματος από ένα εναιώρημα λεπτοαλεσμένων νιφάδων τροφής για ψάρια (βλέπε προσάρτημα 2). Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μάζες μόνο φρέσκων αυγών. Κανονικά, οι προνύμφες αρχίζουν να εκκολάπτονται λίγες ημέρες μετά την τοποθέτηση των αυγών (2 έως 3 ημέρες για το *Chironomus riparius* στους 20 °C και 1 έως 4 ημέρες για το *Chironomus tentans* στους 23 °C και για το *Chironomus yoshimatui* στους 25 °C) και αναπτύσσονται σε τέσσερα στάδια, διάρκειας 4-8 ημερών το καθένα. Για τη δοκιμή θα πρέπει να χρησιμοποιούνται προνύμφες πρώτου σταδίου (2-3 ή 1-4 ημέρες μετά την εκκόλαψη). Το στάδιο των χειρονόμων μπορεί να εξακριβωθεί από το πλάτος της κεφαλικής κάψας (6).

26. Είκοσι προνύμφες πρώτου σταδίου κατανέμονται τυχαία, με αμβλύ σιφώνιο, σε κάθε δοχείο δοκιμής που περιέχει το εμβολιασμένο ίζημα και νερό. Κατά τη διάρκεια της προσθήκης των προνυμφών στα δοχεία δοκιμής, ο αερισμός του νερού πρέπει να διακόπτεται και να μην επαναρχίζει προτού παρέλθουν 24 ώρες από την προσθήκη των προνυμφών (βλέπε παραγράφους 25 και 32). Σύμφωνα με τον χρησιμοποιούμενο σχεδιασμό της δοκιμής (βλέπε παραγράφους 19 και 20), ο αριθμός των προνυμφών που χρησιμοποιούνται ανά συγκέντρωση είναι τουλάχιστον 60 για την εκτίμηση του σημείου EC και 80 για τον προσδιορισμό της NOEC.

Συγκεντρώσεις δοκιμής

27. Η διεξαγωγή δοκιμής καθορισμού εύρους ενδέχεται να είναι χρήσιμη για τον προσδιορισμό του εύρους συγκεντρώσεων της οριστικής δοκιμής. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιείται μια σειρά από συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας με μεγάλα διαστήματα μεταξύ τους. Προκειμένου να παρέχεται η ίδια πυκνότητα επιφάνειας ανά χειρονομίδα με εκείνη που θα χρησιμοποιηθεί στην οριστική δοκιμή, οι χειρονομίδες εκτίθενται σε κάθε συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας για χρονικό διάστημα που επιτρέπει την εκτίμηση των κατάλληλων συγκεντρώσεων δοκιμής, ενώ δεν απαιτούνται επαναλήψεις.

28. Οι συγκεντρώσεις που θα χρησιμοποιηθούν στην οριστική δοκιμή αποφασίζονται με βάση το αποτέλεσμα της δοκιμής καθορισμού εύρους. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις, επιλεγόμενες όπως περιγράφεται στις παραγράφους 18 έως 20.

▼**M4**

Μάρτυρες

29. Θα πρέπει να περιλαμβάνονται στη δοκιμή δοχεία-μάρτυρες, που δεν περιέχουν την ελεγχόμενη ουσία, αλλά περιέχουν ίζημα, με τον κατάλληλο αριθμό επαναλήψεων (βλέπε παραγράφους 19-20). Εάν έχει χρησιμοποιηθεί διαλύτης για την εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας (βλέπε παράγραφο 16), θα πρέπει να προστίθεται ένας μάρτυρας για τον διαλύτη του ιζήματος.

Σύστημα δοκιμής

30. Χρησιμοποιούνται στατικά συστήματα. Σε εξαιρετικές περιπτώσεις, μπορούν να χρησιμοποιούνται ημιστατικά συστήματα ή συστήματα συνεχούς ροής με διαλείπουσα ή συνεχή ανανέωση του υπερκείμενου νερού, για παράδειγμα εάν οι προδιαγραφές ποιότητας του νερού καταστούν ακατάλληλες για τον οργανισμό δοκιμής ή επηρεάζουν τη χημική ισορροπία (π.χ. εάν μειωθούν πολύ τα επίπεδα διαλυμένου οξυγόνου, αυξηθεί πολύ η συγκέντρωση προϊόντων απέκκρισης ή στραγγίζουν από το ίζημα ανόργανα άλατα που επηρεάζουν το pH και/ή τη σκληρότητα του νερού). Ωστόσο, κατά κανόνα επαρκούν και προτιμώνται άλλες μέθοδοι για τη βελτίωση της ποιότητας του υπερκείμενου νερού, όπως ο αερισμός.

Διατροφή

31. Η παροχή τροφής στις προνύμφες είναι απαραίτητη, κατά προτίμηση καθημερινά ή τουλάχιστον τρεις φορές την εβδομάδα. Η τροφή για ψάρια (εναιώρημα σε νερό ή λεπτοαλεσμένη τροφή, π.χ. TetraMin ή TetraPhyll, βλέπε λεπτομέρειες στο προσάρτημα 2), σε ποσότητα 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg για το είδος *C. yoshimatu*i) ανά προνύμφη ανά ημέρα θα πρέπει να είναι επαρκής για τις νεαρές προνύμφες κατά τις πρώτες 10 ημέρες. Οι μεγαλύτερης ηλικίας προνύμφες μπορεί να χρειάζονται ελαφρώς περισσότερη τροφή: 0,5 έως 1 mg ανά προνύμφη ανά ημέρα είναι επαρκής ποσότητα για το υπόλοιπο της δοκιμής. Το σιτηρέσιο θα πρέπει να μειώνεται σε κάθε αγωγή και στους μάρτυρες, σε περίπτωση που αναπτύσσονται μύκητες ή παρατηρείται θνησιμότητα στους μάρτυρες. Εάν η ανάπτυξη μυκήτων δεν μπορεί να ανακοπεί, η δοκιμή πρέπει να επαναλαμβάνεται. Κατά τη δοκιμή ουσιών ισχυρής προσρόφησης (π.χ. με log K_{ow} > 5) ή ουσιών που συνδέονται με το ίζημα με ομοιοπολικούς δεσμούς, η ποσότητα τροφής που απαιτείται για να διασφαλιστεί η επιβίωση και η φυσική ανάπτυξη των οργανισμών μπορεί να προστεθεί στο μορφοποιημένο ίζημα πριν από την περίοδο σταθεροποίησης. Για τον σκοπό αυτό, πρέπει να χρησιμοποιείται φυτικό υλικό αντί της τροφής για ψάρια, π.χ. προσθήκη 0,5 % (ξηρό βάρος) λεπτοαλεσμένων φύλλων τσουκνίδας (*Urtica dioica*), μουριάς (*Morus alba*), λευκού τριφυλλιού (*Trifolium repens*), σπανακιού (*Spinacia oleracea*) ή άλλων φυτικών υλών (*Cerophyl* ή α-κυτταρίνη).

Συνθήκες επώασης

32. Παρέχεται ήπιος αερισμός του υπερκείμενου νερού στα δοχεία δοκιμής, κατά προτίμηση 24 ώρες μετά την προσθήκη των νυμφών, ο οποίος συνεχίζεται καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής (πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου να μη μειώνεται σε επίπεδα κάτω από το 60 % της ASV). Ο αερισμός παρέχεται μέσω από ένα γυάλινου σιφωνίου Pasteur που στερεώνεται σε ύψος 2-3 cm πάνω από το στρώμα του ιζήματος (δηλαδή μία ή μερικές φυσαλίδες/δευτερόλεπτο). Κατά τη δοκιμή πτητικών χημικών ουσιών, μπορεί να εξετάζεται το ενδεχόμενο μη αερισμού του συστήματος ιζήματος-νερού.

33. Η δοκιμή διεξάγεται σε σταθερή θερμοκρασία 20 °C (± 2 °C). Για τα *C. tentans* και *C. yoshimatui* οι συνιστώμενες θερμοκρασίες είναι 23 °C και 25 °C (± 2 °C), αντιστοίχως. Εφαρμόζεται φωτοπερίοδος 16 ωρών και η φωτεινή ισχύς θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 500 και 1 000 Lux.

▼M4

Διάρκεια έκθεσης

34. Η έκθεση αρχίζει με την προσθήκη των προνυμφών στα εμβολιασμένα δοχεία και στα δοχεία-μάρτυρες. Η μέγιστη διάρκεια έκθεσης είναι 28 ημέρες για τα *C. riparius* και *C. yoshimatsui* και 65 ημέρες για το *C. tentans*. Σε περίπτωση εμφάνισης χειρονόμων νωρίτερα, η δοκιμή μπορεί να τερματιστεί μετά παρέλευση τουλάχιστον πέντε ημερών από την εμφάνιση του τελευταίου ενήλικα στο δοχείο-μάρτυρα.

Παρατηρήσεις

Εμφάνιση

35. Προσδιορίζονται ο χρόνος ανάπτυξης και ο συνολικός αριθμός των πλήρως ανεπτυγμένων αρσενικών και θηλυκών χειρονόμων. Τα αρσενικά έντομα αναγνωρίζονται εύκολα από τις πτεροειδείς κεραίες τους.

36. Τα δοχεία δοκιμής πρέπει να παρατηρούνται τουλάχιστον τρεις φορές την εβδομάδα για την οπτική αξιολόγηση κάθε μη φυσιολογικής συμπεριφοράς (π.χ. εγκατάλειψη του ιζήματος, ασυνήθιστη κολύμβηση), σε σύγκριση με το δοχείο-μάρτυρα. Κατά την περίοδο της αναμενόμενης εμφάνισης είναι απαραίτητη η καθημερινή καταμέτρηση των εμφανιζόμενων χειρονόμων. Καταγράφονται καθημερινά το φύλο και ο αριθμός των πλήρως ανεπτυγμένων χειρονόμων. Μετά την αναγνώριση οι χειρονόμοι αφαιρούνται από τα δοχεία. Τυχόν μάζες αυγών που έχουν εναποτεθεί πριν από τον τερματισμό της δοκιμής πρέπει να καταγράφονται και, στη συνέχεια, να απομακρύνονται για να αποτρέπεται η επανεισαγωγή προνυμφών στο ίζημα. Επίσης, καταγράφεται ο αριθμός των ορατών χρυσαλλίδων που δεν τελειοποιήθηκαν. Στο προσάρτημα 5 παρέχονται κατευθύνσεις σχετικά με τη μέτρηση της εμφάνισης.

Ανάπτυξη και επιβίωση

37. Εάν πρέπει να παρέχονται δεδομένα σχετικά με τη 10ήμερη επιβίωση και ανάπτυξη των προνυμφών, θα πρέπει να προβλέπονται πρόσθετα δοχεία δοκιμής κατά την έναρξη της δοκιμής, ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν αργότερα. Το ίζημα από αυτά τα πρόσθετα δοχεία κοσκινίζεται με κόσκινο των 250 μm για να συγκρατηθούν οι προνύμφες. Τα κριτήρια βάσει των οποίων διαπιστώνεται ο θάνατος είναι η ακινησία ή η απουσία αντίδρασης σε μηχανικό ερέθισμα. Οι προνύμφες που δεν ανακτώνται θα πρέπει επίσης να καταμετρώνται ως νεκρές (οι προνύμφες που πεθαίνουν στην αρχή της δοκιμής μπορεί να αποικοδομηθούν από μικρόβια). Προσδιορίζεται το ξηρό βάρος (χωρίς τέφρα) των επιζωσών προνυμφών ανά δοχείο δοκιμής και υπολογίζεται το μέσο ξηρό βάρος ανά άτομο ανά δοχείο. Είναι χρήσιμο να προσδιορίζεται το στάδιο ανάπτυξης των προνυμφών που επιβιώνουν. Προς τούτο μπορεί να χρησιμεύσει η μέτρηση του πλάτους της κεφαλικής κάψας κάθε προνύμφης.

Αναλυτικές μετρήσεις

Συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας

38. Πριν από την έναρξη της δοκιμής (δηλαδή την προσθήκη των προνυμφών), λαμβάνονται δείγματα της κύριας μάζας του ιζήματος από τουλάχιστον ένα δοχείο ανά αγωγή, για τον αναλυτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας στο ίζημα. Συνιστάται η ανάλυση, τουλάχιστον, δειγμάτων του υπερκείμενου νερού, του ενδοπορικού νερού και του ιζήματος στην αρχή (βλέπε παράγραφο 24) και στο τέλος της δοκιμής, στην υψηλότερη και στη χαμηλότερη συγκέντρωση. Οι συγκεκριμένοι προσδιορισμοί της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τη συμπεριφορά/κατανομή της στο σύστημα νερού-ιζήματος.

39. Όταν εκτελούνται ενδιάμεσες μετρήσεις (π.χ. την 7η ημέρα) και εάν για την ανάλυση απαιτούνται μεγάλα δείγματα τα οποία δεν μπορούν να ληφθούν από τα δοχεία δοκιμής χωρίς να επηρεαστεί το σύστημα δοκιμής, πρέπει να εκτελούνται αναλυτικοί προσδιορισμοί σε δείγματα από πρόσθετα δοχεία δοκιμής που υποβάλλονται στην ίδια αγωγή (συμπεριλαμβανομένης της παρουσίας των οργανισμών δοκιμής), αλλά δεν χρησιμοποιούνται για βιολογικές παρατηρήσεις.

▼M4

40. Η φυγοκέντρηση, π.χ. σε 10 000 g και 4 °C για 30 λεπτά, αποτελεί τη συνιστώμενη διαδικασία για την απομόνωση του ενδοπορικού νερού. Ωστόσο, εάν καταδεικνύεται ότι η ελεγχόμενη ουσία δεν προσροφάται στα φίλτρα, είναι αποδεκτή η διήθηση. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να μην είναι δυνατόν να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις στο ενδοπορικό νερό, καθώς το μέγεθος του δείγματος είναι υπερβολικά μικρό.

Φυσικοχημικές παράμετροι

41. Θα πρέπει να μετρώνται το pH και η θερμοκρασία των δοχείων δοκιμής με κατάλληλο τρόπο (βλέπε παράγραφο 10). Η σκληρότητα και η αμμωνία θα πρέπει να μετρώνται στους μάρτυρες και σε ένα δοχείο δοκιμής στην υψηλότερη συγκέντρωση, στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

42. Σκοπός της παρούσας δοκιμής είναι ο προσδιορισμός της επίδρασης της ελεγχόμενης ουσίας στον ρυθμό ανάπτυξης και τον συνολικό αριθμό των πλήρως αναπτυχθέντων αρσενικών και θηλυκών χειρονόμων ή, στην περίπτωση της 10ήμερης δοκιμής, ο προσδιορισμός των επιδράσεων στην επιβίωση και το βάρος των προνυμφών. Εάν δεν υπάρχουν ενδείξεις για στατιστικά διαφορετικές ευαισθησίες των φύλων, τα αποτελέσματα για τα αρσενικά και τα θηλυκά έντομα μπορούν να συνενώνονται για τις στατιστικές αναλύσεις. Οι διαφορές ευαισθησίας μεταξύ των φύλων μπορούν να κριθούν στατιστικά, π.χ. με δοκιμασία πίνακα χ^2-r × 2. Η επιβίωση των προνυμφών και το μέσο ξηρό βάρος ανά άτομο ανά δοχείο πρέπει να προσδιορίζονται μετά από 10 ημέρες, όπου απαιτείται.

43. Οι συγκεντρώσεις στις οποίες παρατηρείται επίδραση, εκφραζόμενες και βασιζόμενες στο ξηρό βάρος, υπολογίζονται κατά προτίμηση από τις συγκεντρώσεις στα ιζήματα οι οποίες μετρώνται κατά την έναρξη της δοκιμής (βλέπε παράγραφο 38).

44. Για τον υπολογισμό των σημείων των τιμών της EC_{50} ή οποιασδήποτε άλλης EC_x, μπορούν να χρησιμοποιούνται τα στατιστικά στοιχεία ανά δοχείο ως πραγματικές επαναλήψεις. Κατά τον υπολογισμό διαστήματος εμπιστοσύνης για οποιαδήποτε EC_x, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η μεταβλητότητα μεταξύ των δοχείων ή να αποδεικνύεται ότι αυτή είναι τόσο μικρή, ώστε να μπορεί να αγνοηθεί. Όταν η προσαρμογή του μοντέλου γίνεται με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, θα πρέπει να εφαρμόζεται μετασχηματισμός στα στατιστικά στοιχεία ανά δοχείο προκειμένου να βελτιώνεται η ομοιογένεια της διασποράς. Ωστόσο, οι τιμές EC_x θα πρέπει να υπολογίζονται αφού μετασχηματιστεί εκ νέου η απόκριση.

45. Όταν η στατιστική ανάλυση στοχεύει στον προσδιορισμό της NOEC/LOEC μέσω δοκιμασίας υπόθεσης, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η μεταβλητότητα μεταξύ των δοχείων, π.χ. μέσω φωλιασμένης (εγκλωβισμένης) ANOVA. Εναλλακτικά, ενδέχεται να είναι κατάλληλες πιο ανθεκτικές δοκιμασίες (21), σε περιπτώσεις όπου παραβιάζονται οι συνήθεις παραδοχές της ANOVA.

Λόγος εμφάνισης

46. Οι λόγοι εμφάνισης είναι ποσοστιαία δεδομένα που μπορούν να αναλυθούν με τη δοκιμασία Cochran-Armitage, εφαρμοζόμενη καθοδικά, όπου αναμένεται μονοτονική σχέση δόσης-απόκρισης και τα δεδομένα αυτά συνάδουν με τη συγκεκριμένη προσδοκία. Σε αντίθετη περίπτωση, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια δοκιμασία Fisher's exact ή Mantel-Haenszel, με διόρθωση των τιμών p κατά Bonferroni-Holm. Εάν υπάρχουν ενδείξεις για μεταβλητότητα μεταξύ των επαναλήψεων στο πλαίσιο της ίδιας συγκέντρωσης, η οποία είναι μεγαλύτερη από εκείνη που θα έδειχνε μια διωνυμική κατανομή (συχνά αναφέρεται ως «εξωδιωνυμική» διασπορά), θα πρέπει να χρησιμοποιείται μια ανθεκτική δοκιμασία Cochran-Armitage ή Fisher exact, όπως η προτεινόμενη στη βιβλιογραφική παραπομπή (21).

▼**M4**

Πprοσδιορίζεται το άθροισμα των χειρονόμων που εμφανίζονται ανά δοχείο, ne, και διαιρείται διά του αριθμού των εισαγόμενων προνυμφών, na:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

όπου:

ER = λόγος εμφάνισης

n_e = αριθμός χειρονόμων που εμφανίστηκαν ανά δοχείο

n_a = αριθμός προνυμφών που εισήχθησαν ανά δοχείο

47. Μια εναλλακτική λύση, που είναι η πλέον κατάλληλη για δείγματα μεγάλου μεγέθους, όταν υπάρχει εξωδιωνυμική διασπορά, είναι να θεωρείται ο δείκτης εμφάνισης ως συνεχής απόκριση και να χρησιμοποιούνται διαδικασίες όπως η δοκιμασία William, όταν αναμένεται μονοτονική σχέση δόσης-απόκρισης και συνάδει με αυτά τα δεδομένα για τον ER. Η δοκιμασία Dunnett είναι κατάλληλη σε περιπτώσεις που δεν ισχύει η μονοτονικότητα. Εν προκειμένω, το δείγμα μεγάλου μεγέθους ορίζεται ως αριθμός μεγαλύτερος του 5 ανά επανάληψη (δοχείο), τόσο για τα άτομα που εμφανίζονται όσο και για εκείνα που δεν εμφανίζονται.

48. Για την εφαρμογή των μεθόδων ANOVA, οι τιμές του ER θα πρέπει πρώτα να μετασχηματίζονται με μετασχηματισμό της τετραγωνικής ρίζας του τόξου ημιτόνου ή με τον μετασχηματισμό Freeman-Tukey για την επίτευξη μιας κατά προσέγγιση κανονικής κατανομής και την εξίσωση των διασπορών. Οι δοκιμασίες Cochran-Armitage, Fisher's exact (Bonferroni) και Mantel-Haenszel μπορούν να εφαρμοστούν όταν χρησιμοποιούνται απόλυτες συχνότητες. Ο μετασχηματισμός της τετραγωνικής ρίζας του τόξου ημιτόνου εφαρμόζεται λαμβάνοντας το αντίστροφο του ημιτόνου ($\sin^{-1}$) της τετραγωνικής ρίζας του ER.

49. Για τους λόγους εμφάνισης, οι τιμές EC_x υπολογίζονται με ανάλυση παλινδρόμησης [ή, π.χ., με probit (22), logit, Weibull, κατάλληλο λογισμικό του εμπορίου κ.λπ.]. Εάν η ανάλυση παλινδρόμησης αποτύχει (π.χ. όταν υπάρχουν λιγότερες από δύο μερικές αποκρίσεις), χρησιμοποιούνται άλλες, μη παραμετρικές μέθοδοι, όπως ο κινητός μέσος (όρος) ή η απλή παρεμβολή.

Ρυθμός ανάπτυξης

50. Ο μέσος χρόνος ανάπτυξης αντιπροσωπεύει το μέσο χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την εισαγωγή των προνυμφών (ημέρα 0 της δοκιμής) έως την εμφάνιση της πειραματικής κοόρτης χειρονόμων. (Για τον υπολογισμό του πραγματικού χρόνου ανάπτυξης, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η ηλικία των προνυμφών κατά τον χρόνο της εισαγωγής). Ο ρυθμός ανάπτυξης ισούται με το αντίστροφο του χρόνου ανάπτυξης (μονάδα: 1/ημέρα) και αντιπροσωπεύει το ημερήσιο τμήμα της ανάπτυξης των προνυμφών. Ο ρυθμός ανάπτυξης προτιμάται για την αξιολόγηση των παρουσών μελετών τοξικότητας σε ίζημα, καθώς παρουσιάζει μικρότερη διασπορά, είναι πιο ομοιογενής και προσεγγίζει περισσότερο την κανονική κατανομή σε σύγκριση με τον χρόνο ανάπτυξης. Ως εκ τούτου, οι ισχυρές παραμετρικές δοκιμασίες μπορούν να εφαρμόζονται στον ρυθμό ανάπτυξης αντί του χρόνου ανάπτυξης. Για τον ρυθμό ανάπτυξης ως συνεχή απόκριση, οι τιμές EC_x μπορούν να υπολογίζονται με ανάλυση παλινδρόμησης [π.χ. (23)(24)].

51. Για τις ακόλουθες στατιστικές δοκιμασίες, ο αριθμός χειρονόμων που παρατηρήθηκε κατά την ημέρα επιθεώρησης × υποτίθεται ότι εμφανίστηκε στο μέσο χρονικό διάστημα μεταξύ της ημέρας x και της ημέρας x - 1 (l = διάρκεια του διαστήματος επιθεώρησης, συνήθως 1 ημέρα). Ο μέσος ρυθμός ανάπτυξης ανά δοχείο υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\overline{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

▼M4

όπου:

$\overline{x}$: μέσος ρυθμός ανάπτυξης ανά δοχείο

i: δείκτης του διαστήματος επιθεώρησης

m: μέγιστος αριθμός διαστημάτων επιθεώρησης

f_i: αριθμός χειρονόμων που εμφανίστηκαν κατά το διάστημα επιθεώρησης i

n_e: συνολικός αριθμός χειρονόμων που εμφανίστηκαν στο τέλος του πειράματος ($=\sum f_i$)

x_i: ρυθμός ανάπτυξης των χειρονόμων που εμφανίστηκαν κατά το διάστημα i

$$x_i = \frac{1}{\left(\text{ημέρα}_i - \frac{l_i}{2}\right)}$$

όπου:

ημέρα_i: ημέρα επιθεώρησης (ημέρες από την εφαρμογή)

l_i: διάρκεια του διαστήματος επιθεώρησης i (ημέρες, συνήθως 1 ημέρα)

Έκθεση δοκιμής

52. Η έκθεση της δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον τις ακόλουθες πληροφορίες:

Ελεγχόμενη ουσία:

— φυσική κατάσταση και, εάν έχουν σημασία, φυσικοχημικές ιδιότητες [υδατοδιαλυτότητα, τάση ατμών, συντελεστής κατανομής στο έδαφος (ή στο ίζημα, εάν είναι διαθέσιμος), σταθερότητα στο νερό κ.λπ.],

— στοιχεία ταυτοποίησης χημικής ουσίας (κοινή ονομασία, χημική ονομασία, συντακτικός τύπος, αριθμός CAS κ.λπ.), συμπεριλαμβανομένων της καθαρότητας και της αναλυτικής μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ελεγχόμενης ουσίας.

Υπό δοκιμή είδος:

— πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν: είδος, επιστημονική ονομασία, πηγή των οργανισμών και συνθήκες αναπαραγωγής,

— πληροφορίες σχετικά με τη μεταχείριση των μαζών αυγών και προνυμφών,

— ηλικία των ζώων κατά τον χρόνο εισαγωγής τους στα δοχεία δοκιμής.

Συνθήκες δοκιμής:

— ίζημα που χρησιμοποιήθηκε, δηλαδή φυσικό ή μορφοποιημένο,

— για τα φυσικά ιζήματα, τοποθεσία και περιγραφή του σημείου δειγματοληψίας του ιζήματος, συμπεριλαμβανομένου, εάν είναι δυνατόν, του ιστορικού μόλυνσης χαρακτηριστικά: pH, περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, αναλογία C/N και κοκκομετρία (κατά περίπτωση),

— παρασκευή του μορφοποιημένου ιζήματος: συστατικά και χαρακτηριστικά (περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, pH, υγρασία κ.λπ. κατά την έναρξη της δοκιμής),

— παρασκευή του νερού δοκιμής (εάν χρησιμοποιείται ανασυσταθέν νερό) και τα χαρακτηριστικά του (συγκέντρωση οξυγόνου, pH, αγωγιμότητα, σκληρότητα κ.λπ. κατά την έναρξη της δοκιμής),

— βάθος του ιζήματος και του υπερκείμενου νερού,

— όγκος του υπερκείμενου και του ενδοπορικού νερού βάρος του υγρού ιζήματος με και χωρίς ενδοπορικό νερό,

▼**M4**

— δοχεία δοκιμής (υλικό και μέγεθος,

— μέθοδος εμβολιασμού του ιζήματος: συγκεντρώσεις δοκιμής που χρησιμοποιήθηκαν, αριθμός επαναλήψεων και χρήση διαλύτη, εάν έγινε,

— φάση σταθεροποίησης της ισορροπίας του συστήματος εμβολιασμένου ιζήματος-νερού: διάρκεια και συνθήκες,

— συνθήκες επώασης: θερμοκρασία, φωτοπερίοδος και φωτεινή ισχύς, αερισμός (συχνότητα και ένταση),

— λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη διατροφή, μεταξύ των οποίων είδος της τροφής, παρασκευή, ποσότητα και καθεστώς σίτισης.

Αποτελέσματα:

— ονομαστικές συγκεντρώσεις δοκιμής, μετρηθείσες συγκεντρώσεις δοκιμής και τα αποτελέσματα όλων των αναλύσεων για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας στο δοχείο δοκιμής,

— ποιότητα του νερού στο εσωτερικό των δοχείων δοκιμής, δηλαδή pH, θερμοκρασία, διαλυμένο οξυγόνο, σκληρότητα και αμμωνία,

— αναπλήρωση εξατμισθέντος νερού δοκιμής, εάν υπήρξε,

— αριθμός των αρσενικών και θηλυκών χειρονόμων που εμφανίστηκαν ανά δοχείο και ανά ημέρα,

— αριθμός των προνυμφών που δεν εμφανίστηκαν ως τέλειοι χειρονόμοι ανά δοχείο,

— μέσο ξηρό βάρος των προνυμφών ανά άτομο, ανά δοχείο και ανά στάδιο ανάπτυξης, ανάλογα με την περίπτωση,

— ποσοστιαία εμφάνιση ανά δοχείο επανάληψης και συγκέντρωση δοκιμής (συνενωμένα αποτελέσματα για αρσενικούς και θηλυκούς χειρονόμους),

— μέσος ρυθμός ανάπτυξης των πλήρως αναπτυχθέντων χειρονόμων ανά δοχείο επανάληψης και αγωγή (συνενωμένα αποτελέσματα για αρσενικούς και θηλυκούς χειρονόμους),

— εκτιμήσεις των τοξικών καταληκτικών σημείων, π.χ. ECx (και τα σχετικά διαστήματα εμπιστοσύνης), NOEC και/ή LOEC, και οι στατιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό τους,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων, συμπεριλαμβανομένης της επίδρασης τυχόν αποκλίσεων από την παρούσα μέθοδο δοκιμών στην έκβαση της δοκιμής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) BBA (1995), Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system, Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

(2) Fleming R et al. (1994), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission, Report No: EC 3738, August 1994, WRc, UK.

(3) SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments, From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002), Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, pp 1125-1241, στο ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate;Biotechnology, Pesticides, ASTM, International, West Conshohocken, PA.

(5) Environment Canada (1997), Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*), Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32, December 1997.

▼**M4**

(6) US-EPA (2000), Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, Second edition, EPA 600/R-99/064, March 2000, Revision to the first edition dated June 1994.

(7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

(9) Milani D., Day K.E., McLeay D.J. και Kirby R.S. (1996), Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canada.

(10) Sugaya Y. (1997), Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.

(11) Kawai K. (1986), Fundamental studies on Chironomid allergy, I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.

(12) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(13) Environment Canada (1995), Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant, Report EPS 1/RM/30ης September 1995.

(14) Μέθοδος δοκιμών Γ.8 του παρόντος παραρτήματος: Τοξικότητα για τους γαιοσκώληκες.

(15) Suedel B.C. και Rodgers J.H. (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 1163-1175.

(16) Naylor C. και Rodrigues C. (1995), Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment, *Chemosphere* 31: 3291-3303.

(17) Dunnett C.W. (1964), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *J. Amer. Statis. Assoc.* 50: 1096-1121.

(18) Dunnett C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, 20: 482-491.

(19) Williams D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, 27: 103-117.

(20) Williams D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, 28: 510-531.

(21) Rao J.N.K. και Scott A.J. (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, *Biometrics* 48: 577-585.

(22) Christensen E.R. (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, *Water Research* 18: 213-221.

(23) Bruce και Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry* 11: 1485-1494.

(24) Slob W. (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints, *Toxicol. Sci.* 66: 298-312.

▼**M4**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου δοκιμών χρησιμοποιούνται οι ακόλουθοι ορισμοί:

Μορφοποιημένο ίζημα ή ανασυσταθέν, τεχνητό ή συνθετικό ίζημα είναι ένα μείγμα υλικών που χρησιμοποιείται για να απομιμείται τα φυσικά συστατικά ενός φυσικού ιζήματος.

Υπερκείμενο νερό είναι το νερό που τοποθετείται πάνω από το ίζημα στο δοχείο δοκιμής.

Διάμεσο νερό ή ενδοπορικό νερό είναι το νερό που καταλαμβάνει τον χώρο μεταξύ των σωματιδίων του ιζήματος και του εδάφους.

Εμβολιασμένο ίζημα είναι το ίζημα στο οποίο έχει προστεθεί η ελεγχόμενη ουσία.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

▼M4

Προσάρτημα 2

Συστάσεις για την καλλιέργεια του *Chironomus riparius*

1. Οι προνύμφες του γένους Chironomus μπορούν να εκτρέφονται σε δοχεία κρυστάλλωσης ή μεγαλύτερα. Λεπτή χαλαζιακή άμμος απλώνεται σε λεπτό στρώμα βάθους περίπου 5 έως 10 mm πάνω στον πυθμένα του δοχείου. Το Kieselguhr (π.χ. Merck, Art 8117) έχει επίσης αποδειχθεί κατάλληλο υπόστρωμα (επαρκεί ένα λεπτότερο στρώμα πάχους πολύ λίγων mm). Στη συνέχεια, προστίθεται επαρκής ποσότητα νερού σε βάθος αρκετών εκατοστών. Η στάθμη του νερού θα πρέπει να συμπληρώνεται, όσο χρειάζεται, για την αναπλήρωση των απωλειών λόγω εξάτμισης, καθώς και για την πρόληψη της αποξήρανσης. Το νερό μπορεί να αντικαθίσταται, εάν είναι απαραίτητο. Θα πρέπει να παρέχεται ήπιος αερισμός. Τα δοχεία εκτροφής των προνυμφών θα πρέπει να είναι τοποθετημένα σε κατάλληλο κλωβό που να αποτρέπει τη διαφυγή των εμφανιζόμενων ενηλίκων. Ο κλωβός πρέπει να είναι αρκετά μεγάλος για να επιτρέπει στα εμφανιζόμενα ενήλικα έντομα να σχηματίζουν σμήνος, γιατί διαφορετικά δεν είναι δυνατή η συνουσία (οι ελάχιστες διαστάσεις είναι περίπου 30 × 30 × 30 cm).

2. Οι κλωβοί θα πρέπει να διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου ή σε χώρο σταθερού περιβάλλοντος, στους 20 + 2 °C, με φωτοπερίοδο 16 ωρών (φωτεινή ισχύς περίπου 1 000 lux). Έχει αναφερθεί ότι υγρασία του αέρα μικρότερη από 60 % RH μπορεί να εμποδίσει την αναπαραγωγή.

Νερό αραίωσης

3. Μπορεί να χρησιμοποιείται οποιοδήποτε κατάλληλο φυσικό ή συνθετικό νερό. Συνήθως χρησιμοποιούνται νερό γεώτρησης, αποχλωριωμένο νερό βρύσης και τεχνητά μέσα (π.χ. θρεπτικό υλικό Elendt «M4» ή «M7», βλέπε κατωτέρω). Το νερό πρέπει να αερίζεται πριν από τη χρήση. Εάν είναι απαραίτητο, το νερό καλλιέργειας μπορεί να ανανεώνεται με έκχυση ή σιφωνισμό του χρησιμοποιημένου νερού από τα δοχεία καλλιέργειας, με προσοχή, χωρίς να καταστρέφονται οι σωλήνες των προνυμφών.

Σίτιση προνυμφών

4. Οι προνύμφες του γένους Chironomus πρέπει να τρέφονται με τροφή για ψάρια σε νιφάδες (TetraMin, TetraPhyll ή άλλη παρόμοια τροφή για ψάρια με κατοχυρωμένο εμπορικό σήμα), σε ποσότητα περίπου 250 mg ανά δοχείο ανά ημέρα. Η τροφή αυτή μπορεί να χορηγείται ως ξηρή αλεσμένη σκόνη ή ως εναιώρημα σε νερό: 1,0 g νιφάδων τροφής προστίθενται σε 20 ml νερού αραίωσης και αναμειγνύεται για να προκύψει ένα ομοιογενές μείγμα. Το παρασκεύασμα αυτό μπορεί να χορηγείται με ρυθμό περίπου 5 ml ανά δοχείο ανά ημέρα (ανακινείται πριν από τη χρήση). Οι μεγαλύτερης ηλικίας προνύμφες μπορούν να λαμβάνουν μεγαλύτερες ποσότητες.

5. Η σίτιση ρυθμίζεται ανάλογα με την ποιότητα του νερού. Εάν το μέσο καλλιέργειας «θολώσει», η σίτιση θα πρέπει να μειωθεί. Οι προσθήκες τροφής θα πρέπει να παρακολουθούνται επισταμένως. Η υπερβολικά μικρή ποσότητα τροφής θα προκαλέσει μετανάστευση των προνυμφών προς τη στήλη ύδατος, ενώ η υπερβολικά μεγάλη ποσότητα θα προκαλέσει αυξημένη μικροβιακή δραστηριότητα και μειωμένες συγκεντρώσεις οξυγόνου. Οι συνθήκες αυτές μπορούν να οδηγήσουν και οι δύο σε μειωμένους ρυθμούς ανάπτυξης.

6. Μπορούν επίσης να προστίθενται κύτταρα ορισμένων πράσινων φυκών (π.χ. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*), όταν ετοιμάζονται νέα δοχεία καλλιέργειας.

Σίτιση ενηλίκων

7. Ορισμένοι πειραματιστές έχουν προτείνει τον εμποτισμό ενός τεμαχίου βαμβακιού με κορεσμένο διάλυμα σακχαρόζης για να χρησιμεύσει ως τροφή των εμφανιζόμενων ενήλικων εντόμων.

▼M4

Εμφάνιση

8. Στους 20 ± 2 °C θα αρχίσουν να εξέρχονται ενήλικα έντομα από τα δοχεία εκτροφής προνυμφών μετά από περίπου 13-15 ημέρες. Τα αρσενικά διακρίνονται εύκολα από τις πτεροειδείς κεραίες τους.

Μάζες αυγών

9. Μόλις εμφανιστούν ενήλικα έντομα μέσα στον κλωβό αναπαραγωγής, όλα τα δοχεία εκτροφής προνυμφών θα πρέπει να ελέγχονται τρεις φορές την εβδομάδα για απόθεση των ζελατινωδών μαζών αυγών. Εάν υπάρχουν μάζες αυγών, πρέπει να αφαιρούνται προσεκτικά και να μεταφέρονται σε έναν μικρό δίσκο που περιέχει δείγμα του νερού αναπαραγωγής. Οι μάζες αυγών χρησιμοποιούνται για την έναρξη καλλιέργειας σε νέο δοχείο (π.χ. 2-4 μάζες αυγών/δοχείο) ή για δοκιμές τοξικότητας.

10. Οι προνύμφες πρώτου σταδίου πρέπει να εκκολάπτονται μετά από 2-3 ημέρες.

Τοποθέτηση νέων δοχείων καλλιέργειας

11. Από τη στιγμή που οι καλλιέργειες έχουν εγκατασταθεί, υπάρχει δυνατότητα ετοιμασίας νέων δοχείων καλλιέργειας προνυμφών ανά εβδομάδα ή λιγότερο συχνά, ανάλογα με τις απαιτήσεις της δοκιμής, αφαιρουμένων των παλαιότερων δοχείων μετά την εμφάνιση των ενήλικων χειρονόμων. Με τη χρήση του συστήματος αυτού, θα παράγεται μια κανονική ποσότητα ενηλίκων με την ελάχιστη δυνατή διαχείριση.

Παρασκευή των διαλυμάτων δοκιμής «M4» και «M7»

12. Ο Elendt (1990) έχει περιγράψει το θρεπτικό υλικό «M4». Το θρεπτικό υλικό «M7» παρασκευάζεται όπως και το «M4» εκτός από τις ουσίες που αναφέρονται στον πίνακα 1, για τις οποίες οι συγκεντρώσεις στο «M7» είναι υποτετραπλάσιες εκείνων του «M4». Συνάσσεται επί του παρόντος δημοσίευση για το θρεπτικό υλικό «M7» (Elendt, προσωπική επικοινωνία). Το διάλυμα δοκιμής δεν πρέπει να παρασκευάζεται σύμφωνα με τους Elendt και Bias (1990), επειδή οι συγκεντρώσεις $NaSiO_3$ 5 H_2O, $NaNO_3$, KH_2PO_4 και K_2HPO_4 που υποδεικνύονται για την παρασκευή των διαλυμάτων παρακαταθήκης δεν είναι επαρκείς.

Παρασκευή του θρεπτικού υλικού «M7»

13. Κάθε διάλυμα παρακαταθήκης (I) παρασκευάζεται χωριστά και από τα εν λόγω διαλύματα (I) παρασκευάζεται συνδυασμένο διάλυμα παρακαταθήκης (II) (βλέπε πίνακα 1). Πενήντα ml συνδυασμένου διαλύματος παρακαταθήκης (II) αναμειγνύονται με τις ποσότητες κάθε διαλύματος παρακαταθήκης μακροθρεπτικών συστατικών που εμφαίνονται στον πίνακα 2 και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι 1 λίτρο με απιονισμένο νερό για την παρασκευή του θρεπτικού υλικού «M7». Παρασκευάζεται διάλυμα παρακαταθήκης βιταμινών με την προσθήκη τριών βιταμινών σε απιονισμένο νερό όπως υποδεικνύεται στον πίνακα 3, και 0,1 ml από το διάλυμα παρακαταθήκης συνδυασμού βιταμινών προστίθενται στο τελικό θρεπτικό υλικό «M7» λίγο πριν από τη χρήση (το διάλυμα παρακαταθήκης βιταμινών αποθηκεύεται κατεψυγμένο σε μικρά κλάσματα). Το θρεπτικό υλικό αερίζεται και σταθεροποιείται.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, Edited by M. Streloke and H.Köpp, Berlin 1995.

▼**M4**

Πίνακας 1

Διαλύματα παρακαταθήκης ιχνοστοιχείων για τα θρεπτικά υλικά M4 και M7

Διάλυμα παρακαταθήκης (I)	Ποσότητα (mg) που αραιώνεται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό	Για την παρασκευή του συνδυασμένου διαλύματος παρακαταθήκης (II): αναμειγνύονται οι ακόλουθες ποσότητες (ml) διαλυμάτων παρακαταθήκης (I) και συμπληρώνεται ο όγκος έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό		Τελικές συγκεντρώσεις στα διαλύματα δοκιμής (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Οι ουσίες αυτές διαφέρουν μεταξύ του M4 και του M7, όπως αναφέρεται ανωτέρω.
(2) Τα διαλύματα αυτά παρασκευάζονται χωριστά, ενώνονται και αποστειρώνονται αμέσως σε αυτόκαυστο.

Πίνακας 2

Διαλύματα παρακαταθήκης μακροθρεπτικών συστατικών για τα θρεπτικά υλικά M4 και M7

	Ποσότητα που αραιώνεται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό (mg)	Ποσότητα διαλυμάτων παρακαταθήκης μακροθρεπτικών συστατικών που προστίθεται για την παρασκευή των θρεπτικών υλικών M4 και M7 (ml/l)	Τελικές συγκεντρώσεις στα διαλύματα δοκιμής M4 και M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Πίνακας 3

Διάλυμα παρακαταθήκης βιταμινών για τα θρεπτικά υλικά M4 και M7. Συνδυάζονται και τα τρία διαλύματα βιταμινών για την παρασκευή ενιαίου διαλύματος παρακαταθήκης βιταμινών

	Ποσότητα που αραιώνεται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό (mg)	Ποσότητα διαλύματος παρακαταθήκης βιταμινών που προστίθεται για την παρασκευή των θρεπτικών υλικών M4 και M7 (ml/l)	Τελικές συγκεντρώσεις στα διαλύματα δοκιμής M4 και M7 (mg/l)
Υδροχλωρική θειαμίνη	750	0,1	0,075
Κυανοκοβαλαμίνη (B12)	10	0,1	0,0010
Βιοτίνη	7,5	0,1	0,00075

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

Elendt B.P. (1990), Selenium Deficiency in Crustacean, *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt B.P. και Bias W.-R. (1990), Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*, *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼M4

Προσάρτημα 3

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΜΟΡΦΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΙΖΗΜΑΤΟΣ

Σύνθεση του ιζήματος

Η σύνθεση του μορφοποιημένου ιζήματος θα πρέπει να έχει ως εξής:

Συστατικά	Χαρακτηριστικά	% επί του ξηρού βάρους του ιζήματος
Τύρφη	Τύρφη σφάγνων, με pH όσο το δυνατόν πλησιέστερα στο 5,5-6,0, χωρίς ορατά υπολείμματα φυτών, λεπτοαλεσμένη (μέγεθος σωματιδίων ≤ 1 mm) και αερόξηρη	4 - 5
Χαλαζιακή άμμος	Μέγεθος κόκκων: > 50 % των σωματιδίων θα πρέπει να έχει μέγεθος 50-200 μm	75 - 76
Καολινιτική άργιλος	Περιεκτικότητα σε καολινίτη ≥ 30 %	20
Οργανικός άνθρακας	Ρυθμίζεται με προσθήκη τύρφης και άμμου	2 (± 0,5)
Ανθρακικό ασβέστιο	$CaCO_3$, κονιοποιημένο, χημικά καθαρό	0,05 - 0,1
Νερό	Αγωγιμότητα ≤ 10 μS/cm	30 - 50

Προετοιμασία

Η τύρφη ξηραίνεται στον αέρα και αλέθεται σε λεπτή σκόνη. Παρασκευάζεται εναιώρημα της απαιτούμενης ποσότητας σκόνης τύρφης σε απιονισμένο νερό με τη βοήθεια ομοιογενοποιητή υψηλής απόδοσης. Το pH του εν λόγω εναιωρήματος ρυθμίζεται στο 5,5 ± 0,5 με $CaCO_3$. Το εναιώρημα εγκλιματίζεται τουλάχιστον για δύο ημέρες με ήπια ανάδευση στους 20 ± 2 °C, για τη σταθεροποίηση του pH και τη δημιουργία σταθερού μικροβιακού συστατικού. Το pH μετράται εκ νέου και θα πρέπει να είναι 6,0 ± 0,5. Στη συνέχεια, το εναιώρημα τύρφης αναμειγνύεται με τα άλλα συστατικά (άμμος και καολινιτική άργιλος) και με απιονισμένο νερό για να ληφθεί ένα ομοιογενές ίζημα με περιεκτικότητα σε νερό 30-50 % επί του ξηρού βάρους του ιζήματος. Το pH του τελικού μείγματος μετράται και πάλι και ρυθμίζεται σε 6,5 έως 7,5 με $CaCO_3$, εάν είναι απαραίτητο. Λαμβάνονται δείγματα του ιζήματος για τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους και της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα. Στη συνέχεια, πριν από τη χρήση του ιζήματος στη δοκιμή τοξικότητας σε χειρονομίδες, συνιστάται ο εγκλιματισμός του μορφοποιημένου ιζήματος για επτά ημέρες υπό τις ίδιες συνθήκες με εκείνες που θα επικρατούν στην επακόλουθη δοκιμή.

Αποθήκευση

Τα ξηρά συστατικά για την παρασκευή του τεχνητού ιζήματος μπορούν να φυλάσσονται σε ξηρό και δροσερό χώρο, σε θερμοκρασία δωματίου. Το μορφοποιημένο (υγρό) ίζημα δεν πρέπει να αποθηκεύεται πριν από τη χρήση του στη δοκιμή. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται αμέσως μετά την πάροδο των 7 ημερών εγκλιματισμού με τον οποίο ολοκληρώνεται η παρασκευή του.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

Κεφάλαιο Γ.8 του παρόντος παραρτήματος: Τοξικότητα για τους γαιοσκώληκες.

Meller M., Egeler P., Rombke J., Schallnass H., Nagel R., Streit B. (1998), Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media, *Ecotox. and Environ. Safety* 39: 10-20.

▼**M4**

Προσάρτημα 4

Χημικά χαρακτηριστικά ενός αποδεκτού νερού αραίωσης

Ουσία	Συγκεντρώσεις
Σωματίδια	< 20 mg/l
Ολικός οργανικός άνθρακας	< 2 mg/l
Μη ιονισμένη αμμωνία	< 1 μg/l
Σκληρότητα ως $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Υπολείμματα χλωρίου	< 10 μg/l
Ολικά οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα	< 50 ng/l
Ολικά οργανοχλωριούχα γεωργικά φάρμακα μαζί με πολυχλωριωμένα διφαινύλια	< 50 ng/l
Ολικό οργανικό χλώριο	< 25 ng/l

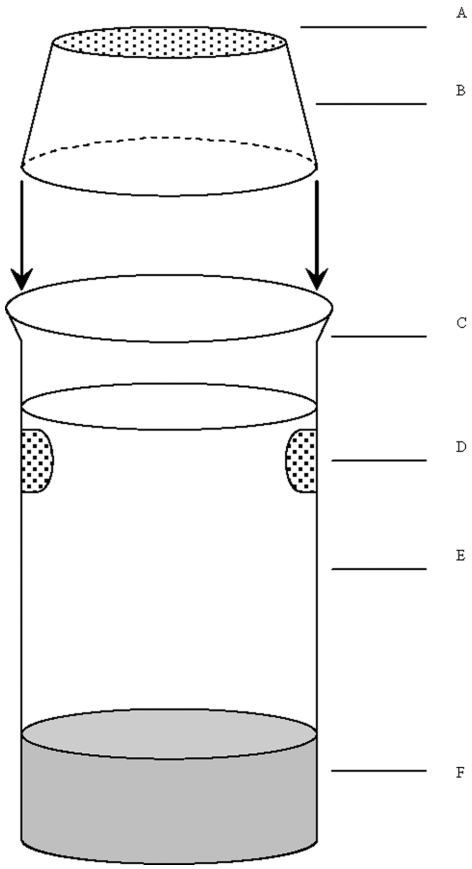
(*) Ωστόσο, σημειώνεται ότι εάν υπάρχουν υπόνοιες για αλληλεπίδραση μεταξύ ιόντων σκληρότητας και της ελεγχόμενης ουσίας, θα πρέπει να χρησιμοποιείται νερό χαμηλότερης σκληρότητας (και, ως εκ τούτου, δεν πρέπει να χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό Elendt M4 σε αυτή την περίπτωση).

▼**M4**

Προσάρτημα 5

Κατευθύνσεις για την παρακολούθηση της εξόδου των προνυμφών χειρονομίδων

Τοποθετούνται παγίδες εξόδου στα ποτήρια ζέσεως της δοκιμής. Οι παγίδες αυτές χρειάζονται από την 20ή ημέρα έως το τέλος της δοκιμής. Ένα παράδειγμα χρησιμοποιούμενης παγίδας αναπαρίσταται κατωτέρω:



A: σίτα από νάιλον

B: ανεστραμμένα πλαστικά ποτήρια

C: ποτήρι έκθεσης χωρίς χείλος

D: έξοδοι σίτας για την ανταλλαγή νερού

E: νερό

F: ίζημα

▼M4

Γ.28. ΔΟΚΙΜΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΧΕΙΡΟΝΟΜΙΔΕΣ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑ ΙΖΗΜΑΤΟΣ-ΝΕΡΟΥ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΟΥ ΝΕΡΟΥ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή TG 219 (2004) του ΟΟΣΑ. Σκοπός της παρούσας μεθόδου δοκιμών είναι η εκτίμηση των επιδράσεων της παρατεταμένης έκθεσης χημικών ουσιών στις προνύμφες των ειδών δίπτερων *Chironomus sp.* των γλυκών υδάτων οι οποίες διαβιούν σε ιζήματα. Βασίζεται κατά κύριο λόγο στην κατευθυντήρια γραμμή του BBA (Γερμανικό ομοσπονδιακό βιολογικό κέντρο ερευνών γεωργίας και δασοκομίας), σύμφωνα με την οποία χρησιμοποιείται ένα δοκιμαστικό σύστημα νερού-ιζήματος με τεχνητό έδαφος και ένα σενάριο έκθεσης σε στήλη ύδατος (1). Στη μέθοδο έχουν επίσης ληφθεί υπόψη τα υπάρχοντα πρωτόκολλα δοκιμών τοξικότητας για τα είδη *Chironomus riparius* και *Chironomus tentans* που έχουν καταρτιστεί στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8) και έχουν υποβληθεί σε κυκλική δοκιμή (1)(6)(9). Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη χειρονομίδων για τα οποία υπάρχει επαρκής τεκμηρίωση, π.χ. *Chironomus yoshimatsui* (10)(11).

2. Το σενάριο έκθεσης που χρησιμοποιείται στην παρούσα μέθοδο είναι ο εμβολιασμός του νερού. Η επιλογή του κατάλληλου σεναρίου έκθεσης εξαρτάται από την επιδιωκόμενη εφαρμογή της δοκιμής. Το σενάριο της έκθεσης στο νερό, που περιλαμβάνει εμβολιασμό της στήλης ύδατος, σκοπό έχει να προσομοιώσει ένα περιστατικό μετακίνησης ψεκαστικού νέφους φυτοφαρμάκων και καλύπτει το αρχικό μέγιστο των συγκεντρώσεων στο ενδοπορικό νερό. Επίσης, εξυπηρετεί και άλλους τύπους έκθεσης (συμπεριλαμβανομένων των χημικών διαρροών), εκτός των διαδικασιών συσσώρευσης, των οποίων η διάρκεια υπερβαίνει τη διάρκεια της δοκιμής.

3. Οι ουσίες που πρέπει να ελέγχονται ως προς οργανισμούς που διαβιούν σε ιζήματα συνήθως παραμένουν σε αυτό το διαμέρισμα για μεγάλες χρονικές περιόδους. Οι οργανισμοί που διαβιούν σε ιζήματα ενδέχεται να εκτίθενται μέσω διάφορων οδών. Η σχετική σημασία της κάθε οδού έκθεσης, καθώς και ο χρόνος που απαιτείται για να συμβάλει στις συνολικές τοξικές επιδράσεις, εξαρτώνται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της εκάστοτε χημικής ουσίας. Για ουσίες ισχυρής προσρόφησης (π.χ. με $\log K_{ow} > 5$) ή για ουσίες που συνδέονται με ιζήματα με ομοιοπολικούς δεσμούς, η πρόσληψη μολυσμένων τροφών μπορεί να είναι μια σημαντική οδός έκθεσης. Προκειμένου να μην υποτιμάται η τοξικότητα των εξαιρετικά λιπόφιλων ουσιών, μπορεί να εξετάζεται η προσθήκη της τροφής στο ίζημα πριν από την εφαρμογή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Για να ληφθούν υπόψη όλες οι πιθανές οδοί έκθεσης, η παρούσα μέθοδος δοκιμών εστιάζει στη μακροχρόνια έκθεση. Η διάρκεια της δοκιμής κυμαίνεται μεταξύ 20 και 28 ημερών για τα *C. riparius* και *C. yoshimatsui*, και από 28 έως 65 ημέρες για τα *C. tentans*. Εάν απαιτούνται βραχυπρόθεσμα δεδομένα για ένα συγκεκριμένο σκοπό, όπως για τη διευρεύνηση των επιδράσεων ασταθών χημικών ουσιών, μπορούν να αποσύρονται πρόσθετα δοχεία επανάληψης μετά από μια περίοδο δέκα ημερών.

4. Τα μετρούμενα καταληκτικά σημεία είναι ο συνολικός αριθμός εμφανιζόμενων ενηλίκων εντόμων και ο χρόνος μέχρι την εμφάνιση. Συνιστάται να εκτελούνται οι μετρήσεις της επιβίωσης και ανάπτυξης των προνυμφών μόνο μετά από ένα δεκαήμερο, εάν απαιτούνται πρόσθετα βραχυπρόθεσμα δεδομένα, με τη χρήση των κατάλληλων πρόσθετων δοχείων επανάληψης.

5. Συνιστάται η χρήση μορφοποιημένου ιζήματος, το οποίο παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα φυσικά ιζήματα:

   — η πειραματική μεταβλητότητα μειώνεται, επειδή σχηματίζει μια αναπαραγόμενη «τυποποιημένη μήτρα» και εκλείπει η ανάγκη εξεύρεσης πηγών αμόλυντου και καθαρού ιζήματος,

   — οι δοκιμές μπορούν να αρχίζουν ανά πάσα στιγμή, χωρίς να αντιμετωπίζουν εποχιακή μεταβλητότητα του ιζήματος δοκιμής και δεν απαιτείται προκατεργασία του ιζήματος για την απομάκρυνση της αυτόχθονης πανίδας. Με τη χρήση μορφοποιημένων ιζημάτων μειώνεται επίσης το κόστος που συνεπάγεται η συλλογή επαρκών ποσοτήτων ιζημάτων από το ύπαιθρο για δοκιμές ρουτίνας,

▼M4

— η χρήση μορφοποιημένου ιζήματος καθιστά δυνατές τις συγκρίσεις τοξικότητας και την ανάλογη κατάταξη των ουσιών: τα δεδομένα τοξικότητας από δοκιμές με φυσικά και τεχνητά ιζήματα ήταν συγκρίσιμα για διάφορες χημικές ουσίες (2).

6. Οι χρησιμοποιούμενοι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

7. Προνύμφες χειρονομίδων πρώτου σταδίου εκτίθενται σε ένα εύρος συγκεντρώσεων της ελεγχόμενης ουσίας σε συστήματα ιζήματος-νερού. Η δοκιμή αρχίζει με την τοποθέτηση των προνυμφών πρώτου σταδίου στα ποτήρια ζέσεως που περιέχουν το σύστημα ιζήματος-νερού και στη συνέχεια εμβολιάζεται η ελεγχόμενη ουσία στο νερό. Η εμφάνιση και ο ρυθμός ανάπτυξης των χειρονομίδων μετρώνται στο τέλος της δοκιμής. Η επιβίωση και το βάρος των προνυμφών μπορούν επίσης να μετρώνται μετά από 10 ημέρες, εάν απαιτείται (με τη χρήση των κατάλληλων πρόσθετων δοχείων επανάληψης). Αυτά τα δεδομένα αναλύονται με τη χρήση είτε ενός μοντέλου παλινδρόμησης, ώστε να εκτιμηθεί η συγκέντρωση η οποία θα μπορούσε να προκαλέσει × % μείωση της εμφάνισης ενηλίκων εντόμων ή της επιβίωσης ή ανάπτυξης των προνυμφών (π.χ. EC_{15}, EC_{50} κ.λπ.), είτε δοκιμασιών στατιστικής υπόθεσης για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης στην οποία δεν παρατηρείται επίδραση (NOEC) ή της κατώτατης συγκέντρωσης παρατηρούμενης επίδρασης (LOEC). Στη δεύτερη περίπτωση απαιτείται σύγκριση μεταξύ των τιμών επίδρασης και των τιμών των μαρτύρων, με τη χρήση στατιστικών δοκιμασιών.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ

8. Θα πρέπει να είναι γνωστές η υδατοδιαλυτότητα και η τάση ατμών της ελεγχόμενης ουσίας, η μετρούμενη ή υπολογιζόμενη κατανομή της στο ίζημα και η σταθερότητά της στο νερό και το ίζημα. Θα πρέπει να διατίθεται μια αξιόπιστη μέθοδος ανάλυσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ελεγχόμενης ουσίας στο υπερκείμενο νερό, στο ενδοπορικό νερό και στο ίζημα, με γνωστή και δημοσιευμένη ορθότητα (accuracy) και όριο ανίχνευσης. Στις χρήσιμες πληροφορίες συγκαταλέγονται ο συντακτικός τύπος και η καθαρότητα της ελεγχόμενης ουσίας. Χρήσιμο στοιχείο είναι επίσης η χημική πορεία της ελεγχόμενης ουσίας (π.χ. διασπορά, βιοτική και αβιοτική αποικοδόμηση κ.λπ.). Περαιτέρω καθοδήγηση για τις δοκιμές ουσιών με φυσικοχημικές ιδιότητες που δυσχεραίνουν τη διεξαγωγή της δοκιμής παρέχεται στη βιβλιογραφική παραπομπή (12).

ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

9. Για τη διασφάλιση της αξιοπιστίας του πρωτοκόλλου και των συνθηκών δοκιμής, μπορούν να ελέγχονται περιοδικά χημικές ουσίες αναφοράς. Μερικές από τις τοξικές ουσίες αναφοράς που χρησιμοποιούνται με επιτυχία σε κυκλικές δοκιμές και μελέτες επικύρωσης είναι το λινδάνιο, η τριφλουραλίνη, η πενταχλωροφαινόλη, το χλωριούχο κάδμιο και το χλωριούχο κάλιο (1)(2)(5)(6)(13).

ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

10. Για να θεωρηθεί έγκυρη η δοκιμή, πρέπει να πληρούνται οι ακόλουθες προϋποθέσεις:

— το ποσοστό εμφάνισης στους μάρτυρες πρέπει να ανέρχεται σε τουλάχιστον 70 % στο τέλος της δοκιμής (1)(6),

— η εμφάνιση ενηλίκων *C. riparius* και *C. yoshimatsui* στα δοχεία μάρτυρες θα πρέπει να σημειώνεται μεταξύ της 12ης και της 23ης ημέρας από την εισαγωγή τους στα δοχεία. Για το *C. tentans* απαιτείται περίοδος 20 έως 65 ημερών,

— στο τέλος της δοκιμής, θα πρέπει να μετρώνται το pH και η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου σε κάθε δοχείο. Η συγκέντρωση οξυγόνου πρέπει να είναι τουλάχιστον 60 % της τιμής κορεσμού του αέρα (ASV) στη χρησιμοποιούμενη θερμοκρασία και το pH του υπερκείμενου νερού να είναι της τάξης του 6-9 σε όλα τα δοχεία δοκιμής,

▼M4

— η θερμοκρασία του νερού δεν πρέπει να διαφέρει κατά περισσότερο από ± 1,0 °C. Η θερμοκρασία του νερού μπορεί να ελέγχεται μέσω ισοθερμικού δωματίου, οπότε η θερμοκρασία δωματίου πρέπει να επιβεβαιώνεται ανά κατάλληλα χρονικά διαστήματα.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Δοχεία δοκιμής

11. Η μελέτη διεξάγεται σε ποτήρια ζέσεως των 600 ml με διάμετρο 8 cm. Κατάλληλα είναι και άλλα δοχεία, αλλά θα πρέπει να εξασφαλίζουν κατάλληλο βάθος υπερκείμενου νερού και ιζήματος. Η επιφάνεια του ιζήματος θα πρέπει να είναι επαρκής για την παροχή 2 έως 3 cm^2 ανά προνύμφη. Η αναλογία του βάθους του ιζήματος προς το βάθος του υπερκείμενου νερού θα πρέπει να είναι 1:4. Τα δοχεία δοκιμής και ο λοιπός εξοπλισμός που θα έρχονται σε επαφή με το σύστημα δοκιμής θα πρέπει να είναι κατασκευασμένα εξ ολοκλήρου από γυαλί ή άλλο χημικώς αδρανές υλικό (π.χ. Teflon).

Επιλογή είδους

12. Το είδος που χρησιμοποιείται στη δοκιμή είναι κατά προτίμηση το *Chironomus riparius*. Κατάλληλο είναι επίσης το *Chironomus tentans*, αλλά είναι πιο δύσκολο στη μεταχείριση και απαιτεί μεγαλύτερο χρονικό διάστημα δοκιμής. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί το *Chironomus yohimatsui*. Οι λεπτομέρειες των μεθόδων καλλιέργειας του *Chironomus riparius* παρατίθενται στο προσάρτημα 2. Πληροφορίες για τις συνθήκες καλλιέργειας είναι επίσης διαθέσιμες για άλλα είδη, δηλαδή τα *Chironomus tentans* (4) και *Chironomus yoshimatsui* (11). Η ταυτοποίηση των ειδών πρέπει να επιβεβαιώνεται πριν από τη δοκιμή, ενώ δεν απαιτείται πριν από κάθε δοκιμή, εάν οι οργανισμοί προέρχονται από εσωτερική καλλιέργεια.

Ίζημα

13. Κατά προτίμηση, πρέπει να χρησιμοποιούνται μορφοποιημένα ιζήματα (που ονομάζονται επίσης ανασυσταθέντα, τεχνητά ή συνθετικά ιζήματα). Ωστόσο, εάν χρησιμοποιείται φυσικό ίζημα, πρέπει να έχει χαρακτηριστεί (τουλάχιστον το pH, η περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, ενώ συνιστάται επίσης ο προσδιορισμός άλλων παραμέτρων, όπως η αναλογία C/N και η κοκκομετρία) και να είναι απαλλαγμένο από τυχόν μόλυνση και άλλους οργανισμούς που θα μπορούσαν να ανταγωνιστούν ή να καταναλώσουν τις χειρονομίδες. Επίσης, πριν από τη χρήση του φυσικού ιζήματος σε δοκιμή τοξικότητας σε χειρονομίδες, συνιστάται ο εγκλιματισμός του για επτά ημέρες υπό τις συνθήκες που θα επικρατούν στην επακόλουθη δοκιμή. Συνιστάται για χρήση στην παρούσα δοκιμή το ακόλουθο μορφοποιημένο ίζημα (1)(15)(16), το οποίο βασίζεται στο τεχνητό έδαφος που χρησιμοποιείται στη μέθοδο δοκιμών Γ.8 (14):

α) 4-5 % (ξηρό βάρος) τύρφης: pH όσο το δυνατόν πλησιέστερα στο 5,5 έως 6,0. Είναι σημαντικό να χρησιμοποιείται τύρφη σε μορφή σκόνης, λεπτοαλεσμένη (μέγεθος σωματιδίων ≤ 1 mm) και μόνο αερόξηρη·

β) 20 % (ξηρό βάρος) καολινιτικής αργίλου (περιεκτικότητα σε καολινίτη κατά προτίμηση άνω του 30 %)·

γ) 75-76 % (ξηρό βάρος) χαλαζιακής άμμου (θα πρέπει να επικρατεί η λεπτή άμμος, με ποσοστό σωματιδίων μεγέθους μεταξύ 50 και 200 μm πάνω από 50 %)·

δ) προστίθεται απιονισμένο νερό για να επιτευχθεί υγρασία του τελικού μείγματος της τάξης 30-50 %·

ε) προστίθεται ανθρακικό ασβέστιο χημικώς καθαρό ($CaCO_3$) για τη ρύθμιση του pH του τελικού μείγματος του ιζήματος σε 7,0 ± 0,5·

στ) η περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα του τελικού μείγματος θα πρέπει να είναι 2 % (± 0,5 %), και να ρυθμίζεται με τη χρήση κατάλληλων ποσοτήτων τύρφης και άμμου, σύμφωνα με τα στοιχεία α) και γ).

▼M4

14. Η πηγή της τύρφης, της καολινιτικής αργίλου και της άμμου θα πρέπει να είναι γνωστή. Τα συστατικά των ιζημάτων θα πρέπει να ελέγχονται για απουσία χημικής μόλυνσης (π.χ. βαρέα μέταλλα, οργανοχλωριωμένες ενώσεις, οργανοφωσφορικές ενώσεις κ.λπ.). Στο προσάρτημα 3, παρατίθεται παράδειγμα παρασκευής μορφοποιημένου ιζήματος. Επίσης, επιτρέπεται η ανάμειξη των ξηρών συστατικών, εάν καταδεικνύεται ότι, μετά την προσθήκη υπερκείμενου νερού, δεν διαχωρίζονται τα συστατικά του ιζήματος (π.χ. επίπλευση σωματιδίων τύρφης) και ότι η τύρφη ή το ίζημα είναι επαρκώς εγκλιματισμένα.

Νερό

15. Κάθε νερό που είναι σύμφωνο με τα χημικά χαρακτηριστικά του αποδεκτού νερού αραίωσης, τα οποία απαριθμούνται στα προσαρτήματα 2 και 4, είναι κατάλληλο ως νερό δοκιμής. Οποιοδήποτε κατάλληλο νερό, φυσικό (επιφανειακά ή υπόγεια ύδατα), ανασυσταθέν (βλέπε προσάρτημα 2) ή αποχλωριωμένο νερό βρύσης είναι αποδεκτό ως νερό καλλιέργειας και δοκιμής, εάν οι χειρονομίδες επιβιώνουν σε αυτό καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας και των δοκιμών χωρίς να επιδείξουν σημεία πίεσης. Κατά την έναρξη της δοκιμής, το pH του νερού δοκιμής θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 6 και 9 και η συνολική σκληρότητα να μην είναι μεγαλύτερη από 400 mg/l ως $CaCO_3$. Ωστόσο, εάν υπάρχουν υπόνοιες για αλληλεπίδραση μεταξύ ιόντων σκληρότητας και της ελεγχόμενης ουσίας, θα πρέπει να χρησιμοποιείται νερό χαμηλότερης σκληρότητας (και ως εκ τούτου, δεν πρέπει να χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό Elendt M4 στην περίπτωση αυτή). Το ίδιο είδος νερού θα πρέπει να χρησιμοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης. Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του νερού, που απαριθμούνται στο προσάρτημα 4, πρέπει να μετρώνται τουλάχιστον δύο φορές ετησίως ή όταν υπάρχουν υπόνοιες για σημαντική μεταβολή τους.

Διαλύματα παρακαταθήκης — Εμβολιασμένο νερό

16. Οι συγκεντρώσεις δοκιμής υπολογίζονται βάσει των συγκεντρώσεων στη στήλη ύδατος, δηλαδή στο νερό που υπέρκειται του ιζήματος. Τα διαλύματα δοκιμής των επιλεγμένων συγκεντρώσεων παρασκευάζονται συνήθως με αραίωση ενός διαλύματος παρακαταθήκης. Τα διαλύματα παρακαταθήκης θα πρέπει κατά προτίμηση να παρασκευάζονται με διάλυση της ελεγχόμενης ουσίας δοκιμής στο μέσο δοκιμής. Η χρήση διαλυτών ή μέσων διασποράς μπορεί να είναι απαραίτητη σε ορισμένες περιπτώσεις, προκειμένου να παρασκευασθεί ένα κατάλληλα συμπυκνωμένο διάλυμα παρακαταθήκης. Στους διαλύτες που μπορούν να χρησιμοποιούνται περιλαμβάνονται η ακετόνη, η αιθανόλη, η μεθανόλη, ο μονοαιθυλαιθέρας της αιθυλενογλυκόλης, ο διμεθυλαιθέρας της αιθυλενογλυκόλης, το διμεθυλοφορμαμίδιο και η τριαιθυλενογλυκόλη. Μέσα διασποράς που μπορούν να χρησιμοποιούνται είναι το Cremophor RH40, το Tween 80, η μεθυλοκυτταρίνη 0,01 % και HCO-40. Η συγκέντρωση του μέσου διαλυτοποίησης στο τελικό μέσο δοκιμής θα πρέπει να είναι ελάχιστη (δηλαδή ≤ 0,1 ml/l) και η ίδια σε κάθε αγωγή. Όταν χρησιμοποιείται μέσο διαλυτοποίησης, αυτό δεν πρέπει να έχει σημαντικές επιδράσεις στην επιβίωση ή ορατή δυσμενή επίδραση στις προνύμφες των χειρονομίδων, όπως γίνεται αντιληπτό με μάρτυρα που περιέχει μόνο διαλύτη. Εντούτοις, θα πρέπει να καταβάλλεται κάθε δυνατή προσπάθεια για την αποφυγή της χρήσης τέτοιων υλικών.

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

17. Ο σχεδιασμός της δοκιμής αφορά την επιλογή του αριθμού και της κλιμάκωσης των συγκεντρώσεων δοκιμής, του αριθμού των δοχείων για κάθε συγκέντρωση και του αριθμού των προνυμφών ανά δοχείο. Περιγράφονται σχεδιασμοί για την εκτίμηση του σημείου EC, την εκτίμηση της NOEC και τη διεξαγωγή οριακής δοκιμής. Η ανάλυση παλινδρόμησης προτιμάται έναντι της προσέγγισης της δοκιμασίας υποθέσεων.

Σχεδιασμός για ανάλυση παλινδρόμησης

18. Η συγκέντρωση επίδρασης (π.χ. EC_{15}, EC_{50}) και το εύρος συγκεντρώσεων που ενδιαφέρουν σε σχέση με την επίδραση της ελεγχόμενης ουσίας, θα πρέπει να καλύπτονται από τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή. Γενικώς, η ορθότητα και ιδίως η εγκυρότητα με την οποία μπορούν να εκτιμηθούν οι συγκεντρώσεις επίδρασης (EC_x), βελτιώνονται όταν η συγκέντρωση επίδρασης περικλείεται στο εύρος συγκεντρώσεων της δοκιμής. Θα πρέπει να αποφεύγεται η παρέκταση πολύ χαμηλότερα από την

▼M4

κατώτατη θετική συγκέντρωση ή πάνω από την υψηλότερη συγκέντρωση Για την επιλογή του εύρους συγκεντρώσεων που θα χρησιμοποιηθεί, χρήσιμη είναι η διεξαγωγή προκαταρκτικής δοκιμής καθορισμού εύρους (βλέπε παράγραφο 27).

19. Εάν πρέπει να εκτιμηθεί η EC_x, θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις, με τρεις επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση. Σε κάθε περίπτωση, συνιστάται η χρησιμοποίηση επαρκών συγκεντρώσεων για μια ικανοποιητική εκτίμηση βάσει μοντέλου. Ο συντελεστής μεταξύ των συγκεντρώσεων δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 2 (εξαίρεση θα μπορούσε να γίνει σε περιπτώσεις που η καμπύλη δόσης-απόκρισης έχει μικρή κλίση). Ο αριθμός των επαναλήψεων σε κάθε αγωγή μπορεί να μειώνεται, εάν αυξάνεται ο αριθμός των συγκεντρώσεων δοκιμής με διαφορετικές αποκρίσεις. Η αύξηση του αριθμού των επαναλήψεων ή η μείωση του μεγέθους των διαστημάτων μεταξύ των συγκεντρώσεων δοκιμής τείνει να οδηγεί σε στενότερα διαστήματα εμπιστοσύνης για τη δοκιμή. Σε περίπτωση που πρέπει να εκτιμηθεί η δεκαήμερη επιβίωση και ανάπτυξη των προνυμφών, απαιτούνται πρόσθετα δοχεία επανάληψης.

Σχεδιασμός για την εκτίμηση NOEC/LOEC

20. Εάν πρέπει να εκτιμηθεί η LOEC ή NOEC, πρέπει να χρησιμοποιούνται πέντε συγκεντρώσεις δοκιμής με τουλάχιστον τέσσερις επαναλήψεις και ο συντελεστής μεταξύ των συγκεντρώσεων δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 2. Ο αριθμός των επαναλήψεων θα πρέπει να είναι επαρκής για να εξασφαλίζει επαρκή στατιστική ισχύ για τον εντοπισμό διαφοράς 20 % από τον μάρτυρα στο επίπεδο σημαντικότητας 5 % (p = 0,05). Για τον ρυθμό ανάπτυξης, κατάλληλη είναι συνήθως μια ανάλυση διασποράς (ANOVA), όπως οι δοκιμασίες Dunnett και Williams (17)(18)(19)(20). Για τον λόγο εμφάνισης, μπορούν να χρησιμοποιούνται οι δοκιμασίες Cochran-Armitage, Fisher exact (με διόρθωση κατά Bonferroni) και Mantel-Haenszel.

Οριακή δοκιμή

21. Εάν δεν έχει παρατηρηθεί καμία επίδραση στην προκαταρκτική δοκιμή καθορισμού εύρους, είναι δυνατόν να διεξαχθεί οριακή δοκιμή (μία συγκέντρωση δοκιμής και ένας μάρτυρας),. Σκοπός της οριακής δοκιμής είναι να δείξει ότι η τοξική τιμή της ελεγχόμενης ουσίας είναι μεγαλύτερη από την οριακή συγκέντρωση που ελέγχθηκε. Δεν είναι δυνατόν να υποδειχθεί συνιστώμενη συγκέντρωση στην παρούσα μέθοδο δοκιμών. Αυτό επαφίεται στην κρίση των ιθυνόντων. Συνήθως, χρειάζονται έξι επαναλήψεις, τόσο για την αγωγή όσο και για τον μάρτυρα. Θα πρέπει να καταδεικνύεται επαρκής στατιστική ισχύ για τον εντοπισμό διαφοράς 20 % από τον μάρτυρα με επίπεδο σημαντικότητας 5 % (p = 0,05). Με μετρική απόκριση (ρυθμός ανάπτυξης και βάρος), η δοκιμασία t είναι κατάλληλη στατιστική μέθοδος, εάν τα δεδομένα πληρούν τις απαιτήσεις της (κανονικότητα, ομοιογενείς διασπορές). Εάν δεν πληρούνται οι απαιτήσεις αυτές, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η δοκιμασία t άνισης διασποράς ή μια μη παραμετρική δοκιμασία, όπως η Wilcoxon-Mann-Whithey. Για τον λόγο εμφάνισης, κατάλληλη είναι η δοκιμή Fisher exact.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Συνθήκες έκθεσης

Ετοιμασία του συστήματος εμβολιασμένου νερού-ιζήματος

22. Κατάλληλες ποσότητες μορφοποιημένου ιζήματος (βλέπε παραγράφους 13-14 και προσάρτημα 3) προστίθενται στα δοχεία δοκιμής για να σχηματίσουν ένα στρώμα τουλάχιστον 1,5 cm. Προστίθεται νερό σε βάθος 6 cm (βλέπε παράγραφο 15). Η αναλογία μεταξύ του βάθους του στρώματος ιζήματος και του βάθους του νερού δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1:4 και το στρώμα ιζήματος δεν πρέπει να είναι βαθύτερο από 3 cm. Το σύστημα ιζήματος-νερού θα πρέπει να παραμένει υπό ήπιο αερισμό για επτά ημέρες πριν από την προσθήκη των οργανισμών δοκιμής (βλέπε παράγραφο 14 και προσάρτημα 3). Για να αποφεύγονται ο διαχωρισμός των συστατικών του ιζήματος και η επαναιώρηση του λεπτού υλικού κατά τη διάρκεια της προσθήκης νερού δοκιμής στη στήλη ύδατος, το ίζημα μπορεί να καλύπτεται με έναν πλαστικό δίσκο, ενώ το νερό χύνεται επάνω σε αυτό, και αμέσως μετά να απομακρύνεται ο δίσκος. Κατάλληλες μπορεί να είναι και άλλες συσκευές.

▼M4

23. Τα δοχεία δοκιμής πρέπει να καλύπτονται (π.χ. με γυάλινες πλάκες). Εάν είναι απαραίτητο, κατά τη διάρκεια της μελέτης το νερό θα πρέπει να συμπληρώνεται μέχρι τον αρχικό όγκο ώστε να αναπληρώνεται η εξάτμιση του νερού. Αυτό θα πρέπει να γίνεται με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό για να αποτρέπεται η συσσώρευση αλάτων.

Προσθήκη των οργανισμών δοκιμής

24. Τέσσερις έως πέντε ημέρες πριν από την προσθήκη των ελεγχόμενων οργανισμών στα δοχεία δοκιμής, θα πρέπει να λαμβάνονται μάζες αυγών από τις καλλιέργειες και να τοποθετούνται σε μικρά δοχεία με το μέσο καλλιέργειας. Μπορεί να χρησιμοποιείται παλαιό μέσο από την αρχική καλλιέργεια ή προσφάτως παρασκευασμένο. Στη δεύτερη περίπτωση, πρέπει να προστίθεται στο μέσο καλλιέργειας μικρή ποσότητα τροφής π.χ. πράσινα φύκη και/ή λίγες σταγόνες διηθήματος από εναιώρημα λεπτοαλεσμένων νιφάδων τροφής για ψάρια (βλέπε προσάρτημα 2). Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο μάζες φρέσκων αυγών. Κανονικά, οι προνύμφες αρχίζουν να εκκολάπτονται λίγες ημέρες μετά την τοποθέτηση των αυγών (2 έως 3 ημέρες για το *Chironomus riparius*, στους 20 °C, και 1 έως 4 ημέρες για το *Chironomus tentans*, στους 23 °C, και το *Chironomus yoshimatui*, στους 25 °C) και αναπτύσσονται σε τέσσερα στάδια, διάρκειας 4-8 ημερών το καθένα. Για τη δοκιμή θα πρέπει να χρησιμοποιούνται προνύμφες πρώτου σταδίου (2-3 ή 1-4 ημέρες μετά την εκκόλαψη). Το στάδιο των χειρονόμων μπορεί να εξακριβωθεί από το πλάτος της κεφαλικής κάψας (6).

25. Είκοσι προνύμφες πρώτου σταδίου κατανέμονται τυχαία, με αμβλύ σιφώνιο, σε κάθε δοχείο δοκιμής που περιέχει το εμβολιασμένο ίζημα και το νερό. Κατά τη διάρκεια της προσθήκης των προνυμφών στα δοχεία δοκιμής, ο αερισμός του νερού πρέπει να διακόπτεται και μην αποκαθίσταται πριν από την παρέλευση 24ώρου από την προσθήκη των προνυμφών (βλέπε παραγράφους 24 και 32). Ανάλογα με τον σχεδιασμό της δοκιμής (βλέπε παραγράφους 19 και 20), ο αριθμός των χρησιμοποιούμενων προνυμφών ανά συγκέντρωση είναι τουλάχιστον 60 για την εκτίμηση του σημείου EC και 80 για τον προσδιορισμό της NOEC.

26. Είκοσι τέσσερις ώρες μετά την προσθήκη των προνυμφών, η ελεγχόμενη ουσία εμβολιάζεται στην υπερκείμενη στήλη ύδατος και στη συνέχεια παρέχεται και πάλι ήπιος αερισμός. Μικροί όγκοι των διαλυμάτων της ελεγχόμενης ουσίας εφαρμόζονται κάτω από την επιφάνεια του νερού με τη βοήθεια σιφωνίου. Το υπερκείμενο νερό πρέπει στη συνέχεια να αναμειγνύεται με επιμέλεια, ώστε να μη διαταράσσεται το ίζημα.

Συγκεντρώσεις δοκιμής

27. Η διεξαγωγή δοκιμής καθορισμού εύρους ενδέχεται να είναι χρήσιμη για τον προσδιορισμό του πεδίου τιμών των συγκεντρώσεων της οριστικής δοκιμής. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιείται μια σειρά από συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας με μεγάλα διαστήματα μεταξύ τους. Προκειμένου να παρέχεται η ίδια πυκνότητα επιφάνειας ανά χειρονομίδα με εκείνη που θα χρησιμοποιηθεί στην οριστική δοκιμή, οι χειρονομίδες εκτίθενται σε κάθε συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας για χρονικό διάστημα που επιτρέπει την εκτίμηση των κατάλληλων συγκεντρώσεων δοκιμής, ενώ δεν απαιτούνται επαναλήψεις.

28. Οι συγκεντρώσεις της οριστικής δοκιμής αποφασίζονται με βάση το αποτέλεσμα της δοκιμής καθορισμού εύρους. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις, επιλεγόμενες όπως περιγράφεται στις παραγράφους 18 έως 20.

Μάρτυρες

29. Θα πρέπει να περιλαμβάνονται στη δοκιμή δοχεία μάρτυρες που δεν περιέχουν την ελεγχόμενη ουσία, αλλά περιέχουν ίζημα, με τον κατάλληλο αριθμό επαναλήψεων (βλέπε παραγράφους 19-20). Εάν έχει χρησιμοποιηθεί διαλύτης για την εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας (βλέπε παράγραφο 16), θα πρέπει να προστίθεται ένας μάρτυρας με διαλύτη ιζήματος.

▼M4

Σύστημα δοκιμής

30. Χρησιμοποιούνται στατικά συστήματα. Σε εξαιρετικές περιπτώσεις, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ημιστατικά συστήματα ή συστήματα συνεχούς ροής με διαλείπουσα ή συνεχή ανανέωση του υπερκείμενου νερού, για παράδειγμα εάν οι προδιαγραφές ποιότητας του νερού καταστούν ακατάλληλες για τον ελεγχόμενο οργανισμό ή επηρεάζουν τη χημική ισορροπία (π.χ. εάν μειωθούν πολύ τα επίπεδα διαλυμένου οξυγόνου, αυξηθεί πολύ η συγκέντρωση των προϊόντων απέκκρισης ή εάν στραγγίζουν από τα ιζήματα ανόργανα άλατα που επηρεάζουν το pH και/ή τη σκληρότητα του νερού). Ωστόσο, κατά κανόνα επαρκούν και προτιμώνται άλλες μέθοδοι για τη βελτίωση της ποιότητας του υπερκείμενου νερού, όπως ο αερισμός.

Διατροφή

31. Η παροχή τροφής στις προνύμφες είναι απαραίτητη, κατά προτίμηση καθημερινά ή τουλάχιστον τρεις φορές την εβδομάδα. Η τροφή για ψάρια (εναιώρημα στο νερό ή λεπτοαλεσμένη τροφή, π.χ. TetraMin ή TetraPhyll, βλέπε λεπτομέρειες στο προσάρτημα 2), σε ποσότητα 0,25-0,5 mg (0,35 - 0,5 mg για το *C. yoshimatui*) ανά προνύμφη ανά ημέρα, πρέπει να είναι επαρκής για νεαρές προνύμφες κατά τις πρώτες 10 ημέρες. Οι μεγαλύτερης ηλικίας προνύμφες μπορεί να χρειάζονται ελαφρώς μεγαλύτερες ποσότητες τροφής: 0,5 έως 1 mg ανά προνύμφη ανά ημέρα είναι επαρκής ποσότητα για το υπόλοιπο της δοκιμής. Το σιτηρέσιο θα πρέπει να μειώνεται σε κάθε αγωγή και στους μάρτυρες σε περίπτωση που αναπτύσσονται μύκητες ή εάν παρατηρείται θνησιμότητα στους μάρτυρες. Εάν η ανάπτυξη μυκήτων δεν μπορεί να ανακοπεί, η δοκιμή πρέπει να επαναλαμβάνεται. Κατά τη δοκιμή ουσιών ισχυρής προσρόφησης (π.χ. με log K_{ow} > 5) ή ουσιών που συνδέονται με το ίζημα με ομοιοπολικούς δεσμούς, η ποσότητα τροφής που απαιτείται για να διασφαλιστεί η επιβίωση και η φυσική ανάπτυξη των οργανισμών μπορεί να προστίθεται στο μορφοποιημένο ίζημα πριν από την περίοδο σταθεροποίησης. Για τον σκοπό αυτό, πρέπει να χρησιμοποιείται φυτικό υλικό αντί της τροφής για ψάρια, π.χ. προσθήκη 0,5 % (ξηρό βάρος) λεπτοαλεσμένων φύλλων, π.χ. τσουκνίδας (*Urtica dioica*), μουριάς (*Morus alba*), λευκού τριφυλλιού (*Trifolium repens*), σπανακιού (*Spinacia oleracea*) ή άλλων φυτικών υλών (*Cerophyl ή άλφα-κυτταρίνη*).

Συνθήκες επώασης

32. Παρέχεται ήπιος αερισμός του υπερκείμενου νερού στα δοχεία δοκιμής, κατά προτίμηση 24 ώρες μετά την προσθήκη των νυμφών και συνεχίζεται καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής (πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου να μη μειώνεται σε επίπεδα κάτω από το 60 % της ASV). Ο αερισμός παρέχεται μέσω γυάλινου σιφωνίου Pasteur που στερεώνεται σε ύψος 2-3 cm πάνω από το στρώμα ιζήματος (δηλαδή μία ή μερικές φυσαλίδες/δευτερόλεπτο). Κατά τη δοκιμή πτητικών χημικών ουσιών, εξετάζεται το ενδεχόμενο μη αερισμού του συστήματος ιζήματος-νερού.

33. Η δοκιμή διεξάγεται σε σταθερή θερμοκρασία 20 °C (± 2 °C). Για τα *C. tentans* και *C. yoshimatui* οι συνιστώμενες θερμοκρασίες είναι 23 °C και 25 °C (± 2 °C), αντιστοίχως. Εφαρμόζεται φωτοπερίοδος 16 ωρών και η φωτεινή ισχύς θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 500 έως 1 000 Lux.

Διάρκεια έκθεσης

34. Η έκθεση αρχίζει με την προσθήκη των προνυμφών στα εμβολιασμένα δοχεία και στα δοχεία-μάρτυρες. Η μέγιστη διάρκεια της έκθεσης είναι 28 ημέρες για τα *C. riparius* και *C. yoshimatsui*, και 65 ημέρες για το *C. tentans*. Σε περίπτωση εμφάνισης χειρονόμων νωρίτερα, η δοκιμή μπορεί να τερματιστεί μετά παρέλευση πέντε τουλάχιστον ημερών από την εμφάνιση του τελευταίου ενήλικα στο δοχείο-μάρτυρα.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Εμφάνιση

35. Προσδιορίζονται ο χρόνος ανάπτυξης και ο συνολικός αριθμός των πλήρως αναπτυχθέντων αρσενικών και θηλυκών χειρονόμων. Τα αρσενικά έντομα αναγνωρίζονται εύκολα από τις πτεροειδείς κεραίες τους.

▼M4

36. Τα δοχεία δοκιμής πρέπει να παρατηρούνται τουλάχιστον τρεις φορές την εβδομάδα με σκοπό την οπτική αξιολόγηση κάθε μη φυσιολογικής συμπεριφοράς (π.χ. εγκατάλειψη του ιζήματος, ασυνήθιστη κολύμβηση), σε σύγκριση με το δοχείο-μάρτυρα. Κατά την περίοδο της αναμενόμενης εμφάνισης είναι απαραίτητη η καθημερινή καταμέτρηση των εμφανιζόμενων χειρονόμων. Καταγράφονται καθημερινά το φύλο και ο αριθμός των πλήρως αναπτυχθέντων χειρονόμων. Μετά την αναγνώριση οι χειρονόμοι απομακρύνονται από τα δοχεία. Τυχόν μάζες αυγών που έχουν εναποτεθεί πριν από τον τερματισμό της δοκιμής πρέπει να καταγράφονται και στη συνέχεια να απομακρύνονται ώστε να αποτρέπεται η εκ νέου εισαγωγή προνυμφών στο ίζημα. Επίσης, καταγράφεται ο αριθμός των ορατών χρυσαλλίδων που δε τελειοποιήθηκαν. Στο προσάρτημα 5 παρέχονται κατευθύνσεις σχετικά με τη μέτρηση της εμφάνισης.

Ανάπτυξη και επιβίωση

37. Εάν πρέπει να παρέχονται δεδομένα σχετικά με τη 10ήμερη επιβίωση και ανάπτυξη των προνυμφών, θα πρέπει να προβλέπονται πρόσθετα δοχεία δοκιμής στην αρχή της δοκιμής, ούτως ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν αργότερα. Το ίζημα από αυτά τα πρόσθετα δοχεία κοσκινίζεται με κόσκινο των 250 μm για να συγκρατηθούν οι προνύμφες. Τα κριτήρια βάσει των οποίων διαπιστώνεται ο θάνατος είναι η ακινησία ή η απουσία αντίδρασης σε μηχανικό ερέθισμα. Οι προνύμφες που δεν ανακτώνται θα πρέπει επίσης να καταμετρώνται ως νεκρές (οι προνύμφες που πεθαίνουν στην αρχή της δοκιμής μπορεί να αποικοδομούνται από μικρόβια). Προσδιορίζεται το ξηρό βάρος (χωρίς την τέφρα) των επιζωσών προνυμφών ανά δοχείο δοκιμής και υπολογίζεται το μέσο ξηρό βάρος ανά προνύμφη ανά δοχείο. Είναι χρήσιμο να προσδιορίζεται το στάδιο ανάπτυξης των επιζωσών προνυμφών. Προς τούτο μπορεί να χρησιμεύσει η μέτρηση του πλάτους της κεφαλικής κάψας κάθε προνύμφης.

Αναλυτικές μετρήσεις

Συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας

38. Πρέπει να αναλύονται, τουλάχιστον, δείγματα του υπερκείμενου νερού, του ενδοπορικού νερού και του ιζήματος στην αρχή (κατά προτίμηση μία ώρα μετά την εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας) και στο τέλος της δοκιμής, στην υψηλότερη και στη χαμηλότερη συγκέντρωση. Οι συγκεκριμένοι προσδιορισμοί της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τη συμπεριφορά/κατανομή της ελεγχόμενης ουσίας στο σύστημα νερού-ιζήματος. Η δειγματοληψία ιζήματος κατά την έναρξη της δοκιμής μπορεί να επηρεάσει το σύστημα δοκιμής (π.χ. απομάκρυνση προνυμφών δοκιμής), και, επομένως, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται επιπλέον δοχεία δοκιμής για την εκτέλεση αναλυτικών προσδιορισμών κατά την έναρξη και κατά τη διάρκεια της δοκιμής, κατά περίπτωση (βλέπε παράγραφο 39). Οι μετρήσεις στο ίζημα μπορεί να μην είναι απαραίτητες, εάν η κατανομή της ελεγχόμενης ουσίας μεταξύ νερού και ιζήματος έχει προσδιοριστεί σαφώς σε μελέτη νερού/ιζήματος υπό ανάλογες συνθήκες (π.χ. αναλογία ιζήματος προς νερό, τύπος εφαρμογής, περιεκτικότητα του ιζήματος σε οργανικό άνθρακα).

39. Όταν εκτελούνται ενδιάμεσες μετρήσεις (π.χ. την 7η ημέρα) και εάν για την ανάλυση απαιτούνται μεγάλα δείγματα τα οποία δεν μπορούν να ληφθούν από τα δοχεία δοκιμής χωρίς να επηρεάσουν το σύστημα δοκιμής, πρέπει να εκτελούνται αναλυτικοί προσδιορισμοί σε δείγματα από πρόσθετα δοχεία δοκιμής που υποβάλλονται στην ίδια αγωγή (συμπεριλαμβανομένης της παρουσίας των οργανισμών δοκιμής), αλλά δεν χρησιμοποιούνται για βιολογικές παρατηρήσεις.

40. Η φυγοκέντρηση, π.χ. σε 10 000 g και 4 °C για 30 λεπτά, αποτελεί τη συνιστώμενη διαδικασία για την απομόνωση του ενδοπορικού νερού. Ωστόσο, εάν καταδεικνύεται ότι η ελεγχόμενη ουσία δεν προσροφάται στους ηθμούς, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της διήθησης. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να μην είναι δυνατόν να προσδιοριστούν με ανάλυση οι συγκεντρώσεις σε ενδοπορικό νερό, καθώς το μέγεθος του δείγματος είναι υπερβολικά μικρό.

▼M4

Φυσικοχημικές παράμετροι

41. Θα πρέπει να μετρώνται με κατάλληλο τρόπο το pH, το διαλυμένο οξυγόνο στο νερό δοκιμής και η θερμοκρασία των δοχείων δοκιμής (βλέπε παράγραφο 10). Η σκληρότητα και η αμμωνία θα πρέπει να μετρώνται στους μάρτυρες και σε ένα δοχείο δοκιμής στην υψηλότερη συγκέντρωση στην αρχή και το τέλος της δοκιμής.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

42. Σκοπός της παρούσας δοκιμής είναι η διαπίστωση της επίδρασης της ελεγχόμενης ουσίας στον ρυθμό ανάπτυξης και τον συνολικό αριθμό των πλήρως αναπτυχθέντων αρσενικών και θηλυκών χειρονόμων ή, στην περίπτωση της 10ήμερης δοκιμής, η διαπίστωση των επιδράσεων στην επιβίωση και το βάρος των προνυμφών. Εάν δεν υπάρχουν ενδείξεις για στατιστικά διαφορετικές ευαισθησίες των φύλων, τα αποτελέσματα για τα αρσενικά και τα θηλυκά έντομα μπορούν να συνενώνονται για τις στατιστικές αναλύσεις. Οι διαφορές ευαισθησίας μεταξύ των φύλων μπορούν να κριθούν στατιστικά, π.χ. με δοκιμή πίνακα χ^2-r × 2. Η επιβίωση των προνυμφών και το μέσο ξηρό βάρος ανά άτομο ανά δοχείο πρέπει να προσδιορίζονται μετά από 10 ημέρες, όπου απαιτείται.

43. Οι συγκεντρώσεις στις οποίες παρατηρείται επίδραση, εκφραζόμενες ως συγκεντρώσεις στο υπερκείμενο νερό, υπολογίζονται κατά προτίμηση με βάση τις συγκεντρώσεις που μετρώνται κατά την έναρξη της δοκιμής (βλέπε παράγραφο 38).

44. Για την εκτίμηση των σημείων των τιμών της EC_{50} ή οποιασδήποτε άλλης EC_x, μπορούν να χρησιμοποιούνται τα στατιστικά στοιχεία ανά δοχείο ως πραγματικές επαναλήψεις. Κατά τον υπολογισμό διαστήματος εμπιστοσύνης για κάθε EC_x, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η μεταβλητότητα μεταξύ των δοχείων ή να αποδεικνύεται ότι η μεταβλητότητα αυτή είναι τόσο μικρή, ώστε να μπορεί να αγνοηθεί. Όταν η προσαρμογή του μοντέλου γίνεται με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, θα πρέπει να εφαρμόζεται μετασχηματισμός στα στατιστικά στοιχεία ανά δοχείο ώστε να βελτιώνεται η ομοιογένεια της διασποράς. Ωστόσο, οι τιμές EC_x θα πρέπει να υπολογίζονται αφού μετασχηματιστεί εκ νέου η απόκριση στην αρχική τιμή.

45. Όταν η στατιστική ανάλυση στοχεύει στον προσδιορισμό της NOEC/LOEC μέσω δοκιμασίας υποθέσεων, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η μεταβλητότητα μεταξύ των δοχείων, π.χ. μέσω φωλιασμένης (εγκλωβισμένης) ANOVA. Εναλλακτικά, μπορεί να είναι κατάλληλες πιο ανθεκτικές δοκιμές (21), σε περιπτώσεις όπου παραβιάζονται οι συνήθεις παραδοχές της ANOVA.

Λόγος εμφάνισης

46. Οι λόγοι εμφάνισης είναι ποσοστιαία δεδομένα που μπορούν να αναλυθούν με δοκιμασία Cochran-Armitage, εφαρμοζόμενη καθοδικά, όπου αναμένεται μονοτονική σχέση δόσης-απόκρισης και τα δεδομένα αυτά συνάδουν με τη συγκεκριμένη προσδοκία. Σε αντίθετη περίπτωση, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια δοκιμή Fisher's exact ή Mantel-Haenszel, με διόρθωση των τιμών p κατά Bonferroni-Holm. Εάν υπάρχουν ενδείξεις για μεταβλητότητα μεταξύ των επαναλήψεων στο πλαίσιο της ίδιας συγκέντρωσης, η οποία είναι μεγαλύτερη από εκείνη που θα έδειχνε μια διωνυμική κατανομή (συχνά αναφέρεται ως «εξωδιωνυμική» διασπορά), θα πρέπει να χρησιμοποιηείται μια ανθεκτική δοκιμή Cochran-Armitage ή Fisher exact, όπως προτείνεται στην παράγραφο (21).

47. Προσδιορίζεται το άθροισμα των χειρονόμων που εμφανίζονται ανά δοχείο, ne, και διαιρείται διά του αριθμού των εισαγόμενων προνυμφών, na:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

▼**M4**

όπου:

ER = λόγος εμφάνισης

n_e = αριθμός χειρονόμων που εμφανίστηκαν ανά δοχείο

n_a = αριθμός προνυμφών που εισήχθησαν ανά δοχείο

48. Μια εναλλακτική λύση που είναι η πλέον κατάλληλη για δείγματα μεγάλου μεγέθους, όταν υπάρχει εξωδιωνυμική διασπορά, είναι να θεωρείται ο λόγος εμφάνισης ως συνεχής απόκριση και να χρησιμοποιούνται διαδικασίες όπως η δοκιμασία William όταν αναμένεται μονοτονική σχέση δόσης-απόκρισης η οποία συνάδει με αυτά τα δεδομένα για τον ER. Η δοκιμασία Dunnett είναι κατάλληλη σε περιπτώσεις που δεν ισχύει η μονοτονικότητα. Εν προκειμένω, το δείγμα μεγάλου μεγέθους ορίζεται ως αριθμός τόσο των εμφανιζόμενων όσο και των μη εμφανιζόμενων εντόμων μεγαλύτερος του 5 ανά επανάληψη (δοχείο).

49. Για την εφαρμογή των μεθόδων ANOVA οι τιμές του ER θα πρέπει πρώτα να μετασχηματίζονται με μετασχηματισμό τετραγωνικής ρίζας του τόξου ημιτόνου ή με μετασχηματισμό Freeman-Tukey για την επίτευξη μιας κατά προσέγγιση κανονικής κατανομής και την εξίσωση των διασπορών. Οι δοκιμασίες Cochran-Armitage, Fisher's exact (Bonferroni) και Mantel-Haenszel μπορούν να εφαρμοστούν όταν χρησιμοποιούνται απόλυτες συχνότητες. Ο μετασχηματισμός τετραγωνικής ρίζας του τόξου ημιτόνου εφαρμόζεται λαμβάνοντας το αντίστροφο του ημιτόνου ($\sin^{-1}$) της τετραγωνικής ρίζας του ER.

50. Για τους λόγους εμφάνισης, οι τιμές EC_x υπολογίζονται με ανάλυση παλινδρόμησης (ή, π.χ., με probit (22), logit, Weibull ή κατάλληλο λογισμικό του εμπορίου κ.λπ.). Εάν η ανάλυση παλινδρόμησης αποτύχει (π.χ. όταν υπάρχουν λιγότερες από δύο μερικές αποκρίσεις), χρησιμοποιούνται άλλες, μη παραμετρικές μέθοδοι, όπως ο κινητός μέσος (όρος) ή η απλή παρεμβολή.

Ρυθμός ανάπτυξης

51. Ο μέσος χρόνος ανάπτυξης αντιπροσωπεύει το μέσο χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την εισαγωγή των προνυμφών (ημέρα 0 της δοκιμής) έως την εμφάνιση της πειραματικής κοόρτης χειρονόμων (για τον υπολογισμό του πραγματικού χρόνου ανάπτυξης, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η ηλικία των προνυμφών κατά τον χρόνο της εισαγωγής). Ο ρυθμός ανάπτυξης ισούται με το αντίστροφο του χρόνου ανάπτυξης (μονάδα: 1/ημέρα) και αντιπροσωπεύει το ημερήσιο τμήμα της ανάπτυξης των προνυμφών. Ο ρυθμός ανάπτυξης προτιμάται για την αξιολόγηση των παρουσών μελετών τοξικότητας σε ίζημα, καθώς παρουσιάζει μικρότερη διασπορά, είναι πιο ομοιογενής και προσεγγίζει περισσότερο την κανονική κατανομή σε σύγκριση με τον χρόνο ανάπτυξης. Ως εκ τούτου, οι διαδικασίες ανθεκτικής παραμετρικής δοκιμασίας μπορούν να εφαρμόζονται στον ρυθμό ανάπτυξης αντί του χρόνου ανάπτυξης. Για τον ρυθμό ανάπτυξης ως συνεχή απόκριση, μπορούν να υπολογιστούν τιμές EC_x με ανάλυση παλινδρόμησης [π.χ. (23)(24)].

52. Για τις ακόλουθες στατιστικές δοκιμασίες, ο αριθμός των χειρονόμων που παρατηρήθηκε κατά την ημέρα επιθεώρησης x υποτίθεται ότι εμφανίστηκε κατά το μέσο χρονικό διάστημα μεταξύ της ημέρας x και της ημέρας x - 1 (1 = διάρκεια του διαστήματος επιθεώρησης, συνήθως 1 ημέρα). Ο μέσος ρυθμός ανάπτυξης ανά δοχείο (x) υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

όπου:

$\bar{x}$: μέσος ρυθμός ανάπτυξης ανά δοχείο

i: δείκτης του διαστήματος επιθεώρησης

m: μέγιστος αριθμός διαστημάτων επιθεώρησης

▼M4

f_i: αριθμός χειρονόμων που εμφανίστηκαν κατά το διάστημα επιθεώρησης i

n_e: συνολικός αριθμός χειρονόμων που εμφανίστηκαν στο τέλος του πειράματος ($=\sum f_i$)

x_i: ρυθμός ανάπτυξης των χειρονόμων που εμφανίστηκαν κατά το διάστημα i

$$x_i = 1/\left(\text{ημέρα}_i - \frac{l_i}{2}\right)$$

όπου:

ημέρα_i: ημέρα επιθεώρησης (ημέρες από την εφαρμογή)

l_i: διάρκεια του διαστήματος επιθεώρησης i (ημέρες, συνήθως 1 ημέρα)

Έκθεση δοκιμής

53. Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον τις ακόλουθες πληροφορίες:

Ελεγχόμενη ουσία:

— φυσική κατάσταση και, κατά περίπτωση, φυσικοχημικές ιδιότητες (υδατοδιαλυτότητα, τάση ατμών, συντελεστής κατανομής στο έδαφος (ή στο ίζημα, εάν είναι διαθέσιμος), σταθερότητα στο νερό κ.λπ.),

— στοιχεία ταυτοποίησης χημικής ουσίας (κοινή ονομασία, χημική ονομασία, συντακτικός τύπος, αριθμός CAS κ.λπ.), συμπεριλαμβανομένων της καθαρότητας και της αναλυτικής μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ελεγχόμενης ουσίας.

Υπό δοκιμή είδος:

— ζώα που χρησιμοποιήθηκαν: είδος, επιστημονική ονομασία, πηγή των οργανισμών και συνθήκες αναπαραγωγής,

— πληροφορίες σχετικά με τη μεταχείριση των μαζών αυγών και των προνυμφών,

— ηλικία των ζώων κατά τον χρόνο εισαγωγής τους στα δοχεία δοκιμής.

Συνθήκες δοκιμής:

— ίζημα που χρησιμοποιήθηκε, δηλαδή φυσικό ή μορφοποιημένο,

— για τα φυσικά ιζήματα, τοποθεσία και περιγραφή του σημείου δειγματοληψίας του ιζήματος, συμπεριλαμβανομένου, εάν είναι δυνατόν, του ιστορικού μόλυνσης· χαρακτηριστικά: pH, περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, αναλογία C/N και κοκκομετρία (κατά περίπτωση),

— παρασκευή του μορφοποιημένου ιζήματος: συστατικά και χαρακτηριστικά (περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, pH, υγρασία κ.λπ. κατά την έναρξη της δοκιμής),

— παρασκευή του νερού δοκιμής (εάν χρησιμοποιείται ανασυσταθέν νερό) και τα χαρακτηριστικά του (συγκέντρωση οξυγόνου, pH, αγωγιμότητα, σκληρότητα κ.λπ. κατά την έναρξη της δοκιμής),

— βάθος του ιζήματος και του υπερκείμενου νερού,

— όγκος του υπερκείμενου και του ενδοπορικού νερού· βάρος του υγρού ιζήματος με και χωρίς ενδοπορικό νερό,

— δοχεία δοκιμής (υλικό και μέγεθος),

— μέθοδος παρασκευής των διαλυμάτων παρακαταθήκης και συγκεντρώσεις δοκιμής·

▼M4

— εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας: συγκεντρώσεις δοκιμής που χρησιμοποιήθηκαν, αριθμός επαναλήψεων και χρήση διαλύτη, εάν έγινε,

— συνθήκες επώασης: θερμοκρασία, φωτοπερίοδος και φωτεινή ισχύς, αερισμός (συχνότητα και ένταση),

— λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη διατροφή, συμπεριλαμβανομένων του είδους τροφής, της παρασκευής, της ποσότητας και του καθεστώτος σίτισης.

Αποτελέσματα:

— ονομαστικές συγκεντρώσεις δοκιμής, μετρούμενες συγκεντρώσεις δοκιμής και τα αποτελέσματα όλων των αναλύσεων για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας στο δοχείο δοκιμής,

— ποιότητα του νερού στο εσωτερικό των δοχείων δοκιμής, δηλαδή pH, θερμοκρασία, διαλυμένο οξυγόνο, σκληρότητα και αμμωνία,

— αναπλήρωση του εξατμισθέντος νερού δοκιμής, εάν υπήρξε,

— αριθμός των αρσενικών και των θηλυκών χειρονόμων που εμφανίστηκαν ανά δοχείο και ανά ημέρα,

— αριθμός των προνυμφών που δεν εμφανίστηκαν ως τέλειοι χειρονόμοι ανά δοχείο,

— μέσο ξηρό βάρος προνύμφης ανά δοχείο και ανά στάδιο, ανάλογα με την περίπτωση·

— ποσοστιαία εμφάνιση ανά επανάληψη και συγκέντρωση δοκιμής (συνενωμένα αποτελέσματα για αρσενικούς και θηλυκούς χειρονόμους),

— μέσος ρυθμός ανάπτυξης των πλήρως αναπτυχθέντων χειρονόμων ανά επανάληψη και αγωγή (συνενωμένα αποτελέσματα για αρσενικούς και θηλυκούς χειρονόμους),

— εκτιμήσεις των τοξικών καταληκτικών σημείων, π.χ. EC_x (και τα σχετικά διαστήματα εμπιστοσύνης), NOEC και/ή LOEC, και οι στατιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό τους,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων, συμπεριλαμβανομένης της επίδρασης τυχόν αποκλίσεων από την παρούσα μέθοδο δοκιμών στην έκβαση της δοκιμής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, Edited by M. Streloke and H. Köpp, Berlin 1995.

(2) Fleming R *et al.* (1994), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738, August 1994, WRc, UK.

(3) SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments, From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002), Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241, στο ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology, Pesticides, ASTM International, West Conshohocken, PA.

(5) Environment Canada (1997), Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*), Biological Test Method, Report SPE 1/RM/32. December 1997.

(6) US-EPA (2000), Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064, March 2000, Revision to the first edition dated June 1994.

▼M4

(7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

(9) Milani D., Day K.E., McLeay D.J., Kirby R.S. (1996), Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius),* Technical Report. Environment Canada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canada.

(10) Sugaya Y. (1997), Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*, *Jp. J. Sanit. Zool.* 48 (4): 345-350.

(11) Kawai K. (1986), Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera), *Jp. J. Sanit. Zool.* 37(1): 47-57.

(12) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(13) Environment Canada (1995), Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant, Report EPS 1/RM/30ης September 1995.

(14) Κεφάλαιο Γ.8 του παρόντος παραρτήματος: Τοξικότητα για τους γαιοσκώληκες.

(15) Suedel B.C. και Rodgers J.H. (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 1163-1175.

(16) Naylor C. και Rodrigues C. (1995), Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment, *Chemosphere* 31: 3291-3303.

(17) Dunnett C.W. (1964), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *J. Amer. Statis. Assoc.* 50: 1096-1121.

(18) Dunnett C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics* 20: 482-491.

(19) Williams D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics* 27: 103-117.

(20) Williams D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics* 28: 510-531.

(21) Rao J.N.K. και Scott A.J. (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, *Biometrics* 48:577-585.

(22) Christensen E.R. (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, *Water Research* 18: 213-221.

(23) Bruce και Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry* 11:1485-1494.

(24) Slob W. (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints, *Toxicol. Sci.* 66: 298-312.

▼**M4**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου δοκιμών χρησιμοποιούνται οι ακόλουθοι ορισμοί:

Μορφοποιημένο ίζημα ή ανασυσταθέν, τεχνητό ή συνθετικό ίζημα είναι ένα μείγμα υλικών που χρησιμοποιείται για να απομιμείται τα φυσικά συστατικά ενός φυσικού ιζήματος.

Υπερκείμενο νερό είναι το νερό που τοποθετείται πάνω από το ίζημα στο δοχείο δοκιμής.

Διάμεσο νερό ή ενδοπορικό νερό είναι το νερό που καταλαμβάνει τον χώρο μεταξύ των σωματιδίων του ιζήματος και του εδάφους.

Εμβολιασμένο νερό είναι το νερό δοκιμής στο οποίο έχει προστεθεί ελεγχόμενη ουσία.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

▼M4

Προσάρτημα 2

Συστάσεις για την καλλιέργεια του *Chironomus riparius*

1. Οι προνύμφες του γένους Chironomus μπορούν να εκτρέφονται σε δοχεία κρυστάλλωσης ή μεγαλύτερα δοχεία. Λεπτή χαλαζιακή άμμος απλώνεται σε ένα λεπτό στρώμα βάθους περίπου 5 έως 10 mm πάνω από τον πυθμένα του δοχείου. Το Kieselguhr (π.χ. Merck, Art 8117) έχει επίσης αποδειχθεί κατάλληλο υπόστρωμα (επαρκεί ένα λεπτότερο στρώμα πάχους πολύ λίγων mm). Στη συνέχεια, προστίθεται επαρκής ποσότητα νερού σε βάθος αρκετών εκατοστών. Το νερό θα πρέπει να συμπληρώνεται, όσο χρειάζεται ώστε να αναπληρώνονται οι απώλειες λόγω εξάτμισης, καθώς και για την πρόληψη της αποξήρανσης. Το νερό μπορεί να αντικαθίσταται, εάν είναι απαραίτητο. Θα πρέπει να παρέχεται ήπιος αερισμός. Τα δοχεία εκτροφής των προνυμφών θα πρέπει να είναι τοποθετημένα σε κατάλληλο κλωβό που να αποτρέπει τη διαφυγή των εμφανιζόμενων ενηλίκων εντόμων. Ο κλωβός πρέπει να είναι αρκετά μεγάλος για να επιτρέπει στα εμφανιζόμενα ενήλικα έντομα να σχηματίσουν σμήνος, γιατί διαφορετικά δεν είναι δυνατή η αναπαραγωγή (οι ελάχιστες διαστάσεις είναι περίπου 30 × 30 × 30 cm).

2. Οι κλωβοί θα πρέπει να διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου ή σε αίθουσα σταθερού περιβάλλοντος, στους 20 + 2 °C, με φωτοπερίοδο 16 ωρών (ισχύς περίπου 1 000 lux). Έχει αναφερθεί ότι υγρασία του αέρα μικρότερη από 60 % RH μπορεί να εμποδίσει την αναπαραγωγή.

Νερό αραίωσης

3. Μπορεί να χρησιμοποιείται οποιοδήποτε κατάλληλο φυσικό ή συνθετικό νερό. Συνήθως χρησιμοποιούνται νερό γεώτρησης, αποχλωριωμένο νερό βρύσης και τεχνητά μέσα (π.χ. θρεπτικό υλικό Elendt «M4» ή «M7», βλέπε κατωτέρω). Το νερό πρέπει να αερίζεται πριν από τη χρήση. Εάν είναι απαραίτητο, το νερό καλλιέργειας μπορεί να ανανεώνεται με έκχυση ή σιφωνισμό του χρησιμοποιημένου νερού από τα δοχεία καλλιέργειας, με προσοχή, χωρίς να καταστρέφονται οι σωλήνες των προνυμφών.

Σίτιση προνυμφών

4. Οι προνύμφες του γένους Chironomus πρέπει να τρέφονται με νιφάδες τροφής για ψάρια (TetraMin, TetraPhyll ή άλλη παρόμοια τροφή για ψάρια με κατοχυρωμένο εμπορικό σήμα), σε ποσότητα περίπου 250 mg ανά δοχείο ανά ημέρα. Η τροφή αυτή μπορεί να χορηγείται ως ξηρή αλεσμένη σκόνη ή ως εναιώρημα σε νερό: 1,0 g νιφάδων τροφής προστίθεται σε 20 ml νερού αραίωσης και αναμειγνύεται για να προκύψει ένα ομοιογενές μείγμα. Το παρασκεύασμα αυτό μπορεί να χορηγείται με ρυθμό περίπου 5 ml ανά δοχείο ημερησίως (ανακινείται πριν από τη χρήση). Οι μεγαλύτερης ηλικίας προνύμφες μπορούν να λαμβάνουν μεγαλύτερες ποσότητες.

5. Η σίτιση ρυθμίζεται ανάλογα με την ποιότητα του νερού. Εάν το μέσο καλλιέργειας «θολώσει», η σίτιση θα πρέπει να μειωθεί. Οι προσθήκες τροφής θα πρέπει να παρακολουθούνται επισταμένως. Η υπερβολικά μικρή ποσότητα τροφής θα προκαλέσει μετανάστευση των προνυμφών προς τη στήλη ύδατος, ενώ η υπερβολικά μεγάλη ποσότητα θα προκαλέσει αυξημένη μικροβιακή δραστηριότητα και μειωμένες συγκεντρώσεις οξυγόνου. Οι συνθήκες αυτές μπορούν να οδηγήσουν και οι δύο σε μειωμένους ρυθμούς ανάπτυξης.

6. Μπορούν επίσης να προστίθενται κύτταρα ορισμένων πράσινων φυκών (π.χ. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*), όταν ετοιμάζονται νέα δοχεία καλλιέργειας.

Σίτιση εμφανιζόμενων ενηλίκων

7. Ορισμένοι πειραματιστές έχουν προτείνει τον εμποτισμό ενός τεμαχίου βαμβακιού με κορεσμένο διάλυμα σακχαρόζης για να χρησιμεύσει ως τροφή για τα εμφανιζόμενα ενήλικα έντομα.

▼M4

Εμφάνιση

8. Στους 20 ± 2 °C θα αρχίσουν να εμφανίζονται ενήλικα έντομα από τα δοχεία εκτροφής προνυμφών μετά από περίπου 13-15 ημέρες. Τα αρσενικά διακρίνονται εύκολα από τις πτεροειδείς κεραίες τους.

Μάζες αυγών

9. Μόλις εμφανιστούν ενήλικα έντομα μέσα στον κλωβό αναπαραγωγής, όλα τα δοχεία εκτροφής προνυμφών θα πρέπει να ελέγχονται τρεις φορές την εβδομάδα για απόθεση των ζελατινωδών μαζών αυγών. Εάν υπάρχουν μάζες αυγών, πρέπει να αφαιρούνται με προσοχή και να μεταφέρονται σε έναν μικρό δίσκο που περιέχει δείγμα του νερού αναπαραγωγής. Οι μάζες των αυγών χρησιμοποιούνται για την έναρξη καλλιέργειας σε νέο δοχείο (π.χ. 2-4 μάζες αυγών/δοχείο) ή για δοκιμές τοξικότητας.

10. Οι προνύμφες πρώτου σταδίου πρέπει να εκκολάπτονται μετά από 2-3 ημέρες.

Ετοιμασία νέων δοχείων καλλιέργειας

11. Από τη στιγμή που οι καλλιέργειες έχουν εγκατασταθεί, υπάρχει δυνατότητα ετοιμασίας νέων δοχείων καλλιέργειας προνυμφών ανά εβδομάδα ή λιγότερο συχνά, ανάλογα με τις απαιτήσεις της δοκιμής, με αφαίρεση των παλαιότερων δοχείων μετά την εμφάνιση των ενήλικων χειρονόμων. Με τη χρήση του συστήματος αυτού, θα παράγεται κανονική ποσότητα ενηλίκων εντόμων με την ελάχιστη δυνατή διαχείριση.

Παρασκευή των διαλυμάτων δοκιμής «M4» και «M7»

12. Το θρεπτικό υλικό «M4» έχει περιγραφεί από τον Elendt (1990). Το υλικό «M7» παρασκευάζεται όπως και το «M4», εκτός από τις ουσίες που αναφέρονται στον πίνακα 1, των οποίων οι συγκεντρώσεις στο «M7» είναι υποτετραπλάσιες εκείνων του «M4». Συντάσσεται επί του παρόντος δημοσίευση για το θρεπτικό υλικό «M7» (Elendt, προσωπική επικοινωνία). Το διάλυμα δοκιμής δεν πρέπει να παρασκευάζεται σύμφωνα με τους Elendt και Bias (1990), επειδή οι συγκεντρώσεις $NaSiO_3$ 5 H_2O, $NaNO_3$, KH_2PO_4 και K_2HPO_4 που υποδεικνύονται για την παρασκευή των διαλυμάτων παρακαταθήκης δεν είναι επαρκείς.

Παρασκευή του θρεπτικού υλικού «M7»

13. Κάθε διάλυμα παρακαταθήκης (I) παρασκευάζεται χωριστά και από τα εν λόγω διαλύματα (I) παρασκευάζεται συνδυασμένο διάλυμα παρακαταθήκης (II) (βλέπε πίνακα 1). Πενήντα ml από το συνδυασμένο διάλυμα παρακαταθήκης (II) αναμειγνύονται με τις ποσότητες κάθε διαλύματος παρακαταθήκης μακροθρεπτικών συστατικών που εμφαίνονται στον πίνακα 2 και ο όγκος συμπληρώνεται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό για την παρασκευή του θρεπτικού υλικού «M7». Παρασκευάζεται διάλυμα παρακαταθήκης βιταμινών με την προσθήκη τριών βιταμινών σε απιονισμένο νερό, όπως υποδεικνύεται στον πίνακα 3, και 0,1 ml από το διάλυμα παρακαταθήκης συνδυασμού βιταμινών προστίθενται στο τελικό θρεπτικό υλικό «M7» λίγο πριν από τη χρήση (το διάλυμα παρακαταθήκης βιταμινών αποθηκεύεται κατεψυγμένο σε μικρά κλάσματα). Το θρεπτικό υλικό αερίζεται και σταθεροποιείται.

Πίνακας 1

Διαλύματα παρακαταθήκης ιχνοστοιχείων για τα θρεπτικά υλικά M4 και M7

Διάλυμα παρακαταθήκης (I)	Ποσότητα (mg) που αραιώνεται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό	Για την παρασκευή του συνδυασμένου διαλύματος παρακαταθήκης (II): αναμειγνύονται οι ακόλουθες ποσότητες (ml) διαλυμάτων παρακαταθήκης (I) και συμπληρώνεται ο όγκος έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό		Τελικές συγκεντρώσεις στα διαλύματα δοκιμής (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 ([1])	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ ([1])	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl ([1])	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M4**

Διάλυμα παρακαταθήκης (I)	Ποσότητα (mg) που αραιώνεται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό	Για την παρασκευή του συνδυασμένου διαλύματος παρακαταθήκης (II): αναμειγνύονται οι ακόλουθες ποσότητες (ml) διαλυμάτων παρακαταθήκης (I) και συμπληρώνεται ο όγκος έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό		Τελικές συγκεντρώσεις στα διαλύματα δοκιμής (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na2EDTA $\cdot$ 2 H_2O (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO4 $\cdot$ 7 H_2O (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Οι ουσίες αυτές διαφέρουν μεταξύ του M4 και του M7, όπως αναφέρεται ανωτέρω.
(2) Τα διαλύματα αυτά παρασκευάζονται χωριστά, ενώνονται και αποστειρώνονται αμέσως σε αυτόκαυστο.

Πίνακας 2

Διαλύματα παρακαταθήκης μακροθρεπτικών συστατικών για τα θρεπτικά υλικά M4 και M7

	Ποσότητα που αραιώνεται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό (mg)	Ποσότητα μητρικών διαλυμάτων μακροθρεπτικών συστατικών που προστίθεται για την παρασκευή των θρεπτικών υλικών M4 και M7 (ml/l)	Τελικές συγκεντρώσεις στα διαλύματα δοκιμής M4 και M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Πίνακας 3

Διάλυμα παρακαταθήκης βιταμινών για τα θρεπτικά υλικά M4 και M7

Συνδυάζονται και τα τρία διαλύματα βιταμινών για την παρασκευή ενιαίου διαλύματος παρακαταθήκης βιταμινών.

	Ποσότητα που αραιώνεται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό (mg)	Ποσότητα διαλύματος παρακαταθήκης βιταμινών που προστίθεται για την παρασκευή των θρεπτικών υλικών M4 και M7 (ml/l)	Τελικές συγκεντρώσεις στα διαλύματα δοκιμής M4 και M7 (mg/l)
Υδροχλωρική θειαμίνη	750	0,1	0,075
Κυανοκοβαλαμίνη (B12)	10	0,1	0,0010
Βιοτίνη	7,5	0,1	0,00075

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

BBA (1995), Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system, Edited by M. Streloke and H.Köpp, Berlin 1995.

Elendt B.P. (1990), Selenium Deficiency in Crustacean, *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt B.P. και Bias W.-R. (1990), Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*, *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼**M4**

Προσάρτημα 3

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΜΟΡΦΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΙΖΗΜΑΤΟΣ

Σύνθεση του ιζήματος

Η σύνθεση του μορφοποιημένου ιζήματος θα πρέπει να έχει ως εξής:

Συστατικά	Χαρακτηριστικά	% επί του ξηρού βάρους του ιζήματος
Τύρφη	Τύρφη σφάγνων, με pH όσο το δυνατόν πλησιέστερα στο 5,5 - 6,0, χωρίς ορατά υπολείμματα φυτών, λεπτοαλεσμένη (μέγεθος σωματιδίων ≤ 1 mm) και αερό-ξηρη	4 - 5
Χαλαζιακή άμμος	Μέγεθος κόκκων: > 50 % των σωματιδίων θα πρέπει να έχει μέγεθος 50-200 μm	75 - 76
Καολινιτική άργιλος	Περιεκτικότητα σε καολινίτη ≥ 30 %	20
Οργανικός άνθρακας	Ρυθμίζεται με προσθήκη τύρφης και άμμου	2 (± 0,5)
Ανθρακικό ασβέστιο	$CaCO_3$, κονιοποιημένο, χημικά καθαρό	0,05 - 0,1
Νερό	Αγωγιμότητα ≤ 10 μS/cm	30 - 50

Προετοιμασία

Η τύρφη ξηραίνεται στον αέρα και αλέθεται σε λεπτή σκόνη. Παρασκευάζεται εναιώρημα της απαιτούμενης ποσότητας σκόνης τύρφης σε απιονισμένο νερό με τη βοήθεια ομοιογενοποιητή υψηλής απόδοσης. Το pH του εν λόγω εναιωρήματος ρυθμίζεται στο 5,5± 0,5 με $CaCO_3$. Το εναιώρημα εγκλιματίζεται τουλάχιστον για δύο ημέρες με ήπια ανάδευση στους 20 ± 2 °C, για τη σταθεροποίηση του pH και τη δημιουργία σταθερού μικροβιακού συστατικού. Το pH μετράται εκ νέου και θα πρέπει να είναι 6,0 ± 0,5. Στη συνέχεια, το εναιώρημα τύρφης αναμειγνύεται με τα άλλα συστατικά (άμμος και καολινιτική άργιλος) και με απιονισμένο νερό για να ληφθεί ένα ομοιογενές ίζημα με περιεκτικότητα σε νερό 30-50 % επί του ξηρού βάρους του ιζήματος. Το pH του τελικού μείγματος μετράται και πάλι και ρυθμίζεται σε 6,5 έως 7,5 με $CaCO_3$, εάν είναι απαραίτητο. Λαμβάνονται δείγματα του ιζήματος για τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους και της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα. Στη συνέχεια, πριν από τη χρήση του ιζήματος στη δοκιμή τοξικότητας σε χειρονομίδες, συνιστάται ο εγκλιματισμός του μορφοποιημένου ιζήματος για επτά ημέρες υπό τις ίδιες συνθήκες με εκείνες που θα επικρατούν στην επακόλουθη δοκιμή.

Αποθήκευση

Τα ξηρά συστατικά για την παρασκευή του τεχνητού ιζήματος μπορούν να φυλάσσονται σε ξηρό και δροσερό χώρο, σε θερμοκρασία δωματίου. Το μορφοποιημένο (υγρό) ίζημα δεν πρέπει να αποθηκεύεται πριν από τη χρήση του στη δοκιμή. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται αμέσως μετά την πάροδο των 7 ημερών εγκλιματισμού με τον οποίο ολοκληρώνεται η παρασκευή του.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

Κεφάλαιο Γ.8 του παρόντος παραρτήματος: Τοξικότητα για τους γαιοσκώληκες.

Meller M., Egeler P., Rombke J., Schallnass H., Nagel R., Streit B. (1998), Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media, *Ecotox. and Environ. Safety* 39: 10-20.

▼**M4**

Προσάρτημα 4

Χημικά χαρακτηριστικά ενός αποδεκτού νερού αραίωσης

Ουσία	Συγκεντρώσεις
Σωματίδια	< 20 mg/l
Ολικός οργανικός άνθρακας	< 2 mg/l
Μη ιονισμένη αμμωνία	< 1 μg/l
Σκληρότητα ως $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Υπολείμματα χλωρίου	< 10 μg/l
Ολικά οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα	< 50 ng/l
Ολικά οργανοχλωριούχα γεωργικά φάρμακα μαζί με πολυχλωριωμένα διφαινύλια	< 50 ng/l
Ολικό οργανικό χλώριο	< 25 ng/l

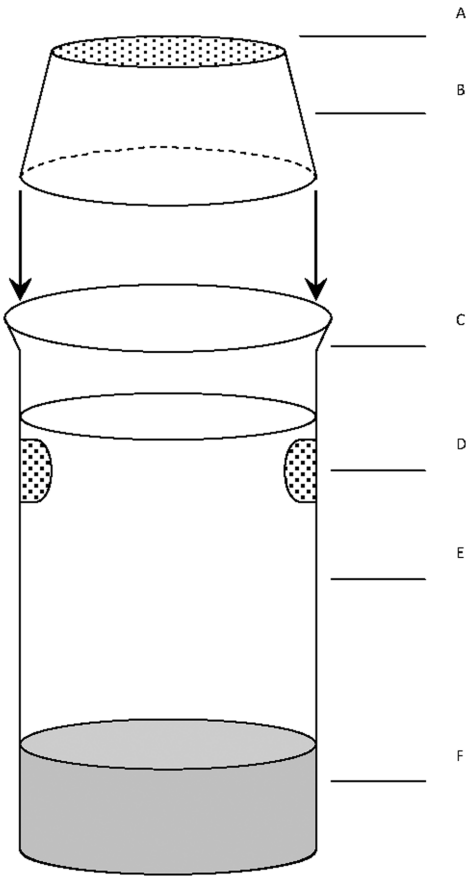
(*) Ωστόσο, σημειώνεται ότι εάν υπάρχουν υπόνοιες για αλληλεπίδραση μεταξύ ιόντων σκληρότητας και της ελεγχόμενης ουσίας, θα πρέπει να χρησιμοποιείται νερό χαμηλότερης σκληρότητας (και, ως εκ τούτου, δεν πρέπει να χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό Elendt M4 σε αυτή την περίπτωση).

▼**M4**

Προσάρτημα 5

Κατευθύνσεις για την παρακολούθηση της εξόδου των προνυμφών χειρονομίδων

Τοποθετούνται παγίδες εξόδου στα ποτήρια ζέσεως της δοκιμής. Οι παγίδες αυτές χρειάζονται από την 20ή ημέρα έως το τέλος της δοκιμής. Ένα παράδειγμα χρησιμοποιούμενης παγίδας αναπαρίσταται κατωτέρω:



A: νάιλον σίτα

B: ανεστραμμένα πλαστικά ποτήρια

C: ποτήρι έκθεσης χωρίς χείλος

D: έξοδοι σίτας για την ανταλλαγή υδάτων

E: νερό

F: ίζημα

▼M4

Γ.29. ΑΜΕΣΗ ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΙΜΟΤΗΤΑ — CO_2 ΣΕ ΣΦΡΑΓΙΣΜΕΝΑ ΔΟΧΕΙΑ (ΔΟΚΙΜΉ ΥΠΕΡΚΕΊΜΕΝΗΣ ΦΆΣΗΣ)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 310 (2006) του ΟΟΣΑ. Πρόκειται για μια μέθοδο διαλογής για την αξιολόγηση της άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας των χημικών ουσιών και παρέχει παρόμοιες πληροφορίες με τις έξι μεθόδους δοκιμών, Α έως Ζ, που περιγράφονται στο κεφάλαιο Γ.4 του παρόντος παραρτήματος. Ως εκ τούτου, μια χημική ουσία που επιδεικνύει θετικά αποτελέσματα στην παρούσα μέθοδο δοκιμών μπορεί να θεωρηθεί άμεσα βιοαποικοδομήσιμη και, κατά συνέπεια, ταχέως αποικοδομήσιμη στο περιβάλλον.

2. Η καθιερωμένη μέθοδος του διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) (1), με βάση την αρχική δοκιμή Sturm (2) για την αξιολόγηση της βιοαποικοδομησιμότητας των οργανικών χημικών ουσιών, με τη μέτρηση του διοξειδίου του άνθρακα που παράγεται από μικροβιακή δράση, αποτελεί κατά κανόνα την πρώτη επιλογή για τη δοκιμή δυσδιάλυτων χημικών ουσιών και αυτών που παρουσιάζουν ισχυρή προσρόφηση. Επιλέγεται, επίσης, για διαλυτές (αλλά όχι πτητικές) χημικές ουσίες, δεδομένου ότι η έκλυση διοξειδίου του άνθρακα θεωρείται από πολλούς ως η μόνη κατηγορηματική απόδειξη μικροβιακής δραστηριότητας. Η απομάκρυνση του διαλυμένου οργανικού άνθρακα μπορεί να επιτευχθεί με φυσικοχημικές διεργασίες – προσρόφηση, εξάτμιση, καθίζηση, υδρόλυση – καθώς και με μικροβιακή δράση, ενώ και πολλές μη βιολογικές αντιδράσεις καταναλώνουν οξυγόνο. Σπάνια παράγεται CO_2 αβιοτικά από οργανικές χημικές ουσίες. Στην αρχική και τροποποιημένη δοκιμή Sturm (1)(2) το CO_2 απομακρύνεται από την υγρή φάση και διοχετεύεται σε απορροφητικά δοχεία με ψεκασμό (δηλαδή διαβίβαση φυσαλίδων αέρα μέσω του υγρού μέσου για την απομάκρυνση του CO_2), ενώ στην εκδοχή του Larson (3)(4) το CO_2 μεταφέρεται από το δοχείο αντίδρασης στους απορροφητές με τη διαβίβαση αέρα απαλλαγμένου από CO_2 μέσω του υπερκείμενου χώρου και, επιπροσθέτως, με συνεχή ανακίνηση του δοχείου δοκιμής. Η ανακίνηση του δοχείου αντίδρασης προβλέπεται μόνο στην τροποποίηση του Larson. Η ανάδευση αναφέρεται μόνον για τις αδιάλυτες ουσίες στο πρότυπο ISO 9439 (5) και στην αρχική έκδοση των ΗΠΑ (6), οι οποίες αναφέρουν ψεκασμό και όχι αντικατάσταση της υπερκείμενης φάσης. Σε μία άλλη επίσημη μέθοδο της Υπηρεσίας Περιβαλλοντικής Προστασίας των ΗΠΑ (EPA) (7), η οποία βασίζεται στη μέθοδο Gledhill (8), το ανακινούμενο δοχείο αντίδρασης δεν έρχεται σε επαφή με την ατμόσφαιρα και το παραγόμενο CO_2 συλλέγεται σε μια εσωτερική αλκαλική παγίδα απευθείας από την αέρια φάση, όπως στις κλασικές αναπνευσιομετρικές φιάλες Warburg/Barcroft.

3. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι ο ανόργανος άνθρακας (IC) συσσωρεύεται στο μέσο κατά την εφαρμογή της τυποποιημένης, τροποποιημένης δοκιμής Sturm σε μια σειρά από χημικές ουσίες (9). Συγκέντρωση IC έως 8 mg/l διαπιστώθηκε κατά τη διάρκεια της αποικοδόμησης ανιλίνης 20 mg C/l. Επομένως, η συλλογή του CO_2 στις αλκαλικές παγίδες δεν δίνει μια πιστή εικόνα της ποσότητας του CO_2 που παράγεται μικροβιολογικά σε ενδιάμεσους χρόνους κατά τη διάρκεια της αποικοδόμησης. Κατά συνέπεια, η προδιαγραφή σύμφωνα με την οποία > 60 % της θεωρητικά μέγιστης παραγωγής CO_2 ($ThCO_2$) πρέπει να συλλέγεται εντός «10ήμερου χρονικού διαστήματος» (οι 10 ημέρες αμέσως μετά από την επίτευξη βιοαποικοδόμησης σε ποσοστό 10 %) προκειμένου μια ελεγχόμενη χημική ουσία να ταξινομείται ως άμεσα βιοαποικοδομημένη δεν θα πληρούται για ορισμένες χημικές ουσίες οι οποίες θα μπορούσαν να καταταχθούν στην κατηγορία αυτή μέσω της απομάκρυνσης του διαλυμένου οργανικού άνθρακα (DOC).

4. Όταν η ποσοστιαία αποικοδόμηση λαμβάνει κατώτερη τιμή από την αναμενόμενη, είναι πιθανό ότι ο IC έχει συσσωρευθεί στο διάλυμα δοκιμής. Στην περίπτωση αυτή, η αποικοδομησιμότητα μπορεί να εκτιμηθεί με τις υπόλοιπες δοκιμές άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας.

▼M4

5. Τα λοιπά μειονεκτήματα της μεθοδολογίας Sturm (περίπλοκη, χρονοβόρα, πιο επιρρεπής σε πειραματικά σφάλματα και μη εφαρμοστέα σε πτητικές χημικές ουσίες), είχαν υποκινήσει νωρίτερα την έρευνα με αντικείμενο μια τεχνική με σφραγισμένο δοχείο, διαφορετική από αυτήν του Gledhill, αντί του συστήματος συνεχούς ροής αερίου (10)(11). Οι Boatman et al. (12) επανεξέτασαν τις προηγούμενες μεθόδους και υιοθέτησαν ένα κλειστό σύστημα υπερκείμενης φάσης, στο οποίο το CO_2 ελευθερωνόταν εντός του υπερκείμενου χώρου στο τέλος της επώασης με οξίνιση του μέσου. Το CO_2 μετρούνταν με ανάλυση αεριοχρωματογραφίας (GC)/IC σε αυτομάτως λαμβανόμενα δείγματα της υπερκείμενης φάσης, αλλά δεν συνυπολογιζόταν ο διαλυμένος ανόργανος άνθρακας (DIC) στην υγρή φάση. Επίσης, τα δοχεία που χρησιμοποιήθηκαν ήταν πολύ μικρά (20 ml) και περιείχαν μόνο 10 ml του μέσου, πράγμα που προκαλούσε προβλήματα π.χ. κατά την προσθήκη των αναγκαστικά πολύ μικρών ποσοτήτων αδιάλυτων ελεγχόμενων χημικών ουσιών και/ή ανεπαρκή ή μηδενική παρουσία μικροοργανισμών στο εμβολιασμένο μέσο, ικανών να αποικοδομήσουν τις ελεγχόμενες χημικές ουσίες.

6. Οι δυσκολίες αυτές έχουν υπερνικηθεί χάρη στις ανεξάρτητες μελέτες των Struijs και Stoltenkamp (13) και των Birch και Fletcher (14), με τους δεύτερους να εμπνέονται από την εμπειρία τους με συσκευές που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή αναερόβιας βιοαποικοδόμησης (15). Στην πρώτη μέθοδο (13), το CO_2 μετράται στον υπερκείμενο χώρο μετά από οξίνιση και ισορρόπηση, ενώ στη δεύτερη (14) ο DIC μετράται τόσο στην αέρια όσο και στην υγρή φάση, χωρίς κατεργασία. Πάνω από το 90 % του IC που σχηματίστηκε ήταν παρόν στην υγρή φάση. Αμφότερες οι μέθοδοι είχαν πλεονεκτήματα έναντι της δοκιμής Sturm από την άποψη ότι το σύστημα δοκιμής είναι πιο συμπαγές και εύχρηστο, μπορούν να υποβληθούν σε δοκιμή πτητικές χημικές ουσίες και αποφεύγεται η πιθανή καθυστέρηση στη μέτρηση του παραγόμενου CO_2.

7. Οι δύο προσεγγίσεις συνδυάστηκαν στο πρότυπο υπερκείμενης φάσης CO_2 του ISO (16), το οποίο υποβλήθηκε σε κυκλική δοκιμή (17) και πρόκειται για το πρότυπο που αποτελεί τη βάση της παρούσας μεθόδου δοκιμών. Ομοίως, οι δύο προσεγγίσεις έχουν χρησιμοποιηθεί στη μέθοδο της Υπηρεσίας Περιβαλλοντικής Προστασίας των ΗΠΑ (EPA) (18). Έχουν διατυπωθεί συστάσεις για δύο μεθόδους μέτρησης του CO_2, συγκεκριμένα του CO_2 στον υπερκείμενο χώρο μετά από την οξίνιση (13) και του IC στην υγρή φάση, μετά από την προσθήκη περίσσειας αλκαλίου. Η δεύτερη μέθοδος εισήχθη από τον Peterson κατά τη διάρκεια της κυκλικής δοκιμής CONCAWE (19) της παρούσας μεθόδου υπερκείμενης φάσης, η οποία τροποποιήθηκε για τη μέτρηση της εγγενούς βιοαποικοδομησιμότητας. Οι αλλαγές που επήλθαν με την αναθεώρηση, το 1992 (20), των μεθόδων του κεφαλαίου Γ.4 του παρόντος παραρτήματος για την άμεση βιοαποικοδομησιμότητα έχουν ενσωματωθεί στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, ώστε οι συνθήκες (μέσο, διάρκεια κ.λπ.), να είναι κατά τα άλλα ίδιες με εκείνες της αναθεωρημένης δοκιμή Sturm (20). Οι Birch και Fletcher (14) έχουν δείξει ότι με την παρούσα δοκιμή υπερκείμενης φάσης ελήφθησαν αποτελέσματα πολύ παρόμοια με εκείνα που προέκυψαν με τις ίδιες χημικές ουσίες στην κυκλική δοκιμή του ΟΟΣΑ (21) για τις αναθεωρημένες μεθόδους δοκιμών.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

8. Η ελεγχόμενη χημική ουσία, κατά κανόνα σε συγκέντρωση 20 mg C/l, ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας, επωάζεται σε ένα μέσο με ρυθμιστικό διάλυμα και ανόργανα άλατα, το οποίο έχει εμβολιαστεί με έναν μεικτό πληθυσμό μικροοργανισμών. Η δοκιμή διεξάγεται σε σφραγισμένες φιάλες με υπερκείμενο χώρο αέρα, ο οποίος παρέχει απόθεμα οξυγόνου για την αερόβια βιοαποικοδόμηση. Η έκλυση CO_2 που προκύπτει από την τελική αερόβια βιοαποικοδόμηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας προσδιορίζεται με μέτρηση της περίσσειας IC που παράγεται στις φιάλες δοκιμής σε σχέση με εκείνον που παράγεται σε τυφλά δοχεία που περιέχουν μόνον εμβολιασμένο μέσο. Η έκταση της βιοαποικοδόμησης εκφράζεται ως ποσοστό της θεωρητικής μέγιστης παραγωγής IC (ThIC), με βάση την ποσότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας (ως οργανικού άνθρακα) που έχει αρχικά προστεθεί.

9. Μπορούν επίσης να μετρηθούν η απομάκρυνση DOC και/ή η έκταση της πρωτοβάθμιας βιοαποικοδόμησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας (20).

▼M4

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

10. Η περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (% w/w) της ελεγχόμενης χημικής ουσίας πρέπει να είναι γνωστή, είτε από τη χημική δομή της είτε με μέτρηση, ούτως ώστε να μπορεί να υπολογιστεί το ποσοστό αποικοδόμησης. Για τις πτητικές ελεγχόμενες χημικές ουσίες, μια μετρημένη ή υπολογισμένη σταθερά του νόμου του Henry είναι χρήσιμη για τον καθορισμό της κατάλληλης αναλογίας των όγκων του υπερκείμενου χώρου και του υγρού. Οι πληροφορίες σχετικά με την τοξικότητα των ελεγχόμενων χημικών ουσιών στους μικροοργανισμούς είναι χρήσιμες για την επιλογή μιας κατάλληλης συγκέντρωσης δοκιμής, καθώς και για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων που παρουσιάζουν ανεπαρκή βιοαποικοδομησιμότητα: συνιστάται να περιλαμβάνεται ο μάρτυρας αναστολής εκτός εάν είναι γνωστό ότι η ελεγχόμενη χημική ουσία δεν είναι ανασταλτική στη μικροβιακή δραστηριότητα (βλέπε παράγραφο 24).

ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

11. Η δοκιμή εφαρμόζεται σε υδατοδιαλυτές και αδιάλυτες ελεγχόμενες χημικές ουσίες, ενώ θα πρέπει να διασφαλίζεται η καλή διασπορά της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Χρησιμοποιώντας τη συνιστώμενη αναλογία όγκων υπερκείμενου χώρου και υγρού 1:2, οι πτητικές χημικές ουσίες με σταθερά του νόμου του Henry έως 50 $Pa.m^3.mol^{-1}$ μπορεί να υποβληθούν σε δοκιμή, καθώς το ποσοστό της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στον υπερκείμενο χώρο δεν θα υπερβαίνει το 1 % (13). Μικρότερος όγκος υπερκείμενου χώρου μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατά τη δοκιμή χημικών ουσιών, οι οποίες είναι πιο ασταθείς, των οποίων όμως η βιοδιαθεσιμότητα μπορεί να είναι περιοριστική ειδικά εάν είναι ελάχιστα διαλυτή στο νερό. Ωστόσο, οι χρήστες πρέπει να εξασφαλίζουν ότι η αναλογία όγκων υπερκείμενου χώρου και νερού και η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας είναι τέτοιες ώστε να είναι διαθέσιμο επαρκές οξυγόνο που να επιτρέπει την πλήρη αερόβια βιοαποικοδόμηση (π.χ. αποφυγή χρήσης υψηλής συγκέντρωσης υποστρώματος και μικρού όγκου υπερκείμενου χώρου). Καθοδήγηση σχετικά με το θέμα αυτό παρέχουν οι παραπομπές (13)(23).

ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

12. Προκειμένου να ελεγχθεί η διαδικασία δοκιμής, θα πρέπει να εξετάζεται παράλληλα μια χημική ουσία αναφοράς γνωστής βιοαποικοδομησιμότητας. Για τον σκοπό αυτό, μπορούν να χρησιμοποιούνται ανιλίνη, βενζοϊκό νάτριο ή αιθυλενογλυκόλη κατά τη δοκιμή υδατοδιαλυτών ελεγχόμενων χημικών ουσιών και 1-οκτανόλη για δυσδιάλυτες ελεγχόμενες χημικές ουσίες (13). Το ποσοστό βιοαποικοδόμησης των χημικών αυτών ουσιών πρέπει να φθάνει σε επίπεδα > 60 % ThIC εντός 14 ημερών.

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ

13. Στην κυκλική δοκιμή ISO της μεθόδου (17), ελήφθησαν τα ακόλουθα αποτελέσματα υπό τις συνιστώμενες συνθήκες, συμπεριλαμβανομένων των 20 mg C ελεγχόμενης χημικής ουσίας/l.

Ελεγχόμενη χημική ουσία	Μέσο ποσοστό βιοαποικοδόμησης (28 ημέρες)	Συντελεστής μεταβλητότητας (%)	Αριθμός εργαστηρίων
Ανιλίνη	90	16	17
1-Οκτανόλη	85	12	14

Η μεταβλητότητα εντός της δοκιμής (επαναληψιμότητα), με τη χρήση ανιλίνης, ήταν χαμηλή, με συντελεστές μεταβλητότητας όχι μεγαλύτερους από 5 % σε όλες σχεδόν τις μετρήσεις των δοκιμών. Στις δύο περιπτώσεις κατά τις οποίες η επαναληψιμότητα ήταν χειρότερη, η μεγαλύτερη μεταβλητότητα οφειλόταν κατά πάσα πιθανότητα στη μεγάλη παραγωγή IC στα τυφλά. Η επαναληψιμότητα ήταν χειρότερη με την 1-οκτανόλη, αλλά εξακολουθούσε να είναι μικρότερη από 10 % στο 79 % των μετρήσεων της δοκιμής. Η εν λόγω μεγαλύτερη μεταβλητότητα εντός της δοκιμής μπορεί να οφείλεται σε σφάλματα δοσολογίας, καθώς ένας μικρός όγκος (3 έως 4 μl) 1-οκτανόλης έπρεπε να εγχέεται σε σφραγισμένες φιάλες δοκιμής. Υψηλότεροι συντελεστές μεταβλητότητας προκύπτουν όταν χρησιμοποιούνται χαμηλότερες συγκεντρώσεις των ελεγχόμενων χημικών ουσιών, ειδικά σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από 10 mg C/l. Αυτό θα μπορούσε εν μέρει να αντιμετωπιστεί με τη μείωση της συγκέντρωσης του ολικού ανόργανου άνθρακα (TIC) στο εμβόλιο.

▼**M4**

14. Σε μια κυκλική δοκιμή της ΕΕ (24) με την προσθήκη πέντε επιφανειοδραστικών ουσιών σε συγκέντρωση 10 mg C/l, ελήφθησαν τα ακόλουθα αποτελέσματα:

Ελεγχόμενη χημική ουσία	Μέσο ποσοστό βιοαποικοδόμησης (28 ημέρες)	Συντελεστής μεταβλητότητας (%)	Αριθμός εργαστηρίων
Βενζολοσουλφονικό τετραπροπυλένιο	17	45	10
Σουλφοηλεκτρικό δισοοκτύλιο (ανιονικό)	72	22	9
Χλωριούχο δεκαεξυλοτριμεθυλαμμώνιο (*) (κατιονικό)	75	13	10
Ισο-εννεϋλοφαινόλη (αιθοξυλιωμένη)$_9$ (μη ιονικό)	41	32	10
Αμιδο-κοκο-προπυλοδιμεθυλυδροξυσουλφοβεταΐνη (επαμφοτερίζον)	60	23	11

(*) Προστέθηκε SiO_2 για να εξουδετερώσει την τοξικότητα.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι, γενικά, η μεταβλητότητα ήταν υψηλότερη για τις επιφανειοδραστικές ουσίες με τη λιγότερο ικανοποιητική βιοαποικοδόμηση. Η μεταβλητότητα εντός της δοκιμής ήταν μικρότερη από 15 % σε πάνω από το 90 % των περιπτώσεων, ενώ η υψηλότερη ανήλθε σε 30-40 %.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Οι περισσότερες επιφανειοδραστικές ουσίες δεν είναι ενιαία μόρια, αλλά μείγματα ισομερών, ομολόγων κ.λπ., τα οποία αποικοδομούνται μετά από διάφορες χαρακτηριστικές λανθάνουσες περιόδους και σε διαφορετικές ταχύτητες κινητικής, με αποτέλεσμα «θολές», αμβλείες καμπύλες, ούτως ώστε η τιμή επιτυχίας του 60 % να μην μπορεί να επιτευχθεί εντός του «10ημέρου χρονικού διαστήματος», παρόλο που κάθε επιμέρους μόριο θα έφθανε σε επίπεδα > 60 % εντός 10 ημερών εάν υποβαλλόταν μεμονωμένα σε δοκιμή. Τούτο μπορεί να παρατηρηθεί και με άλλα σύνθετα μείγματα.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Εξοπλισμός

15. Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός, καθώς και:

α) γυάλινες φιάλες ορού, σφραγισμένες με πώματα από ελαστικό βουτυλίου και επιπώματα από αλουμίνιο. Το προτεινόμενο μέγεθος είναι «125 ml», με συνολικό όγκο περίπου 160 ml (στην περίπτωση αυτή, ο όγκος κάθε φιάλης θα πρέπει να είναι γνωστός ως 160 ± 1 ml). Μπορούν να χρησιμοποιούνται δοχεία μικρότερου μεγέθους, όταν τα αποτελέσματα πληρούν τις προϋποθέσεις των παραγράφων 66 και 67·

β) αναλυτής άνθρακα ή άλλο όργανο (π.χ. αεριοχρωματογράφος) για τη μέτρηση του ανόργανου άνθρακα·

▼**M4**

γ) σύριγγες μεγάλης ακρίβειας για αέρια και υγρά δείγματα·

δ) τάρακτρο σε περιβάλλον ελεγχόμενης θερμοκρασίας·

ε) παροχή αέρα απαλλαγμένου από CO_2 — μπορεί να επιτευχθεί με τη διοχέτευση αέρα μέσω κόκκων καυστικής σόδας ή με τη χρήση μείγματος αερίων 80 % N_2 / 20 % O_2 (προαιρετικά) (βλέπε παράγραφο 28)·

στ) συσκευή διήθησης με μεμβράνη πορώδους 0,20-0,45 μm (προαιρετικά)·

ζ) αναλυτής οργανικού άνθρακα (προαιρετικά).

Αντιδραστήρια

16. Χρησιμοποιούνται αντιδραστήρια αναλυτικής καθαρότητας σε όλη τη δοκιμή.

Νερό

17. Πρέπει να χρησιμοποιείται απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό που περιέχει ≤ 1 mg/l ως ολικό οργανικό άνθρακα. Αυτό αντιπροσωπεύει ≤ 5 % της αρχικής περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα που εισάγεται από τη συνιστώμενη δόση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

Διαλύματα παρακαταθήκης για το μέσο ανόργανων αλάτων

18. Τα διαλύματα παρακαταθήκης και το μέσο ανόργανων αλάτων είναι παρόμοια με τα προβλεπόμενα στο πρότυπο ISO 14593 (16) και στις δοκιμές του κεφαλαίου Γ.4 «Άμεση βιοαποικοδομησιμότητα» (20). Η χρήση υψηλότερης συγκέντρωσης χλωριούχου αμμωνίου (2,0 g/l αντί για 0,5 g/l) θα πρέπει να είναι απαραίτητη μόνο σε πολύ εξαιρετικές περιπτώσεις, π.χ. όταν η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας είναι > 40 mg C/l. Τα διαλύματα παρακαταθήκης θα πρέπει να φυλάσσονται υπό ψύξη και να απορρίπτονται μετά από έξι μήνες, ή και νωρίτερα, εάν υπάρχουν ενδείξεις καθίζησης ή ανάπτυξης μικροβίων. Παρασκευάζονται τα ακόλουθα διαλύματα παρακαταθήκης:

α) Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4) 8,50 g

Όξινο φωσφορικό κάλιο (K_2HPO_4) 21,75 g

Διένυδρο όξινο φωσφορικό νάτριο ($Na_2HPO_4.2H_2O$) 33,40 g

Χλωριούχο αμμώνιο (NH_4Cl) 0,50 g

Διάλυση σε νερό και συμπλήρωση του όγκου μέχρι το 1 λίτρο. Το pH του διαλύματος θα πρέπει να είναι 7,4 (± 0,2). Σε αντίθετη περίπτωση, παρασκευάζεται νέο διάλυμα.

β) Διένυδρο χλωριούχο ασβέστιο ($CaCl_2.2H_2O$) 36,40 g

Διάλυση σε νερό και συμπλήρωση του όγκου μέχρι το 1 λίτρο.

γ) Επταένυδρο θειικό μαγνήσιο ($MgSO_4.7H_2O$) 22,50 g

Διάλυση σε νερό και συμπλήρωση του όγκου μέχρι το 1 λίτρο.

δ) Εξαένυδρος χλωριούχος σίδηρος (III) ($FeCl_3.6H_20$) 0,25 g

Διάλυση σε νερό, συμπλήρωση του όγκου μέχρι το 1 λίτρο και προσθήκη μιας σταγόνας πυκνού HCl.

Παρασκευή του ανόργανου μέσου

19. Αναμειγνύονται 10 ml διαλύματος α) με περίπου 800 ml νερού (παράγραφος 17), στη συνέχεια προστίθεται 1 ml των διαλυμάτων β), γ) και δ) και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι το 1 λίτρο με νερό (παράγραφος 17).

Άλλα αντιδραστήρια

20. Πυκνό ορθοφωσφορικό οξύ (H_3PO_4) (> 85 % κατά μάζα προς όγκο).

▼M4

Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου 7M

21. Διαλύονται 280 g υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) σε 1 λίτρο νερού (παράγραφος 17). Προσδιορίζεται η συγκέντρωση του DIC του εν λόγω διαλύματος και η τιμή της λαμβάνεται υπόψη κατά τον υπολογισμό του αποτελέσματος της δοκιμής (βλέπε παραγράφους 55 και 61), ιδίως υπό το πρίσμα του κριτηρίου εγκυρότητας της παραγράφου 66 (β). Παρασκευάζεται νέο διάλυμα σε περίπτωση που η συγκέντρωση του DIC είναι πολύ υψηλή.

Ελεγχόμενη χημική ουσία

22. Παρασκευάζεται διάλυμα παρακαταθήκης μιας επαρκώς υδατοδιαλυτής ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε νερό (παράγραφος 17) ή στο μέσο δοκιμής (παράγραφος 19), με συγκέντρωση κατά προτίμηση 100πλάσια της τελικής συγκέντρωσης που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή. Ενδέχεται να χρειαστεί ρύθμιση του pH του διαλύματος παρακαταθήκης. Το διάλυμα παρακαταθήκης θα πρέπει να προστίθεται στο ανόργανο μέσο για να προκύψει τελική συγκέντρωση οργανικού άνθρακα μεταξύ 2 και 40 mg C/l, κατά προτίμηση 20 mg C/l. Εάν χρησιμοποιούνται συγκεντρώσεις χαμηλότερες από αυτές, η ακρίβεια που προκύπτει μπορεί να έχει απομειωθεί. Οι διαλυτές και αδιάλυτες υγρές χημικές ουσίες μπορούν να προστίθενται απευθείας στα δοχεία με σύριγγες μεγάλης ακρίβειας. Οι δυσδιάλυτες και αδιάλυτες ελεγχόμενες χημικές ουσίες μπορεί να απαιτούν ειδική κατεργασία (25). Υπάρχουν οι εξής επιλογές:

α) απευθείας προσθήκη ποσοτήτων γνωστού βάρους·

β) διασπορά με υπερήχους πριν από την προσθήκη·

γ) διασπορά με τη βοήθεια γαλακτωματοποιητών, για τους οποίους απαιτείται να έχει διαπιστωθεί αν έχουν ανασταλτική ή διεγερτική επίδραση στη μικροβιακή δραστηριότητα, πριν από την προσθήκη·

δ) προσρόφηση υγρών ελεγχόμενων χημικών ουσιών ή διαλύματος σε κατάλληλο πτητικό διαλύτη σε αδρανές μέσο ή στήριγμα (π.χ. φίλτρο γυάλινων ινών), ακολουθούμενη από εξάτμιση του διαλύτη, εάν έχει χρησιμοποιηθεί, και απευθείας προσθήκη γνωστών ποσοτήτων·

ε) προσθήκη γνωστού όγκου διαλύματος της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε πολύ πτητικό διαλύτη σε κενό δοχείο δοκιμής, ακολουθούμενη από εξάτμιση του διαλύτη.

Τα μέσα ή διαλύτες που χρησιμοποιούνται στα στοιχεία γ), δ) και ε) θα πρέπει να ελέγχονται για διεγερτική ή ανασταλτική επίδραση στη μικροβιακή δραστηριότητα [βλέπε παράγραφο 42 στοιχείο β)].

Χημικές ουσίες αναφοράς

23. Παρασκευάζεται διάλυμα παρακαταθήκης της (διαλυτής) χημικής ουσίας αναφοράς σε νερό (παράγραφος 17), με συγκέντρωση κατά προτίμηση 100πλάσια της τελικής συγκέντρωσης που θα χρησιμοποιηθεί (20 mg C/l) στη δοκιμή.

Έλεγχος αναστολής

24. Συχνά, οι ελεγχόμενες χημικές ουσίες δεν παρουσιάζουν σημαντική αποικοδόμηση υπό τις συνθήκες που χρησιμοποιούνται στις εκτιμήσεις της άμεσης βιοαποικοδόμησης. Μια πιθανή αιτία είναι ότι η ελεγχόμενη ουσία είναι ανασταλτική για το εμβόλιο στη συγκέντρωση στην οποία εφαρμόζεται στη δοκιμή. Στον σχεδιασμό της δοκιμής μπορεί να περιλαμβάνεται έλεγχος αναστολής για τη διευκόλυνση του χαρακτηρισμού (εκ των υστέρων) της αναστολής ως πιθανής αιτίας ή συμβάλλοντος παράγοντα. Εναλλακτικά, ο έλεγχος αναστολής μπορεί να αποκλείσει αυτή την παρεμποδιστική δράση και να δείξει ότι η μηδενική ή η μικρή αποικοδόμηση οφείλεται αποκλειστικά σε μη επιδεκτικότητα μικροβιακής επίθεσης υπό τις συνθήκες της δοκιμής. Προκειμένου να ληφθούν πληροφορίες σχετικά με την τοξικότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας για τους (αερόβιους) μικροοργανισμούς, παρασκευάζεται διάλυμα στο μέσο δοκιμής, που περιέχει την ελεγχόμενη χημική ουσία και τη χημική ουσία αναφοράς (παράγραφος 19) στην ίδια συγκέντρωση, ανά ουσία, με εκείνη που προστέθηκε, αντίστοιχα (βλέπε παραγράφους 22 και 23).

▼**M4**

Εμβόλιο

25. Το εμβόλιο μπορεί να προέρχεται από ποικιλία πηγών: ενεργός ιλύς, εκροές εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων (μη χλωριωμένες), επιφανειακά ύδατα και εδάφη ή από συνδυασμό αυτών (20). Η βιοαποικοδομητική δραστηριότητα της πηγής θα πρέπει να ελέγχεται με τη χρήση χημικής ουσίας αναφοράς. Ανεξάρτητα από την πηγή, οι μικροοργανισμοί που έχουν προηγουμένως εκτεθεί στην ελεγχόμενη χημική ουσία δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται εάν η διαδικασία πρόκειται να εφαρμοστεί ως δοκιμή άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας.

Προειδοποίηση: Η ενεργός ιλύς, τα λύματα και οι εκροές εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων περιέχουν παθογόνους οργανισμούς και απαιτούν προσεκτικό χειρισμό.

26. Βάσει εμπειρίας, ο βέλτιστος όγκος για το εμβόλιο είναι εκείνος που:

— είναι επαρκής για να επιτευχθεί κατάλληλη βιοαποικοδομητική δραστηριότητα,

— αποικοδομεί τη χημική ουσία αναφοράς κατά το ποσοστό που ορίζεται (βλέπε παράγραφο 66),

— αποδίδει 10^2 έως 10^5 μονάδες σχηματισμού αποικιών ανά χιλιοστόλιτρο στο τελικό μείγμα,

— συνήθως αποδίδει συγκέντρωση 4 mg/l αιωρούμενων στερεών στο τελικό μείγμα, όταν χρησιμοποιείται ενεργός ιλύς· μπορούν να χρησιμοποιηθούν συγκεντρώσεις έως 30 mg/l, αλλά ενδέχεται να αυξήσουν σημαντικά την παραγωγή CO_2 των τυφλών (26),

— συνεισφέρει λιγότερο από το 10 % της αρχικής συγκέντρωσης του οργανικού άνθρακα που εισάγεται με τη χημική δοκιμή,

— είναι γενικά 1-10 ml εμβολίου ανά λίτρο διαλύματος δοκιμής.

Ενεργός ιλύς

27. Συλλέγεται πρόσφατη ενεργός ιλύς από τη δεξαμενή αερισμού μιας εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων ή εργαστηριακής μονάδας, που επεξεργάζεται κατά κύριο λόγο οικιακά λύματα. Εάν είναι απαραίτητο, θα πρέπει να απομακρύνονται τα χονδρόκοκκα σωματίδια με κοσκίνισμα (π.χ. με κόσκινο του 1 mm^2) και η ιλύς να διατηρείται σε αερόβια κατάσταση μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

28. Εναλλακτικά, μετά από την αφαίρεση τυχόν χονδρόκοκκων σωματιδίων, προβείτε σε καθίζηση ή φυγοκέντρηση (π.χ. 1 100 × g για 10 λεπτά). Το υπερκείμενο υγρό απορρίπτεται. Η ιλύς μπορεί να εκπλυθεί με το ανόργανο διάλυμα. Σχηματίζεται εναιώρημα της συμπυκνωμένης ιλύος σε ανόργανο μέσο για να επιτευχθεί συγκέντρωση 3-5 g αιωρούμενων στερεών/l. Ακολουθεί αερισμός, όσο απαιτείται.

29. Η ιλύς πρέπει να λαμβάνεται από συμβατική εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων που λειτουργεί αποτελεσματικά. Αν η ιλύς πρέπει να ληφθεί από εγκατάσταση επεξεργασίας υψηλής παραγωγικότητας ή θεωρείται ότι περιέχει αναστολείς, θα πρέπει να εκπλύνεται. Η επαναφερθείσα σε μορφή εναιωρήματος ιλύς αφήνεται να καθιζήσει ή φυγοκεντρείται, μετά από επιμελή ανάμειξη, το υπερκείμενο υγρό απορρίπτεται και σχηματίζεται εναιώρημα της πλυμένης ιλύος σε νέο όγκο ανόργανου μέσου. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρι να κριθεί ότι η ιλύς είναι απαλλαγμένη από περίσσεια υποστρώματος ή αναστολέα.

30. Αφού επιτευχθεί πλήρης επαναιώρηση ή σε περίπτωση ανεπεξέργαστης ιλύος, λαμβάνεται δείγμα ακριβώς πριν από τη χρήση, για τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους των αιωρούμενων στερεών.

31. Μια εναλλακτική λύση είναι η ομοιογενοποίηση της ενεργού ιλύος (3-5 g αιωρούμενων στερεών/l). Η ιλύς υποβάλλεται σε κατεργασία σε αναμείκτη Waring για 2 λεπτά με μεσαία ταχύτητα. Η αναμειγμένη ιλύς αφήνεται να καθιζήσει για χρονικό διάστημα 30 λεπτών ή και περισσότερο εάν αυτό απαιτείται και το υγρό μεταγγίζεται για να χρησιμοποιηθεί σαν εμβόλιο σε αναλογία περίπου 10 ml/l ανόργανου μέσου.

▼M4

32. Περαιτέρω μείωση της έκλυσης CO_2 στο τυφλό μπορεί να επιτευχθεί με ολονύκτιο αερισμό της ιλύος με αέρα απαλλαγμένο από CO_2. Χρησιμοποιούνται 4 mg/l στερεών ενεργού ιλύος, όσο και η συγκέντρωση του εμβολίου στη δοκιμή αυτή (13).

Δευτεροβάθμιες εκροές εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων

33. Εναλλακτικά, το εμβόλιο μπορεί να προέρχεται από τις δευτεροβάθμιες εκροές εγκατάστασης επεξεργασίας ή μονάδας εργαστηριακής κλίμακας για οικιακά, κατά κύριο λόγο, λύματα. Διατηρείται το δείγμα υπό αερόβιες συνθήκες και χρησιμοποιείται την ημέρα της συλλογής ή προεγκλιματίζεται, εάν είναι απαραίτητο. Οι εκροές θα πρέπει να διηθούνται με χονδρό ηθμό για την απομάκρυνση των χονδρών σωματιδίων. Μετράται το pH.

34. Για να μειωθεί η περιεκτικότητα σε IC, ψεκάζεται στο διήθημα αέρας απαλλαγμένος από CO_2 [παράγραφος 15 στοιχείο ε)] για 1 ώρα, ενώ διατηρείται το pH στο 6,5 με ορθοφωσφορικό οξύ (παράγραφος 20). Το pH αποκαθίσταται στην αρχική του τιμή με υδροξείδιο του νατρίου (παράγραφος 21) και, μετά από καθίζηση για περίπου 1 ώρα, λαμβάνεται κατάλληλος όγκος του υπερκείμενου υγρού για εμβολιασμό. Η συγκεκριμένη διαδικασία ψεκασμού μειώνει την περιεκτικότητα του εμβολίου σε IC. Για παράδειγμα, όταν χρησιμοποιήθηκε ως εμβόλιο ο μέγιστος συνιστώμενος όγκος ψεκασμένου διηθήματος εκροής (100 ml) ανά λίτρο, η ποσότητα του IC στα τυφλά δοχεία-μάρτυρες κυμαινόταν μεταξύ 0,4 και 1,3 mg/l (14), τιμές που αντιστοιχούν σε 2-6,5 % της ελεγχόμενης χημικής ουσίας C σε συγκέντρωση 20 mg% C/l και 4-13 % σε συγκέντρωση 10 mg C/l.

Επιφανειακά ύδατα

35. Λαμβάνεται δείγμα από κατάλληλα επιφανειακά ύδατα. Θα πρέπει να διατηρούνται σε αερόβιες συνθήκες και να χρησιμοποιούνται την ημέρα της συλλογής. Το δείγμα θα πρέπει να συμπυκνωθεί, εφόσον είναι αναγκαίο, με διήθηση ή φυγοκέντρηση. Ο όγκος του εμβολίου που θα χρησιμοποιηθεί σε κάθε δοχείο δοκιμής πρέπει να πληροί τα κριτήρια που αναφέρονται στην παράγραφο 26.

Εδάφη

36. Λαμβάνεται δείγμα κατάλληλου εδάφους, το οποίο συλλέγεται από βάθος μέχρι 20 cm κάτω από την επιφάνεια του εδάφους. Τυχόν πέτρες, υπολείμματα φυτών και ασπόνδυλα θα πρέπει να αφαιρούνται από το δείγμα εδάφους, πριν αυτό κοσκινιστεί με κόσκινο των 2 mm (εάν το δείγμα είναι πολύ υγρό για να κοσκινιστεί αμέσως, ξηραίνεται μερικώς στον αέρα για να διευκολυνθεί το κοσκίνισμα). Θα πρέπει να διατηρείται υπό αερόβιες συνθήκες και να χρησιμοποιείται την ημέρα της συλλογής (εάν το δείγμα μεταφέρεται σε χαλαρά κλεισμένη σακούλα από μαύρο πολυαιθυλένιο, μπορεί να αποθηκεύεται στους 2 έως 4 °C μέσα στη σακούλα για χρονικό διάστημα έως ενός μήνα).

Προεγκλιματισμός του εμβολίου

37. Το εμβόλιο μπορεί να προεγκλιματίζεται στις πειραματικές συνθήκες, δεν μπορεί όμως να προσαρμόζεται εκ των προτέρων στην εξεταζόμενη ουσία. Ο προεγκλιματισμός μπορεί να μειώσει την τυφλή έκλυση CO_2. Ο προεγκλιματισμός συνίσταται από τον αερισμό της ενεργού ιλύος μετά από αραίωση σε μέσο δοκιμής σε 30 mg/l με υγρό αέρα απαλλαγμένο από CO_2 για μέχρι 5-7 ημέρες, στη θερμοκρασία της δοκιμής.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΩΝ

Αριθμός φιαλών

38. Ο αριθμός των φιαλών (παράγραφος 15-α) που απαιτούνται για μια δοκιμή θα εξαρτηθεί από τη συχνότητα της ανάλυσης και τη διάρκεια της δοκιμής.

39. Συνιστάται η ανάλυση των τριπλότυπων φιαλών μετά από επαρκή χρονικά διαστήματα, ούτως ώστε να είναι δυνατός ο προσδιορισμός του 10ήμερου χρονικού διαστήματος. Επίσης, αναλύονται τουλάχιστον πέντε φιάλες δοκιμής (παράγραφος 15-α) από τα σύνολα α), β) και γ) (βλέπε παράγραφο 42) στο τέλος της δοκιμής, για να καταστεί δυνατός ο υπολογισμός του 95 % των διαστημάτων εμπιστοσύνης για τη μέση τιμή της ποσοστιαίας βιοαποικοδόμησης.

▼M4

Εμβολιασμένο μέσο

40. Το εμβόλιο χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 4 mg/l ξηρών στερεών ενεργού ιλύος. Αμέσως πριν από τη χρήση, παρασκευάζεται επαρκές εμβολιασμένο μέσο με την προσθήκη, για παράδειγμα, 2 ml καταλλήλως επεξεργασμένης ενεργού ιλύος (παράγραφοι 27 έως 32) με συγκέντρωση 2 000 mg/l σε 1 λίτρο μέσου ανόργανων αλάτων (παράγραφος 19). Όταν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν δευτεροβάθμιες εκροές, προστίθενται έως 100 ml εκροής (παράγραφος 33) σε 900 ml μέσου ανόργανων αλάτων (παράγραφος 19) και το σύνολο αραιώνεται μέχρι το 1 λίτρο με το μέσο αυτό.

Ετοιμασία των φιαλών

41. Γνωστά κλάσματα του εμβολιασμένου μέσου διανέμονται σε πολλαπλές φιάλες για να προκύψει αναλογία υπερκείμενου χώρου-υγρού 1:2 (π.χ. προσθήκη 107 ml σε φιάλες χωρητικότητας 160 ml). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλες αναλογίες, θα πρέπει όμως να ληφθεί υπόψη η προειδοποίηση της παραγράφου 11. Κατά τη χρήση οποιουδήποτε τύπου εμβολίου, πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για την επαρκή ανάμειξη του εμβολιασμένου μέσου, ώστε να εξασφαλίζεται η ομοιόμορφη κατανομή του στις φιάλες δοκιμής.

42. Ετοιμάζονται σειρές φιαλών [παράγραφος 15 στοιχείο α)] που περιλαμβάνουν τα εξής:

α) δοχεία δοκιμής (συμβολίζονται με F_T) που περιέχουν την ελεγχόμενη χημική ουσία·

β) τυφλούς μάρτυρες (συμβολίζονται με F_B) που περιέχουν μόνο το μέσο δοκιμής και το εμβόλιο. Πρέπει επίσης να προστίθενται τυχόν χημικές ουσίες, διαλύτες, μέσα ή φίλτρα από ίνες γυαλιού που χρησιμοποιούνται για την εισαγωγή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στα δοχεία δοκιμής·

γ) δοχεία (συμβολίζονται με F_C) για τον έλεγχο της διαδικασίας, τα οποία περιέχουν τη χημική ουσία αναφοράς·

δ) εάν χρειάζεται, δοχεία (συμβολίζονται με F_I) για τον έλεγχο της πιθανής ανασταλτικής επίδρασης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τα οποία περιέχουν τόσο την ελεγχόμενη χημική ουσία, όσο και τη χημική ουσία αναφοράς, στις ίδιες συγκεντρώσεις (παράγραφος 24) όπως στις φιάλες F_T και F_C, αντίστοιχα·

ε) δοχεία (συμβολίζονται με F_S) για τον έλεγχο της πιθανής αβιοτικής αποικοδόμησης, όπως εκείνα του στοιχείου α) με 50 mg/l $HgCl_2$ ή αποστειρωμένα με άλλα μέσα (π.χ. σε αυτόκαυστο).

43. Οι υδατοδιαλυτές ελεγχόμενες χημικές ουσίες και χημικές ουσίες αναφοράς προστίθενται ως υδατικά διαλύματα παρακαταθήκης (παράγραφοι 22, 23 και 24) για να προκύψει συγκέντρωση 10 έως 20 mg C/l.

44. Οι αδιάλυτες ελεγχόμενες χημικές ουσίες και χημικές ουσίες αναφοράς προστίθενται σε φιάλες με διάφορους τρόπους [βλέπε παράγραφο 22 στοιχεία α)-ε)], ανάλογα με τη φύση των ελεγχόμενων χημικών ουσιών, είτε πριν είτε μετά την προσθήκη του εμβολιασμένου μέσου, ανάλογα με τη μέθοδο επεξεργασίας της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Εάν χρησιμοποιείται μία από τις διαδικασίες που αναφέρονται στην παράγραφο 22α-ε, τότε οι κενές φιάλες F_B (παράγραφος 42β) πρέπει να υποβάλλονται σε επεξεργασία με παρόμοιο τρόπο, αλλά εξαιρουμένης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας ή της χημικής ουσίας αναφοράς.

45. Οι πτητικές ελεγχόμενες χημικές ουσίες θα πρέπει να εγχέονται σε σφραγισμένες φιάλες (παράγραφος 47), με τη χρήση μικροσύριγγας. Η δόση υπολογίζεται από τον όγκο που εμβολιάζεται και την πυκνότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

46. Όπου είναι αναγκαίο, θα πρέπει να προστίθεται στα δοχεία νερό, ούτως ώστε να προκύπτει ο ίδιος όγκος υγρού σε κάθε δοχείο. Πρέπει να διασφαλίζεται ότι η αναλογία υπερκείμενου χώρου-υγρού (συνήθως 1:2) και η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας είναι τέτοιες ώστε να είναι διαθέσιμο επαρκές οξυγόνο στον υπερκείμενο χώρο που να επιτρέπει την πλήρη βιοαποικοδόμηση.

▼M4

47. Όλες οι φιάλες στη συνέχεια σφραγίζονται, για παράδειγμα, με διαφράγματα από ελαστικό βουτυλίου και πώματα αλουμινίου. Σε αυτό το στάδιο, θα πρέπει να προστίθενται οι πτητικές ελεγχόμενες χημικές ουσίες (παράγραφος 45). Εάν πρέπει, αφενός, να παρακολουθείται η μείωση στη συγκέντρωση DOC του διαλύματος δοκιμής και, αφετέρου, να εκτελούνται αναλύσεις σε χρόνο μηδέν για την αρχική συγκέντρωση IC [στείροι μάρτυρες, παράγραφος 42 στοιχείο ε)] ή άλλων προσδιοριζόμενων στοιχείων, λαμβάνεται κατάλληλο δείγμα από το δοχείο δοκιμής. Στη συνέχεια, το δοχείο δοκιμής και το περιεχόμενό του απορρίπτονται.

48. Οι σφραγισμένες φιάλες τοποθετούνται σε περιστροφικό τάρακτρο [παράγραφος 15 στοιχείο δ)], με ταχύτητα ανακίνησης που επαρκεί για να διατηρεί το περιεχόμενο της φιάλης καλά αναμιγνυόμενο και σε εναιώρημα (π.χ. 150 έως 200 στροφές ανά λεπτό), και επωάζονται στο σκοτάδι, στους 20 °C ± 1 °C.

Δειγματοληψία

49. Η μέθοδος της δειγματοληψίας εξαρτάται από την περίοδο υστέρησης και την κινητική ταχύτητα βιοαποικοδόμησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Φιάλες χρησιμοποιούνται για ανάλυση την ημέρα της δειγματοληψίας, η οποία πρέπει να λαμβάνει χώρα τουλάχιστον εβδομαδιαία ή και πιο συχνά (π.χ. δύο φορές την εβδομάδα) εάν απαιτείται πλήρης καμπύλη αποικοδόμησης. Λαμβάνεται από το τάρακτρο ο απαιτούμενος αριθμός πολλαπλών φιαλών, οι οποίες αντιπροσωπεύουν τις φιάλες F_T, F_B και F_C και, αν χρησιμοποιούνται, τις F_I και F_S (βλέπε παράγραφο 42). Η κανονική διάρκεια της δοκιμής είναι 28 ημέρες. Εάν η καμπύλη βιοαποικοδόμησης δείχνει ότι έχει επιτευχθεί οριζοντίωση πριν από την 28η ημέρα, η δοκιμή μπορεί να περατωθεί νωρίτερα. Λαμβάνονται για ανάλυση δείγματα από τις πέντε φιάλες που προορίζονται για την 28η ημέρα της δοκιμής και τα αποτελέσματα χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό των ορίων εμπιστοσύνης ή του συντελεστή μεταβλητότητας της ποσοστιαίας βιοαποικοδόμησης. Από τις φιάλες που εξυπηρετούν τους ελέγχους της αναστολής και της αβιοτικής αποικοδόμησης δεν χρειάζεται να λαμβάνονται δείγματα τόσο συχνά όσο από τις άλλες φιάλες: αρκούν η 1η και η 28η ημέρα.

Ανάλυση ανόργανου άνθρακα (IC)

50. Η παραγωγή CO_2 στις φιάλες προσδιορίζεται με μέτρηση της αύξησης της συγκέντρωσης του ανόργανου άνθρακα (IC) κατά τη διάρκεια της επώασης. Διατίθενται δύο συνιστώμενες μέθοδοι για τη μέτρηση της ποσότητας του IC που παράγεται κατά τη δοκιμή και περιγράφονται κατωτέρω. Δεδομένου ότι οι μέθοδοι μπορεί να δώσουν ελαφρώς διαφορετικά αποτελέσματα, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί μόνο μία για όλες τις μετρήσεις μιας δοκιμής.

51. Η μέθοδος α) συνιστάται, εάν το μέσο είναι πιθανό να περιέχει υπολείμματα, για παράδειγμα, γυάλινου διηθητικού χαρτιού και/ή αδιάλυτης ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Η ανάλυση αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας έναν αεριοχρωματογράφο, σε περίπτωση που δεν διατίθεται αναλυτής άνθρακα. Κατά την ανάλυση του αερίου του υπερκείμενου χώρου, είναι σημαντικό οι φιάλες να είναι στη θερμοκρασία ή κοντά στη θερμοκρασία της δοκιμής. Η μέθοδος (β) μπορεί να είναι ευκολότερη για τα εργαστήρια που χρησιμοποιούν αναλυτές άνθρακα για τη μέτρηση του IC. Είναι σημαντικό το διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (παράγραφος 21) που χρησιμοποιείται για τη μετατροπή του CO_2 σε ανθρακικό να είναι είτε προσφάτως παρασκευασμένο είτε η περιεκτικότητά του σε IC να είναι γνωστή, ούτως ώστε αυτό να μπορεί να λαμβάνεται υπόψη κατά τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων της δοκιμής (βλέπε παράγραφο 66-β.)

Μέθοδος α): οξίνιση μέχρι pH < 3

52. Πριν από κάθε παρτίδα αναλύσεων, ο αναλυτής IC βαθμονομείται χρησιμοποιώντας ένα κατάλληλο IC πρότυπο (π.χ. 1 % w/w CO_2 σε N_2). Πυκνό ορθοφωσφορικό οξύ (παράγραφος 20) εγχέεται μέσω του διαφράγματος κάθε φιάλης από την οποία έχει ληφθεί δείγμα για να μειώσει το pH του μέσου σε < 3 (π.χ. προσθήκη 1 ml σε 107 ml μέσου δοκιμής). Οι φιάλες τοποθετούνται και πάλι στο τάρακτρο. Μετά από ανακίνηση επί μία ώρα στη θερμοκρασία δοκιμής, απομακρύνονται οι φιάλες από το τάρακτρο, αφαιρούνται γνωστά κλάσματα αερίου (π.χ. 1 ml) από τον υπερκείμενο χώρο κάθε φιάλης και εγχέονται στον αναλυτή IC. Οι μετρούμενες συγκεντρώσεις IC καταγράφονται ως mg C/l.

▼M4

53. Η αρχή της παρούσας μεθόδου είναι ότι μετά την οξίνιση σε pH<3 και την εξισορρόπηση στους 20 °C, η σταθερά ισορροπίας για την κατανομή του CO_2 μεταξύ των υγρών και αερίων φάσεων στις φιάλες δοκιμής είναι 1,0, όταν μετράται ως συγκέντρωση (13). Αυτό θα πρέπει να αποδεικνύεται για το σύστημα δοκιμής τουλάχιστον μία φορά ως εξής:

Ετοιμάζονται φιάλες που περιέχουν 5 και 10 mg/l ως IC, με τη χρήση διαλύματος άνυδρου ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3) σε απαλλαγμένο από CO_2 νερό, το οποίο παρασκευάζεται με οξίνιση νερού μέχρι pH 6,5 με πυκνό ορθοφωσφορικό οξύ (παράγραφος 20), ολονύκτιο ψεκασμό με απαλλαγμένο από CO_2 αέρα και, τέλος, εξουδετέρωση του pH με αλκάλιο. Εξακριβώνεται ότι η αναλογία όγκων υπερκείμενου χώρου και υγρού είναι η ίδια όπως και στις δοκιμές (π.χ. 1:2). Ακολουθεί οξίνιση και εξισορρόπηση, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 52, και μέτρηση των συγκεντρώσεων IC, τόσο στην υπερκείμενη όσο και στην υγρή φάση. Ελέγχεται αν οι δύο συγκεντρώσεις είναι ίδιες, εντός των ορίων του πειραματικού σφάλματος. Εάν δεν είναι, ο τεχνικός θα πρέπει να επανεξετάσει τις διαδικασίες. Ο έλεγχος αυτός της κατανομής του IC μεταξύ υγρής και αέριας φάσης δεν είναι αναγκαίος κάθε φορά που διεξάγεται η δοκιμή. Τεκμαίρεται ότι διενεργείται κατά τη βαθμονόμηση.

54. Εάν πρόκειται να μετρηθεί η απομάκρυνση DOC (μόνο για υδατοδιαλυτές ελεγχόμενες χημικές ουσίες), τα δείγματα θα πρέπει να λαμβάνονται από την υγρή φάση από ξεχωριστές (μη οξινισμένες) φιάλες, να διηθούνται με μεμβράνη και να εισάγονται στον αναλυτή DOC. Οι φιάλες αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για άλλες αναλύσεις, ανάλογα με τις ανάγκες, με σκοπό τη μέτρηση της πρωτοβάθμιας βιοαποικοδόμησης.

Μέθοδος β): μετατροπή του CO_2 σε ανθρακικό άλας

55. Πριν από κάθε παρτίδα αναλύσεων, ο αναλυτής IC βαθμονομείται με κατάλληλο πρότυπο – για παράδειγμα, διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου ($NaHCO_3$) σε νερό απαλλαγμένο από CO_2 (βλέπε παράγραφος 53) με συγκέντρωση 0 έως 20 mg/l ως IC. Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (7M, παράγραφος 21) (π.χ. 1 ml σε 107 ml μέσου) εγχέεται μέσω του διαφράγματος του δείγματος κάθε φιάλης και οι φιάλες ανακινούνται για 1 ώρα στη θερμοκρασία δοκιμής. Χρησιμοποιείται το ίδιο διάλυμα NaOH σε όλες τις φιάλες που αποσύρονται μια συγκεκριμένη ημέρα, αλλά όχι απαραίτητα σε όλες τις δειγματοληψίες καθ' όλη τη δοκιμή. Εάν απαιτούνται τυφλές απόλυτες τιμές του IC σε όλες τις δειγματοληψίες, οι προσδιορισμοί του IC στο διάλυμα NaOH θα απαιτούνται κάθε φορά που αυτό χρησιμοποιείται. Οι φιάλες απομακρύνονται από το τάρακτρο και αφήνονται σε ηρεμία. Αφαιρούνται με σύριγγα κατάλληλοι όγκοι (π.χ. 50 έως 1 000 μl) της υγρής φάσης κάθε δοχείου. Τα δείγματα εγχέονται στον αναλυτή IC και καταγράφονται οι συγκεντρώσεις IC. Θα πρέπει να εξασφαλίζεται ότι ο χρησιμοποιούμενος αναλυτής είναι κατάλληλα εξοπλισμένος για να ανταποκριθεί στα αλκαλικά δείγματα που παράγονται στην παρούσα μέθοδο.

56. Η αρχή της παρούσας μεθόδου είναι ότι, μετά από την προσθήκη του αλκάλεος και την ανακίνηση, η συγκέντρωση του IC στον υπερκείμενο χώρο είναι αμελητέα. Αυτό θα πρέπει να ελέγχεται για το σύστημα δοκιμής τουλάχιστον μία φορά με τη χρήση προτύπων IC, την προσθήκη αλκαλίου και εξισορρόπηση, και με μέτρηση της συγκέντρωσης του IC τόσο στην υπερκείμενη όσο και στην υγρή φάση (βλέπε παράγραφο 53). Η συγκέντρωση στον υπερκείμενο χώρο θα πρέπει να προσεγγίζει το μηδέν. Ο έλεγχος αυτός για τη σχεδόν πλήρη απορρόφηση του CO_2 δεν χρειάζεται κάθε φορά που διεξάγεται η δοκιμή.

57. Εάν πρόκειται να μετρηθεί η απομάκρυνση DOC (μόνο για υδατοδιαλυτές ελεγχόμενες χημικές ουσίες), τα δείγματα θα πρέπει να λαμβάνονται από την υγρή φάση από ξεχωριστές φιάλες (οι οποίες δεν περιέχουν προστιθέμενο αλκάλιο), να διηθούνται με μεμβράνη και να εισάγονται στον αναλυτή DOC. Οι φιάλες αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για άλλες αναλύσεις, εφόσον είναι αναγκαίο, για τη μέτρηση της πρωταρχικής βιοαποικοδομησιμότητας.

▼M4

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Υπολογισμός των αποτελεσμάτων

58. Εάν επιτυγχάνεται 100 % ανοργανοποίηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε CO_2, ο πλεονάζων ThIC που παράγεται στους τυφλούς μάρτυρες ισούται με τον TOC που προστέθηκε σε κάθε φιάλη δοκιμής κατά την έναρξη της δοκιμής, που είναι:

$$ThIC = TOC.$$

Η συνολική μάζα (mg) του ανόργανου άνθρακα (TIC) εντός κάθε φιάλης είναι:

$$TIC = (\text{mg C στο υγρό} + \text{mg C στον υπερκείμενο χώρο}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \quad \text{Εξίσωση [1]}$$

όπου:

V_L = όγκος του υγρού μέσα στη φιάλη (σε λίτρα),

CL = συγκέντρωση του IC στο υγρό (mg/l ως άνθρακας),

VH = όγκος υπερκείμενης αέριας φάσης (headspace) (σε λίτρα),

CH = συγκέντρωση του IC στην υπερκείμενη αέρια φάση (mg/l ως άνθρακας).

Οι υπολογισμοί του TIC για τις δύο αναλυτικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση του IC στη δοκιμή αυτή περιγράφονται κατωτέρω στις παραγράφους 60 και 61. Η ποσοστιαία βιοαποικοδόμηση (% D) σε κάθε περίπτωση δίνεται από:

$$\%D = \frac{(TIC_t - TIC_b)}{TOC} \times 100 \quad \text{Εξίσωση [2]}$$

όπου:

TICT = mg TIC στη φιάλη δοκιμής στον χρόνο t,

TICb = μέσος TIC σε mg σε τυφλές φιάλες σε χρόνο t,

TOC = mg TOC που προστέθηκε αρχικά στο δοχείο δοκιμής.

Η ποσοστιαία βιοαποικοδόμηση σε ποσοστό % D υπολογίζεται για τις φιάλες δοκιμής (F_T), αναφοράς (F_C) και, εάν συμπεριλαμβάνεται, τη φιάλη ελέγχου παρακολούθησης της αναστολής (F_I) από τα αντίστοιχα ποσά του TIC που παράγεται σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας.

59. Εάν έχει επέλθει σημαντική αύξηση της περιεκτικότητας του TIC στους στείρους μάρτυρες (F_S) κατά τη διάρκεια της περιόδου δοκιμής, τότε μπορεί να συναχθεί ότι έχει πραγματοποιηθεί η αβιοτική αποικοδόμηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και αυτό πρέπει να ληφθεί υπόψη στον υπολογισμό του D στην εξίσωση [2].

Οξίνιση σε pH < 3

60. Δεδομένου ότι η οξίνιση σε pH < 3 και η εξισορρόπηση έχουν ως αποτέλεσμα την εξισορρόπηση της συγκέντρωσης TIC στις υγρές και αέριες φάσεις, θα πρέπει να μετράται μόνον η συγκέντρωση του IC στην αέρια φάση. Επομένως, από την Εξίσωση [1] $TIC = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, όπου V_B = όγκος της φιάλης ορού.

Μετατροπή του CO_2 σε ανθρακικό άλας

61. Στη μέθοδο αυτή οι υπολογισμοί πραγματοποιούνται όπως στην Εξίσωση [1], αλλά η αμελητέα ποσότητα του IC στην αέρια φάση αγνοείται, δηλαδή $V_H \times C_H = 0$, και $TIC = V_L \times C_L$.

▼M4

Έκφραση των αποτελεσμάτων

62. Η καμπύλη βιοαποικοδόμησης λαμβάνεται με γραφική παράσταση του ποσοστού βιοαποικοδόμησης, D, σε συνάρτηση με τον χρόνο επώασης και, εάν είναι δυνατόν, υποδεικνύονται η λανθάνουσα φάση, η φάση βιοαποικοδόμησης, το 10ήμερο χρονικό διάστημα και η φάση οριζοντίωσης, δηλαδή η φάση κατά την οποία επιτεύχθηκε η μέγιστη αποικοδόμηση και η σταθεροποιήθηκε η καμπύλη βιοαποικοδόμησης. Εάν λαμβάνονται συγκρίσιμα αποτελέσματα για δοχεία παράλληλης δοκιμής F_T (διαφορά < 20 %), χαράσσεται μια μέση καμπύλη (βλέπε προσάρτημα 2, σχήμα1). Εάν όχι, χαράσσονται καμπύλες για κάθε δοχείο. Προσδιορίζεται η μέση τιμή της ποσοστιαίας βιοαποικοδόμησης στη φάση οριζοντίωσης ή εκτιμάται η υψηλότερη τιμή (π.χ. όταν η καμπύλη μειώνεται στη φάση οριζοντίωσης), αλλά είναι σημαντικό να εκτιμηθεί ότι στην τελευταία αυτή περίπτωση η τιμή δεν αποτελεί έκτοπη τιμή. Στην έκθεση δοκιμής, αυτό το μέγιστο επίπεδο βιοαποικοδόμησης αναφέρεται ως ο «βαθμός βιοαποικοδόμησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας». Εάν ο αριθμός των δοχείων δοκιμής ήταν ανεπαρκής για να υποδηλώσει φάση οριζοντίωσης, χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό μέσης τιμής τα μετρούμενα δεδομένα της τελευταίας ημέρας της δοκιμής. Η τελευταία αυτή τιμή, ο μέσος όρος των πέντε επαναλήψεων, χρησιμεύει για να δείξει την ακρίβεια με την οποία προσδιορίσθηκε η ποσοστιαία βιοαποικοδόμηση. Αναφέρεται επίσης η τιμή που λαμβάνεται στο τέλος του 10ήμερου χρονικού διαστήματος.

63. Κατά τον ίδιο τρόπο, χαράσσεται καμπύλη για τη χημική ουσία αναφοράς, F_C, και, εάν συμπεριλαμβάνεται, για τον έλεγχο της αβιοτικής απομάκρυνσης, F_S, και τον μάρτυρα αναστολής, F_I.

64. Καταγράφονται οι ποσότητες του TIC που υπάρχει στους τυφλούς μάρτυρες (F_B), όπως και οι αντίστοιχες των φιαλών F_S (αβιοτικός έλεγχος), εάν τα δοχεία αυτά είχαν συμπεριληφθεί στη δοκιμή.

65. Υπολογίζεται η D για τα δοχεία F_I, με βάση τη θεωρητική απόδοση IC που αναμένεται μόνο από το συστατικό αναφοράς του μείγματος. Εάν, κατά την 28η ημέρα, $[(D_{FC}\ (^1) - D_{FI}\ (^2))/D_{FC}] \times 100 > 25$ %, μπορεί να υποτεθεί ότι η ελεγχόμενη χημική ουσία ανέστειλε τη δραστηριότητα του εμβολίου, το οποίο μπορεί να εξηγεί τις χαμηλές τιμές του D_{FT} που λαμβάνονται υπό τις συνθήκες της δοκιμής. Στην περίπτωση αυτή η δοκιμή θα μπορούσε να επαναληφθεί με χαμηλότερη συγκέντρωση δοκιμής και κατά προτίμηση με μείωση του DIC στο εμβόλιο και του TIC που σχηματίζεται στους τυφλούς μάρτυρες, δεδομένου ότι διαφορετικά η χαμηλότερη συγκέντρωση θα υποβαθμίσει την ακρίβεια της μεθόδου. Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί άλλο εμβόλιο. Εάν, σε φιάλη F_S (αβιοτική) παρατηρείται σημαντική αύξηση (> 10 %) της ποσότητας του TIC, μπορεί να έχουν υπάρξει διεργασίες αβιοτικής αποικοδόμησης.

Εγκυρότητα των αποτελεσμάτων

▼M7

66. Μια δοκιμή θεωρείται έγκυρη εφόσον:

α) η μέση ποσοστιαία αποικοδόμηση στα δοχεία F_C που περιέχουν τη χημική ουσία αναφοράς είναι > 60 % κατά τη 14η ημέρα της επώασης και

β) η μέση ποσότητα του TIC στους τυφλούς μάρτυρες F_B στο τέλος της δοκιμής είναι < 3 mg C/l.

Εάν δεν πληρούνται τα όρια αυτά, πρέπει να επαναληφθεί η δοκιμή με εμβόλιο από άλλη πηγή και/ή να επανεξεταστούν οι διαδικασίες που χρησιμοποιούνται. Για παράδειγμα, εάν η υψηλή παραγωγή IC στους τυφλούς μάρτυρες αποτελεί πρόβλημα, θα πρέπει να ακολουθείται η διαδικασία που προβλέπεται στις παραγράφους 27 έως 32.

(1) Η ποσοστιαία αποικοδόμηση στα δοχεία F_C που περιέχουν την ουσία αναφοράς.
(2) Η ποσοστιαία αποικοδόμηση στα δοχεία F_I.

▼M4

67. Εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία δεν φθάσει το 60 % ThIC και αποδειχθεί ότι δεν είναι ανασταλτική (παράγραφος 65), η δοκιμή μπορεί να επαναληφθεί με αυξημένη συγκέντρωση εμβολίου (έως 30 mg/l ενεργού ιλύος και 100 ml εκροής/l) ή εμβόλια από άλλες πηγές, ιδίως εάν η αποικοδόμηση κυμαινόταν μεταξύ 20 και 60 %.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

68. Η βιοαποικοδόμηση > 60 % ThIC εντός του 10ήμερου χρονικού διαστήματος στην παρούσα δοκιμή αποδεικνύει ότι η ελεγχόμενη χημική ουσία είναι άμεσα βιοαποικοδομήσιμη υπό αερόβιες συνθήκες.

69. Εάν δεν επιτευχθεί η τιμή επιτυχίας του 60 % ThIC, προσδιορίζεται το pH των μέσων σε φιάλες δεν έχουν καταστεί όξινες ή αλκαλικές. Μια τιμή μικρότερη από 6,5 θα μπορούσε να υποδηλώνει νιτροποίηση. Σε μια τέτοια περίπτωση η δοκιμή επαναλαμβάνεται με ρυθμιστικό διάλυμα υψηλότερης συγκέντρωσης.

Έκθεση δοκιμής

70. Καταρτίζεται πίνακας των ποσοστών % D για κάθε φιάλη δοκιμής (F_T), αναφοράς (F_C) και, εάν συμπεριλαμβάνεται, για τη φιάλη μάρτυρα αναστολής (F_I) ανά ημέρα δειγματοληψίας. Εάν προέκυψαν συγκρίσιμα αποτελέσματα για τις πολλαπλές φιάλες, χαράσσεται καμπύλη της μέσης % D συναρτήσει του χρόνου. Καταγράφεται η ποσότητα του TIC στους τυφλούς (F_B) και τους στείρους μάρτυρες (F_S), του DOC και/ή άλλων προσδιοριζόμενων στοιχείων, καθώς και η ποσοστιαία απομάκρυνσή τους.

71. Προσδιορίζεται η μέση τιμή της % D στη φάση οριζοντίωσης ή λαμβάνεται η υψηλότερη τιμή, εάν η καμπύλη βιοαποικοδόμησης δεν παρουσιάζει οριζοντίωση, και αναφέρεται ως ο «βαθμός βιοαποικοδόμησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας». Είναι σημαντικό να εξασφαλίζεται ότι στη δεύτερη περίπτωση, η υψηλότερη τιμή δεν αποτελεί έκτοπη τιμή.

72. Η έκθεση της δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Ελεγχόμενη χημική ουσία:

— κοινή ονομασία, χημική ονομασία, αριθμός CAS, συντακτικός τύπος και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

— καθαρότητα (ξένες προσμείξεις) της ελεγχόμενης ουσίας.

Συνθήκες δοκιμής:

— αναφορά στην παρούσα μέθοδο δοκιμών,

— περιγραφή του χρησιμοποιούμενου συστήματος δοκιμής (π.χ. όγκος του δοχείου, αναλογία υπερκείμενου χώρου προς υγρό, μέθοδος ανάδευσης κ.λπ.),

— εφαρμογή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και της χημικής ουσίας αναφοράς στο σύστημα δοκιμής: η συγκέντρωση δοκιμής που χρησιμοποιείται και η ποσότητα του διοξειδίου του άνθρακα που χορηγείται σε κάθε φιάλη δοκιμής, οποιαδήποτε χρήση διαλυτών,

— οι λεπτομέρειες του χρησιμοποιούμενου εμβολίου, οποιαδήποτε προ-επεξεργασία και προεγκλιματισμός,

— θερμοκρασία επώασης,

— εγκυρότητα της αρχής της ανάλυσης IC,

— κύρια χαρακτηριστικά του αναλυτή IC που χρησιμοποιείται (και οποιεσδήποτε άλλες αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται),

— πλήθος πολλαπλών δοχείων (replicates).

Αποτελέσματα:

— ανεπεξέργαστα δεδομένα και υπολογισμένες τιμές της βιοαποικοδομησιμότητας σε μορφή πίνακα,

▼M4

— γραφική παράσταση του ποσοστού αποικοδόμησης συναρτήσει του χρόνου για τις ελεγχόμενες χημικές ουσίες και τις χημικές ουσίες αναφοράς, της λανθάνουσας φάσης, της φάσης αποικοδόμησης, του 10ήμερου χρονικού διαστήματος και κλίση,

— ποσοστιαία απομάκρυνση στη φάση σταθερής κατάστασης, στο τέλος της δοκιμής, και μετά το 10ήμερο χρονικό διάστημα,

— αιτιολογία οποιασδήποτε απόρριψης των αποτελεσμάτων των δοκιμών,

— οποιαδήποτε άλλα γεγονότα συναφή με τη διαδικασία που ακολουθήθηκε,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) Κεφάλαιο Γ.4 του παρόντος παραρτήματος: Προσδιορισμός «άμεσης» βιοαποικοδομησιμότητας – Δοκιμή έκλυσης CO_2 (Μέθοδος Γ.4-Γ).

(2) Sturm R.N. (1973), Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation, *J. A. Oil Chem. Soc.* 50: 159-167.

(3) Larson R.J. (1979), Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals, *Appl. Env. Microbiol.* 38: 1153-1161.

(4) Larson R.J., Hansmann M.A. και Bookland E.A. (1996), Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, *Chemosphere* 33: 1195-1210.

(5) ISO 9439 (1990, revised 1999), Water Quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium - Carbon dioxide evolution Test (Sturm).

(6) US EPA (1996), Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

(7) US EPA (1996), Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

(8) Gledhill W.E. (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate, *Appl Microbiol.* 30: 922-929.

(9) Weytjens D., Van Ginneken I. και Painter H.A. (1994), The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability, *Chemosphere* 28: 801-812.

(10) Ennis D.M. και Kramer A. (1975), A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides, *J. Food Sci.* 40: 181-185.

(11) Ennis D.M., Kramer A., Jameson C.W., Mazzoccki P.H. και Bailey P.H. (1978), *Appl. Env. Microbiol.* 35: 51-53.

(12) Boatman R.J., Cunningham S.L. και Ziegler D.A. (1986), A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, *Env. Toxicol. Chem.* 5: 233-243.

(13) Struijs J. και Stoltenkamp J. (1990), Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test, *Ecotox. Env. Safety* 19: 204-211.

(14) Birch R.R. και Fletcher R.J. (1991), The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability, *Chemosphere* 23: 507-524.

(15) Birch R.R., Biver C., Campagna R., Gledhill W.E., Pagga U., Steber J., Reust H., και Bontinck W.J. (1989), Screening of chemicals for anaerobic biodegradation, *Chemosphere* 19: 1527-1550.

▼**M4**

(16) ISO 14593 (1999), Water Quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in an aerobic medium-method by analysis of inorganic carbon in sealed vessels (CO_2 headspace test).

(17) Battersby N.S. (1997), The ISO headspace CO_2 biodegradation test, *Chemosphere* 34: 1813-1822.

(18) US EPA (1996), Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.

(19) Battersby N.S., Ciccognani D., Evans M.R., King D., Painter H.A., Peterson D.R. και Starkey M. (1999), An «inherent» biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test, *Chemosphere* 38: 3219-3235.

(20) Κεφάλαιο Γ.4 του παρόντος παραρτήματος: Προσδιορισμός «άμεσης» βιοαποικοδομησιμότητας.

(21) OECD (1988), OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman's report (M. Hashimoto, MITI) and final report (M. Kitano and M. Takatsuki, CITI). Paris.

(22) Κεφάλαιο Γ.11 του παρόντος παραρτήματος: Ενεργός ιλύς — έλεγχος αναστολής της αναπνοής.

(23) Struijs J., Stoltenkamp-Wouterse M.J. και Dekkers A.L.M. (1995), A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests, *Biodegradation* 6: 319-327.

(24) EU (1999), Ring-test of the ISO Headspace CO_2 method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK.

(25) ISO 10634 (1996), Water Quality - Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

▼M4

Προσάρτημα 1

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΟΡΙΣΜΟΙ

10ήμερο χρονικό διάστημα: Οι δέκα ημέρες αμέσως μετά την επίτευξη αποικοδόμησης 10 %.

DIC: Διαλυμένος ανόργανος άνθρακας

DOC: Διαλυμένος οργανικός άνθρακας είναι ο οργανικός άνθρακας που υπάρχει σε διάλυμα ή διέρχεται από φίλτρο των 0,45 μικρομέτρων ή παραμένει στο υπερκείμενο υγρό μετά από φυγοκέντρηση σε περίπου 4 000 g (περίπου 40 000 m sec^{-2}) επί 15 λεπτά.

IC: Ανόργανος άνθρακας

$ThCO_2$: Θεωρητικό διοξείδιο του άνθρακα (mg) είναι η ποσότητα διοξειδίου του άνθρακα που υπολογίζεται ότι παράγεται από τη γνωστή ή μετρούμενη περιεκτικότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε άνθρακα, όταν ανοργανοποιείται πλήρως. Εκφράζεται επίσης σε mg διοξειδίου του άνθρακα που εκλύεται ανά mg ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

ThIC: Θεωρητικός ανόργανος άνθρακας

TIC: Ολικός ανόργανος άνθρακας

Ανοργανοποίηση: Ανοργανοποίηση είναι η πλήρης αποικοδόμηση μιας οργανικής χημικής ουσίας προς CO_2 και H_2O υπό αερόβιες συνθήκες και προς CH_4, CO_2 και H_2O υπό αναερόβιες συνθήκες.

Εγγενής βιοαποικοδομησιμότητα: Κατάταξη χημικών ουσιών για τις οποίες υπάρχουν ακλόνητες αποδείξεις βιοαποικοδόμησης (πρωτοβάθμιας ή τελικής) σε οποιαδήποτε δοκιμή βιοαποικοδομησιμότητας.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Ευκόλως βιοαποικοδομήσιμη: Αυθαίρετη κατάταξη χημικών ουσιών που έχουν επιτύχει σε συγκεκριμένες δοκιμές διαλογής για τελική βιοαποικοδομησιμότητα. Οι δοκιμές αυτές είναι τόσο αυστηρές ώστε να τεκμαίρεται ότι οι εν λόγω χημικές ουσίες βιοαποικοδομούνται ταχέως και πλήρως σε υδάτινο περιβάλλον υπό αερόβιες συνθήκες

Λανθάνουσα φάση: Ο χρόνος που μεσολαβεί από την έναρξη μιας δοκιμής έως ότου εγκλιματιστούν και/ή προσαρμοστούν οι διασπώντες μικροοργανισμοί και αυξηθεί ο βαθμός βιοαποικοδόμησης χημικής ουσίας ή οργανικής ύλης σε ανιχνεύσιμο επίπεδο (π.χ. 10 % της μέγιστης θεωρητικής βιοαποικοδόμησης ή μικρότερο ποσοστό, ανάλογα με την ακρίβεια της μεθόδου μέτρησης).

Τελική αερόβια βιοαποικοδόμηση: Ο βαθμός αποικοδόμησης που επιτυγχάνεται όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία καταναλώνεται πλήρως από μικροοργανισμούς, με αποτέλεσμα την παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα, νερού, ανόργανων αλάτων και νέων μικροβιακών κυτταρικών συστατικών (βιομάζα).

Φάση αποικοδόμησης: Ο χρόνος που μεσολαβεί από το τέλος της λανθάνουσας περιόδου έως ότου επιτευχθεί το 90 % του μέγιστου βαθμού αποικοδόμησης.

Φάση οριζοντίωσης: Οριζοντίωση είναι η φάση κατά την οποία έχει επιτευχθεί η μέγιστη αποικοδόμηση και η καμπύλη βιοαποικοδόμησης έχει σταθεροποιηθεί.

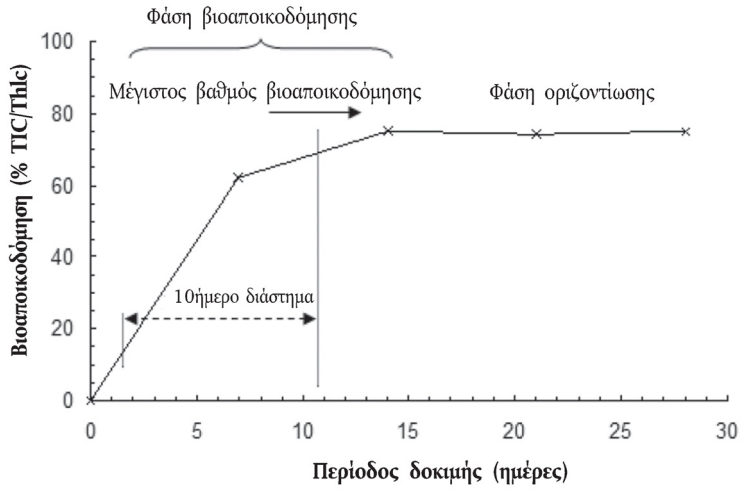
▼**M4**

Προσάρτημα 2

Παράδειγμα καμπύλης βιοαποικοδόμησης

Σχήμα 1

Βιοαποικοδόμηση οκτανόλης-1 στη δοκιμή υπερκείμενης φάσης CO_2



Γλωσσάριο

Βιοαποικοδόμηση

Φάση βιοαποικοδόμησης

Μέγιστος βαθμός βιοαποικοδόμησης

Φάση οριζοντίωσης

10ήμερο διάστημα

Περίοδος δοκιμής (ημέρες)

▼M4

Γ. 30. ΒΙΟΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΣΕ ΧΕΡΣΑΙΟΥΣ ΟΛΙΓΟΧΑΙΤΟΥΣ (OLIGOCHAETA)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών του ΟΟΣΑ (TG) 317 (2010). Μεταξύ των μεθόδων δοκιμών που σχετίζονται με την περιβαλλοντική συμπεριφορά, οι δοκιμές «Βιοσυγκέντρωση: Δοκιμή σε ψάρια με συνεχή ροή νερού» [κεφάλαιο Γ.13 του παρόντος παραρτήματος (49)] και «Βιοσυσσώρευση σε βενθικούς ολιγόχαιτους που διαβιούν σε ιζήματα» (53) δημοσιεύθηκαν το 1996 και το 2008 αντίστοιχα. Η παρέκταση στους χερσαίους οργανισμούς, όπως οι γαιοσκώληκες, των δεδομένων για τη βιοσυσσώρευση στους υδρόβιους οργανισμούς είναι δύσκολη, ακόμη και αδύνατη. Επί του παρόντος χρησιμοποιούνται υπολογιστικά μοντέλα που βασίζονται στη δοκιμή της λιποφιλικότητας μιας χημικής ουσίας, π.χ. (14)(37), για την εκτίμηση της βιοσυσσώρευσης των χημικών ουσιών στο έδαφος, όπως π.χ. το τεχνικό έγγραφο καθοδήγησης της ΕΕ (19). Η ανάγκη για μια μέθοδο δοκιμών ειδικά για ένα διαμέρισμα έχει ήδη αντιμετωπιστεί, π.χ. (55). Μια τέτοια μέθοδος είναι ιδιαίτερα σημαντική για την αξιολόγηση της δευτερογενούς δηλητηρίασης στις χερσαίες τροφικές αλυσίδες (4). Αρκετές εθνικές μέθοδοι δοκιμών εξετάζουν το ζήτημα της βιοσυσσώρευσης σε άλλους οργανισμούς, εκτός από τα ψάρια, π.χ. (2) και (72). Μια μέθοδος για τη μέτρηση της βιοσυσσώρευσης σε γαιοσκώληκες από μολυσμένα εδάφη (Eisenia fetida, Savigny) και λευκούς σκώληκες έχει αναπτυχθεί από την Αμερικανική Εταιρεία Δοκιμών και Υλικών (ASTM) (3). Μια διεθνώς αποδεκτή μέθοδος για τον προσδιορισμό της βιοσυσσώρευσης σε εμβολιασμένο έδαφος θα βελτιώσει την εκτίμηση των κινδύνων στους οποίους εκθέτουν οι χημικές ουσίες τα χερσαία οικοσυστήματα, π.χ. (25)(29).

2. Τα ασπόνδυλα που τρέφονται από το έδαφος εκτίθενται σε χημικές ουσίες του εδάφους. Μεταξύ των ζώων αυτών, οι χερσαίοι ολιγόχαιτοι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη δομή και τη λειτουργία των εδαφών (15)(20). Οι χερσαίοι ολιγόχαιτοι ζουν στο έδαφος και εν μέρει στην επιφάνειά του (ιδίως στον ξηροτάπητα). Είναι συχνά ένα από τα είδη με τη μεγαλύτερη αφθονία από άποψη βιομάζας (54). Με τη βιοανάδευση (bioturbation) του εδάφους και λειτουργώντας ως λεία, τα ζώα αυτά μπορούν να ασκούν ισχυρή επίδραση στη βιοδιαθεσιμότητα των χημικών ουσιών για άλλους οργανισμούς, όπως τα ασπόνδυλα [π.χ. θηρευτικά ακάρεα και σκαθάρια, π.χ. (64)] ή τα θηρευτικά σπονδυλωτά (π.χ. αλεπούδες και γλάροι) (18)(62). Ορισμένα είδη χερσαίων ολιγόχαιτων που χρησιμοποιούνται σήμερα σε οικοτοξικολογικές δοκιμές περιγράφονται στο προσάρτημα 5.

3. Ο πρότυπος οδηγός της ASTM για τη διεξαγωγή εργαστηριακών δοκιμών εδαφικής τοξικότητας ή βιοσυσσώρευσης σε γαιοσκώληκες Eisenia fetida της οικογένειας Lumbricidae και λευκούς σκώληκες Enchytraeus albidus της οικογένειας Enchytraeidae (3), παρέχει πολλά βασικά και χρήσιμα στοιχεία για την εφαρμογή της παρούσας μεθόδου δοκιμών εδαφικής βιοσυσσώρευσης. Άλλα έγγραφα που αναφέρονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών είναι το κεφάλαιο Γ.13 του παρόντος παραρτήματος «Βιοσυγκέντρωση: Δοκιμή σε ψάρια με συνεχή ροή νερού» (49) και η κατευθυντήρια γραμμή TG 315 του ΟΟΣΑ «Βιοσυσσώρευση σε βενθικούς ολιγόχαιτους που διαβιούν σε ιζήματα» (53). Η πρακτική εμπειρία από μελέτες εδαφικής βιοσυσσώρευσης και οι δημοσιεύσεις στη βιβλιογραφία, π.χ. (1)(5)(11)(12)(28)(40)(43)(45)(57)(59)(76)(78)(79), αποτελούν επίσης σημαντικές πηγές πληροφοριών για την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

4. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών εφαρμόζεται ως επί το πλείστον σε σταθερές, ουδέτερες οργανικές χημικές ουσίες, οι οποίες έχουν την τάση να προσροφώνται σε εδάφη. Με την παρούσα μέθοδο είναι δυνατή η διεξαγωγή δοκιμών για βιοσυσσώρευση σταθερών οργανομεταλλικών ενώσεων που συνδέονται με το έδαφος. Επίσης, η μέθοδος εφαρμόζεται σε μέταλλα και άλλα ιχνοστοιχεία.

ΠΡΟΫΠΟΘΕΣΗ

5. Δοκιμές για τη μέτρηση της βιοσυσσώρευσης μιας χημικής ουσίας σε χερσαίους ολιγόχαιτους έχουν διεξαχθεί με βαρέα μέταλλα [βλέπε π.χ. (63)] και έμμονες οργανικές χημικές ουσίες που έχουν τιμές log Kow μεταξύ 3,0 και 6,0, π.χ. (40). Οι δοκιμές αυτές ισχύουν επίσης για:

   — χημικές ουσίες που παρουσιάζουν log K_{ow} άνω του 6,0 (υπερυδρόφοβες χημικές ουσίες),

▼M4

— χημικές ουσίες που ανήκουν στην κατηγορία των οργανικών χημικών ουσιών με γνωστό δυναμικό βιοσυσσώρευσης σε ζωντανούς οργανισμούς, π.χ. επιφανειοδραστικές ή εξαιρετικά προσροφητικές χημικές ουσίες,

— χημικές ουσίες των οποίων τα δομικά χαρακτηριστικά αποτελούν ένδειξη δυναμικού βιοσυσσώρευσης, π.χ. ανάλογες με χημικές ουσίες με γνωστό δυναμικό βιοσυσσώρευσης, και

— μέταλλα.

6. Πριν από την έναρξη της μελέτης θα πρέπει να λαμβάνονται πληροφορίες σχετικά με την ελεγχόμενη χημική ουσία, όπως η κοινή ονομασία, η χημική ονομασία (κατά προτίμηση κατά IUPAC), ο συντακτικός τύπος, ο αριθμός CAS, η καθαρότητα, οι προφυλάξεις ασφαλείας, οι κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης και οι μέθοδοι ανάλυσης. Επιπλέον, πρέπει να είναι γνωστές οι ακόλουθες πληροφορίες:

α) υδατοδιαλυτότητα,

β) συντελεστής κατανομής σε μείγμα οκτανόλης-νερού, K_{ow},

γ) συντελεστής κατανομής σε έδαφος/στα ύδατα, εκφρασμένος ως K_{oc},

δ) τάση ατμών,

ε) αποικοδομησιμότητα (π.χ. στο έδαφος, στα ύδατα),

στ) γνωστοί μεταβολίτες.

7. Μπορούν να χρησιμοποιούνται ραδιοσημασμένες ή μη ραδιοσημασμένες ελεγχόμενες χημικές ουσίες. Ωστόσο, για να διευκολύνεται η ανάλυση, συνιστάται η χρήση ραδιοσημασμένης ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Η απόφαση λαμβάνεται με βάση είτε τα όρια ανίχνευσης είτε την ανάγκη μέτρησης της μητρικής χημικής ουσίας και των μεταβολιτών. Εάν χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένη ελεγχόμενη χημική ουσία και μετρώνται τα συνολικά ραδιενεργά κατάλοιπα, είναι σημαντικό τα ραδιοσημασμένα κατάλοιπα, τόσο στο έδαφος όσο και στους οργανισμούς δοκιμής, να χαρακτηρίζονται ως προς τα ποσοστά της μητρικής ελεγχόμενης χημικής ουσίας και να επισημαίνονται ως μη μητρικά, π.χ. σε δείγματα που λαμβάνονται σε σταθερή κατάσταση ή στο τέλος της φάσης πρόσληψης, για να καθίσταται δυνατός ο υπολογισμός συντελεστή βιοσυσσώρευσης (BAF) για τη μητρική ελεγχόμενη χημική ουσία και τους μεταβολίτες στο έδαφος που ενδιαφέρουν (βλέπε παράγραφο 50). Η μέθοδος που περιγράφεται στο παρόν κεφάλαιο ενδέχεται να πρέπει να τροποποιηθεί, π.χ., ώστε να παρέχει επαρκή βιομάζα, για τη μέτρηση μη ραδιοσημασμένων οργανικών ελεγχόμενων χημικών ουσιών ή μετάλλων. Όταν μετρώνται τα ολικά ραδιενεργά κατάλοιπα (με καταμέτρηση υγρού σπινθηρισμού μετά από εκχύλιση, καύση ή διαλυτοποίηση των ιστών), ο συντελεστής βιοσυσσώρευσης βασίζεται στη μητρική ελεγχόμενη χημική ουσία και στους μεταβολίτες. Ο υπολογισμός του BAF θα πρέπει κατά προτίμηση να βασίζεται στη συγκέντρωση της μητρικής χημικής ουσίας στους οργανισμούς και τα ολικά ραδιενεργά κατάλοιπα. Στη συνέχεια, για λόγους συγκρισιμότητας μεταξύ των αποτελεσμάτων από διαφορετικές δοκιμές βιοσυσσώρευσης, θα πρέπει να υπολογίζεται από τον BAF ο συντελεστής συσσώρευσης σε βιόκοσμο-έδαφος (BSAF), κανονικοποιημένος ως προς το λιπιδικό περιεχόμενο των σκωλήκων και την περιεκτικότητα του εδάφους σε οργανικό άνθρακα (OC).

8. Η τοξικότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας για το είδος που χρησιμοποιείται στη δοκιμή θα πρέπει να είναι γνωστή, π.χ. συγκέντρωση επίδρασης (ECx) ή θανατηφόρος συγκέντρωση (LCx) για το χρονικό διάστημα της φάσης πρόσληψης [π.χ. (19)]. Η επιλεγόμενη συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας θα πρέπει κατά προτίμηση να είναι περίπου το 1 % της οξείας ασυμπτωτικής τιμής LC_{50} και τουλάχιστον δεκαπλάσια του ορίου ανίχνευσής της στο έδαφος με τη χρησιμοποιούμενη αναλυτική μέθοδο. Θα πρέπει να προτιμώνται, εάν υπάρχουν, οι τιμές τοξικότητας, που προέρχονται από μακροχρόνιες μελέτες με υποθανατηφόρα καταληκτικά σημεία (51)(52). Εάν τα στοιχεία αυτά δεν είναι διαθέσιμα, χρήσιμες πληροφορίες μπορούν να προκύψουν από δοκιμή οξείας τοξικότητας [βλέπε π.χ. (23)].

▼M4

9. Θα πρέπει να υπάρχουν κατάλληλη αναλυτική μέθοδος, γνωστής ορθότητας (accuracy), ακρίβειας (precision) και ευαισθησίας, για τον ποσοτικό προσδιορισμό της χημικής ουσίας στα διαλύματα δοκιμής, στο έδαφος και σε βιολογικό υλικό, καθώς και λεπτομερείς πληροφορίες για την παρασκευή και την αποθήκευση του δείγματος, αλλά και δελτία δεδομένων ασφάλειας υλικών. Θα πρέπει επίσης να είναι γνωστά τα αναλυτικά όρια ανίχνευσης του υπό δοκιμή στοιχείου στο έδαφος όσο και στους ιστούς των σκωλήκων. Εάν χρησιμοποιείται σημασμένη με ^{14}C ελεγχόμενη χημική ουσία, θα πρέπει να είναι γνωστή η ειδική ραδιενέργεια (δηλαδή Bq mol^{-1}) και το ποσοστό της ραδιενέργειας που συνδέεται με προσμείξεις. Η ειδική ραδιενέργεια της ελεγχόμενης χημικής ουσίας θα πρέπει να είναι αρκετά υψηλή για να διευκολύνεται η ανάλυση, ενώ οι χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις δοκιμής δεν θα πρέπει να προκαλούν την εκδήλωση τοξικών επιδράσεων.

10. Η δοκιμή μπορεί να διεξαχθεί με τεχνητό έδαφος ή με φυσικά εδάφη. Θα πρέπει να είναι γνωστές πριν από την έναρξη της δοκιμής πληροφορίες σχετικά με τα χαρακτηριστικά του χρησιμοποιούμενου φυσικού εδάφους, όπως η προέλευση ή τα συστατικά του, το pH, η περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, η κατανομή μεγέθους σωματιδίων (ποσοστό άμμου, ιλύος και αργίλου) και η υδατοχωρητικότητα (WHC) (3)(48).

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

11. Οι παράμετροι που χαρακτηρίζουν τη βιοσυσσώρευση μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας είναι, μεταξύ άλλων, ο συντελεστής βιοσυσσώρευσης (BAF), η σταθερά ταχύτητας πρόσληψης (k_s) και η σταθερά ταχύτητας αποβολής (k_e). Οι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

12. Η δοκιμή αποτελείται από δύο φάσεις: τη φάση πρόσληψης (έκθεση) και τη φάση αποβολής (μετά την έκθεση). Κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης, πολλαπλές ομάδες σκωλήκων εκτίθενται σε έδαφος το οποίο έχει εμβολιαστεί με την ελεγχόμενη χημική ουσία. Εκτός από τα ζώα δοκιμής, ομάδες σκωλήκων διατηρούνται ως μάρτυρες υπό πανομοιότυπες συνθήκες, χωρίς την ελεγχόμενη χημική ουσία. Μετράται το ξηρό βάρος και το λιπιδικό περιεχόμενο των οργανισμών δοκιμής. Για τον σκοπό αυτό μπορούν να χρησιμοποιηθούν σκώληκες της ομάδας-μάρτυρα. Μπορούν να ληφθούν αναλυτικές τιμές υποβάθρου (τυφλό πείραμα) με την ανάλυση δειγμάτων από τους σκώληκες-μάρτυρες και το έδαφος-μάρτυρα. Για τη φάση αποβολής οι σκώληκες μεταφέρονται σε έδαφος απαλλαγμένο από την ελεγχόμενη χημική ουσία. Η φάση αποβολής είναι πάντα υποχρεωτική, εκτός εάν η πρόσληψη της ελεγχόμενης χημικής ουσίας κατά τη διάρκεια της φάσης έκθεσης ήταν ασήμαντη. Η φάση αποβολής παρέχει πληροφορίες σχετικά με την ταχύτητα με την οποία η ελεγχόμενη χημική ουσία απεκκρίνεται από τους οργανισμούς δοκιμής [π.χ. (27)]. Εάν κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης δεν επιτευχθεί σταθερή κατάσταση, ο προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων - συντελεστής κινητικής βιοσυσσώρευσης BAFk, σταθερές ταχύτητας πρόσληψης και αποβολής - θα πρέπει κατά προτίμηση να βασίζεται σε ταυτόχρονη προσαρμογή των αποτελεσμάτων των φάσεων πρόσληψης και αποβολής. Η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια των σκωλήκων παρακολουθείται καθ' όλη τη διάρκεια και των δύο φάσεων της δοκιμής.

13. Κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης, εκτελούνται μετρήσεις σε χρόνους δειγματοληψίας μέγιστης διάρκειας 14 ημερών (Enchytraeidae) ή 21 ημερών (γαιοσκώληκες), έως ότου επιτευχθεί σταθερή κατάσταση (11)(12)(67). Σταθερή κατάσταση επικρατεί όταν η γραφική παράσταση της συγκέντρωσης στους σκώληκες συναρτήσει του χρόνου είναι παράλληλη προς τον άξονα του χρόνου και τρεις διαδοχικές αναλύσεις συγκέντρωσης σε δείγματα που ελήφθησαν κατά διαστήματα τουλάχιστον δύο ημερών δεν διαφέρουν μεταξύ τους περισσότερο από ± 20 % με βάση στατιστικές συγκρίσεις (π.χ., ανάλυση μεταβλητότητας, ανάλυση παλινδρόμησης).

14. Η φάση αποβολής συνίσταται στη μεταφορά των οργανισμών δοκιμής σε δοχεία που περιέχουν το ίδιο υπόστρωμα, χωρίς την ελεγχόμενη χημική ουσία. Κατά τη φάση αποβολής, εκτελούνται μετρήσεις σε χρόνους δειγματοληψίας κατά τη διάρκεια 14 ημερών (Enchytraeidae) ή 21 ημερών (γαιοσκώληκες), εκτός εάν προγενέστερος αναλυτικός προσδιορισμός έδειξε μείωση κατά 90 % των υπολειμμάτων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στους σκώληκες. Η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στους σκώληκες

▼M4

στο τέλος της φάσης αποβολής αναφέρεται ως μη αποβληθέντα υπολείμματα. Ο συντελεστής βιοσυσσώρευσης σταθερής κατάστασης (BAFss) υπολογίζεται, κατά προτίμηση, τόσο ως ο λόγος των συγκεντρώσεων στους σκώληκες (Ca) και στο έδαφος (Cs) σε φαινόμενη σταθερή κατάσταση, όσο και ως συντελεστής κινητικής βιοσυσσώρευσης, BAFK, ως ο λόγος της σταθεράς ταχύτητας πρόσληψης από το έδαφος (ks) προς τη σταθερά ταχύτητας αποβολής (ke) (βλέπε ορισμούς στο προσάρτημα 1), με την παραδοχή ότι η κινητική είναι πρώτης τάξης (βλέπε υπολογισμούς στο προσάρτημα 2). Εάν είναι προφανές ότι η κινητική δεν είναι πρώτης τάξης, πρέπει να χρησιμοποιούνται άλλα μοντέλα.

15. Η σταθερά ταχύτητας πρόσληψης, η σταθερά ταχύτητας αποβολής (ή οι σταθερές, όταν υπεισέρχονται άλλα μοντέλα), ο συντελεστής κινητικής βιοσυσσώρευσης (BAFK), και όπου είναι δυνατόν, τα όρια εμπιστοσύνης καθεμίας από τις παραμέτρους αυτές υπολογίζονται με υπολογιστικά μοντέλα εξισώσεων (βλέπε καθοδήγηση στο προσάρτημα 2). Η ποιότητα της προσαρμογής κάθε μοντέλου μπορεί να διαπιστωθεί, π.χ., από τον συντελεστή συσχέτισης ή τον συντελεστή προσδιορισμού (συντελεστές που προσεγγίζουν τη μονάδα δηλώνουν καλή προσαρμογή) ή με δοκιμασία «χι-τετράγωνο». Επίσης, το μέγεθος της τυπικής απόκλισης ή του ορίου εμπιστοσύνης γύρω από τις εκτιμώμενες παραμέτρους μπορεί να είναι ενδεικτικό καλής προσαρμογής του μοντέλου.

16. Για να μειωθεί η μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων των δοκιμών στην περίπτωση ελεγχόμενων χημικών ουσιών με υψηλή λιποφιλία, οι συντελεστές βιοσυσσώρευσης θα πρέπει να εκφράζονται σε σχέση με το λιπιδικό περιεχόμενο και την περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (kg οργανικού άνθρακα του εδάφους (OC) kg^{-1} λιπιδικού περιεχομένου του σκώληκα). Η προσέγγιση αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι για ορισμένες κατηγορίες χημικών ουσιών υπάρχει σαφής σχέση μεταξύ του δυναμικού βιοσυσσώρευσης και της λιποφιλίας, σχέση που έχει τεκμηριωθεί για τα ψάρια (47). Υπάρχει σχέση μεταξύ του λιπιδικού περιεχομένου των ψαριών και της βιοσυσσώρευσης των εν λόγω χημικών ουσιών. Για τους βενθικούς οργανισμούς, έχουν διαπιστωθεί παρόμοιες συσχετίσεις π.χ. (30)(44). Ομοίως, η συσχέτιση αυτή έχει καταδειχθεί για τους χερσαίους ολιγόχαιτους, π.χ. (5)(6)(7)(14). Εάν είναι διαθέσιμος επαρκής ιστός σκωλήκων, το λιπιδικό περιεχόμενο των ζώων δοκιμής μπορεί να προσδιοριστεί στο ίδιο βιολογικό υλικό με αυτό που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιούνται ζώα-μάρτυρες για τη μέτρηση του λιπιδικού περιεχομένου.

ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

17. Για να είναι έγκυρη μια δοκιμή πρέπει να πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια για τους μάρτυρες και τις ομάδες αγωγής:

— Στο τέλος της δοκιμής, η συνολική θνησιμότητα κατά τις φάσεις πρόσληψης και αποβολής δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 10 % (γαιοσκώληκες) ή το 20 % (Enchytraeidae) του συνολικού αριθμού των σκωλήκων που εισήχθησαν στη δοκιμή.

— Για τα είδη *Eisenia fetida* και *Eisenia andrei*, η μέση απώλεια μάζας, μετρούμενη στο τέλος της φάσης πρόσληψης και στο τέλος της φάσης αποβολής, δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 20 % σε σύγκριση με το αρχικό υγρό βάρος (f.w.) κατά την έναρξη κάθε φάσης.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Είδη δοκιμής

18. Για τη δοκιμή βιοσυσσώρευσης συνιστώνται διάφορα είδη χερσαίων ολιγόχαιτων. Τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα είδη, *Eisenia fetida* και *Eisenia andrei* (Lumbricidae), ή *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus crypticus* και *Enchytraeus luxuriosus* (Enchytraeidae) περιγράφονται στο προσάρτημα 5.

▼M4

Εξοπλισμός

19. Πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια ώστε να μη χρησιμοποιούνται, σε οποιοδήποτε τμήμα του εξοπλισμού, υλικά που μπορούν να διαλύσουν ή να προσροφήσουν την ελεγχόμενη χημική ουσία ή να αποπλύνουν άλλες χημικές ουσίες και να έχουν δυσμενή επίδραση στα ζώα δοκιμής. Μπορούν να χρησιμοποιούνται συνήθη ορθογώνια ή κυλινδρικά δοχεία, κατασκευασμένα από χημικώς αδρανές υλικό και με κατάλληλη χωρητικότητα ανάλογα με τον βαθμό φόρτισης, δηλαδή των αριθμό των σκωλήκων δοκιμής. Για τον εξοπλισμό που έρχεται σε επαφή με τα μέσα της δοκιμής μπορεί να χρησιμοποιείται ανοξείδωτος χάλυβας, πλαστικό ή γυαλί. Τα δοχεία δοκιμής πρέπει να καλύπτονται κατάλληλα για την αποτροπή της απόδρασης των σκωλήκων, ενώ ταυτόχρονα θα πρέπει να εξασφαλίζεται επαρκής αερισμός. Για τις χημικές ουσίες με υψηλούς συντελεστές προσρόφησης, όπως τα συνθετικά πυρεθροειδή, μπορεί να απαιτείται η χρήση σιλανιωμένου γυαλιού. Στις περιπτώσεις αυτές ο εξοπλισμός πρέπει να απορρίπτεται μετά τη χρήση (49). Θα πρέπει να αποτρέπεται η διαφυγή των ραδιοσημασμένων στοιχείων της δοκιμής και των πτητικών χημικών ουσιών. Για τη συγκράτηση τυχόν υπολειμμάτων που εξατμίζονται από τα δοχεία δοκιμής θα πρέπει να χρησιμοποιούνται παγίδες (π.χ. γυάλινες φιάλες πλύσης αερίου) που περιέχουν κατάλληλα απορροφητικά υλικά.

Έδαφος

20. Το έδαφος δοκιμής πρέπει να είναι τέτοιας ποιότητας ώστε οι οργανισμοί δοκιμής να μπορούν να επιβιώνουν και, κατά προτίμηση, να αναπαράγονται καθ' όλη τη διάρκεια του εγκλιματισμού και της δοκιμής, χωρίς να παρουσιάζουν ανώμαλη εμφάνιση ή συμπεριφορά. Οι σκώληκες πρέπει να φωλιάζουν στο έδαφος.

21. Συνιστάται να χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για τις δοκιμές το τεχνητό έδαφος που περιγράφεται στο κεφάλαιο Γ.8 του παρόντος παραρτήματος (48). Η προετοιμασία του τεχνητού εδάφους για χρήση στις δοκιμές βιοσυσσώρευσης, περιγράφεται στο προσάρτημα 4, το οποίο περιλαμβάνει και συστάσεις για την αποθήκευσή του. Το αερόξηρο τεχνητό έδαφος μπορεί να φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι τη χρήση.

22. Ωστόσο, φυσικά εδάφη που προέρχονται από μη ρυπασμένες τοποθεσίες μπορούν να χρησιμεύσουν ως έδαφος δοκιμής και/ή καλλιέργειας. Τα φυσικά εδάφη θα πρέπει να χαρακτηρίζονται τουλάχιστον από την προέλευση (τόπος συλλογής), το pH, την περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, την κατανομή μεγέθους σωματιδίων (ποσοστό άμμου, ιλύος και αργίλου), τη μέγιστη υδατοχωρητικότητα (WHCmax) και το ποσοστό υγρασίας (3). Η ανάλυση του εδάφους ή των συστατικών του για παρουσία μικρορύπων πριν από τη χρήση παρέχει χρήσιμες πληροφορίες. Εάν χρησιμοποιείται έδαφος από γεωργική έκταση, δεν θα πρέπει να έχει υποστεί κατεργασία με φυτοπροστατευτικά προϊόντα ή κοπριά ζώων που έχουν υποβληθεί σε αγωγή ως λίπασμα, για τουλάχιστον ένα έτος, και με οργανικά λιπάσματα, για τουλάχιστον έξι μήνες πριν από τη δειγματοληψία (50). Οι διαδικασίες χειρισμού του φυσικού εδάφους πριν από τη χρήση σε οικοτοξικολογικές δοκιμές με ολιγόχαιτους στο εργαστήριο περιγράφονται στη βιβλιογραφική αναφορά (3). Ο χρόνος αποθήκευσης των φυσικών εδαφών στο εργαστήριο πρέπει να είναι ο ελάχιστος δυνατός.

Εφαρμογή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας

23. Η ελεγχόμενη χημική ουσία ενσωματώνεται στο έδαφος. Θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Μια υδατοδιαλυτή ελεγχόμενη χημική ουσία θα πρέπει να διαλύεται πλήρως σε νερό πριν αναμειχθεί με το έδαφος. Η συνιστώμενη διαδικασία εμβολιασμού για δυσδιάλυτες στο νερό ελεγχόμενες χημικές ουσίες περιλαμβάνει την επίστρωση ενός ή περισσοτέρων από τα συστατικά του (τεχνητού) εδάφους με την ελεγχόμενη χημική ουσία. Για παράδειγμα, η χαλαζιακή άμμος ή τμήμα της μπορεί να εμποτιστεί με διάλυμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε κατάλληλο οργανικό διαλύτη, ο οποίος στη συνέχεια εξατμίζεται αργά μέχρι ξηρού. Το επιστρωμένο κλάσμα μπορεί στη συνέχεια να αναμειχθεί με το υγρό έδαφος. Το μεγάλο πλεονέκτημα αυτής της διαδικασίας είναι ότι δεν εισάγεται διαλύτης στο έδαφος. Όταν χρησιμοποιείται φυσικό έδαφος, η ελεγχόμενη χημική ουσία μπορεί να προστεθεί με εμβολιασμό ενός αερόξηρου τμήματος του εδάφους, όπως περιγράφεται ανωτέρω

▼M4

για το τεχνητό έδαφος, ή με ανάδευση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας μέσα στο υγρό έδαφος, με επακόλουθη εξάτμιση, εάν χρησιμοποιείται παράγοντας διαλυτοποίησης. Γενικά, θα πρέπει να αποφεύγεται όσο το δυνατόν περισσότερο η επαφή του υγρού εδάφους με διαλύτες. Θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα ακόλουθα (3):

— Εάν χρησιμοποιείται άλλος διαλύτης εκτός από το νερό, αυτός θα πρέπει να είναι αναμείξιμος με το νερό και/ή να μπορεί να απομακρυνθεί (για παράδειγμα, να εξατμιστεί), αφήνοντας στο έδαφος μόνο την ελεγχόμενη χημική ουσία.

— Εάν χρησιμοποιείται διαλύτης-μάρτυρας, δεν χρειάζεται αρνητικός μάρτυρας. Ο διαλύτης-μάρτυρας θα πρέπει να περιέχει την υψηλότερη από τις συγκεντρώσεις διαλύτη που προστίθενται στο έδαφος και να παρασκευάζεται με διαλύτη από την ίδια παρτίδα με εκείνη που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του διαλύματος παρακαταθήκης. Τα βασικά κριτήρια για την επιλογή κατάλληλου μέσου διαλυτοποίησης πρέπει να είναι η τοξικότητα και η πτητικότητα του διαλύτη, καθώς και η διαλυτότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στον επιλεγμένο διαλύτη.

24. Για χημικές ουσίες που είναι δυσδιάλυτες στο νερό και σε οργανικούς διαλύτες, μπορούν να αναμειγνύονται 2,0-2,5 g λεπτοαλεσμένης χαλαζιακής άμμου ανά δοχείο δοκιμής με την ποσότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, π.χ. με τη χρήση υγδίου με ύπερο, για να ληφθεί η επιθυμητή συγκέντρωση δοκιμής. Αυτό το μείγμα χαλαζιακής άμμου και ελεγχόμενης χημικής ουσίας προστίθεται στο έδαφος, που έχει προηγουμένως υγρανθεί, και αναμειγνύεται πλήρως με κατάλληλη ποσότητα απιονισμένου νερού για να ληφθεί η απαιτούμενη περιεκτικότητα σε υγρασία. Το τελικό μείγμα κατανέμεται στα δοχεία δοκιμής. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για κάθε συγκέντρωση δοκιμής και παρασκευάζεται επίσης ένας κατάλληλος μάρτυρας με 2,0-2,5 g λεπτοαλεσμένης χαλαζιακής άμμου ανά δοχείο δοκιμής.

25. Μετά τον εμβολιασμό θα πρέπει να προσδιορίζεται η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο έδαφος και, πριν από την εισαγωγή των οργανισμών δοκιμής, θα πρέπει να ελέγχεται η ομοιογενής κατανομή της στο έδαφος. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό, καθώς και οι λόγοι για την επιλογή μιας συγκεκριμένης διαδικασίας εμβολιασμού πρέπει να αναφέρονται (24).

26. Στην ιδανική περίπτωση, θα πρέπει να επιτυγχάνεται ισορροπία μεταξύ του εδάφους και του ενδοπορικού νερού πριν από την προσθήκη των οργανισμών. Συνιστάται χρονικό διάστημα τεσσάρων ημερών στους 20 °C. Για πολλές δυσδιάλυτες στο νερό οργανικές χημικές ουσίες, ο χρόνος που απαιτείται για να επιτευχθεί πραγματική ισορροπία μεταξύ των προσροφημένων και των διαλυμένων τμημάτων μπορεί να είναι ημέρες ή μήνες. Ανάλογα με τον σκοπό της μελέτης, για παράδειγμα όταν πρέπει να προσομοιώνονται περιβαλλοντικές συνθήκες, το εμβολιασμένο έδαφος μπορεί να «παλαιώνεται» για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, π.χ. τρεις εβδομάδες στους 20 °C για τα μέταλλα (22).

Καλλιέργεια των οργανισμών δοκιμής

27. Οι σκώληκες θα πρέπει, κατά προτίμηση, να διατηρούνται σε μόνιμη εργαστηριακή καλλιέργεια. Καθοδήγηση σχετικά με τις μεθόδους εργαστηριακής καλλιέργειας των ειδών Eisenia fetida και Eisenia andrei και των ειδών της οικογένειας Enchytraeidae παρέχεται στο προσάρτημα 5 [βλέπε επίσης (48)(51)(52)].

28. Οι σκώληκες που χρησιμοποιούνται στις δοκιμές πρέπει να είναι απαλλαγμένοι από παρατηρήσιμες νόσους, ανωμαλίες και παράσιτα.

ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

29. Οι οργανισμοί δοκιμής εκτίθενται στην ελεγχόμενη χημική ουσία κατά τη φάση πρόσληψης, η οποία θα πρέπει να διαρκεί 14 ημέρες (Enchytraeidae) ή 21 ημέρες (γαιοσκώληκες), εκτός εάν καταδεικνύεται ότι έχει επιτευχθεί σταθερή κατάσταση.

▼M4

30. Για τη φάση αποβολής οι σκώληκες μεταφέρονται σε έδαφος που δεν περιέχει την ελεγχόμενη χημική ουσία. Το πρώτο δείγμα πρέπει να λαμβάνεται εντός 4-24 ωρών από την έναρξη της φάσης αποβολής. Παραδείγματα προγραμμάτων δειγματοληψίας για μια 21ήμερη φάση πρόσληψης και μια 21ήμερη φάση αποβολής παρατίθενται στο προσάρτημα 3.

Οργανισμοί δοκιμής

31. Για πολλά είδη χερσαίων λευκών σκωλήκων (Enchytraeidae) το βάρος σώματος είναι πολύ μικρό (π.χ. 5-10 mg υγρού βάρους ανά άτομο για το είδος Enchytraeus albidus και λιγότερο για τα είδη *Enchytraeus crypticus* και *Enchytraeus luxuriosus*). Προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις βάρους και η χημική ανάλυση, μπορεί να είναι απαραίτητη η συνένωση των σκωλήκων των πολλαπλών δοχείων (δηλαδή όλοι οι σκώληκες ενός από τα πολλαπλά δοχεία θα χρησιμοποιηθούν για τη λήψη ενός αναλυτικού αποτελέσματος ιστών). Σε καθένα από τα πολλαπλά δοχεία προστίθενται 20 άτομα Enchytraeus, ενώ πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τρία δοχεία πολλαπλού προσδιορισμού. Εάν το αναλυτικό όριο ανίχνευσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας είναι υψηλό, ενδέχεται να απαιτούνται περισσότεροι σκώληκες. Για τα είδη δοκιμής με μεγαλύτερο βάρος σώματος (*Eisenia fetida* και *Eisenia andrei*), μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλαπλά δοχεία τα οποία περιέχουν ένα άτομο.

32. Οι γαιοσκώληκες που χρησιμοποιούνται σε μια δοκιμή θα πρέπει να έχουν παρόμοιο βάρος (π.χ. τα *Eisenia fetida* και *Eisenia andrei* θα πρέπει να έχουν βάρος 250-600 mg κατ' άτομο). Τα Enchytraeus (π.χ. *Enchytraeus albidu*) θα πρέπει να έχουν μήκος περίπου 1 cm. Όλοι οι σκώληκες που χρησιμοποιούνται σε μια συγκεκριμένη δοκιμή θα πρέπει να προέρχονται από την ίδια πηγή και να είναι ενήλικα ζώα με δακτυλιοειδή τμήματα (βλέπε προσάρτημα 5). Δεδομένου ότι το βάρος και η ηλικία του ζώου μπορεί να έχουν επίδραση στις τιμές BAF (π.χ. λόγω διαφορετικού λιπιδικού περιεχομένου και/ή της παρουσίας αυγών), οι παράμετροι αυτές θα πρέπει να καταγράφονται με ακρίβεια και να λαμβάνονται υπόψη κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Επιπλέον, είναι δυνατόν να αποτίθενται κουκούλια κατά τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης, πράγμα που επηρεάζει επίσης τις τιμές BAF. Συνιστάται να ζυγίζεται, πριν από τη δοκιμή, ένα επιμέρους δείγμα των σκωλήκων δοκιμής για την εκτίμηση του μέσου υγρού και ξηρού βάρους.

33. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται υψηλή αναλογία εδάφους/σκωλήκων προκειμένου να ελαχιστοποιείται η μείωση της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο έδαφος κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης. Για τα είδη *Eisenia fetida* και *Eisenia andrei* συνιστάται ελάχιστη ποσότητα 50 g ξηρού βάρους (d.w.) εδάφους ανά σκώληκα και, για τα Enchytraeus, τουλάχιστον 10-20 g ξηρού βάρους εδάφους ανά δοχείο δοκιμής. Τα δοχεία θα πρέπει να περιέχουν ένα στρώμα εδάφους 2-3 cm (Enchytraeidae) ή 4-5 cm (γαιοσκώληκες).

34. Οι σκώληκες που χρησιμοποιούνται σε μια δοκιμή απομακρύνονται από την καλλιέργεια (π.χ. τα Enchytraeus με λαβίδες). Τα ενήλικα ζώα μεταφέρονται σε μη κατεργασμένο έδαφος δοκιμής για εγκλιματισμό και σιτίζονται (βλέπε παράγραφο 36). Εάν οι συνθήκες δοκιμής διαφέρουν από τις συνθήκες καλλιέργειας, μια φάση εγκλιματισμού διάρκειας 24-72 ωρών θα πρέπει να είναι επαρκής προκειμένου να προσαρμοστούν οι σκώληκες στις συνθήκες δοκιμής. Μετά τον εγκλιματισμό, οι γαιοσκώληκες εκπλύνονται με μεταφορά σε γυάλινα τριβλία (π.χ. τριβλία Petri) που περιέχουν καθαρό νερό και, στη συνέχεια, ζυγίζονται πριν προστεθούν στο έδαφος δοκιμής. Πριν από τη ζύγιση, θα πρέπει να απομακρύνεται η περίσσεια νερού από τους σκώληκες, με ελαφρά επαφή με το άκρο του τριβλίου ή στέγνωμα με τη βοήθεια ελαφρώς βρεγμένου απορροφητικού χαρτιού.

35. Η συμπεριφορά που επιδεικνύουν οι οργανισμοί δοκιμής όσον αφορά το φώλιασμα θα πρέπει να παρατηρείται και να καταγράφεται. Σε δοκιμές με γαιοσκώληκες τα ζώα (μάρτυρες και ομάδες αγωγής) συνήθως φωλιάζουν στο έδαφος εντός μερικών ωρών. Αυτό θα πρέπει να ελέγχεται το αργότερο 24 ώρες μετά την προσθήκη των σκωλήκων στα δοχεία δοκιμής. Εάν οι γαιοσκώληκες δεν φωλιάσουν στο έδαφος (π.χ. ποσοστό άνω του 10 % αφού παρέλθει περισσότερο από το ήμισυ της φάσης πρόσληψης), αυτό δηλώνει

▼M4

ότι είτε οι συνθήκες δοκιμής δεν είναι κατάλληλες είτε οι οργανισμοί δοκιμής δεν είναι υγιείς. Σε μια τέτοια περίπτωση η δοκιμή θα πρέπει να διακοπεί και να επαναληφθεί. Τα Enchytraeus ζουν κυρίως στους διάμεσους πόρους του εδάφους και συχνά η περιδερμίδα τους μπορεί να έρχεται μόνο εν μέρει σε επαφή με το περιβάλλον υπόστρωμα. Η έκθεση των Enchytraeus που φωλιάζουν και όσων δεν φωλιάζουν υποτίθεται ότι είναι ισοδύναμη και η απουσία φωλιάσματος δεν συνεπάγεται κατ' ανάγκη την επανάληψη της δοκιμής.

Διατροφή

36. Θα πρέπει να προβλέπεται χορήγηση τροφής στις περιπτώσεις που χρησιμοποιείται έδαφος με χαμηλή περιεκτικότητα σε ολικό οργανικό άνθρακα. Όταν χρησιμοποιείται τεχνητό έδαφος, συνιστάται εβδομαδιαία χορήγηση τροφής (δηλαδή οι σκώληκες θα πρέπει να τρέφονται μία φορά ανά εβδομάδα), αποτελούμενης από 7 mg αποξηραμένης κοπριάς ανά g ξηρού βάρους εδάφους, για τους γαιοσκώληκες, και από 2-2,5 mg νιφάδων βρώμης ανά g ξηρού βάρους εδάφους για τα Enchytraeus (11). Το πρώτο σιτηρέσιο θα πρέπει να αναμειγνύεται με το έδαφος αμέσως πριν προστεθούν οι οργανισμοί δοκιμής. Κατά προτίμηση, πρέπει να χρησιμοποιείται το ίδιο είδος τροφής όπως στις καλλιέργειες (βλέπε προσάρτημα 5).

Φως και θερμοκρασία

37. Οι δοκιμές πρέπει να διεξάγονται υπό ελεγχόμενο κύκλο φωτός/σκοταδιού 16/8 ωρών, κατά προτίμηση με φωτεινή ισχύ 400 έως 800 lx στην περιοχή των δοχείων δοκιμής (3). Η θερμοκρασία δοκιμής θα πρέπει να είναι 20 ± 2 °C καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής.

Συγκεντρώσεις δοκιμής

38. Χρησιμοποιείται μία και μόνο συγκέντρωση. Οι περιπτώσεις στις οποίες απαιτούνται μία ή περισσότερες πρόσθετες συγκεντρώσεις θα πρέπει να αιτιολογούνται. Εάν η τοξικότητα (ECx) της ελεγχόμενης χημικής ουσίας προσεγγίζει το αναλυτικό όριο ανίχνευσης, συνιστάται η χρήση ραδιοσημασμένης ελεγχόμενης χημικής ουσίας με υψηλή ειδική ραδιενέργεια. Για τα μέταλλα, η συγκέντρωση θα πρέπει να υπερβαίνει το επίπεδο υποβάθρου στους ιστούς και στο έδαφος.

Πολλαπλότητα

39. Για τις κινητικές μετρήσεις (φάση πρόσληψης και αποβολής), ο ελάχιστος αριθμός δοχείων που υποβάλλονται σε αγωγή πρέπει να είναι τρία ανά σημείο δειγματοληψίας. Ο συνολικός αριθμός των πολλαπλών δοχείων θα πρέπει να είναι επαρκής για να καλύπτει όλους τους χρόνους δειγματοληψίας κατά τις φάσεις πρόσληψης και αποβολής.

40. Για τις βιολογικές παρατηρήσεις και μετρήσεις (π.χ. αναλογία ξηρού προς υγρό βάρος, λιπιδικό περιεχόμενο) και για την ανάλυση των συγκεντρώσεων υποβάθρου στους σκώληκες και το έδαφος, θα πρέπει να προβλέπονται τουλάχιστον 12 δοχεία αρνητικού μάρτυρα (δειγματοληψία από τέσσερα από τα δοχεία αυτά κατά την έναρξη της δοκιμής, από τέσσερα στο τέλος της φάσης πρόσληψης και από τέσσερα στο τέλος της φάσης αποβολής), εάν δεν χρησιμοποιείται άλλος διαλύτης πλην του νερού. Εάν χρησιμοποιείται μέσο διαλυτοποίησης για την εφαρμογή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, θα πρέπει, επιπλέον των πολλαπλών δοχείων που υποβάλλονται σε αγωγή, να εκτελούνται μετρήσεις σε μάρτυρα του διαλύτη (θα πρέπει να λαμβάνονται δείγματα από τέσσερα δοχεία πολλαπλού προσδιορισμού κατά την έναρξη της δοκιμής, από τέσσερα στο τέλος της φάσης πρόσληψης και από τέσσερα κατά το τέλος της φάσης αποβολής), που περιέχει όλα τα συστατικά εκτός από το υπό δοκιμή στοιχείο. Στην περίπτωση αυτή, είναι επίσης δυνατόν να προβλέπονται τέσσερα επιπρόσθετα δοχεία αρνητικού μάρτυρα (χωρίς διαλύτη) για προαιρετική δειγματοληψία στο τέλος της φάσης πρόσληψης. Τα εν λόγω πολλαπλά δοχεία μπορούν να συγκρίνονται από βιολογικής πλευράς με τον μάρτυρα του διαλύτη ώστε να συγκεντρώνονται πληροφορίες σχετικά με την ενδεχόμενη επίδραση του διαλύτη στους οργανισμούς δοκιμής. Συνιστάται η ετοιμασία επαρκούς αριθμού πρόσθετων εφεδρικών πολλαπλών δοχείων (π.χ. οκτώ) για αγωγή και ως μαρτύρων.

▼M4

Συχνότητα μετρήσεων της ποιότητας του εδάφους

41. Πρέπει να μετρώνται το pH και η υγρασία του εδάφους, καθώς και η θερμοκρασία (συνεχώς) της αίθουσας δοκιμής στην αρχή και στο τέλος των φάσεων πρόσληψης και αποβολής Μία φορά την εβδομάδα θα πρέπει να ελέγχεται η υγρασία του εδάφους με ζύγιση των δοχείων δοκιμής και σύγκριση των τρεχόντων βαρών με τα αρχικά βάρη στην αρχή της δοκιμής. Οι απώλειες νερού θα πρέπει να αναπληρώνονται με την προσθήκη απιονισμένου νερού.

Δειγματοληψία και ανάλυση σκωλήκων και εδάφους

42. Παράδειγμα χρονοδιαγράμματος για τις φάσεις πρόσληψης και αποβολής σε δοκιμές βιοσυσσώρευσης με γαιοσκώληκες και Enchytraeus παρατίθεται στο προσάρτημα 3.

43. Από τα δοχεία δοκιμής λαμβάνονται δείγματα του εδάφους για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, πριν από την εισαγωγή των σκωλήκων, καθώς και κατά τη διάρκεια των φάσεων πρόσληψης και αποβολής. Κατά τη δοκιμή προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στους σκώληκες και στο έδαφος. Γενικά, μετρώνται οι συνολικές συγκεντρώσεις στο έδαφος. Εναλλακτικά, μπορούν να μετρώνται οι συγκεντρώσεις στο ενδοπορικό νερό. Σε μια τέτοια περίπτωση, η αιτιολόγηση και οι κατάλληλες μέθοδοι θα πρέπει να εξασφαλίζονται πριν από την έναρξη της μελέτης και να συμπεριλαμβάνονται στην έκθεση.

44. Από τους σκώληκες και το έδαφος λαμβάνονται δείγματα τουλάχιστον έξι φορές κατά τη διάρκεια των φάσεων πρόσληψης και αποβολής. Εάν έχει καταδειχθεί η σταθερότητα μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας, μπορεί να μειωθεί ο αριθμός των αναλύσεων του εδάφους. Συνιστάται η ανάλυση τουλάχιστον τριών δοχείων πολλαπλού προσδιορισμού στην αρχή και στο τέλος της φάσης πρόσληψης. Εάν η συγκέντρωση που μετράται στο έδαφος στο τέλος της φάσης πρόσληψης αποκλίνει από την αρχική συγκέντρωση κατά περισσότερο από 30 %, θα πρέπει να αναλύονται και τα δείγματα εδάφους που έχουν ληφθεί σε άλλες ημερομηνίες.

45. Σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας αφαιρούνται οι σκώληκες του συγκεκριμένου δοχείου πολλαπλού προσδιορισμού από το έδαφος (π.χ. αφού απλωθεί το έδαφος του δοχείου σε έναν ρηχό δίσκο και συλλεγούν οι σκώληκες με τη βοήθεια μαλακών λαβίδων) και εκπλύνονται γρήγορα με νερό σε ρηχό γυάλινο ή χαλύβδινο δίσκο. Απομακρύνεται η περίσσεια νερού (βλέπε παράγραφο 34). Οι σκώληκες μεταφέρονται με προσοχή σε προζυγισμένο δοχείο και ζυγίζονται αμέσως, συμπεριλαμβανομένου του περιεχομένου του εντέρου.

46. Στη συνέχεια, οι γαιοσκώληκες (*Eisenia* sp.) θα πρέπει να αφήνονται να κενώσουν το έντερό τους στη διάρκεια της νύκτας, π.χ. πάνω σε υγρό διηθητικό χαρτί, τοποθετημένο σε τρυβλίο Petri με κάλυμμα (βλέπε παράγραφο 34). Μετά την κένωση θα πρέπει να προσδιορίζεται το βάρος των σκωλήκων προκειμένου να εκτιμάται η πιθανή μείωση της βιομάζας κατά τη διάρκεια της δοκιμής (βλέπε κριτήρια εγκυρότητας στην παράγραφο 17). Η ζύγιση και η ιστολογική ανάλυση των Enchytraeus εκτελούνται χωρίς να έχει μεσολαβήσει κένωση, καθώς αυτή είναι τεχνικά δύσκολη λόγω του μικρού μεγέθους των σκωλήκων αυτών. Μετά από τον προσδιορισμό του τελικού βάρους, οι σκώληκες θα πρέπει να θανατώνονται αμέσως, με την πλέον ενδεδειγμένη μέθοδο (π.χ. χρήση υγρού αζώτου ή κατάψυξη σε θερμοκρασίες κάτω των – 18 °C).

47. Κατά τη φάση αποβολής, οι σκώληκες αντικαθιστούν το μολυσμένο περιεχόμενο του εντέρου με καθαρό χώμα. Αυτό συνεπάγεται ότι οι μετρήσεις σε σκώληκες χωρίς να έχει μεσολαβήσει κένωση (εν προκειμένω, Enchytraeus), δείγματα των οποίων έχουν ληφθεί αμέσως πριν από τη φάση αποβολής, περιλαμβάνουν μολυσμένο έδαφος από το έντερο. Για τους υδρόβιους ολιγόχαιτους υποτίθεται ότι μετά τις πρώτες 4-24 ώρες της φάσης αποβολής, το μεγαλύτερο μέρος του μολυσμένου περιεχομένου του εντέρου έχει αντικατασταθεί από καθαρό ίζημα, π.χ. (46). Παρόμοια ευρήματα έχουν αναφερθεί για γαιοσκώληκες σε μελέτες με αντικείμενο τη συσσώρευση ραδιοσημασμένου καδμίου και ψευδαργύρου (78). Στα Enchytraeus που δεν έχουν κενώσει το έντερό τους, η συγκέντρωση σε αυτό το πρώτο δείγμα της φάσης αποβολής μπορεί να θεωρηθεί ως η συγκέντρωση στον ιστό μετά την κένωση του εντέρου. Για να ληφθεί υπόψη η αραίωση της συγκέντρωσης του υπό δοκιμή στοιχείου από μη μολυσμένο έδαφος κατά τη φάση αποβολής, το βάρος του περιεχομένου του εντέρου μπορεί να υπολογιστεί από τον λόγο υγρού βάρους/βάρος της τέφρας του σκώληκα ή από τον λόγο ξηρού βάρους/βάρος της τέφρας του σκώληκα.

▼M4

48. Τα δείγματα εδάφους και σκωλήκων πρέπει να αναλύονται κατά προτίμηση αμέσως μετά την αφαίρεση (δηλαδή εντός 1-2 ημερών), προκειμένου να αποφεύγονται η αποικοδόμηση ή άλλες απώλειες. Συνιστάται ο υπολογισμός των κατά προσέγγιση ποσοστών πρόσληψης και αποβολής κατά την πορεία της δοκιμής. Εάν η ανάλυση καθυστερεί, τα δείγματα θα πρέπει να φυλάσσονται με κατάλληλη μέθοδο, π.χ. κατάψυξη (≤ – 18 °C).

49. Θα πρέπει να ελέγχεται αν η ακρίβεια και η αναπαραγωγιμότητα της χημικής ανάλυσης, καθώς και η ανάκτηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας από τα δείγματα εδάφους και σκωλήκων είναι ικανοποιητικές για τη συγκεκριμένη μέθοδο. Θα πρέπει να αναφέρονται η αποδοτικότητα της εκχύλισης, το όριο ανίχνευσης (LOD) και το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ). Ομοίως, θα πρέπει να εξακριβώνεται ότι η ελεγχόμενη χημική ουσία δεν είναι ανιχνεύσιμη στα δοχεία μάρτυρες σε συγκεντρώσεις που υπερβαίνουν τη συγκέντρωση υποβάθρου. Όταν η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στον οργανισμό δοκιμής Ca είναι > 0 στους σκώληκες-μάρτυρες, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται στον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων (βλέπε προσάρτημα 2). Ο τρόπος χειρισμού όλων των δειγμάτων καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής θα πρέπει να ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο μόλυνσης και απωλειών (π.χ. λόγω προσρόφησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στη συσκευή δειγματοληψίας).

50. Η χρήση ραδιοσημασμένης ελεγχόμενης χημικής ουσίας καθιστά δυνατή την ανάλυση της μητρικής ουσίας και των μεταβολιτών. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της μητρικής ελεγχόμενης χημικής ουσίας και των μεταβολιτών σε σταθερή κατάσταση ή στο τέλος της φάσης πρόσληψης παρέχει σημαντικές πληροφορίες. Τα δείγματα θα πρέπει στη συνέχεια να «καθαρίζονται», ούτως ώστε να μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά η μητρική χημική ουσία χωριστά. Εάν οι μεταβολίτες υπερβαίνουν, μεμονωμένα, το 10 % της συνολικής ραδιενέργειας των αναλυόμενων δειγμάτων, συνιστάται η ταυτοποίηση των μεταβολιτών αυτών.

51. Θα πρέπει να καταγράφονται και να αναφέρονται η συνολική ανάκτηση και η ανάκτηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στους σκώληκες, στο έδαφος και, εφόσον έχουν χρησιμοποιηθεί, στις παγίδες που περιέχουν απορροφητικά υλικά για τη συγκράτηση ελεγχόμενων χημικών ουσιών οι οποίες εξατμίζονται.

52. Η συνένωση των ατόμων που ελήφθησαν ως δείγματα από ένα συγκεκριμένο δοχείο δοκιμής είναι αποδεκτή στην περίπτωση των σκωλήκων της οικογένειας Enchytraeidae, που είναι μικρότεροι από τους γαιοσκώληκες. Εάν η συνένωση συνεπάγεται μείωση του αριθμού των πολλαπλών μετρήσεων, η μείωση αυτή περιορίζει τις στατιστικές διαδικασίες που μπορούν να εφαρμοστούν στα δεδομένα. Εάν απαιτείται συγκεκριμένη στατιστική διαδικασία και ισχύς, θα πρέπει να χρησιμοποιείται στη δοκιμή ο κατάλληλος αριθμός πολλαπλών δοχείων δοκιμής που συνάδει με την επιθυμητή συνένωση, διαδικασία και ισχύ.

53. Συνιστάται να εκφράζεται ο BAF τόσο ως συνάρτηση του συνολικού ξηρού βάρους όσο και ως συνάρτηση του λιπιδικού περιεχομένου, όταν απαιτείται (δηλαδή για εξαιρετικά υδρόφοβες χημικές ουσίες). Πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες μέθοδοι για τον προσδιορισμό του λιπιδικού περιεχομένου (ορισμένες από τις υφιστάμενες μεθόδους —π.χ. (31)(58)— θα πρέπει να προσαρμόζονται για τον σκοπό αυτό). Στις εν λόγω μεθόδους χρησιμοποιείται τεχνική εκχύλισης με χλωροφόρμιο/μεθανόλη. Ωστόσο, για να αποφευχθεί η χρήση χλωριωμένων διαλυτών, θα πρέπει να χρησιμοποιείται μια τροποποίηση της μεθόδου Bligh και Dyer (9) που περιγράφεται στη βιβλιογραφική παραπομπή (17). Δεδομένου ότι οι διάφορες μέθοδοι μπορεί να μην αποδίδουν ταυτόσημα αποτελέσματα (10), έχει σημασία να αναφέρονται λεπτομερή στοιχεία για τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο. Όταν είναι δυνατόν, δηλαδή εάν είναι διαθέσιμος επαρκής ιστός σκωλήκων, η ανάλυση των λιπιδίων θα πρέπει ιδανικά να εκτελείται στο ίδιο δείγμα ή εκχύλισμα με εκείνο που χρησιμοποιείται για την ανάλυση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, δεδομένου ότι τα λιπίδια πρέπει συχνά να απομακρύνονται από το εκχύλισμα ώστε να είναι δυνατή η χρωματογραφική ανάλυσή του (49). Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιούνται τα ζώα-μάρτυρες για τη μέτρηση του λιπιδικού περιεχομένου, το οποία μπορεί στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί για την κανονικοποίηση των τιμών BAF. Με την προσέγγιση αυτή μειώνεται η μόλυνση του εξοπλισμού από την ελεγχόμενη χημική ουσία.

▼M4

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

54. Η καμπύλη πρόσληψης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας λαμβάνεται με γραφική παράσταση, σε αριθμητικές κλίμακες, της συγκέντρωσης της ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια των σκωλήκων κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης συναρτήσει του χρόνου. Όταν η καμπύλη εμφανίζει οριζοντίωση ή σταθερή κατάσταση (βλέπε ορισμούς στο προσάρτημα 1), ο συντελεστής βιοσυσσώρευσης σε σταθερή κατάσταση, BAFss, υπολογίζεται ως εξής:

$$\frac{C_a \text{ σε σταθερή κατάσταση ή στο τέλος της φάσης πρόσληψης (μέση τιμή)}}{C_s \text{ σε σταθερή κατάσταση ή στο τέλος της φάσης πρόσληψης (μέση τιμή)}}$$

C_a είναι η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στον οργανισμό δοκιμής

C_s είναι η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο έδαφος

55. Όταν δεν επιτυγχάνεται σταθερή κατάσταση, αντί του BAFss θα πρέπει να προσδιορίζεται ο BAF_K, με βάση τις σταθερές ταχύτητας, όπως περιγράφεται κατωτέρω:

— Προσδιορίζεται ο συντελεστής συσσώρευσης (BAF_K) ως λόγος k_s/k_e.

— Οι ταχύτητες πρόσληψης και αποβολής υπολογίζονται κατά προτίμηση ταυτόχρονα (βλέπε εξίσωση 11 στο προσάρτημα 2).

— Η σταθερά ταχύτητας αποβολής (k_e) προσδιορίζεται συνήθως από την καμπύλη αποβολής (δηλαδή τη γραφική παράσταση της συγκέντρωσης του υπό δοκιμή στοιχείου στους σκώληκες κατά τη φάση αποβολής). Στη συνέχεια υπολογίζεται η σταθερά ταχύτητας πρόσληψης, k_s, με βάση την k_e και την τιμή C_a που προκύπτει από την καμπύλη πρόσληψης —βλέπε περιγραφή των μεθόδων αυτών στο προσάρτημα 2. Η μέθοδος που προτιμάται για τη λήψη του BAF_K και των σταθερών ταχύτητας k_s και k_e είναι η χρήση μεθόδων εκτίμησης μη γραμμικών παραμέτρων σε υπολογιστή. Εάν είναι προφανές ότι η αποβολή δεν είναι πρώτης τάξης, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πιο περίπλοκα μοντέλα.

Έκθεση δοκιμής

56. Η έκθεση της δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη χημική ουσία:

— Κάθε διαθέσιμη πληροφορία σχετικά με την οξεία ή τη μακροχρόνια τοξικότητα (π.χ. EC_x, $LC_{x,}$ NOEC) της ελεγχόμενης χημικής ουσίας για τους ολιγόχαιτους που διαβιούν στο έδαφος,

— καθαρότητα, φυσική κατάσταση και φυσικοχημικές ιδιότητες, π.χ. log K_{ow}, υδατοδιαλυτότητα,

— στοιχεία ταυτότητας της χημικής ουσίας, πηγή του υπό δοκιμή στοιχείου, ταυτότητα και συγκέντρωση του διαλύτη που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκε,

— εάν χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένη ελεγχόμενη χημική ουσία, ακριβής θέση των σημασμένων ατόμων, ειδική ραδιενέργεια και ραδιοχημική καθαρότητα.

Υπό δοκιμή είδος:

— επιστημονική ονομασία, στέλεχος, πηγή, τυχόν προηγηθείσα αγωγή, εγκλιματισμός, ηλικία, εύρος μεγεθών κ.λπ.

▼M4

Συνθήκες δοκιμής:

— εφαρμοσθείσα διαδικασία δοκιμής,

— τύπος και χαρακτηριστικά του χρησιμοποιηθέντος φωτισμού και φωτοπερίοδος(-οι),

— σχεδιασμός της δοκιμής (π.χ. αριθμός και μέγεθος των δοχείων δοκιμής, μάζα του εδάφους και ύψος του στρώματος του εδάφους, αριθμός πολλαπλών προσδιορισμών, αριθμός σκωλήκων ανά προσδιορισμό, αριθμός των συγκεντρώσεων δοκιμής, διάρκεια των φάσεων πρόσληψης και αποβολής, συχνότητα δειγματοληψίας),

— αιτιολόγηση της επιλογής του υλικού του δοχείου δοκιμής,

— μέθοδος παρασκευής και εφαρμογής του υπό δοκιμή στοιχείου, καθώς και αιτιολόγηση της επιλογής μιας συγκεκριμένης μεθόδου,

— ονομαστικές συγκεντρώσεις δοκιμής, μέσοι όροι των τιμών που μετρήθηκαν στα δοχεία δοκιμής και οι τυπικές αποκλίσεις τους, και η μέθοδος με την οποία επιτεύχθηκαν οι τιμές αυτές,

— πηγή των συστατικών του τεχνητού εδάφους ή —εάν χρησιμοποιούνται φυσικά μέσα— προέλευση του εδάφους, περιγραφή τυχόν προκατεργασίας, αποτελέσματα για τους μάρτυρες (επιβίωση, ανάπτυξη βιομάζας, αναπαραγωγή), χαρακτηριστικά του εδάφους (pH, περιεκτικότητα σε ολικό οργανικό άνθρακα, κατανομή μεγέθους σωματιδίων (ποσοστό άμμου, ιλύος και αργίλου), μέγιστη υδατοχωρητικότητα (WHC_{max}), ποσοστό υγρασίας στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής και τυχόν άλλες μετρήσεις),

— λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με την κατεργασία των δειγμάτων εδάφους και σκωλήκων, μεταξύ των οποίων λεπτομέρειες για την παρασκευή, την αποθήκευση, τις διαδικασίες εμβολιασμού, την εκχύλιση και τις αναλυτικές διαδικασίες (και ακρίβεια) για το υπό δοκιμή στοιχείο στους σκώληκες και στο έδαφος και για το λιπιδικό περιεχόμενο (αν έχει μετρηθεί), και ανακτήσεις του υπό δοκιμή στοιχείου.

Αποτελέσματα:

— θνησιμότητα των σκωλήκων-μαρτύρων και των σκωλήκων κάθε δοχείου δοκιμής και τυχόν παρατηρηθείσα ανώμαλη συμπεριφορά (π.χ. αποφυγή του εδάφους, απουσία αναπαραγωγής σε δοκιμή βιοσυσσώρευσης με Enchytraeus),

— αναλογία ξηρού προς υγρό βάρος του εδάφους και των οργανισμών δοκιμής (χρήσιμη για κανονικοποίηση),

— υγρά βάρη των σκωλήκων σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας· για τους γαιοσκώληκες, υγρά βάρη κατά την έναρξη της δοκιμής και σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας, πριν και μετά την κένωση του εντέρου,

— λιπιδικό περιεχόμενο των οργανισμών δοκιμής (αν έχει προσδιοριστεί),

— καμπύλες στις οποίες εμφαίνεται η κινητική πρόσληψης και αποβολής της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στους σκώληκες, καθώς και ο χρόνος μέχρι τη σταθερή κατάσταση,

— τιμές C_a και C_s (με τυπική απόκλιση και εύρος, κατά περίπτωση) για όλους τους χρόνους δειγματοληψίας (η C_a εκφράζεται σε g kg^{-1} υγρού και ξηρού βάρους ολόκληρου του σώματος, ενώ η C_s εκφράζεται σε g kg^{-1} υγρού και ξηρού βάρους εδάφους). Εάν απαιτείται ο συντελεστής συσσώρευσης σε βιόκοσμο-έδαφος (BSAF) (π.χ. για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων δύο ή περισσότερων δοκιμών που έχουν διεξαχθεί σε ζώα με διαφορετικό λιπιδικό περιεχόμενο), η C_a μπορεί επιπλέον να εκφράζεται σε g kg^{-1} λιπιδικού περιεχομένου του οργανισμού και η C_s σε g kg^{-1} οργανικού άνθρακα (OC) του εδάφους,

— BAF (εκφραζόμενος σε kg·εδάφους kg^{-1} σκώληκα), σταθερά ταχύτητας πρόσληψης εδάφους k_s (εκφραζόμενη σε g εδάφους kg^{-1} σκώληκα $ημέρα^{-1}$) και σταθερά ταχύτητας αποβολής k_e (εκφραζόμενη σε $ημέρα^{-1}$)· επιπροσθέτως μπορεί να αναφέρεται ο BSAF (εκφραζόμενος σε kg OC εδάφους kg^{-1} λιπιδικού περιεχομένου σκώληκα),

▼M4

— εάν έχουν μετρηθεί: εκατοστιαίες αναλογίες της μητρικής χημικής ουσίας, των μεταβολιτών και των δεσμευμένων υπολειμμάτων (δηλαδή το ποσοστό της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που δεν είναι δυνατόν να εκχυλιστεί με τις κοινές μεθόδους εκχύλισης) που ανιχνεύθηκαν στο έδαφος και στα ζώα δοκιμής,

— μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τις στατιστικές αναλύσεις των δεδομένων.

Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων:

— συμμόρφωση των αποτελεσμάτων με τα κριτήρια εγκυρότητας που αναφέρονται στην παράγραφο 17,

— μη αναμενόμενα ή ασυνήθη αποτελέσματα, π.χ. ατελής αποβολή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας από τα ζώα δοκιμής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) Amorim M. (2000), Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ-HCH) in the Enchytraeid Enchytraeus albidus, Master thesis, University Coimbra.

(2) ASTM (2000), Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688-00a.

(3) ASTM International (2004), Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. ASTM International, E1676-04: 26 pp.

(4) Beek B., Boehling S., Bruckmann U., Franke C., Joehncke U., Studinger G. (2000), The assessment of bioaccumulation, στο Hutzinger O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation - New Aspects and Developments, Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.

(5) Belfroid A., Sikkenk M., Seinen W., Van Gestel C., Hermens J. (1994), The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil, *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 93-99.

(6) Belfroid A., Van Wezel A., Sikkenk M., Van Gestel C., Seinen W. και Hermens J. (1993), The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water, *Ecotox. Environ. Safety* 25: 154-165.

(7) Belfroid A., Meiling J., Drenth H., Hermens J., Seinen W., Van Gestel C. (1995), Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*), *Ecotox. Environ. Safety* 31: 185-191.

(8) Bell A.W. (1958), The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus, Ann. Mus. Novitat.* 1902: 1-13.

(9) Bligh E.G. και Dyer W.J. (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Pysiol.* 37: 911-917.

(10) Bouche M. (1972), Lombriciens de France. Ecologie et Systematique. INRA, Annales de Zoologie-Ecologie animale, Paris, 671 p.

(11) Bruns E., Egeler Ph., Moser T., Römbke J., Scheffczyk A., Spörlein P. (2001a), Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten, Report to the German Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 298 64 416.

(12) Bruns E., Egeler Ph., Römbke J. Scheffczyk A., Spörlein P. (2001b), Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida), *Hydrobiologia* 463: 185-196.

(13) Conder J.M. και Lanno R.P. (2003), Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida, J. Soils Sediments* 3: 13-20.

▼M4

(14) Connell D.W. και Markwell R.D. (1990), Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System, *Chemosphere* 20: 91-100.

(15) Didden W.A.M. (1993), Ecology of Terrestrial Enchytraeidae, *Pedobiologia* 37: 2-29.

(16) Didden W. (2003), Oligochaeta, In: Bioindicators and biomonitors. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (eds.), Elsevier Science Ltd., The Netherlands, pp. 555-576.

(17) De Boer J., Smedes F., Wells D., Allan A. (1999), Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

(18) Dietrich D.R., Schmid P., Zweifel U., Schlatter C., Jenni-Eiermann S., Bachmann H., Bühler U., Zbinden N. (1995), Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29: 140-145.

(19) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 18ης Δεκεμβρίου 2006, για την καταχώριση, την αξιολόγηση, την αδειοδότηση και τους περιορισμούς των χημικών προϊόντων (REACH) και για την ίδρυση του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Χημικών Προϊόντων καθώς και για την τροποποίηση της οδηγίας 1999/45/ΕΚ και για την κατάργηση του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 793/93 του Συμβουλίου και του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1488/94 της Επιτροπής καθώς και της οδηγίας 76/769/ΕΟΚ του Συμβουλίου και των οδηγιών της Επιτροπής 91/155/ΕΟΚ, 93/67/ΕΟΚ, 93/105/ΕΚ και 2000/21/ΕΚ (ΕΕ L 396 της 30.12.2006, σ. 1).

(20) Edwards C.A. και Bohlen P.J. (1996), Biology and ecology of earthworms. Third Edition, Chapman & Hall, London, 426 pp.

(21) OECD (2008), *Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates*, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris

(22) Egeler Ph., Gilberg D., Scheffczyk A., Moser Th. και Römbke J. (2009), Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten). Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No.: 204 67 458: 149 pp. Available for download at: http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf

(23) Elmegaard N. and Jagers op Akkerhuis GAJM (2000). Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: 57 pp.

(24) Environment Canada (1995), Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(25) EPPO (2003), Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33: 195-208.

(26) Franke C (1996), How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? *Chemosphere* 32: 1897-1905.

(27) Franke C, Studinger G, Berger G, Böhling S, Bruckmann U, Cohors-Fresenborg D, Jöhncke U (1994), The assessment of bioaccumulation, *Chemosphere* 29: 1501-1514.

(28) Füll C (1996), Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae), Dissertation University Mainz, 156 pp.

▼M4

(29) Füll C, Schulte C, Kula C (2003), Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF - Z. Umweltchem, *Ökotox.* 15: 78-84.

(30) Gabric A.J., Connell D.W., Bell P.R.F. (1990), A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes, *Wat. Res.* 24: 1225-1231.

(31) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A., Parrish C.C. (1985), Micromethods for lipids in aquatic invertebrates, *Limnology and Oceanography* 30: 1099-1105.

(32) Hawker DW και Connell DW (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701-707.

(33) Hund-Rinke K. και Wiechering H. (2000), Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests, *J. Soils Sediments* 1: 15-20.

(34) Hund-Rinke K., Römbke J., Riepert F., Achazi R. (2000), Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg, 59-81.

(35) ISO 11268-2 (1998) Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction.

(36) Jaenike J. (1982), «*Eisenia foetida*» is two biological species, *Megadrilogica* 4: 6-8.

(37) Jager T. (1998), Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta), *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2080-2090.

(38) Jager T., Sanchez P.A., Muijs B., van der Welde E., Posthuma L. (2000), Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil, *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 953-961.

(39) Jager T., Baerselman R., Dijkman E., De Groot A.C., Hogendoorn E.A., DeJong A., Kruitbosch J.A.W., Peijnenburg W.J.G.M. (2003a), Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures, *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 767-775.

(40) Jager T., Fleuren R.L.J., Hoogendoorn E., de Korte G. (2003b), Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta), *Environ. Sci. Technol.* 37: 3399-3404.

(41) Janssen M.P.M., Bruins A., De Vries T.H., Van Straalen N.M. (1991), Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 305-312.

(42) Kasprzak K. (1982), Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems, *Pedobiologia* 23: 217-232.

(43) Khalil A.M. (1990), Aufnahme und Metabolismus von ^{14}C-Hexachlorbenzol und ^{14}C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertation University München, 137 pp.

(44) Landrum P.F. (1989), Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi, Environ. Sci. Toxicol.* 23: 588-595.

(45) Marinussen M.P.J.C., Van der Zee S.E.A.T.M., De Haan F.A. (1997). Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions, *Ecotox. Environ. Safety* 36: 17-26.

(46) Mount D.R., Dawson T.D., Burkhard L.P. (1999), Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegates, Environ. Toxicol. Chem.* 18: 1244-1249.

▼**M4**

(47) Nendza M. (1991), QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow}/log BCF correlations, στο: R. Nagel και R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.

(48) Κεφάλαιο Γ.8 του παρόντος παραρτήματος – Τοξικότητα για τους γαιοσκώληκες.

(49) Κεφάλαιο Γ.13 του παρόντος παραρτήματος – Βιοσυγκέντρωση: δοκιμή σε ψάρια με συνεχή ροή νερού.

(50) Κεφάλαιο Γ.21 του παρόντος παραρτήματος – Μικροοργανισμοί εδάφους: δοκιμή μετατροπής αζώτου.

(51) OECD (2004a), Enchytraeid reproduction test, Test Guideline No. 220, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(52) Oecd (2004b), Earthworm reproduction test (Eisenia fetida/Eisenia Andrei), Test Guideline No. 222, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(53) OECD (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(54) Petersen H. και Luxton M. (1982), A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes, *Oikos* 39: 287-388.

(55) Phillips D.J.H. (1993), Bioaccumulation, στο: Handbook of Ecotoxicology Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford, 378-396.

(56) Pflugmacher J. (1992), Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffzienten UWSF- Z. Umweltchem, *Ökotox.* 4: 77-81.

(57) Posthuma L., Weltje L., Anton-Sanchez F.A. (1996), Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida,* RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.

(58) Randall R.C., Lee II H., Ozretich R.J., Lake J.L., Pruell R.J. (1991), Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation, *Environ.Toxicol. Chem.* 10: 1431-1436.

(59) Römbke J., Egele, P., Füll C. (1998), Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 S.

(60) Römbke J. και Moser Th. (1999), Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test, UBA-Texte 4/99: 373 pp.

(61) Römbke J., Riepert F., Achazi R. (2000), Enchytraeen als Testorganismen, In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105-129.

(62) Romijn CA.FM., Luttik R., Van De Meent D., Slooff W., Canton J.H. (1993), Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains, *Ecotox. Envir. Safety* 27: 107-127.

(63) Sample B.E., Suter D.W., Beauchamp J.J., Efroymson R.A. (1999), Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation, *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 2110-2120.

(64) Schlosser H.-J. και Riepert F. (1992), Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung, *Zool. Beitr.* NF 34: 413-433.

(65) Schmelz R. και Collado R. (1999), *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida), *Carolinea* 57: 93–100.

▼**M4**

(66) Sims R.W. και Gerard B.M. (1985), Earthworms, στο: Kermack D. M. & Barnes R. S. K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S, London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.

(67) Sousa J.P., Loureiro S., Pieper S., Frost M., Kratz W., Nogueira A.J.A., Soares A.M.V.M. (2000), Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod, *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 2557–2563.

(68) Spacie A. και Hamelink J.L. (1982), Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish, *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 309-320.

(69) Stephenson G.L., Kaushik A., Kaushik N.K., Solomon K.R., Steele T., Scroggins R.P. (1998), Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: Advances in earthworm ecotoxicology. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds.). Setac Press, Pensacola, 67-81.

(70) Sterenborg I., Vork N.A., Verkade S.K., Van Gestel C.A.M., Van Straalen N.M. (2003), Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta, Environ. Toxicol. Chemistry* 22: 1167-1171.

(71) UBA (Umweltbundesamt) (1991), Bioakkumulation - Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.

(72) US EPA (2000), Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(73) Van Brummelen T.C. και Van Straalen N.M. (1996), Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber, Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 277-285.

(74) Van Gestel C.A.M. (1992), The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms, a review, In: Ecotoxicology of Earthworms (Ed. Becker H., Edwards P.J., Greig-Smith P.W. & Heimbach F.), Intercept Press, Andover (GB).

(75) Van Gestel C.A. και Ma W.-C. (1990), An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies, *Chemosphere* 21: 1023-1033.

(76) Van Straalen N.M., Donker M.H., Vijver M.G., van Gestel C.A.M. (2005), Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates, *Environmental Pollution* 136: 409-417.

(77) Venter J.M. και Reinecke A.J. (1988), The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta), South African J. Zool. 23: 161-165.

(78) Vijver M.G., Vink J.P.M., Jager T., Wolterbeek H.T., van Straalen N.M., van Gestel CAM (2005), Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. *Soil Biol. Biochem.* 37: 1843-1851.

(79) Widianarko B. και Van Straalen N.M. (1996), Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 402-406.

▼**M4**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Α**ποβολή** μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας είναι η απώλεια της χημικής αυτής ουσίας από τον ιστό του οργανισμού δοκιμής με ενεργητικές ή παθητικές διεργασίες, ανεξάρτητα από την παρουσία ή απουσία του υπό δοκιμή στοιχείου στο περιβάλλον μέσο.

Βιομεγέθυνση είναι η αύξηση της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια ενός οργανισμού, η οποία οφείλεται κυρίως στην πρόσληψη από μολυσμένη τροφή ή λεία, σε σχέση με τη συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην τροφή ή τη λεία. Η βιομεγέθυνση μπορεί να οδηγήσει σε μεταφορά ή συσσώρευση του υπό δοκιμή στοιχείου στις τροφικές αλυσίδες.

Βιοσυγκέντρωση είναι η αύξηση της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια ενός οργανισμού, η οποία οφείλεται στην πρόσληψη της χημικής ουσίας αποκλειστικά από το περιβάλλον μέσο (δηλαδή μέσω της επιφάνειας του σώματος και του καταποθέντος εδάφους), σε σχέση με τη συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο περιβάλλον μέσο.

Βιοσυσσώρευση είναι η αύξηση της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια ενός οργανισμού σε σχέση με τη συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο περιβάλλον μέσο. Η βιοσυσσώρευση προκύπτει από τις διαδικασίες βιοσυγκέντρωσης και βιομεγέθυνσης (βλέπε κατωτέρω).

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Η **οριζοντίωση** ή **σταθερή κατάσταση** ορίζεται ως η ισορροπία μεταξύ των διαδικασιών πρόσληψης και αποβολής που συντελούνται ταυτόχρονα κατά τη φάση έκθεσης. Η σταθερή κατάσταση στη γραφική παράσταση του BAF συναρτήσει του χρόνου επιτυγχάνεται όταν η καμπύλη καθίσταται παράλληλη με τον άξονα του χρόνου και τρεις διαδοχικοί προσδιορισμοί του BAF σε δείγματα που έχουν ληφθεί ανά διαστήματα τουλάχιστον δύο ημερών δεν διαφέρουν μεταξύ τους σε ποσοστό μεγαλύτερο από 20 %, χωρίς να υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών περιόδων δειγματοληψίας. Στην περίπτωση ελεγχόμενων χημικών ουσιών που προσλαμβάνονται με αργό ρυθμό, ενδείκνυνται περισσότερο διαστήματα επτά ημερών (49).

Σταθερά ταχύτητας αποβολής (k_e) είναι η αριθμητική τιμή που ορίζει τον ρυθμό μείωσης της συγκέντρωσης του υπό δοκιμή στοιχείου στη μάζα ή την επιφάνεια του οργανισμού δοκιμής, μετά τη μεταφορά των οργανισμών δοκιμής από μέσο που περιέχει το υπό δοκιμή στοιχείο σε μέσο που δεν περιέχει τη χημική ουσία· η k_e εκφράζεται σε ημέρα^{-1}.

Σταθερά ταχύτητας πρόσληψης εδάφους (k_s) είναι η αριθμητική τιμή που ορίζει τον ρυθμό αύξησης της συγκέντρωσης του υπό δοκιμή στοιχείου στη μάζα ή την επιφάνεια του οργανισμού δοκιμής, η οποία οφείλεται στην πρόσληψη από την εδαφική φάση. Η k_s εκφράζεται σε g εδάφους·kg^{-1} σκώληκα·ημέρα^{-1}.

Συντελεστής βιοσυσσώρευσης (BAF) σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης, στο πλαίσιο της παρούσας δοκιμής βιοσυσσώρευσης, είναι το πηλίκο της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια του οργανισμού δοκιμής (C_a, σε g·kg^{-1} ξηρού βάρους σκώληκα) διά της συγκέντρωσης της χημικής ουσίας στο περιβάλλον μέσο (C_s, σε g·kg^{-1} ξηρού βάρους εδάφους) και εκφράζεται σε kg·εδάφους· kg^{-1} σκώληκα.

Συντελεστής βιοσυσσώρευσης σε σταθερή κατάσταση (BAFss) είναι ο BAF σε σταθερή κατάσταση και δεν μεταβάλλεται σημαντικά κατά τη διάρκεια παρατεταμένης χρονικής περιόδου, δεδομένου ότι η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο περιβάλλον μέσο (C_s, σε g·kg^{-1} ξηρού βάρους εδάφους) είναι σταθερή κατά τη διάρκεια της εν λόγω χρονικής περιόδου.

Ο **συντελεστής βιοσυσσώρευσης** που υπολογίζεται απευθείας από τον λόγο της σταθεράς ταχύτητας πρόσληψης εδάφους προς τη σταθερά ταχύτητας αποβολής (k_s και k_e, βλέπε ανωτέρω) ονομάζεται συντελεστής κινητικής βιοσυσσώρευσης (BAF_K).

▼M4

Συντελεστής κατανομής σε οκτανόλη-νερό (K_{ow}) είναι ο λόγος της διαλυτότητας μιας χημικής ουσίας σε n-οκτανόλη προς τη διαλυτότητά της στο νερό, σε κατάσταση ισορροπίας, συμβολιζόμενος και ως P_{ow}. Ο λογάριθμος του K_{ow} (log K_{ow}) χρησιμοποιείται ως ένδειξη του δυναμικού βιοσυσσώρευσης μιας χημικής ουσίας από υδρόβιους οργανισμούς.

Συντελεστής κατανομής σε οργανικό άνθρακα-νερό (K_{oc}) είναι ο λόγος της συγκέντρωσης μιας χημικής ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια του κλάσματος οργανικού άνθρακα του εδάφους προς τη συγκέντρωση της χημικής ουσίας στο νερό, σε κατάσταση ισορροπίας.

Συντελεστής συσσώρευσης σε βιόκοσμο-έδαφος (BSAF) είναι το πηλίκο της κανονικοποιημένης ως προς τα λιπίδια συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια του οργανισμού δοκιμής διά της κανονικοποιημένης ως προς τον οργανικό άνθρακα συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο έδαφος, σε σταθερή κατάσταση. Στην περίπτωση αυτή, η C_a εκφράζεται σε $g \cdot kg^{-1}$ λιπιδικού περιεχομένου του οργανισμού και η C_s σε $g \cdot kg^{-1}$ περιεκτικότητας του εδάφους σε οργανικό άνθρακα. Ο BSAF εκφράζεται σε kg $OC \cdot kg^{-1}$ λιπιδίων.

Φάση αποβολής είναι το χρονικό διάστημα κατά το οποίο μελετάται η αποβολή (ή η καθαρή απώλεια) της χημικής ουσίας από τους οργανισμούς δοκιμής, μετά τη μεταφορά των οργανισμών δοκιμής από μολυσμένο μέσο σε μέσο που δεν περιέχει το υπό δοκιμή στοιχείο.

Φάση έκθεσης ή πρόσληψης είναι το χρονικό διάστημα κατά το οποίο οι οργανισμοί δοκιμής εκτίθενται στην ελεγχόμενη χημική ουσία.

▼M4

Προσάρτημα 2

Υπολογισμός των παραμέτρων πρόσληψης και αποβολής

Το κύριο καταληκτικό σημείο μιας δοκιμής βιοσυσσώρευσης είναι ο συντελεστής βιοσυσσώρευσης, BAF. Ο μετρούμενος BAF μπορεί να υπολογιστεί με διαίρεση της συγκέντρωσης στον οργανισμό δοκιμής, C_a, διά της συγκέντρωσης στο έδαφος, C_s, σε σταθερή κατάσταση. Εάν δεν επιτυγχάνεται σταθερή κατάσταση κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης, αντί του BAFss υπολογίζεται ο BAF_K από τις σταθερές ταχύτητας. Ωστόσο, θα πρέπει να επισημαίνεται αν ο BAF βασίζεται σε συγκεντρώσεις σταθερής κατάστασης ή όχι.

Ο συνήθης τρόπος λήψης του συντελεστή κινητικής βιοσυσσώρευσης (BAF_K), της σταθεράς ταχύτητας πρόσληψης εδάφους (k_s) και της σταθεράς ταχύτητας αποβολής (k_e) είναι η χρήση μεθόδων εκτίμησης μη γραμμικών παραμέτρων σε υπολογιστή, π.χ., με βάση τα μοντέλα που περιγράφονται στη βιβλιογραφική παραπομπή (68). Με βάση ένα σύνολο διαδοχικών δεδομένων χρόνου-συγκέντρωσης και τις εξισώσεις μοντέλου:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[εξίσωση 1]}$$

ή

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[εξίσωση 2]}$$

όπου:

C_a = συγκέντρωση της χημικής ουσίας στους σκώληκες [g kg^{-1} υγρού ή ξηρού βάρους]

k_s = σταθερά ταχύτητας πρόσληψης στον ιστό [g εδάφους kg^{-1} σκώληκα ημέρα^{-1}]

C_s = συγκέντρωση της χημικής ουσίας στο έδαφος [g kg^{-1} υγρού ή ξηρού βάρους]

ke = σταθερά ταχύτητας αποβολής [ημέρα^{-1}]

tc = ο χρόνος στο τέλος της φάσης πρόσληψης,

τα εν λόγω προγράμματα ηλεκτρονικών υπολογιστών υπολογίζουν τις τιμές BAF_K, k_s και k_e.

Όταν η συγκέντρωση υποβάθρου στους μη εκτεθειμένους σκώληκες π.χ. κατά την ημέρα 0, διαφέρει σημαντικά από το μηδέν (αυτό μπορεί να ισχύει, π.χ., για τα μέταλλα), αυτή η συγκέντρωση υποβάθρου ($C_{a,0}$) θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται στις ανωτέρω εξισώσεις, οπότε προκύπτουν οι εξισώσεις:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[εξίσωση 3]}$$

και

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[εξίσωση 4]}$$

Στις περιπτώσεις όπου παρατηρείται σημαντική μείωση της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο έδαφος κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα ακόλουθα μοντέλα, π.χ. (67)(79):

$$C_s = C_0(e^{-k}0^{t}) \qquad \text{[εξίσωση 5]}$$

▼**M4**

όπου:

C_s = συγκέντρωση της χημικής ουσίας στο έδαφος [g kg^{-1} υγρού ή ξηρού βάρους]

k_0 = σταθερά ταχύτητας αποικοδόμησης στο έδαφος [ημέρα^{-1}]

C_0 = αρχική συγκέντρωση της χημικής ουσίας στο έδαφος [g kg^{-1} υγρού ή ξηρού βάρους]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[εξίσωση 6]}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 tc} - e^{-k} e^{tc} * e^{-k(t-tc)} \qquad t > t_c \qquad \text{[εξίσωση 7]}$$

όπου:

C_a = συγκέντρωση της χημικής ουσίας στους σκώληκες [g kg^{-1} υγρού ή ξηρού βάρους]

k_s = σταθερά ταχύτητας πρόσληψης στον ιστό [g εδάφους kg^{-1} σκώληκα ημέρα^{-1}]

k_0 = σταθερά ταχύτητας αποικοδόμησης στο έδαφος [ημέρα^{-1}]

ke = σταθερά ταχύτητας αποβολής [ημέρα^{-1}]

t_c = ο χρόνος στο τέλος της φάσης πρόσληψης.

Όταν η σταθερή κατάσταση επιτυγχάνεται κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης (δηλαδή $t = \infty$), η εξίσωση 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[εξίσωση 1]}$$

μπορεί να απλοποιηθεί σε:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

ή

$$C_a / C_s = k_s / k_e = BAF_K \qquad \text{[εξίσωση 8]}$$

Στη συνέχεια, η σχέση $k_s/k_e \times C_s$ είναι μια προσέγγιση για τη συγκέντρωση του υπό δοκιμή στοιχείου στον ιστό του σκώληκα σε σταθερή κατάσταση ($C_{a,ss}$).

Ο συντελεστής συσσώρευσης σε βιόκοσμο-έδαφος (BSAF) μπορεί να υπολογιστεί ως εξής:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \qquad \text{[εξίσωση 9]}$$

όπου f_{oc} είναι το κλάσμα του οργανικού άνθρακα του εδάφους και f_{lip} το κλάσμα των λιπιδίων του σκώληκα, προσδιοριζόμενα και τα δύο, κατά προτίμηση, σε δείγματα που έχουν ληφθεί από τη δοκιμή και με βάση είτε το ξηρό είτε το υγρό βάρος, αντίστοιχα.

Η κινητική αποβολής μπορεί να μοντελοποιηθεί με τη χρήση των δεδομένων από τη φάση αποβολής και την εφαρμογή της ακόλουθης εξίσωσης μοντέλου και μιας μεθόδου εκτίμησης μη γραμμικών παραμέτρων σε υπολογιστή. Εάν η γραφική παράσταση των σημείων δεδομένων συναρτήσει του χρόνου δηλώνει σταθερή εκθετική μείωση της συγκέντρωσης του υπό δοκιμή στοιχείου στα ζώα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μονοδιαμερισματικό μοντέλο (εξίσωση 9) για την περιγραφή της χρονικής εξέλιξης της αποβολής.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^{t} \qquad \text{[εξίσωση 10]}$$

▼**M4**

Μερικές φορές, οι διεργασίες αποβολής φαίνεται να είναι διφασικές, εμφανίζοντας ταχεία μείωση της C_a κατά τα πρώτα στάδια, η οποία μεταλλάσσεται σε βραδύτερη απώλεια των υπό δοκιμή στοιχείων κατά τα επόμενα στάδια της αποβολής, π.χ. (27)(68). Οι δύο φάσεις μπορούν να ερμηνευθούν με την παραδοχή ότι υπάρχουν δύο διαφορετικά διαμερίσματα στον οργανισμό, από τα οποία το υπό δοκιμή στοιχείο απομακρύνεται με διαφορετικές ταχύτητες. Στις περιπτώσεις αυτές, θα πρέπει να μελετάται η ειδική βιβλιογραφία, π.χ. (38)(39)(40)(78).

Με τη βοήθεια των ανωτέρω εξισώσεων μοντέλου, οι κινητικές παράμετροι (k_s και k_e) μπορούν επίσης να υπολογιστούν με μία μόνο διαδικασία μέτρησης, μέσω της ταυτόχρονης εφαρμογής του μοντέλου κινητικής πρώτης τάξης σε όλα τα δεδομένα που προκύπτουν τόσο από τη φάση πρόσληψης, όσο και από τη φάση αποβολής. Για την περιγραφή μιας μεθόδου που επιτρέπει ενδεχομένως έναν τέτοιο συνδυασμένο υπολογισμό των σταθερών ταχύτητας πρόσληψης και αποβολής, βλέπε βιβλιογραφικές παραπομπές (41), (73) και (70).

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \quad \text{[εξίσωση 11]}$$

Σημείωση: Όταν οι παράμετροι πρόσληψης και αποβολής υπολογίζονται ταυτόχρονα από τα συνδυασμένα δεδομένα πρόσληψης και αποβολής, το «m» που εμφαίνεται στην εξίσωση 11 είναι ένας περιγραφέας που επιτρέπει στο πρόγραμμα του υπολογιστή να αντιστοιχίσει τους επιμέρους όρους της εξίσωσης με τα σύνολα δεδομένων της κάθε φάσης και να εκτελέσει ορθώς την αξιολόγηση (m = 1 για τη φάση πρόσληψης, m = 2 για τη φάση αποβολής).

Παρ' όλα αυτά, οι ανωτέρω εξισώσεις μοντέλου θα πρέπει να χρησιμοποιούνται με επιφύλαξη, ιδίως όταν μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της δοκιμής η βιοδιαθεσιμότητα ή η (βιο)αποικοδόμηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας [βλέπε π.χ. (79)].

▼**M4**

Προσάρτημα 3

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΧΡΟΝΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΔΟΚΙΜΕΣ ΒΙΟΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ

Δοκιμή σε γαιοσκώληκες

α) Φάση πρόσληψης με 8 ημερομηνίες δειγματοληψίας για τον υπολογισμό της κινητικής

Ημέρα	Δραστηριότητα
– 6	Εγκλιματισμός του προετοιμασμένου εδάφους για 48 ώρες
– 4	Εμβολιασμός του κλάσματος εδάφους με το διάλυμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, εξάτμιση του διαλύτη, ανάμειξη των συστατικών του εδάφους, κατανομή του εδάφους στα δοχεία δοκιμής, εξισορρόπηση στις συνθήκες δοκιμής για 4 ημέρες (3 εβδομάδες αν πρόκειται για έδαφος εμβολιασμένο με μέταλλα)
– 3 έως – 1	Διαχωρισμός των οργανισμών δοκιμής από την καλλιέργεια για εγκλιματισμό, προετοιμασία και ύγρανση των συστατικών του εδάφους
0	Μέτρηση της θερμοκρασίας και του pH του εδάφους, λήψη δειγμάτων εδάφους από τα δοχεία αγωγής και τους μάρτυρες διαλύτη για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, προσθήκη τροφής, ζύγιση και τυχαία κατανομή των σκωλήκων στα δοχεία δοκιμής, κράτηση επαρκών επιμέρους δειγμάτων σκωλήκων για τον προσδιορισμό των αναλυτικών τιμών υποβάθρου, του υγρού και ξηρού βάρους και του λιπιδικού περιεχομένου, ζύγιση όλων των δοχείων δοκιμής για τον έλεγχο της υγρασίας του εδάφους, έλεγχος της παροχής αέρα, εάν χρησιμοποιείται κλειστό σύστημα δοκιμών
1	Έλεγχος της παροχής αέρα, καταγραφή της συμπεριφοράς των σκωλήκων και της θερμοκρασίας, δειγματοληψία εδάφους και σκωλήκων για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του υπό δοκιμή στοιχείου
2	Ομοίως με την 1η ημέρα
3	Έλεγχος της παροχής αέρα, της συμπεριφοράς των σκωλήκων και της θερμοκρασίας
4	Ομοίως με την 1η ημέρα,
5 - 6	Ομοίως με την 3η ημέρα,
7	Ομοίως με την 1η ημέρα· προσθήκη τροφής, έλεγχος της υγρασίας του εδάφους με νέα ζύγιση των δοχείων δοκιμής και αναπλήρωση του εξατμισθέντος νερού
8 - 9	Ομοίως με την 3η ημέρα,
10	Ομοίως με την 1η ημέρα,
11 - 13	Ομοίως με την 3η ημέρα,
14	Ομοίως με την 1η ημέρα· προσθήκη τροφής, έλεγχος της υγρασίας του εδάφους με νέα ζύγιση των δοχείων δοκιμής και αναπλήρωση του εξατμισθέντος νερού
15 - 16	Ομοίως με την 3η ημέρα
17	Ομοίως με την 1η ημέρα
18 - 20	Ομοίως με την 3η ημέρα

▼**M4**

Ημέρα	Δραστηριότητα
21	Ομοίως με την 1η ημέρα· μέτρηση της θερμοκρασίας και του pH του εδάφους, έλεγχος της υγρασίας του εδάφους με νέα ζύγιση των δοχείων δοκιμής, τέλος της φάσης πρόσληψης, μεταφορά των σκωλήκων από τα υπόλοιπα εκτεθέντα πολλαπλά δοχεία σε δοχεία που περιέχουν καθαρό έδαφος για τη φάση αποβολής (χωρίς κένωση εντέρου), δειγματοληψία εδάφους και σκωλήκων από τους μάρτυρες διαλύτη.
	Οι δραστηριότητες πριν από την έκθεση (φάση εξισορρόπησης) θα πρέπει να προγραμματίζονται με γνώμονα τις ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.
	Οι δραστηριότητες που περιγράφονται για την 3η ημέρα πρέπει να διεξάγονται καθημερινά (τουλάχιστον κατά τις εργάσιμες ημέρες).

β) Φάση αποβολής

Ημέρα	Δραστηριότητα
– 6	Προετοιμασία και ύγρανση των συστατικών του εδάφους, εγκλιματισμός του προετοιμασμένου εδάφους για 48 ώρες
– 4	Ανάμειξη των συστατικών του εδάφους, κατανομή του εδάφους στα δοχεία δοκιμής, επώαση στις συνθήκες δοκιμής για 4 ημέρες
0 (τέλος της φάσης πρόσληψης)	Μέτρηση της θερμοκρασίας και του pH του εδάφους, ζύγιση και τυχαία κατανομή των σκωλήκων στα δοχεία δοκιμής, προσθήκη τροφής, μεταφορά των σκωλήκων από τα υπόλοιπα εκτεθέντα πολλαπλά δοχεία σε δοχεία που περιέχουν καθαρό έδαφος, δειγματοληψία εδάφους και σκωλήκων μετά από 4 - 6 ώρες για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας
1	Έλεγχος της παροχής αέρα, καταγραφή της συμπεριφοράς των σκωλήκων και της θερμοκρασίας, δειγματοληψία εδάφους και σκωλήκων για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας
2	Ομοίως με την 1η ημέρα
3	Έλεγχος της παροχής αέρα, της συμπεριφοράς των σκωλήκων και της θερμοκρασίας
4	Ομοίως με την 1η ημέρα
5 - 6	Ομοίως με την 3η ημέρα
7	Ομοίως με την 1η ημέρα· προσθήκη τροφής, έλεγχος της υγρασίας του εδάφους με νέα ζύγιση των δοχείων δοκιμής και αναπλήρωση του εξατμισθέντος νερού
8 - 9	Ομοίως με την 3η ημέρα
10	Ομοίως με την 1η ημέρα
11 - 13	Ομοίως με την 3η ημέρα
14	Ομοίως με την 1η ημέρα· προσθήκη τροφής, έλεγχος της υγρασίας του εδάφους με νέα ζύγιση των δοχείων δοκιμής και αναπλήρωση του εξατμισθέντος νερού
15 - 16	Ομοίως με με την 3η ημέρα
17	Ομοίως με την 1η ημέρα

▼**M4**

Ημέρα	Δραστηριότητα
18 - 20	Ομοίως με την 3η ημέρα
21	Ομοίως με την 1η ημέρα· μέτρηση της θερμοκρασίας και του pH του εδάφους, έλεγχος της υγρασίας του εδάφους με νέα ζύγιση των δοχείων δοκιμής, δειγματοληψία εδάφους και σκωλήκων από τους μάρτυρες διαλύτη
	Η προετοιμασία του εδάφους πριν από την έναρξη της φάσης αποβολής θα πρέπει να γίνεται με τον ίδιο τρόπο όπως πριν από τη φάση πρόσληψης.
	Οι δραστηριότητες που περιγράφονται για την 3η ημέρα πρέπει να διεξάγονται καθημερινά (τουλάχιστον κατά τις εργάσιμες ημέρες).

Δοκιμή σε Enchytraeidae

α) Φάση πρόσληψης με 8 ημερομηνίες δειγματοληψίας για τον υπολογισμό της κινητικής

Ημέρα	Δραστηριότητα
– 6	Εγκλιματισμός του προετοιμασμένου εδάφους για 48 ώρες
– 4	Εμβολιασμός του κλάσματος εδάφους με το διάλυμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, εξάτμιση του διαλύτη, ανάμειξη των συστατικών του εδάφους, κατανομή του εδάφους στα δοχεία δοκιμής, εξισορρόπηση στις συνθήκες δοκιμής για 4 ημέρες (3 εβδομάδες, αν πρόκειται για έδαφος εμβολιασμένο με μέταλλα)
– 3 έως – 1	Διαχωρισμός των οργανισμών δοκιμής από την καλλιέργεια για εγκλιματισμό, προετοιμασία και ύγρανση των συστατικών του εδάφους
0	Μέτρηση της θερμοκρασίας και του pH του εδάφους, λήψη δειγμάτων εδάφους από τα δοχεία αγωγής και τους μάρτυρες διαλύτη για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, προσθήκη τροφής στο έδαφος, ζύγιση και τυχαία κατανομή των σκωλήκων στα δοχεία δοκιμής, κράτηση επαρκών επιμέρους δειγμάτων σκωλήκων για τον προσδιορισμό των αναλυτικών τιμών υποβάθρου, του υγρού και ξηρού βάρους και του λιπιδικού περιεχομένου, ζύγιση όλων των δοχείων δοκιμής για τον έλεγχο της υγρασίας του εδάφους, έλεγχος της παροχής αέρα, εάν χρησιμοποιείται κλειστό σύστημα δοκιμών
1	Έλεγχος της παροχής αέρα, καταγραφή της συμπεριφοράς των σκωλήκων και της θερμοκρασίας, δειγματοληψία εδάφους και σκωλήκων για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του υπό δοκιμή στοιχείου
2	Ομοίως με την 1η ημέρα
3	Έλεγχος της παροχής αέρα, της συμπεριφοράς των σκωλήκων και της θερμοκρασίας
4	Ομοίως με την 1η ημέρα
5 - 6	Ομοίως με την 3η ημέρα
7	Ομοίως με την 1η ημέρα· προσθήκη τροφής στο έδαφος, έλεγχος της υγρασίας του εδάφους με νέα ζύγιση των δοχείων δοκιμής και αναπλήρωση του εξατμισθέντος νερού
9	Ομοίως με την 1η ημέρα
10	Ομοίως με την 3η ημέρα

▼**M4**

Ημέρα	Δραστηριότητα
11	Ομοίως με την 1η ημέρα
12 - 13	Ομοίως με την 3η ημέρα
14	Ομοίως με την 1η ημέρα· προσθήκη τροφής στο έδαφος, μέτρηση της θερμοκρασίας και του pH του εδάφους, έλεγχος της υγρασίας του εδάφους με νέα ζύγιση των δοχείων δοκιμής, τέλος της φάσης πρόσληψης, μεταφορά των σκωλήκων από τα υπόλοιπα εκτεθέντα πολλαπλά δοχεία σε δοχεία που περιέχουν καθαρό έδαφος για τη φάση αποβολής (χωρίς κένωση εντέρου), δειγματοληψία εδάφους και σκωλήκων από τους μάρτυρες διαλύτη
	Οι δραστηριότητες πριν από την έκθεση (φάση εξισορρόπησης) θα πρέπει να προγραμματίζονται με γνώμονα τις ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.
	Οι δραστηριότητες που περιγράφονται για την 3η ημέρα πρέπει να διεξάγονται καθημερινά (τουλάχιστον κατά τις εργάσιμες ημέρες).

▼M4

Προσάρτημα 4

Τεχνητό έδαφος — συστάσεις για την παρασκευή και την αποθήκευση

Επειδή ενδέχεται να μην είναι διαθέσιμο φυσικό έδαφος από μια συγκεκριμένη πηγή καθ' όλη τη διάρκεια του έτους και οι αυτόχθονες οργανισμοί, καθώς και η παρουσία μικρορύπων, μπορούν να επηρεάσουν τη δοκιμή, συνιστάται να χρησιμοποιείται στην παρούσα δοκιμή τεχνητό υπόστρωμα —το τεχνητό έδαφος κατά το κεφάλαιο Γ.8 του παρόντος παραρτήματος «Τοξικότητα για τους γαιοσκώληκες»(48). Διάφορα υπό δοκιμή είδη μπορούν να επιβιώνουν, να αναπτύσσονται και να αναπαράγονται στο έδαφος αυτό, ενώ εξασφαλίζεται μέγιστη τυποποίηση, καθώς και ενδοεργαστηριακή και διεργαστηριακή συγκρισιμότητα των συνθηκών δοκιμής και των καλλιέργειας.

Συστατικά του εδάφους

Τύρφη:	10 %	Τύρφη σφάγνων, σύμφωνα με την κατευθυντήρια γραμμή 207 του ΟΟΣΑ (48)
Χαλαζιακή άμμος:	70 %	Βιομηχανική χαλαζιακή άμμος (αερόξηρη). Κοκκομετρία: άνω του 50 % των σωματιδίων θα πρέπει να έχουν μέγεθος 50-200 μm, αλλά όλα τα σωματίδια θα πρέπει να είναι ≤ 2 mm
Καολινιτική άργιλος:	20 %	Περιεκτικότητα σε καολινίτη ≥ 30 %
Ανθρακικό ασβέστιο:	≤ 1 %	$CaCO_3$, κονιοποιημένο, χημικά καθαρό

Προαιρετικά, μπορεί να μειωθεί η περιεκτικότητα του τεχνητού εδάφους σε οργανικό άνθρακα, π.χ. με ελάττωση της περιεκτικότητας σε τύρφη σε 4-5 % επί ξηρού εδάφους και ανάλογη αύξηση της περιεκτικότητας σε άμμο. Με αυτή τη μείωση της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα, είναι δυνατόν να μειωθούν οι δυνατότητες προσρόφησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο έδαφος (οργανικός άνθρακας) και να αυξηθεί η διαθεσιμότητά της για τους σκώληκες (74). Έχει καταδειχθεί ότι τα είδη *Enchytraeus albidus* και *Eisenia fetida* μπορούν να πληρούν τα κριτήρια εγκυρότητας σχετικά με την αναπαραγωγή, όταν υποβάλλονται σε δοκιμές με γεωργικά εδάφη χαμηλότερης περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα, π.χ. 2,7 % (33), (61), και η πείρα δείχνει ότι αυτό μπορεί να επιτευχθεί και σε τεχνητό έδαφος με 5 % τύρφης.

Παρασκευή

Τα ξηρά συστατικά του εδάφους αναμιγνύονται επιμελώς (π.χ. σε εργαστηριακό αναμείκτη μεγάλης κλίμακας). Αυτό θα πρέπει να γίνεται περίπου μία εβδομάδα πριν από την έναρξη της δοκιμής. Το μείγμα των ξηρών συστατικών του εδάφους πρέπει να υγραίνεται με απιονισμένο νερό, τουλάχιστον 48 ώρες πριν από την εφαρμογή του υπό δοκιμή στοιχείου, για την εξισορρόπηση/σταθεροποίηση της οξύτητας. Για τον προσδιορισμό του pH χρησιμοποιείται μείγμα εδάφους και διαλύματος KCl 1 M σε αναλογία 1:5. Εάν η τιμή του pH δεν περικλείεται εντός του απαιτούμενου εύρους (6,0 ± 0,5), προστίθεται στο έδαφος επαρκής ποσότητα $CaCO_3$ ή παρασκευάζεται νέα παρτίδα εδάφους.

Η μέγιστη υδατοχωρητικότητα (WHC) του τεχνητού εδάφους προσδιορίζεται σύμφωνα με το πρότυπο ISO 11268-2 (35). Τουλάχιστον δύο ημέρες πριν από την έναρξη της δοκιμής, το ξηρό τεχνητό έδαφος υγραίνεται με την προσθήκη επαρκούς ποσότητας απιονισμένου ή ανασυσταθέντος νερού ώστε να επιτευχθεί περίπου το ήμισυ της τελικής υγρασίας, η οποία θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 40 % και 60 % της μέγιστης WHC. Κατά την έναρξη της δοκιμής, το προηγουμένως υγρανθέν έδαφος χωρίζεται σε τόσες παρτίδες όσες και ο αριθμός των συγκεντρώσεων δοκιμής και των μαρτύρων που χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή και η υγρασία ρυθμίζεται σε 40-60 % της μέγιστης WHC με το διάλυμα του υπό δοκιμή στοιχείου και/ή με την προσθήκη απιονισμένου ή ανασυσταθέντος νερού. Η υγρασία προσδιορίζεται στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής (στους 105 °C) και θα πρέπει να είναι η βέλτιστη για τις ανάγκες των ειδών (μπορεί επίσης να ελεγχθεί ως εξής: όταν το έδαφος συμπιέζεται ήπια με το χέρι, θα πρέπει να εμφανίζονται μικρές σταγόνες νερού μεταξύ των δακτύλων).

▼**M4**

Αποθήκευση

Τα ξηρά συστατικά του τεχνητού εδάφους μπορούν να φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι τη χρήση. Το έτοιμο, προηγουμένως υγρανθέν έδαφος μπορεί να φυλάσσεται σε δροσερό χώρο για μέγιστο χρονικό διάστημα τριών ημερών πριν από τον εμβολιασμό. Πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για την ελαχιστοποίηση της εξάτμισης του νερού. Το έδαφος που έχει εμβολιαστεί με το υπό δοκιμή στοιχείο θα πρέπει να χρησιμοποιείται αμέσως, εκτός εάν υπάρχουν πληροφορίες σύμφωνα με τις οποίες το συγκεκριμένο έδαφος μπορεί να αποθηκεύεται χωρίς να επηρεάζονται η τοξικότητα και η βιοδιαθεσιμότητα του υπό δοκιμή στοιχείου. Στη συνέχεια, δείγματα του εμβολιασμένου εδάφους μπορούν να φυλάσσονται στις συνθήκες που συνιστώνται για το συγκεκριμένο υπό δοκιμή στοιχείο, μέχρι την ανάλυση.

▼M4

Προσάρτημα 5

Είδη χερσαίων ολιγοχαίτων που συνιστώνται για τη δοκιμή βιοσυσσώρευσης από το έδαφος

Γαιοσκώληκες

Το συνιστώμενο για τη δοκιμή είδος είναι το *Eisenia fetida* (Savigny 1826), που ανήκει στην οικογένεια Lumbricidae. Από το 1972 διακρίνονται δύο υποείδη [*Eisenia fetida* και *Eisenia andrei* (10)]. Κατά τον Jaenike (36), είναι γνήσια χωριστά είδη. Το *Eisenia fetida* αναγνωρίζεται εύκολα από τις φωτεινές μεσοτμηματικές κίτρινες ταινίες του, ενώ το *Eisenia andrei* έχει ομοιόμορφο, σκούρο κόκκινο χρώμα. Προέρχονται πιθανότατα από την περιοχή του Εύξεινου Πόντου και σήμερα είναι εμφανίζουν παγκόσμια κατανομή, ιδίως σε ανθρωπογενώς τροποποιημένα ενδιαιτήματα, όπως σε σωρούς κομποστοποίησης. Μπορούν και τα δύο να χρησιμοποιηθούν για οικοτοξικολογικές δοκιμές, καθώς και για δοκιμές βιοσυσσώρευσης.

Τα *Eisenia fetida* και *Eisenia andrei* διατίθενται στο εμπόριο, π.χ. ως δόλωμα για ψάρια. Σε σύγκριση με άλλους γαιοσκώληκες της οικογένειας Lumbricidae, έχουν μικρό κύκλο ζωής, φθάνοντας σε ωρίμαση σε 2 έως 3 μήνες περίπου (σε θερμοκρασία δωματίου). Η βέλτιστη θερμοκρασία τους είναι περίπου 20-24 °C. Προτιμούν σχετικώς υγρά υποστρώματα με σχεδόν ουδέτερο pH και υψηλή περιεκτικότητα σε οργανική ύλη. Δεδομένου ότι τα είδη αυτά χρησιμοποιούνται ευρέως σε τυποποιημένες οικοτοξικολογικές δοκιμές για περίπου 25 χρόνια, η καλλιέργεια τους έχει καθιερωθεί (48)(77).

Τα δύο είδη μπορούν να αναπαράγονται σε ευρύ φάσμα ζωικών αποβλήτων. Το μέσο αναπαραγωγής που συνιστά ο ISO (35) είναι ένα μείγμα κοπριάς αλόγου ή βοοειδών και τύρφης σε αναλογία 50:50. Το μέσο θα πρέπει να έχει τιμή pH περίπου 6 έως 7 (ρυθμίζεται με ανθρακικό ασβέστιο), χαμηλή ιοντική αγωγιμότητα (κάτω των 6 mS/cm ή συγκέντρωση άλατος κάτω του 0,5 %) και να μην είναι υπερβολικά μολυσμένο από αμμωνία ή ούρα ζώων. Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα διαθέσιμο στο εμπόριο χώμα κηπουρικής χωρίς πρόσθετα ή τεχνητό έδαφος σύμφωνα με την κατευθυντήρια γραμμή του ΟΟΣΑ (48) ή μείγμα των δύο σε αναλογία 50:50. Το υπόστρωμα πρέπει να είναι υγρό αλλά όχι μουσκεμένο. Κατάλληλα για χρήση είναι τα κουτιά αναπαραγωγής των 10 έως 50 λίτρων.

Για να ληφθούν σκώληκες κανονικής ηλικίας και μάζας, είναι προτιμότερο να αρχίσει η καλλιέργεια με κουκούλια. Ως εκ τούτου, προστίθενται ενήλικοι σκώληκες σε ένα κουτί αναπαραγωγής που περιέχει φρέσκο υπόστρωμα για την παραγωγή κουκουλιών. Η πρακτική εμπειρία δείχνει ότι επιτυγχάνονται ικανοποιητικά ποσοστά αναπαραγωγής με πυκνότητα πληθυσμού περίπου 100 ενήλικων σκωλήκων ανά kg υποστρώματος (υγρό βάρος). Μετά από 28 ημέρες, απομακρύνονται οι ενήλικοι σκώληκες. Οι γαιοσκώληκες που έχουν εκκολαφθεί από τα κουκούλια χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή όταν ωριμάσουν, μετά από τουλάχιστον 2 μήνες, αλλά σε λιγότερο από 12 μήνες.

Οι σκώληκες των ειδών που περιγράφονται ανωτέρω θεωρούνται υγιείς εάν κινούνται μέσα στο υπόστρωμα, δεν προσπαθούν να το εγκαταλείψουν και αναπαράγονται συνεχώς. Η πολύ αργή κίνηση ή ένα κίτρινο οπίσθιο άκρο (στην περίπτωση των *Eisenia fetida*) υποδηλώνει εξάντληση του υποστρώματος. Στην περίπτωση αυτή, συνιστάται η ανανέωση του υποστρώματος και/ή η μείωση του αριθμού των ζώων ανά κουτί.

Πρόσθετες επιλεγμένες βιβλιογραφικές παραπομπές

Gerard B.M. (1964), Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. *Linnean Soc. London* 6: 1-58.

Graff O. (1953), Die Regenwürmer Deutschlands, *Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch.* 7: 1-81.

Römbke J., Egeler P., Füll C. (1997), Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S. (1977), Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden, *Oikos* 28: 49-55.

Satchell J.E. (1955), Some aspects of earthworm ecology, *Soil Zoology* (Kevan): 180-201.

▼M4

Sims R.W. και Gerard B.M. (1985), A synopsis of the earthworms, *Linnean Soc. London* 31: 1-171.

Tomlin A.D. (1984), The earthworm bait market in North America. In: Earthworm Ecology - from Darwin to vermiculture, Satchell J.E. (ed.), Chapman & Hall, London, 331-338 pp.

Enchytraeidae

Το συνιστώμενο για τη δοκιμή είδος είναι το *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (λευκός σκώληκας). Τα *Enchytraeus albidus* είναι ένα από τα μεγαλύτερου μήκους (έως 15 mm) είδη της οικογένειας Enchytraeidae, με παγκόσμια κατανομή, π.χ. (8). Το *Enchytraeus albidus* εντοπίζεται σε θαλάσσια, λιμναία και χερσαία ενδιαιτήματα, κυρίως σε αποσυντιθέμενη οργανική ύλη (φύκια, κομπόστ) και σπανίως σε λειμώνες (42). Αυτή η ευρεία οικολογική ανοχή και ορισμένες μορφολογικές παραλλαγές δείχνουν ότι μπορεί να υπάρχουν διαφορετικές φυλές αυτού του είδους.

Το *Enchytraeus albidus* είναι διαθέσιμο στο εμπόριο, πωλούμενο ως τροφή για ψάρια. Θα πρέπει να ελέγχεται αν η καλλιέργεια είναι μολυσμένη από άλλα, συνήθως μικρότερα είδη (60). Σε περίπτωση μόλυνσης, όλοι οι σκώληκες θα πρέπει να εκπλύνονται με νερό σε τρυβλίο Petri. Στη συνέχεια, επιλέγονται μεγάλα ενήλικα δείγματα *Enchytraeus albidus* (με τη χρήση στερεομικροσκοπίου) για να ξεκινήσει μια νέα καλλιέργεια. Όλοι οι υπόλοιποι σκώληκες απορρίπτονται. Ο κύκλος ζωής τους είναι σύντομος, καθώς φθάνουν σε ωρίμαση εντός 33 (στους 18 °C) έως 74 ημερών (στους 12 °C). Για τη δοκιμή θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο καλλιέργειες που έχουν παραμείνει στο εργαστήριο για τουλάχιστον 5 εβδομάδες (μία γενεά), χωρίς να έχουν παρουσιαστεί προβλήματα.

Κατάλληλα είναι και άλλα είδη του γένους *Enchytraeus*, ιδιαίτερα το *Enchytraeus luxuriosus*. Το είδος αυτό είναι πραγματικός κάτοικος του εδάφους, που έχει περιγραφεί πρόσφατα στη δημοσίευση (65). Εάν χρησιμοποιούνται άλλα είδη *Enchytraeus*, θα πρέπει να προσδιορίζονται σαφώς και να αιτιολογείται η επιλογή τους.

Το *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe 1992) είναι ένα είδος που ανήκει στην ίδια οικογένεια με το *Enchytraeus luxuriosus*. Δεν έχει διαπιστωθεί με βεβαιότητα αν απαντά στο έδαφος, δεδομένου ότι έχει περιγραφεί μόνο η παρουσία του σε καλλιέργειες γαιοσκωλήκων και σωρούς κομποστοποίησης (Römbke 2003). Επομένως, δεν είναι γνωστές οι αρχικές οικολογικές απαιτήσεις του. Ωστόσο, πρόσφατες εργαστηριακές μελέτες σε διάφορα γεωργικά εδάφη επιβεβαιώνουν ότι το είδος αυτό έχει ευρεία ανοχή προς τις ιδιότητες του εδάφους όπως το pH και η υφή (Jänsch και άλλοι 2005). Κατά τα τελευταία έτη, το είδος αυτό έχει συχνά χρησιμοποιηθεί σε οικοτοξικολογικές μελέτες, λόγω της απλής αναπαραγωγής και δοκιμής του, π.χ. Kuperman και άλλοι 2003). Ωστόσο, είναι μικρού μήκους (3-12 mm, 7 mm κατά μέσο όρο) (Westheide & Müller 1996), γεγονός που δυσχεραίνει τον χειρισμό του σε σύγκριση με το *Enchytraeus albidus*. Όταν χρησιμοποιείται το είδος αυτό αντί του *Enchytraeus albidus*, το μέγεθος του δοχείου δοκιμής μπορεί, χωρίς να είναι απαραίτητο, να είναι μικρότερο. Επιπλέον, πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι το είδος αυτό αναπαράγεται πολύ γρήγορα, με χρόνο γενεάς μικρότερο από 20 ημέρες στους 20 ± 2 °C (Achazi και άλλοι 1999) και ακόμη πιο γρήγορα σε υψηλότερες θερμοκρασίες.

Οι σκώληκες του είδους *Enchytraeus albidus* (καθώς και άλλα είδη *Enchytraeus*) μπορούν να αναπαράγονται σε μεγάλα πλαστικά κουτιά (π.χ. διαστάσεων 30 × 60 × 10 cm ή 20 × 12 × 8 cm, κατάλληλα για την καλλιέργεια σκωλήκων μικρού μεγέθους) τα οποία πληρούνται με ένα μείγμα τεχνητού εδάφους και διαθέσιμου στο εμπόριο, μη μολυσμένου χώματος κηπουρικής χωρίς πρόσθετα. Το υλικό κομποστοποίησης θα πρέπει να αποφεύγεται, δεδομένου ότι μπορεί να περιέχει τοξικές χημικές ουσίες, όπως βαρέα μέταλλα. Πριν από τη χρήση θα πρέπει να αφαιρείται η πανίδα από το έδαφος αναπαραγωγής, με τριπλή κατάψυξη. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί καθαρό τεχνητό έδαφος, αλλά ο ρυθμός αναπαραγωγής μπορεί να είναι βραδύτερος σε σύγκριση με εκείνον που επιτυγχάνεται με ανάμεικτα υποστρώματα. Το υπόστρωμα θα πρέπει να έχει pH 6,0 ± 0,5. Η καλλιέργεια διατηρείται σε επωαστήρα σε θερμοκρασία 15 ± 2 °C χωρίς φως. Σε κάθε περίπτωση, θα πρέπει να αποφεύγονται θερμοκρασίες υψηλότερες από 23 °C. Όσον αφορά την υγρασία του τεχνητού/φυσικού εδάφους, αυτό θα πρέπει να είναι υγρό αλλά όχι μουσκεμένο. Όταν το έδαφος συμπιέζεται ήπια με το χέρι, θα πρέπει να εμφανίζονται μόνο μικρές σταγόνες νερού. Σε κάθε περίπτωση, θα πρέπει να αποφεύγονται οι ανοξικές συνθήκες (π.χ. εάν χρησιμοποιείται κάλυμμα, ο αριθμός των οπών του καλύμματος θα πρέπει να είναι αρκετά μεγάλος ώστε να εξασφαλίζεται επαρκής εναλλαγή αέρα). Το έδαφος αναπαραγωγής θα πρέπει να αερίζεται με προσεκτική ανάμειξη μία φορά την εβδομάδα.

▼M4

Οι σκώληκες θα πρέπει να σιτίζονται τουλάχιστον μία φορά ανά εβδομάδα, κατά βούληση, με νιφάδες βρώμης οι οποίες τοποθετούνται σε μια κοιλότητα στην επιφάνεια του εδάφους και καλύπτονται με χώμα. Εάν η τροφή από την τελευταία ημερομηνία χορήγησης παραμένει στο δοχείο, θα πρέπει να προσαρμόζεται αναλόγως η ποσότητα της χορηγούμενης τροφής. Εάν αναπτύσσονται μύκητες στα υπολείμματα τροφής, αυτή θα πρέπει να αντικαθίσταται από νέα ποσότητα νιφάδων βρώμης. Προκειμένου να τονωθεί η αναπαραγωγή, οι νιφάδες βρώμης μπορούν να συμπληρώνονται με διαθέσιμη στο εμπόριο, τροποποιημένη βιταμινούχο σκόνη πρωτεΐνης ανά δύο εβδομάδες. Μετά από τρεις μήνες, τα ζώα μεταφέρονται σε προσφάτως παρασκευασμένη καλλιέργεια ή υπόστρωμα αναπαραγωγής. Οι νιφάδες βρώμης, οι οποίες θα πρέπει να φυλάσσονται σε σφραγισμένα δοχεία, πρέπει να αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο ή να θερμαίνονται πριν από τη χρήση, ώστε να αποφεύγονται μολύνσεις από ακάρεα σιτηρών (π.χ. *Glyzyphagus* sp., Astigmata, Acarina) ή θηρευτικά ακάρεα [π.χ. *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles, Gamasida, Acarina*]. Μετά την απολύμανση, η τροφή αλέθεται ώστε να μπορεί εύκολα να διασκορπιστεί στην επιφάνεια του εδάφους. Μια άλλη πιθανή πηγή τροφής είναι οι ζύμες αρτοποιίας ή η τροφή ψαριών Tetra-Min®.

Σε γενικές γραμμές, οι συνθήκες καλλιέργειας είναι επαρκείς, εάν οι σκώληκες δεν προσπαθούν να εγκαταλείψουν το υπόστρωμα, κινούνται γρήγορα μέσα στο έδαφος, παρουσιάζουν στιλπνή εξωτερική επιφάνεια χωρίς προσκολλημένα σωματίδια του εδάφους, και έχουν περισσότερο ή λιγότερο υπόλευκο χρώμα, καθώς και εάν είναι ορατοί σκώληκες διαφόρων ηλικιών. Στην πραγματικότητα, οι σκώληκες μπορούν να θεωρηθούν υγιείς, εάν αναπαράγονται συνεχώς.

Πρόσθετες επιλεγμένες βιβλιογραφικές παραπομπές

Achazi R.K., Fröhlich E., Henneken M., Pilz C. (1999), The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta), Newsletter on Enchytraeidae 6: 117-126.

Jänsch S., Amorim M.J.B., Römbke J. (2005), Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species, *Environ. Reviews* 13: 51-83.

Kuperman R.G., Checkai R.T., Simini M., Phillips C.T., Kolakowski J.E., Kurnas C.W., Sunahara G.I. (2003), Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX, *Pedobiologia* 47: 651-656.

Römbke J. (2003), Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review, *Pedobiologia* 47: 607-616.

Westheide W. και Graefe U. (1992), Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida), *J. Nat. Hist.* 26: 479-488.

Westheide W. και Müller M.C. (1996), Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology, *Hydrobiologia* 334: 263-267.

▼M6

Γ.31. ΔΟΚΙΜΗ ΣΕ ΧΕΡΣΑΙΑ ΦΥΤΑ: ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΑΔΥΣΗΣ ΣΠΟΡΟΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΠΟΡΟΦΥΤΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμής είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 208 του ΟΟΣΑ (2006). Οι μέθοδοι δοκιμών επανεξετάζονται περιοδικά με βάση την επιστημονική πρόοδο και την εφαρμοσιμότητά τους στην κανονιστική χρήση. Η παρούσα επικαιροποιημένη μέθοδος δοκιμών έχει σχεδιαστεί με σκοπό να εκτιμηθούν οι δυνητικές επιδράσεις των χημικών ουσιών στην ανάδυση και την ανάπτυξη σποροφύτων. Ως τέτοια, δεν καλύπτει τις χρόνιες επιδράσεις ή τις επιδράσεις στην αναπαραγωγή (δηλ. σπορόδεση, σχηματισμός ανθέων, ωρίμανση καρπών). Πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι συνθήκες έκθεσης και οι ιδιότητες της χημικής ουσίας που πρόκειται να υποβληθεί σε δοκιμή, ώστε να εξασφαλίζεται ότι χρησιμοποιούνται οι ενδεικνυόμενες μέθοδοι δοκιμών (π.χ. κατά τη δοκιμή μετάλλων / μεταλλικών ενώσεων θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι επιδράσεις του pH και των αντίστοιχων αντισταθμιστικών ιόντων) (1). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν αφορά τα φυτά που εκτίθενται σε ατμούς χημικών ουσιών. Η μέθοδος εφαρμόζεται στις δοκιμές χημικών ουσιών εν γένει, βιοκτόνων και προϊόντων προστασίας των καλλιεργειών (γνωστών και ως φυτοπροστατευτικών προϊόντων ή παρασιτοκτόνων). Έχει αναπτυχθεί με βάση υφιστάμενες μεθόδους (2) (3) (4) (5) (6) (7). Ελήφθησαν επίσης υπόψη άλλες παραπομπές που αφορούν τις δοκιμές σε φυτά (8) (9) (10). Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

2. Η δοκιμή εκτιμά τις επιδράσεις στην ανάδυση σποροφύτων και την αρχική ανάπτυξη ανώτερων φυτών έπειτα από έκθεση στην υπό δοκιμή χημική ουσία στο έδαφος (ή σε άλλη κατάλληλη μήτρα εδάφους). Οι σπόροι τοποθετούνται σε έδαφος που έχει υποστεί αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία, και εκτιμώνται οι επιδράσεις μετά την πάροδο συνήθως 14 έως 21 ημερών έπειτα από ανάδυση του 50 % των σποροφύτων στην ομάδα ελέγχου. Τα μετρούμενα τελικά σημεία είναι η οπτική εκτίμηση της ανάδυσης σποροφύτων, το ξηρό βάρος των βλαστών (εναλλακτικά, το υγρό βάρος των βλαστών) και, σε ορισμένες περιπτώσεις, το ύψος των βλαστών, καθώς και η εκτίμηση των εμφανών βλαβερών επιδράσεων σε διάφορα μέρη του φυτού. Αυτές οι μετρήσεις και οι παρατηρήσεις συγκρίνονται με τις αντίστοιχες για τα φυτά ελέγχου που δεν έχουν υποβληθεί σε αγωγή.

3. Ανάλογα με την αναμενόμενη οδό έκθεσης, η υπό δοκιμή χημική ουσία είτε ενσωματώνεται στο έδαφος (ή, ενδεχομένως, σε τεχνητή μήτρα εδάφους) είτε εφαρμόζεται στην επιφάνεια του εδάφους, κάτι που αντιπροσωπεύει ακριβώς την πιθανή οδό έκθεσης στη χημική ουσία. Η ενσωμάτωση στο έδαφος πραγματοποιείται με αγωγή του χύδην εδάφους. Μετά την εφαρμογή, το έδαφος μεταφέρεται σε δοχεία και, στη συνέχεια, οι σπόροι του συγκεκριμένου είδους φυτού φυτεύονται στο έδαφος. Οι επιφανειακές εφαρμογές πραγματοποιούνται σε έδαφος μέσα σε δοχείο στο οποίο έχουν ήδη φυτευθεί οι σπόροι. Στη συνέχεια, οι μονάδες δοκιμής (μάρτυρες και εδάφη που έχουν υποστεί αγωγή συν σπόροι) τοποθετούνται σε κατάλληλες συνθήκες που ευνοούν την εκβλάστηση/ανάπτυξη των φυτών.

4. Ανάλογα με τον επιδιωκόμενο σκοπό, η δοκιμή μπορεί να διεξάγεται για τον προσδιορισμό της καμπύλης δόσης-απόκρισης, ή σε μία συγκέντρωση/ποσότητα ως οριακή δοκιμή. Εάν τα αποτελέσματα από τη δοκιμή σε μία συγκέντρωση/ποσότητα υπερβαίνουν ένα συγκεκριμένο όριο τοξικότητας (π.χ. εάν διαπιστώνονται επιδράσεις που υπερβαίνουν το x %), διενεργείται δοκιμή προσδιορισμού του εύρους τιμών με σκοπό να προσδιοριστεί το ανώτερο και το κατώτερο όριο τοξικότητας και, στη συνέχεια, δοκιμή σε πολλαπλές συγκεντρώσεις/ποσότητες, με σκοπό τη χάραξη καμπύλης δόσης-απόκρισης. Εφαρμόζεται κατάλληλη στατιστική ανάλυση, για να ληφθεί η αποτελεσματική συγκέντρωση EC_x ή η αποτελεσματική ποσότητα εφαρμογής ER_x (π.χ. EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}) για την(τις) πιο ευαίσθητη(-ες) ενδεικνυόμενη(-ες) παράμετρο(-τρους). Με αυτή τη δοκιμή μπορούν επίσης να υπολογιστούν η συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC) και η κατώτατη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης (LOEC).

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

5. Οι ακόλουθες πληροφορίες είναι χρήσιμες για τον καθορισμό της αναμενόμενης οδού έκθεσης στη χημική ουσία και για τον σχεδιασμό της δοκιμής: ο συντακτικός τύπος, η καθαρότητα, η υδατοδιαλυτότητα, η διαλυτότητα σε

▼M6

οργανικούς διαλύτες, ο συντελεστής κατανομής σε 1-οκτανόλη/νερό, η προσροφητική συμπεριφορά του εδάφους, η τάση ατμών, η χημική σταθερότητα στο νερό και στο φως, και η βιοαποικοδομησιμότητα.

ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

6. Η δοκιμή θεωρείται έγκυρη, εάν διαπιστώνεται κατόπιν ελέγχων ότι ικανοποιούνται τα ακόλουθα κριτήρια επιδόσεων:

— η ανάδυση σποροφύτων είναι τουλάχιστον 70 %·

— τα σπορόφυτα δεν παρουσιάζουν εμφανείς φυτοτοξικές επιδράσεις (π.χ. χλώρωση, νέκρωση, μάρανση, παραμόρφωση των φύλλων και των μίσχων) και τα φυτά παρουσιάζουν μόνο τη συνηθισμένη, για το συγκεκριμένο είδος, διακύμανση ως προς την ανάπτυξη και τη μορφολογία·

— η μέση επιβίωση των σποροφύτων ελέγχου που έχουν αναδυθεί είναι τουλάχιστον 90 % κατά τη διάρκεια της δοκιμής·

— οι περιβαλλοντικές συνθήκες για ένα συγκεκριμένο είδος είναι ταυτόσημες και τα θρεπτικά μέσα περιέχουν την ίδια ποσότητα μήτρας εδάφους, υποστηρικτικών θρεπτικών μέσων, ή υποστρώματος από την ίδια πηγή.

ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

7. Η χημική ουσία αναφοράς μπορεί να υποβάλλεται σε δοκιμή ανά τακτά χρονικά διαστήματα, για να επαληθευτεί ότι η εκτέλεση της δοκιμής και η απόκριση των συγκεκριμένων φυτών της δοκιμής, καθώς και οι συνθήκες της δοκιμής δεν έχουν μεταβληθεί σημαντικά με την πάροδο του χρόνου. Εναλλακτικά, θα μπορούσαν να χρησιμοποιούνται οι παλαιότερες μετρήσεις της βιομάζας ή της ανάπτυξης των μαρτύρων, ώστε να αξιολογούνται οι επιδόσεις του συστήματος δοκιμής σε συγκεκριμένα εργαστήρια, και να λειτουργούν ως μέτρα ελέγχου της ενδοεργαστηριακής ποιότητας.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Φυσικό έδαφος — Τεχνητό υπόστρωμα

8. Τα φυτά μπορούν να αναπτύσσονται σε δοχεία με αμμώδη πηλό, πηλώδη άμμο ή αμμοαργιλώδη πηλό, που να περιέχει έως 1,5 τοις εκατό οργανικό άνθρακα (περίπου 3 τοις εκατό οργανική ύλη). Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί χώμα εμπορίου για γλάστρες ή μείγμα συνθετικού εδάφους που να περιέχει έως 1,5 τοις εκατό οργανικό άνθρακα. Τα αργιλώδη εδάφη δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται, εάν είναι γνωστό ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία έχει υψηλή συγγένεια με την άργιλο. Το έδαφος αγρού θα πρέπει να διέρχεται από κόσκινο με οπές μεγέθους 2 mm, ώστε να ομογενοποιείται και να απομακρύνονται τα χονδρόκοκκα σωματίδια. Θα πρέπει να δηλώνονται ο τύπος και η υφή, το ποσοστό (%) οργανικού άνθρακα, το pH και η περιεκτικότητα σε άλατα, καθώς και η ηλεκτρονική αγωγιμότητα του τελικού προετοιμασμένου εδάφους. Το έδαφος θα πρέπει να ταξινομείται σύμφωνα με τυποποιημένο σύστημα ταξινόμησης (11). Το έδαφος θα μπορούσε να υποβάλλεται σε παστερίωση ή σε θερμική επεξεργασία, ώστε να μειώνεται η επίδραση των παθογόνων του εδάφους.

9. Το φυσικό έδαφος μπορεί να περιπλέξει την ερμηνεία των αποτελεσμάτων και να αυξήσει τη μεταβλητότητα, λόγω των διαφορετικών φυσικών/χημικών ιδιοτήτων και μικροβιακών πληθυσμών. Με τη σειρά τους, αυτές οι μεταβλητές μεταβάλλουν την ικανότητα κατακράτησης υγρασίας, την ικανότητα δημιουργίας χημικών δεσμών, τον αερισμό και την περιεκτικότητα σε θρεπτικά στοιχεία και ιχνοστοιχεία. Εκτός από τη μεταβλητότητα των συγκεκριμένων φυσικών παραγόντων, θα υπάρξει μεταβλητότητα και στις χημικές ιδιότητες, όπως στο pH και στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό, οι οποίες ενδέχεται να επηρεάσουν τη βιοδιαθεσιμότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (12) (13) (14).

10. Κατά κανόνα, τα τεχνητά υποστρώματα δεν χρησιμοποιούνται για τη διεξαγωγή δοκιμών σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα, αλλά μπορεί να χρησιμοποιούνται για τη διεξαγωγή δοκιμών σε χημικές ουσίες εν γένει ή όταν είναι επιθυμητό να ελαχιστοποιηθεί η μεταβλητότητα των φυσικών εδαφών και να αυξηθεί η συγκρισιμότητα των αποτελεσμάτων των δοκιμών. Τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται θα πρέπει να αποτελούνται από αδρανή υλικά που ελαχιστοποιούν την αλληλεπίδραση με την υπό δοκιμή χημική ουσία, τον φορέα διαλύτη, ή και τα δύο. Έχει διαπιστωθεί ότι η

▼M6

εκπλυμένη με οξύ χαλαζιακή άμμος, ο ορυκτοβάμβακας και τα γυάλινα σφαιρίδια (π.χ. με διάμετρο 0,35 έως 0,85 mm) συνιστούν κατάλληλα αδρανή υλικά που απορροφούν ελάχιστα την υπό δοκιμή χημική ουσία (15), εξασφαλίζοντας έτσι τη μέγιστη διαθεσιμότητα της χημικής ουσίας στο σπορόφυτο μέσω πρόσληψης από τις ρίζες. Ορισμένα από τα ακατάλληλα υποστρώματα είναι ο βερμικουλίτης, ο περλίτης και άλλα εξαιρετικά απορροφητικά υλικά. Θα πρέπει να παρέχονται τα θρεπτικά στοιχεία για την ανάπτυξη των φυτών, ώστε να εξασφαλίζεται ότι τα φυτά δεν υφίστανται καταπόνηση λόγω ανεπάρκειας θρεπτικών στοιχείων, κάτι που θα πρέπει να εκτιμάται, όταν είναι εφικτό, μέσω χημικής ανάλυσης ή με οπτική αξιολόγηση των φυτών ελέγχου.

Κριτήρια για την επιλογή των υπό δοκιμή ειδών

11. Τα είδη που επιλέγονται θα πρέπει να ανήκουν σε ικανοποιητικά εκτενές φάσμα –π.χ. όσον αφορά την ταξινομική πολυμορφία τους στο φυτικό βασίλειο, την κατανομή τους, την αφθονία τους, τα χαρακτηριστικά του κύκλου ζωής τους και την περιοχή της φυσικής παρουσίας τους–, ώστε να αναπτύσσεται ένα εύρος αποκρίσεων (8) (10) (16) (17) (18) (19) (20). Για την επιλογή θα πρέπει να εξετάζονται τα ακόλουθα χαρακτηριστικά των πιθανών υπό δοκιμή ειδών:

— τα είδη έχουν ομοιόμορφους σπόρους οι οποίοι είναι άμεσα διαθέσιμοι από αξιόπιστες τυποποιημένες πηγές και παράγουν σταθερή, αξιόπιστη και ομοιόμορφη εκβλάστηση, καθώς και ομοιόμορφη ανάπτυξη των σποροφύτων·

— τα φυτά μπορούν να υποβάλλονται σε δοκιμές στο εργαστήριο και μπορούν να παράγουν αξιόπιστα και αναπαραγώγιμα αποτελέσματα εντός της ίδιας εγκατάστασης δοκιμών ή μεταξύ διαφορετικών εγκαταστάσεων δοκιμών·

— η ευαισθησία των υπό δοκιμή ειδών θα πρέπει να αντιστοιχεί στις αποκρίσεις των φυτών τα οποία βρίσκονται στο περιβάλλον που εκτίθεται στη χημική ουσία·

— έχουν χρησιμοποιηθεί, ως έναν βαθμό, σε προηγούμενες δοκιμές τοξικότητας και η χρήση τους –π.χ. σε βιοδοκιμασίες ζιζανιοκτόνων, στο κοσκίνισμα βαρέων μετάλλων, σε δοκιμές αντοχής στην αλατότητα ή σε ανόργανες ουσίες, ή σε μελέτες αλληλοπάθειας– παρουσιάζει ευαισθησία σε μεγάλο φάσμα παραγόντων καταπόνησης·

— είναι συμβατά με τις συνθήκες ανάπτυξης της μεθόδου δοκιμών·

— πληρούν τα κριτήρια εγκυρότητας της δοκιμής.

Ορισμένα από τα είδη που έχουν χρησιμοποιηθεί συχνότερα σε δοκιμές κατά το παρελθόν παρατίθενται στο προσάρτημα 2, και τα πιθανά μη καλλιεργούμενα είδη παρατίθενται στο προσάρτημα 3.

12. Ο αριθμός των ειδών που θα υποβληθούν σε δοκιμές εξαρτάται από τις σχετικές κανονιστικές απαιτήσεις και, ως εκ τούτου, δεν προσδιορίζεται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών.

Εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας

13. Η χημική ουσία θα πρέπει να εφαρμόζεται σε κατάλληλο φορέα (π.χ. νερό, ακετόνη, αιθανόλη, αιθυλενογλυκόλη, αραβικό κόμμι, άμμος). Μπορούν επίσης να υποβληθούν σε δοκιμή τα μείγματα (παρασκευασμένα προϊόντα ή παρασκευάσματα) που περιέχουν ενεργά συστατικά και διάφορες βοηθητικές ουσίες.

Ενσωμάτωση στο έδαφος ή σε τεχνητό υπόστρωμα

14. Οι χημικές ουσίες που είναι υδατοδιαλυτές ή αιωρούνται στο νερό μπορούν να προστίθενται σε νερό και, στη συνέχεια, το διάλυμα αναμειγνύεται με έδαφος με τη βοήθεια κατάλληλης διάταξης ανάδευσης. Αυτός ο τύπος δοκιμής μπορεί να ενδείκνυται σε περίπτωση που η έκθεση στη χημική ουσία πραγματοποιείται μέσω του εδάφους ή του ενδοπορικού νερού του εδάφους, και εάν υπάρχει κίνδυνος πρόσληψης από τις ρίζες. Η προσθήκη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας δεν θα πρέπει να υπερβαίνει την υδατοχωρητικότητα του εδάφους. Ο όγκος του προστιθέμενου νερού θα πρέπει να είναι ίδιος για κάθε συγκέντρωση δοκιμής, αλλά θα πρέπει να είναι περιορισμένος ώστε να αποφεύγεται ο σχηματισμός συσσωματωμάτων εδάφους.

▼M6

15. Οι χημικές ουσίες με χαμηλή υδατοδιαλυτότητα θα πρέπει να διαλύονται σε κατάλληλο πτητικό διαλύτη (π.χ. ακετόνη, αιθανόλη) και να αναμειγνύονται με άμμο. Στη συνέχεια, ο διαλύτης μπορεί να απομακρύνεται από την άμμο με τη βοήθεια ενός ρεύματος αέρα, με συνεχή ανάμειξη της άμμου. Η άμμος που έχει υποστεί αγωγή αναμειγνύεται με το πειραματικό έδαφος. Παρασκευάζεται δεύτερος μάρτυρας, ο οποίος αποτελείται μόνο από άμμο και διαλύτη. Σε κάθε επίπεδο της αγωγής και στον δεύτερο μάρτυρα προστίθενται ίσες ποσότητες άμμου, της οποίας ο διαλύτης αναμειγνύεται και απομακρύνεται. Όταν πρόκειται για στερεές και αδιάλυτες υπό δοκιμή χημικές ουσίες, το ξηρό έδαφος και η χημική ουσία αναμειγνύονται σε κατάλληλη διάταξη ανάμειξης. Ακολούθως, το έδαφος προστίθεται στα δοχεία και οι σπόροι φυτεύονται αμέσως.

16. Σε περίπτωση που, αντί εδάφους, χρησιμοποιείται τεχνητό υπόστρωμα, οι χημικές ουσίες που είναι υδατοδιαλυτές μπορούν να διαλύονται σε θρεπτικό διάλυμα ακριβώς πριν από την έναρξη της δοκιμής. Οι χημικές ουσίες που είναι αδιάλυτες στο νερό, αλλά μπορούν να αιωρούνται στο νερό με τη βοήθεια φορέα διαλύτη, θα πρέπει να προστίθενται μαζί με τον φορέα στο θρεπτικό διάλυμα. Οι μη υδατοδιαλυτές χημικές ουσίες, για τις οποίες δεν υπάρχει διαθέσιμος μη τοξικός υδατοδιαλυτός φορέας, θα πρέπει να διαλύονται σε κατάλληλο πτητικό διαλύτη. Το διάλυμα αναμειγνύεται με άμμο ή γυάλινα σφαιρίδια, τοποθετείται σε περιστροφική συσκευή κενού και εξατμίζεται, σχηματίζοντας ενιαία επικάλυψη της χημικής ουσίας στην άμμο ή στα σφαιρίδια. Ένα ζυγισμένο τμήμα των σφαιριδίων θα πρέπει να εξάγεται με τον ίδιο οργανικό διαλύτη και τη χημική ουσία της δοκιμής πριν από την πλήρωση των δοχείων.

Επιφανειακή εφαρμογή

17. Στην περίπτωση φυτοπροστατευτικών προϊόντων, για την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας χρησιμοποιείται συχνά ψεκασμός της επιφάνειας του εδάφους με το διάλυμα δοκιμής. Ο σχεδιασμός και η χωρητικότητα όλου του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται για την εκτέλεση των δοκιμών, συμπεριλαμβανομένου του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται για την παρασκευή και τη χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, θα πρέπει να εξασφαλίζουν ότι οι δοκιμές στις οποίες αυτός χρησιμοποιείται μπορούν να διεξάγονται με ακρίβεια και να παρέχουν αναπαραγώγιμη κάλυψη. Η κάλυψη θα πρέπει να είναι ομοιόμορφη σε όλες τις επιφάνειες του εδάφους. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να απομακρύνεται η πιθανότητα προσρόφησης των χημικών ουσιών από τον εξοπλισμό ή αντίδρασής τους με αυτόν (π.χ. πλαστικές σωληνώσεις και λιπόφιλες χημικές ουσίες ή εξαρτήματα και στοιχεία από χάλυβα). Η υπό δοκιμή χημική ουσία ψεκάζεται πάνω στην επιφάνεια του εδάφους, κατά προσομοίωση των συνήθων εφαρμογών με δεξαμενή ψεκασμού. Γενικά, ο όγκος των ψεκασμών θα πρέπει να βρίσκεται εντός του εύρους που χρησιμοποιείται στη συνήθη γεωργική πρακτική και θα πρέπει να δηλώνεται (ποσότητα νερού κ.λπ.). Ο τύπος του ακροφυσίου που επιλέγεται θα πρέπει να εξασφαλίζει την ομοιόμορφη κάλυψη της επιφάνειας του εδάφους. Σε περίπτωση που εφαρμόζονται διαλύτες και φορείς, θα πρέπει να δημιουργείται δεύτερη ομάδα φυτών ελέγχου, η οποία να λαμβάνει μόνο τον διαλύτη/φορέα. Αυτό δεν είναι απαραίτητο για τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα τα οποία υποβάλλονται σε δοκιμή με τη μορφή παρασκευασμάτων.

Επαλήθευση της συγκέντρωσης/ποσότητας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας

18. Οι συγκεντρώσεις/ποσότητες εφαρμογής πρέπει να επιβεβαιώνονται με κατάλληλη αναλυτική επαλήθευση. Εάν πρόκειται για διαλυτές χημικές ουσίες, η επαλήθευση όλων των συγκεντρώσεων/ποσοτήτων δοκιμής μπορεί να επιβεβαιώνεται με ανάλυση της υψηλότερης συγκέντρωσης του διαλύματος δοκιμής, συνοδευόμενη από στοιχεία τεκμηρίωσης σχετικά με την επακόλουθη διάλυση και χρήση του βαθμονομημένου εξοπλισμού εφαρμογής (π.χ. βαθμονομημένα αναλυτικά γυάλινα σκεύη και όργανα, βαθμονόμηση του ψεκαστικού εξοπλισμού). Εάν πρόκειται για αδιάλυτες χημικές ουσίες, η επαλήθευση του σύνθετου υλικού πρέπει να παρέχεται με τη ζύγιση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που προστίθεται στο έδαφος. Εάν απαιτείται απόδειξη της ομοιογένειας, μπορεί να κρίνεται αναγκαία η ανάλυση του εδάφους.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σχεδιασμός της δοκιμής

19. Οι σπόροι του ίδιου είδους φυτεύονται σε δοχεία. Ο αριθμός των σπόρων που φυτεύονται σε κάθε δοχείο εξαρτάται από το είδος, το μέγεθος του δοχείου και τη διάρκεια της δοκιμής. Ο αριθμός των φυτών ανά δοχείο θα πρέπει να παρέχει κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης και να αποτρέπει τον

▼M6

υπερπληθυσμό κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Η μέγιστη πυκνότητα των φυτών θα πρέπει να είναι μεταξύ 3 — 10 σπόροι ανά 100 cm^2, ανάλογα με το μέγεθος των σπόρων. Για παράδειγμα, συνιστώνται ένα ή δύο φυτά αραβοσίτου, σόγιας, τομάτας, αγγουριού ή ζαχαρότευτλων ανά περιέκτη 15 cm· τρία φυτά κράμβης ή αρακά ανά περιέκτη 15 cm· και 5 έως 10 σπόροι κρεμμυδιού, σιταριού ή άλλοι μικροί σπόροι ανά περιέκτη 15 cm. Ο αριθμός των σπόρων και των δοχείων επανάληψης (ως επανάληψη ορίζεται το δοχείο και, γι' αυτό, τα φυτά του ίδιου δοχείου δεν αποτελούν επαναλήψεις) θα πρέπει να είναι επαρκής ώστε να επιτυγχάνεται η βέλτιστη στατιστική ανάλυση (21). Θα πρέπει να επισημανθεί ότι η μεταβλητότητα θα είναι μεγαλύτερη για υπό δοκιμή είδη για τα οποία χρησιμοποιείται μικρότερος αριθμός μεγάλων σπόρων ανά δοχείο (επανάληψη), σε σύγκριση με υπό δοκιμή είδη για τα οποία είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί μεγαλύτερος αριθμός μικρών σπόρων ανά δοχείο. Η φύτευση ίσου αριθμού σπόρων σε κάθε δοχείο μπορεί να ελαχιστοποιήσει αυτή τη μεταβλητότητα.

20. Η χρήση των ομάδων ελέγχου εξασφαλίζει ότι οι παρατηρούμενες επιδράσεις συνδέονται μόνο με την έκθεση στην υπό δοκιμή χημική ουσία ή αποδίδονται μόνο στην εν λόγω έκθεση. Η κατάλληλη ομάδα ελέγχου θα πρέπει να είναι πανομοιότυπη από κάθε άποψη με την ομάδα δοκιμής, με εξαίρεση την έκθεση στην υπό δοκιμή χημική ουσία. Στο πλαίσιο συγκεκριμένης δοκιμής, όλα τα φυτά δοκιμής –συμπεριλαμβανομένων των μαρτύρων– θα πρέπει να προέρχονται από την ίδια πηγή. Για να αποφεύγεται η μεροληψία, απαιτείται η τυχαία κατανομή των δοχείων δοκιμής και ελέγχου.

21. Οι σπόροι που είναι επικαλυμμένοι με εντομοκτόνο ή μυκητοκτόνο (δηλ. οι επενδυμένοι σπόροι) θα πρέπει να αποφεύγονται. Ωστόσο, η χρήση ορισμένων μη συστημικών μυκητοκτόνων επαφής (π.χ. Captan, Thiram) επιτρέπεται από ορισμένες κανονιστικές αρχές (22). Εάν υπάρχει κίνδυνος παρουσίας παθογόνων που μεταφέρονται με τον σπόρο, οι σπόροι μπορεί να εμποτίζονται για σύντομο χρονικό διάστημα σε ασθενές διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 5 % και, στη συνέχεια, να εκπλύνονται διεξοδικά με τρεχούμενο νερό και να ξηραίνονται. Δεν επιτρέπεται η θεραπευτική αγωγή με άλλο φυτοπροστατευτικό προϊόν.

Συνθήκες δοκιμής

22. Οι συνθήκες δοκιμής θα πρέπει να προσεγγίζουν τις συνθήκες που είναι αναγκαίες για την κανονική ανάπτυξη των υπό δοκιμή ειδών και ποικιλιών (στο προσάρτημα 4 παρατίθενται παραδείγματα συνθηκών δοκιμής). Τα αναδυόμενα φυτά θα πρέπει να διατηρούνται υπό ορθές φυτοκομικές πρακτικές σε θαλάμους ελεγχόμενου περιβάλλοντος, φύτοτρα ή θερμοκήπια. Όταν χρησιμοποιούνται εγκαταστάσεις καλλιέργειας, αυτές οι πρακτικές περιλαμβάνουν συνήθως τον έλεγχο και την επαρκώς συχνή (π.χ. ημερήσια) καταγραφή της θερμοκρασίας, της υγρασίας, της συγκέντρωσης διοξειδίου του άνθρακα, του φωτός (φωτεινή ένταση, μήκος κύματος, φωτοσυνθετικά ενεργός ακτινοβολία) και της φωτοπεριόδου, των ποτιστικών μέσων κ.λπ., ώστε να εξασφαλίζεται ικανοποιητική ανάπτυξη του φυτού, όπως εκτιμάται από τα φυτά ελέγχου του επιλεγμένου είδους. Οι θερμοκρασίες στα θερμοκήπια θα πρέπει να ελέγχονται μέσω συστημάτων αερισμού, θέρμανσης και/ή ψύξης. Κατά κανόνα, για την εκτέλεση δοκιμών σε θερμοκήπια συνιστώνται οι ακόλουθες συνθήκες:

— θερμοκρασία: 22 °C ± 10 °C·

— υγρασία: 70 % ± 25 %·

— φωτοπερίοδος: τουλάχιστον 16 ώρες φωτός·

— φωτεινή ένταση: 350 ± 50 μE/m^2/s. Μπορεί να κρίνεται αναγκαίο να υπάρξει επιπλέον φωτισμός, εάν η ένταση μειώνεται σε λιγότερο από 200 μE/m^2/s, μήκος κύματος 400 - 700 nm, εκτός εάν πρόκειται για είδη με χαμηλότερες απαιτήσεις φωτός.

Οι περιβαλλοντικές συνθήκες θα πρέπει να παρακολουθούνται και να δηλώνονται κατά τη διάρκεια της μελέτης. Τα φυτά θα πρέπει να καλλιεργούνται σε μη πορώδη πλαστικά ή στιλβωμένα δοχεία τοποθετημένα επάνω σε

▼M6

δίσκο ή πιάτο. Η θέση των δοχείων μπορεί να αλλάζει κατά διαστήματα, ώστε να ελαχιστοποιείται η μεταβλητότητα ως προς την ανάπτυξη των φυτών (λόγω των διαφορετικών συνθηκών δοκιμής στις εγκαταστάσεις καλλιέργειας). Τα δοχεία πρέπει να είναι αρκετά μεγάλα ώστε να επιτρέπουν την κανονική ανάπτυξη.

23. Τα θρεπτικά στοιχεία του εδάφους μπορούν να συμπληρώνονται εάν κρίνεται αναγκαίο, ώστε να διατηρείται ικανοποιητική ευρωστία του φυτού. Η αναγκαιότητα και το χρονοδιάγραμμα χορήγησης επιπλέον θρεπτικών στοιχείων μπορούν να αξιολογούνται με παρατήρηση των φυτών ελέγχου. Συνιστάται το πότισμα από το κάτω μέρος των δοχείων (π.χ. με τη χρήση φυτιλιών από υαλόνημα). Ωστόσο, το πότισμα από το επάνω μέρος μπορεί να χρησιμοποιείται στην αρχή για να διεγείρεται η εκβλάστηση των σπόρων και, σε περίπτωση εφαρμογής στην επιφάνεια του εδάφους, να διευκολύνεται η εισαγωγή της χημικής ουσίας στο έδαφος.

24. Οι συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης θα πρέπει να είναι κατάλληλες για το υπό δοκιμή είδος και την υπό δοκιμή χημική ουσία που εξετάζονται. Τα φυτά ελέγχου και τα φυτά που έχουν υποβληθεί σε αγωγή πρέπει να διατηρούνται στις ίδιες περιβαλλοντικές συνθήκες. Ωστόσο, θα πρέπει να λαμβάνονται κατάλληλα μέτρα ώστε να αποφεύγεται η διασταυρούμενη έκθεση (π.χ. πτητικών χημικών ουσιών) μεταξύ διαφορετικών αγωγών, καθώς και η έκθεση των μαρτύρων στην υπό δοκιμή χημική ουσία.

Δοκιμές σε μία συγκέντρωση/ποσότητα

25. Για να προσδιοριστεί η κατάλληλη συγκέντρωση/ποσότητα μιας χημικής ουσίας με σκοπό την εκτέλεση δοκιμής σε μία μόνο συγκέντρωση ή ποσότητα (πρόκληση/όριο), πρέπει να εξετάζεται μια σειρά παραγόντων. Για τις χημικές ουσίες εν γένει, αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν τις φυσικές/χημικές ιδιότητες της χημικής ουσίας. Για τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, πρέπει να εξετάζονται οι φυσικές/χημικές ιδιότητες και ο τρόπος χρήσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, η μέγιστη συγκέντρωση ή ποσότητα εφαρμογής της, ο αριθμός εφαρμογών ανά περίοδο και/ή η παραμονή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Για να προσδιοριστεί κατά πόσον μια γενική χημική ουσία διαθέτει φυτοτοξικές ιδιότητες, μπορεί να κρίνεται σκόπιμο να εκτελεστεί η δοκιμή σε μέγιστο επίπεδο 1 000 mg/kg ξηρού εδάφους.

Δοκιμή προσδιορισμού του εύρους τιμών

26. Εάν κρίνεται αναγκαίο, η δοκιμή προσδιορισμού του εύρους τιμών θα μπορούσε να εκτελείται ώστε να λαμβάνονται πληροφορίες σχετικά με τις συγκεντρώσεις/ποσότητες προς δοκιμή στο πλαίσιο οριστικής μελέτης δόσης-απόκρισης. Στη δοκιμή προσδιορισμού του εύρους τιμών, οι συγκεντρώσεις/ποσότητες δοκιμής θα πρέπει να απέχουν πολύ μεταξύ τους (π.χ. 0,1, 1,0, 10, 100 και 1 000 mg/kg ξηρού εδάφους). Στην περίπτωση φυτοπροστατευτικών προϊόντων, οι συγκεντρώσεις/ποσότητες θα μπορούσαν να βασίζονται στη συνιστώμενη ή μέγιστη συγκέντρωση/ποσότητα εφαρμογής, π.χ. 1/100, 1/10, 1/1 της συνιστώμενης ή μέγιστης συγκέντρωσης/ποσότητας εφαρμογής.

Δοκιμές σε πολλαπλές συγκεντρώσεις/ποσότητες

27. Ο στόχος της δοκιμής σε πολλαπλές συγκεντρώσεις/ποσότητες είναι να καθορίζεται η σχέση δόσης-απόκρισης και να προσδιορίζεται η τιμή της EC_x ή της ER_x σε σχέση με την ανάδυση, τη βιομάζα και/ή τις εμφανείς επιδράσεις σε σύγκριση με τους μάρτυρες που δεν έχουν εκτεθεί στην ουσία, όπως απαιτείται από τις κανονιστικές αρχές.

28. Ο αριθμός των συγκεντρώσεων/ποσοτήτων και η μεταξύ τους απόσταση θα πρέπει να είναι ικανά ώστε να προσδιορίζονται αξιόπιστα η σχέση δόσης-απόκρισης και η εξίσωση παλινδρόμησης, και να παρέχεται εκτίμηση της EC_x ή της ER_x. Οι επιλεγμένες συγκεντρώσεις/ποσότητες θα πρέπει να περιλαμβάνουν τις τιμές της EC_x ή της ER_x οι οποίες πρέπει να προσδιοριστούν. Για παράδειγμα, εάν απαιτείται τιμή της EC_{50}, θα ήταν επιθυμητό να εκτελείται η δοκιμή σε ποσότητες που προκαλούν επίδραση 20 έως 80 %. Ο συνιστώμενος αριθμός των συγκεντρώσεων/ποσοτήτων δοκιμής για την

▼M6

επίτευξη αυτής της επίδρασης πρέπει να είναι τουλάχιστον πέντε σε γεωμετρική πρόοδο συν ένας μάρτυρας που δεν έχει υποβληθεί σε αγωγή, και ο παράγοντας της μεταξύ τους απόστασης δεν πρέπει να υπερβαίνει το τρία. Για κάθε ομάδα αγωγής και ελέγχου, ο αριθμός των επαναλήψεων θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 4 και ο συνολικός αριθμός των σπόρων θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 20. Για να αυξηθεί η στατιστική ισχύς της δοκιμής, ενδέχεται να χρειαστούν περισσότερες επαναλήψεις εάν πρόκειται για φυτά με χαμηλό ρυθμό εκβλάστησης ή ποικίλη αυξητική συμπεριφορά. Εάν χρησιμοποιείται μεγαλύτερος αριθμός συγκεντρώσεων/ποσοτήτων δοκιμής, ο αριθμός των επαναλήψεων μπορεί να μειωθεί. Εάν πρέπει να εκτιμηθεί η NOEC, μπορεί να χρειαστούν περισσότερες επαναλήψεις ώστε να εξασφαλιστεί η επιθυμητή στατιστική ισχύς (23).

Παρατηρήσεις

29. Κατά τη διάρκεια της περιόδου παρατήρησης, δηλ. από 14 έως 21 ημέρες μετά την ανάδυση του 50 % των φυτών ελέγχου (και των μαρτύρων με τον διαλύτη, κατά περίπτωση), τα φυτά εξετάζονται συχνά (τουλάχιστον σε εβδομαδιαία και, εάν είναι δυνατόν, σε ημερήσια βάση), ώστε να παρακολουθούνται η ανάδυση, η ορατή φυτοτοξικότητα και η θνησιμότητα. Στο τέλος της δοκιμής, θα πρέπει να καταγράφεται η μέτρηση της ποσοστιαίας ανάδυσης και της βιομάζας των φυτών που επιζούν, καθώς και οι εμφανείς βλαβερές επιδράσεις σε διάφορα μέρη του φυτού. Οι επιδράσεις αυτές περιλαμβάνουν ανωμαλίες στην εμφάνιση των αναδυόμενων σποροφύτων, καθυστερημένη ανάπτυξη, χλώρωση, αποχρωματισμό, θνησιμότητα και επιδράσεις στην ανάπτυξη του φυτού. Η τελική βιομάζα μπορεί να μετράται με βάση το τελικό μέσο ξηρό βάρος των βλαστών των φυτών που επιζούν, με συλλογή των βλαστών στην επιφάνεια του εδάφους και με ξήρανσή τους μέχρι σταθερού βάρους στους 60 °C. Εναλλακτικά, η τελική βιομάζα μπορεί να μετράται με βάση το υγρό βάρος των βλαστών. Το ύψος των βλαστών μπορεί να είναι ένα άλλο τελικό σημείο, εάν απαιτείται από τις κανονιστικές αρχές. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται ενιαίο σύστημα βαθμολόγησης για εμφανείς κακώσεις, ώστε να αξιολογούνται οι παρατηρήσιμες τοξικές αποκρίσεις. Παραδείγματα εκτέλεσης ποιοτικών και ποσοτικών οπτικών εκτιμήσεων παρέχονται στις βιβλιογραφικές παραπομπές (23) και (24).

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΕΙΣ

Στατιστική ανάλυση

Δοκιμή σε μία συγκέντρωση/ποσότητα

30. Τα δεδομένα για κάθε είδος φυτού θα πρέπει να αναλύονται με τη βοήθεια κατάλληλης στατιστικής μεθόδου (21). Θα πρέπει να δηλώνεται το επίπεδο της επίδρασης στη συγκέντρωση/ποσότητα δοκιμής, ή η αδυναμία επίτευξης συγκεκριμένης επίδρασης στη συγκέντρωση/ποσότητα δοκιμής (π.χ., < *x* % της παρατηρούμενης επίδρασης σε συγκέντρωση ή ποσότητα *y*).

Δοκιμή σε πολλαπλές συγκεντρώσεις/ποσότητες

31. Η σχέση δόσης-απόκρισης καθορίζεται με εξίσωση παλινδρόμησης. Μπορούν να χρησιμοποιούνται διάφορα μοντέλα: π.χ. για την εκτίμηση της EC_x ή της ER_x (π.χ. EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}) και των ορίων εμπιστοσύνης τους όσον αφορά την ανάδυση θα μπορούσαν να είναι κατάλληλες η μέθοδος δεδομένων που δέχονται μόνο δύο τιμές, η μέθοδος μονάδων logit, probit ή Weibull, η μέθοδος Spearman-Karber, η απλοποιημένη μέθοδος Spearman-Karber κ.ά. Για να εκτιμηθεί η ανάπτυξη των σποροφύτων (βάρος και ύψος) με τη μορφή συνεχών τελικών σημείων, η EC_x ή η ER_x και τα όρια εμπιστοσύνης τους μπορούν να εκτιμηθούν με τη βοήθεια κατάλληλης ανάλυσης παλινδρόμησης [π.χ. η ανάλυση με μη γραμμική παλινδρόμηση Bruce-Versteeg (25)]. Στο μέτρο του δυνατού, η R^2 θα πρέπει να είναι ίση με 0,7 ή υψηλότερη για τα πιο ευαίσθητα είδη και οι συγκεντρώσεις/ποσότητες δοκιμής που χρησιμοποιούνται να περιλαμβάνουν επιδράσεις 20 % έως 80 %. Εάν πρέπει να εκτιμηθεί η NOEC, θα πρέπει να προτιμάται η διενέργεια ισχυρών στατιστικών δοκιμών, οι οποίες θα πρέπει να επιλέγονται με βάση την κατανομή δεδομένων (21) (26).

Έκθεση δοκιμής

32. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να παρουσιάζει τα αποτελέσματα των μελετών, λεπτομερή περιγραφή των συνθηκών δοκιμής, διεξοδική εξέταση των αποτελεσμάτων, ανάλυση των δεδομένων, καθώς και τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την ανάλυση. Θα πρέπει να παρέχονται περίληψη σε μορφή πίνακα και σύνοψη των αποτελεσμάτων. Η έκθεση πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα:

▼M6

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

— δεδομένα χημικής ταυτοποίησης, σχετικές ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (π.χ. log P_{ow}, υδατοδιαλυτότητα, τάση ατμών και πληροφορίες σχετικά με την πορεία της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και τη συμπεριφορά της στο περιβάλλον, εάν είναι διαθέσιμες)·

— λεπτομέρειες σχετικά με την παρασκευή του διαλύματος δοκιμής και επαλήθευση των συγκεντρώσεων δοκιμής, όπως προσδιορίζονται στο σημείο 18.

Ελεγχόμενο είδος:

— λεπτομέρειες σχετικά με τον οργανισμό δοκιμής: είδος/ποικιλία, οικογένειες φυτών, επιστημονικές και κοινές ονομασίες, πηγή και ιστορικό του σπόρου με όσο το δυνατόν περισσότερες λεπτομέρειες (δηλ. όνομα του προμηθευτή, ποσοστό εκβλάστησης, τάξη μεγέθους του σπόρου, αριθμός παρτίδας, έτος σποράς ή καλλιεργητική περίοδος συλλογής, ημερομηνία αξιολόγησης της εκβλάστησης), βιωσιμότητα κ.λπ.·

— αριθμός των μονοκοτυλήδονων και δικοτυλήδονων ειδών που υποβλήθηκαν στη δοκιμή·

— σκεπτικό για την επιλογή των ειδών·

— περιγραφή της αποθήκευσης, της επεξεργασίας και της διατήρησης των σπόρων.

Συνθήκες δοκιμής:

— εγκαταστάσεις δοκιμών (π.χ. θάλαμος ανάπτυξης, φύτοτρο και θερμοκήπιο)·

— περιγραφή του συστήματος της δοκιμής (π.χ. διαστάσεις των δοχείων, υλικό των δοχείων και ποσότητες εδάφους)·

— χαρακτηριστικά του εδάφους [υφή ή τύπος του εδάφους: κατανομή και ταξινόμηση των σωματιδίων του εδάφους, φυσικές και χημικές ιδιότητες, όπως το ποσοστό (%) οργανικής ύλης, το ποσοστό (%) οργανικού άνθρακα και το pH]·

— παρασκευή εδάφους/υποστρώματος (π.χ. έδαφος, τεχνητό έδαφος, άμμος και άλλα) πριν από τη δοκιμή·

— περιγραφή του θρεπτικού μέσου, εάν χρησιμοποιείται·

— εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας: περιγραφή της μεθόδου εφαρμογής, περιγραφή του εξοπλισμού, βαθμός έκθεσης και όγκος, συμπεριλαμβανομένης της χημικής επαλήθευσης, περιγραφή της μεθόδου βαθμονόμησης και περιγραφή των περιβαλλοντικών συνθηκών κατά την εφαρμογή·

— συνθήκες ανάπτυξης: φωτεινή ένταση (π.χ. PAR, φωτοσυνθετικά ενεργός ακτινοβολία), φωτοπερίοδος, μέγιστες/ελάχιστες θερμοκρασίες, χρονοδιάγραμμα και μέθοδος ποτίσματος, γονιμοποίηση·

— αριθμός σπόρων ανά δοχείο, αριθμός φυτών ανά δόση, αριθμός επαναλήψεων (δοχείων) ανά βαθμό έκθεσης·

— είδος και αριθμός μαρτύρων (αρνητικοί και/ή θετικοί μάρτυρες, τυχόν μάρτυρας με τον διαλύτη)·

— διάρκεια της δοκιμής.

Αποτελέσματα:

— πίνακας όλων των τελικών σημείων για κάθε επανάληψη, συγκέντρωση/ποσότητα δοκιμής και είδος·

— αριθμός και ποσοστό ανάδυσης σε σύγκριση με τους μάρτυρες·

— μετρήσεις βιομάζας (ξηρό ή υγρό βάρος των βλαστών) των φυτών ως ποσοστό των μαρτύρων·

▼M6

— ύψος των βλαστών των φυτών ως ποσοστό των μαρτύρων, εάν μετρώνται·

— ποσοστό εμφανών κακώσεων και ποιοτική και ποσοτική περιγραφή των εμφανών κακώσεων (χλώρωση, νέκρωση, μάρανση, παραμόρφωση των φύλλων και των μίσχων, καθώς και τυχόν απουσία επιδράσεων) που προκαλούνται από την υπό δοκιμή χημική ουσία σε σύγκριση με τα φυτά ελέγχου·

— περιγραφή της κλίμακας αξιολόγησης που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση των εμφανών κακώσεων, εάν παρέχεται οπτική εκτίμηση·

— για μελέτες σε μία ποσότητα, θα πρέπει να δηλώνεται το ποσοστό των κακώσεων·

— οι τιμές της EC_x ή της ER_x (π.χ. EC_{50}, ER_{50}, EC_{25}, ER_{25}) και τα σχετικά όρια εμπιστοσύνης. Όταν διενεργείται ανάλυση παλινδρόμησης, θα πρέπει να παρέχεται το τυπικό σφάλμα για την εξίσωση παλινδρόμησης και το τυπικό σφάλμα για την εκτίμηση μεμονωμένων παραμέτρων (π.χ. κλίση, σημείο τομής)·

— οι τιμές NOEC (και LOEC), εάν υπολογίζονται·

— περιγραφή των στατιστικών διαδικασιών και παραδοχών που χρησιμοποιούνται·

— γραφική απεικόνιση αυτών των δεδομένων και σχέση δόσης-απόκρισης του είδους που υποβάλλεται σε δοκιμή.

Αποκλίσεις από τις διαδικασίες που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών και τυχόν ασυνήθιστα συμβάντα κατά τη δοκιμή.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Schrader G., Metge K., and Bahadir M. (1998). Importance of salt ions in ecotoxicological tests with soil arthropods. Applied Soil Ecology, 7, 189-193.

(2) International Organisation of Standards. (1993). ISO 11269-1. Soil Quality – Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora — Part 1: Method for the Measurement of Inhibition of Root Growth.

(3) International Organisation of Standards. (1995). ISO 11269-2. Soil Quality – Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora — Part 2: Effects of Chemicals on the Emergence and Growth of Higher Plants.

(4) American Standard for Testing Material (ASTM). (2002). E 1963-98. Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests.

(5) U.S. EPA. (1982). FIFRA, 40CFR, Part 158.540. Subdivision J, Parts 122-1 and 123-1.

(6) US EPA. (1996). OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 850. Ecological Effects Test Guidelines:

— 850.4000: Background — Non-target Plant Testing;

— 850.4025: Target Area Phytotoxicity;

— 850.4100: Terrestrial Plant Toxicity, Tier I (Seedling Emergence);

— 850.4200: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test;

— 850.4225: Seedling Emergence, Tier II;

— 850.4230: Early Seedling Growth Toxicity Test.

(7) AFNOR, X31-201. (1982). Essai d'inhibition de la germination de semences par une substance. AFNOR X31-203/ISO 11269-1. (1993) Determination des effets des polluants sur la flore du sol: Méthode de mesurage de l'inhibition de la croissance des racines.

(8) Boutin, C., Freemark, K.E. and Keddy, C.J. (1993). Proposed guidelines for registration of chemical pesticides: Non-target plant testing and evaluation. Technical Report Series No.145. Canadian Wildlife Service (Headquarters), Environment Canada, Hull, Κεμπέκ, Καναδάς.

▼**M6**

(9) Forster, R., Heimbach, U., Kula, C., and Zwerger, P. (1997). Effects of Plant Protection Products on Non-Target Organisms — A contribution to the Discussion of Risk Assessment and Risk Mitigation for Terrestrial Non-Target Organisms (Flora and Fauna). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. No 48.

(10) Hale, B., Hall, J.C., Solomon, K., and Stephenson, G. (1994). A Critical Review of the Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides; Non-Target Plant Testing and Evaluation, Centre for Toxicology, University of Guelph, Οντάριο, Καναδάς.

(11) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sc. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

(12) Audus, L.J. (1964). Herbicide behaviour in the soil. In: Audus, L.J. ed. *The Physiology and biochemistry of Herbicides*, London, New York, Academic Press, NY, Chapter 5, σ. 163-206.

(13) Beall, M.L., Jr. and Nash, R.G. (1969). Crop seedling uptake of DDT, dieldrin, endrin, and heptachlor from soil, J. Agro. 61:571-575.

(14) Beetsman, G.D., Kenney, D.R. and Chesters, G. (1969). Dieldrin uptake by corn as affected by soil properties, J. Agro. 61:247-250.

(15) U.S. Food and Drug Administration (FDA). (1987). Environmental Assessment Technical Handbook. Environmental Assessment Technical Assistance Document 4.07, Seedling Growth, 14 σ., FDA, Washington, DC.

(16) McKelvey, R.A., Wright, J.P., Honegger, J.L. and Warren, L.W. (2002). A Comparison of Crop and Non-crop Plants as Sensitive Indicator Species for Regulatory Testing. Pest Management Science vol. 58:1161-1174

(17) Boutin, C.; Elmegaard, N. and Kjær, C. (2004). Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: Implications for risk assessment. Ecotoxicology vol. 13(4): 349-369.

(18) Boutin, C., and Rogers, C.A. (2000). Patterns of sensitivity of plant species to various herbicides — An analysis with two databases. Ecotoxicology vol.9(4):255-271.

(19) Boutin, C. and Harper, J.L. (1991). A comparative study of the population dynamics of five species of *Veronica* in natural habitats. J. Ecol. 9:155-271.

(20) Boutin, C., Lee, H.-B., Peart, T.E., Batchelor, S.P. and Maguire, R.J.. (2000). Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. Envir. Toxicol. Chem. 19 (10): 2532-2541.

(21) ΟΟΣΑ (2006). Draft Guidance Document, Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No 54, Οργανισμός Οικονομικής Συνεργασίας και Ανάπτυξης, Παρίσι.

(22) Hatzios, K.K. and Penner, D. (1985). Interactions of herbicides with other agrochemicals in higher plants. Rev. Weed Sci. 1:1-63.

(23) Hamill, P.B., Marriage, P.B. and G. Friesen. (1977). A method for assessing herbicide performance in small plot experiments. Weed Science 25:386-389.

(24) Frans, R.E. and Talbert, R.E. (1992). Design of field experiments and the measurement and analysis of plant response. In: B. Truelove (Ed.) Research Methods in Weed Science, 2nd ed. Southern weed Science Society, Auburn, 15-23.

(25) Bruce, R.D. and Versteeg, D. J.(1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Toxicity Data. Environmental Toxicology and Chemistry 11, 1485-1492.

(26) Κεφάλαιο Γ.33 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμασία αναπαραγωγής γαιοσκωλήκων (*Eisenia fetida/Eisenia andrei*).

▼M6

Προσάρτημα 1

Ορισμοί

Δραστικό συστατικό (δ.σ.) [ή δραστική ουσία (δ.ο.)]: το υλικό που έχει σχεδιαστεί ώστε να επιφέρει συγκεκριμένη βιολογική επίδραση (π.χ. καταπολέμηση των εντόμων, καταπολέμηση των ασθενειών των φυτών, καταπολέμηση των ζιζανίων στην περιοχή αγωγής), γνωστό και ως δραστικό συστατικό / δραστική ουσία τεχνικής καθαρότητας.

Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Προϊόντα προστασίας των καλλιεργειών ή φυτοπροστατευτικά προϊόντα ή παρασιτοκτόνα: υλικά με συγκεκριμένη βιολογική δράση, τα οποία χρησιμοποιούνται σκόπιμα για να προστατεύσουν τις καλλιέργειες από τα παράσιτα (π.χ. μυκητιάσεις, έντομα και ανταγωνιστικά φυτά).

EC_x, x % συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης, ή ER_x, x % ποσότητα **παρατηρούμενης επίδρασης**: η συγκέντρωση ή η ποσότητα η οποία επιφέρει ανεπιθύμητη μεταβολή ή αλλοίωση x % στο τελικό σημείο δοκιμής που μετράται σε σχέση με τον μάρτυρα (π.χ. η μείωση κατά 25 % ή 50 % στην ανάδυση σποροφύτων, στο ύψος των βλαστών, στον τελικό αριθμό των φυτών που είναι παρόντα, ή η ανάλογη αύξηση των εμφανών κακώσεων θα συνιστούσε, αντίστοιχα, EC_{25}/ER_{25} ή EC_{50}/ER_{50}).

Ανάδυση: η εμφάνιση του κολεοπτίλου ή του κοτυληδόνου επάνω από την επιφάνεια του εδάφους.

Σκεύασμα: το εμπορικό παρασκευασμένο προϊόν που περιέχει τη δραστική ουσία (το δραστικό συστατικό), γνωστό και ως τελικό σκεύασμα [1] ή τυπικό τελικό προϊόν.

LOEC (κατώτατη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης): η ελάχιστη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην οποία παρατηρείται επίδραση. Στην παρούσα δοκιμή, η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στη LOEC έχει στατιστικώς σημαντική επίδραση ($p < 0,05$) εντός δεδομένης περιόδου έκθεσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα, και υπερβαίνει την τιμή της NOEC.

Μη στοχευόμενα φυτά: τα φυτά που βρίσκονται εκτός της περιοχής των στοχοθετημένων φυτών. Για τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, ο όρος αυτός αφορά συνήθως τα φυτά που βρίσκονται εκτός της περιοχής αγωγής.

NOEC (συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης): η υψηλότερη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην οποία δεν παρατηρείται επίδραση. Στην παρούσα δοκιμή, η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στη NOEC δεν έχει στατιστικώς σημαντική επίδραση ($p < 0,05$) εντός δεδομένης περιόδου έκθεσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα.

Φυτοτοξικότητα: επιβλαβείς αποκλίσεις (σύμφωνα με μετρήσεις και οπτικές εκτιμήσεις) από τη συνήθη εμφάνιση και πορεία ανάπτυξης των φυτών ως αντίδραση σε συγκεκριμένη χημική ουσία.

Επανάληψη: η πειραματική μονάδα που αντιπροσωπεύει την ομάδα ελέγχου και/ή την ομάδα αγωγής. Στις εν λόγω μελέτες, ως επανάληψη ορίζεται το δοχείο.

Οπτική εκτίμηση: αξιολόγηση της ορατής βλάβης έπειτα από παρατηρήσεις ως προς τη στήριξη, την ευρωστία, τη δυσμορφία, τη χλώρωση και τη νέκρωση του φυτού, καθώς και τη συνολική εμφάνισή του σε σύγκριση με μάρτυρα.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

[1] Τελικό παρασκεύασμα: το παρασκευασμένο προϊόν που περιέχει τη δραστική χημική ουσία (το δραστικό συστατικό) που πωλείται στο εμπόριο.

▼**M6**

Προσάρτημα 2

Κατάλογος ειδών που χρησιμοποιούνται συνήθως στίσε δοκιμές σε φυτά

Οικογένεια	Είδος	Κοινή ονομασία
DICOTYLEDONAE		
Apiaceae (Umbelliferae)	*Daucus carota*	Καρότο
Asteraceae (Compositae)	*Helianthus annuus*	Ηλίανθος
Asteraceae (Compositae)	*Lactuca sativa*	Μαρούλι
Brassicaceae (Cruciferae)	*Sinapis alba*	Σινάπι άσπρο
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica campestris* var. *chinensis*	Κινέζικο λάχανο
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica napus*	Ελαιοκράμβη
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica oleracea* var. *capitata*	Λάχανο
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica rapa*	Γογγύλι (ρέβα)
Brassicaceae (Cruciferae)	*Lepidium sativum*	Κάρδαμο το εδώδιμο
Brassicaceae (Cruciferae)	*Raphanus sativus*	Ραπάνι
Chenopodiaceae	*Beta vulgaris*	Ζαχαρότευτλο
Cucurbitaceae	*Cucumis sativus*	Αγγούρι
Fabaceae (Leguminosae)	*Glycine max (G. soja)*	Σόγια
Fabaceae (Leguminosae)	*Phaseolus aureus*	Φασόλι μούνγκο
Fabaceae (Leguminosae)	*Phaseolus vulgaris*	Φασίολος ο νάνος και φασίολος ο κοινός
Fabaceae (Leguminosae)	*Pisum sativum*	Μπιζέλι
Fabaceae (Leguminosae)	*Trigonella foenum-graecum*	Τριγωνέλλα ή μοσχοσίταρο
Fabaceae (Leguminosae)	*Lotus corniculatus*	Λωτός ο κερατιοφόρος
Fabaceae (Leguminosae)	*Trifolium pratense*	Τριφύλλι το λειμώνιο
Fabaceae (Leguminosae)	*Vicia sativa*	Βίκος ο κοινός
Linaceae	*Linum usitatissimum*	Λινάρι
Polygonaceae	*Fagopyrum esculentum*	Φαγόπυρο το εδώδιμο ή μαύρο σιτάρι
Solanaceae	*Solanum lycopersicon*	Τομάτα

▼**M6**

Οικογένεια	Είδος	Κοινή ονομασία
MONOCOTYLEDONAE		
Liliaceae (Amarylladaceae)	*Allium cepa*	Κρεμμύδι
Poaceae (Gramineae)	*Avena sativa*	Βρώμη
Poaceae (Gramineae)	*Hordeum vulgare*	Κριθάρι
Poaceae (Gramineae)	*Lolium perenne*	Λόλιο το πολυετές
Poaceae (Gramineae)	*Oryza sativa*	Ρύζι
Poaceae (Gramineae)	*Secale cereale*	Σίκαλη
Poaceae (Gramineae)	*Sorghum bicolor*	Σόργο
Poaceae (Gramineae)	*Triticum aestivum*	Σιτάρι
Poaceae (Gramineae)	*Zea mays*	Αραβόσιτος

▼M6

Προσάρτημα 3

Κατάλογος πιθανών μη καλλιεργούμενων ειδών

Πιθανά είδη σύμφωνα με τον ΟΟΣΑ για τις δοκιμές τοξικότητας σε φυτά

Σημείωση: Ο ακόλουθος πίνακας παρέχει πληροφορίες για 52 μη καλλιεργούμενα είδη (οι παραπομπές για κάθε εγγραφή δίνονται εντός παρενθέσεων). Οι αναφερόμενοι ρυθμοί ανάδυσης προέρχονται από δημοσιευμένη βιβλιογραφία και παρέχονται μόνο ως γενική κατεύθυνση. Η προσωπική πείρα μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με την πηγή του σπόρου και άλλους παράγοντες.

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ Βοτανική ονομασία του είδους (κοινή ονομασία στα ελληνικά)	Διάρκεια ζωής [1] και ενδιαίτημα	Βάρος σπόρου (mg)	Φωτοπερίοδος για την εκβλάστηση ή την ανάπτυξη [2]	Βάθος φύτευσης (mm) [3]	Χρόνος εκβλάστησης (ημέρες) [4]	Ειδικές αγωγές [5]	Δοκιμή τοξικότητας [6]	Προμηθευτές σπόρων [7]	Άλλες παραπομπές [8]
APIACEAE *Torilis japonica* (Τοριλίδα της Ιαπωνίας)	Α, Β διαταραγμένες περιοχές, θαμνοστοιχίες, βοσκότοποι (16, 19)	1,7 — 1,9 (14, 19)	L = D (14)	0 (1, 19)	5 (50 %) (19)	ψυχρή στρωμάτωση (7, 14, 18, 19) η ωρίμανση μπορεί να κρίνεται απαραίτητη (19) αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (1, 19) καμία ειδική αγωγή (5)	POST (5)		
ASTERACEAE *Bellis perennis* (Μαργαρίτα)	Ρ χορτολιβαδικές εκτάσεις, αρόσιμες εκτάσεις, χλοοτάπητες (16, 19)	0,09 — 0,17 (4, 19)	L = D (14)	0 (4)	3 (50 %) (19) 11 (100 %) (18)	η εκβλάστηση δεν επηρεάζεται από την ένταση της ακτινοβολίας (18, 19) καμία ειδική αγωγή (4, 14)	POST (4)	Α, Δ, ΣΤ	7
Centaurea cyanus (Κύανος ή κενταύρια)	Α αγροί, παρυφές δρόμων, ανοικτά ενδιαιτήματα (16)	4,1 — 4,9 (4, 14)	L = D (14)	0-3 (2, 4, 14)	14-21 (100 %) (14)	καμία ειδική αγωγή (2, 4)	POST (2,4)	Α, Δ, Ε, ΣΤ	7
Centaurea nigra (Κενταύρια η μελανή)	Ρ αγροί, παρυφές δρόμων, ανοικτά ενδιαιτήματα (16, 19)	2,4 — 2,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3 (50 %) (19) 4 (97 %) (18)	η ωρίμανση μπορεί να κρίνεται απαραίτητη (18, 19) αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (19) καμία ειδική αγωγή (5, 14, 26)	POST (5, 22, 26)	Α	
Inula helenium (Ινουλα ή ελένιο)	Ρ υγρά, διαταραγμένα μέρη (16)	1 — 1,3 (14, 29)		0 (4, 29)		καμία ειδική αγωγή (4)	POST (4)	Α, ΣΤ	

▼M6

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ Βοτανική ονομασία του είδους (κοινή ονομασία στα ελληνικά)	Διάρκεια ζωής ([1]) και ενδιαίτημα	Βάρος σπόρου (mg)	Φωτοπερίοδος για την εκβλάστηση ή την ανάπτυξη ([2])	Βάθος φύτευσης (mm) ([3])	Χρόνος εκβλάστησης (ημέρες) ([4])	Ειδικές αγωγές ([5])	Δοκιμή τοξικότητας ([6])	Προμηθευτές σπόρων ([7])	Άλλες παραπομπές ([8])
Leontodon hispidus (Λεοντόδους)	P αγροί, παρυφές δρόμων, διαταραγμένες περιοχές (16, 19)	0,85 — 1,2 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	4 (50 %) (19) 7 (80 %) (18)	αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (17, 18, 19) καμία ειδική αγωγή (5, 23)	POST (5, 22, 23)		
Rudbeckia hirta (Ρουντμπέκια)	B, P διαταραγμένες περιοχές (16)	0,3 (4, 14)	L = D (14)	0 (4, 33)	< 10 (100 %) (33)	καμία ειδική αγωγή (4, 14, 33)	POST (4, 33)	Γ, Δ, Ε, ΣΤ	
Solidago canadensis (Σολιντάγκο του Καναδά ή καναδική χρυσόβεργα)	P βοσκότοποι, ανοικτές περιοχές (16)	0,06 — 0,08 (4, 14)	L = D (11)	0 (4)	14-21 (11)	ανάμειξη με ίση ποσότητα άμμου και εμποτισμός σε 500 ppm GA για 24 ώρες (11) καμία ειδική αγωγή (4)	POST (4)	Ε, ΣΤ	
Xanthium pensylvanicum (Ξάνθιο)	A αγροί, ανοικτά ενδιαιτήματα (16)	25 — 61 (14, 29)		0 (1) 5 (29)		πιθανή αναστολή της εκβλάστησης λόγω σκότους (1) εμποτισμός σε θερμό νερό για 12 ώρες (29)	PRE & POST (31)	A	
Xanthium spinosum (Ξάνθιο το αγκαθωτό)	A ανοικτά ενδιαιτήματα (16)	200 (14)	L = D (14) L > D (6)	10 (6)		τραυματισμός (14) καμία ειδική αγωγή (6)	PRE & POST (6)	A	
Xanthium strumarium (Ξάνθιο το χειράδιο)	A αγροί, ανοικτά ενδιαιτήματα (16)	67,4 (14)	L = D (14)	10 — 20 (6, 21)		καμία ειδική αγωγή (6, 14, 21)	PRE & POST (6, 21, 28, 31)	A	
BRASSICACEAE *Cardamine pratensis* (Καρδαμίνη η λιβαδική ή Καρδαμίνη των αγρών)	P αγροί, παρυφές δρόμων, χλοοτάπητες (16, 19)	0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 15 (98 %) (18)	αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (18, 19) καμία ειδική αγωγή (5, 14, 22)	POST (5, 22)	ΣΤ	

▼M6

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ Βοτανική ονομασία του είδους (κοινή ονομασία στα ελληνικά)	Διάρκεια ζωής ([1]) και ενδιαίτημα	Βάρος σπόρου (mg)	Φωτοπερίοδος για την εκβλάστηση ή την ανάπτυξη ([2])	Βάθος φύτευσης (mm) ([3])	Χρόνος εκβλάστησης (ημέρες) ([4])	Ειδικές αγωγές ([5])	Δοκιμή τοξικότητας ([6])	Προμηθευτές σπόρων ([7])	Άλλες παραπομπές ([8])
CARYOPHYLLACEAE *Lychnis flos-cuculi* (Λυχνίς ή το άνθος του κούκου)	P (16)	0,21 (14)	L = D (14)		< 14 (100 %) (14, 25)	η ωρίμανση μπορεί να κρίνεται απαραίτητη (18) καμία ειδική αγωγή (5, 14, 15, 22-26)	POST (5, 15, 22-26)	ΣΤ	
CHENOPODIACEAE *Chenopodium album* (Χηνοπόδιο το λευκό ή λουβουδιά)	A παρυφές αγρών, διαταραγμένες περιοχές (16, 19)	0,7 — 1,5 (14, 19, 34)	L = D (14)	0 (1, 19)	2 (50 %) (19)	η αγωγή διαφέρει ανάλογα με το χρώμα των σπόρων (19) λήθαργος σε εν ξηρώ αποθήκευση (19) αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (1, 18, 19) ψυχρή στρωμάτωση (18) καμία ειδική αγωγή (14, 34)	PRE & POST (28, 31, 34)	A	32
CLUSIACEAE *Hypericum perforatum* (Υπερικόν το διάτρητον, κοινώς βάλσαμο, βαλσαμόχορτο ή σπαθίδα)	P αγροί, αρόσιμες εκτάσεις, ανοικτά ενδιαιτήματα (16, 19)	0,1 — 0,23 (14, 19)	L= D (14)	0 (1, 19)	3 (19) 11 (90 %) (18)	αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (1, 18, 19) καμία ειδική αγωγή (5, 14, 15, 25, 27)	POST (5, 15, 25, 27)	A, E, ΣΤ	
CONVOLVULACEAE *Ipomoea hederacea* (Αγριοφασουλιά)	A παρυφές δρόμων, ανοικτά ενδιαιτήματα, σιταγροί (16)	28,2 (14)	L > D (6, 10)	10 — 20 (6, 10, 21)	4 (100 %) (10)	η εκβλάστηση δεν επηρεάζεται από την ένταση της ακτινοβολίας (1) καμία ειδική αγωγή (6, 21)	PRE & POST (6, 12, 21, 28)	A	
CYPERACEAE *Cyperus rotundus* (Κύπειρος ο στρογγυλός)	P αρόσιμες εκτάσεις, βοσκότοποι, παρυφές δρόμων (16, 30)	0,2 (14)	L= D (14)	0 (1) 10 — 20 (6, 10)	12 (91 %) (10)	αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (1) καμία ειδική αγωγή (6, 10, 14)	PRE & POST (6, 28, 31)	B	7
FABACEAE *Lotus corniculatus* (Λωτός ο κερατιοφόρος ή αγριοτριφύλλι)	P λειμώνες, παρυφές δρόμων, ανοικτά ενδιαιτήματα (16, 19)	1 — 1,67 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	τραυματισμός (14, 19) η εκβλάστηση δεν επηρεάζεται από την ένταση της ακτινοβολίας (18, 19) καμία ειδική αγωγή (23, 25)	POST (5, 23, 25)	A, Δ, E, ΣΤ	

▼M6

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ Βοτανική ονομασία του είδους (κοινή ονομασία στα ελληνικά)	Διάρκεια ζωής ([1]) και ενδιαίτημα	Βάρος σπόρου (mg)	Φωτοπερίοδος για την εκβλάστηση ή την ανάπτυξη ([2])	Βάθος φύτευσης (mm) ([3])	Χρόνος εκβλάστησης (ημέρες) ([4])	Ειδικές αγωγές ([5])	Δοκιμή τοξικότητας ([6])	Προμηθευτές σπόρων ([7])	Άλλες παραπομπές ([8])
Senna obtusifolia (Κασσία)	A υγρά δάση (16)	23 — 28 (9)	L = D (14) L > D (9)	10 — 20 (6, 9)		εμποτισμός σπόρων σε νερό για 24 ώρες (9) τραυματισμός (14) η βιωσιμότητα των σπόρων διαφέρει ανάλογα με το χρώμα (1) καμία ειδική αγωγή (6)	POST (6, 9)	A	
Sesbania exaltata (Κάνναβη)	A προσχωσιγενή εδάφη (16)	11 — 13 (9, 14)	L > D (9)	10 — 20 (9, 21)		εμποτισμός σπόρων σε νερό για 24 ώρες (9) η εκβλάστηση δεν επηρεάζεται από την ένταση της ακτινοβολίας (1) καμία ειδική αγωγή (21)	PRE & POST (9, 21, 28, 31)	A	
Trifolium pratense Τριφύλλι το λειμώνιο	P αγροί, παρυφές δρόμων, αρόσιμες εκτάσεις (16, 19)	1,4 — 1,7 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	τραυματισμός (14, 18) η ωρίμανση μπορεί να κρίνεται απαραίτητη (19) η εκβλάστηση δεν επηρεάζεται από την ένταση της ακτινοβολίας (1, 19) καμία ειδική αγωγή (5)	POST (5)	A, E, ΣΤ	
LAMIACEAE *Leonurus cardiaca* (Λεόνουρος ή μανοβότανο)	P ανοικτές περιοχές (16)	0,75 — 1,0 (4, 14)	L = D (14)	0 (4)		καμία ειδική αγωγή (4, 14)	POST (4)	ΣΤ	
Mentha spicata (Μίνθη η σταχυώδης ή Δυόσμος)	P υγρές περιοχές (16)	2,21 (4)		0 (4)		καμία ειδική αγωγή (4)	POST (4)	ΣΤ	
Nepeta cataria (Γλήχωμα το γαλεόφιλον ή νεπέτα ή γατόχορτο)	P διαταραγμένες περιοχές (16)	0,54 (4, 14)	L = D (14)	0 (4)		καμία ειδική αγωγή (2, 4, 14)	POST (2,4)	ΣΤ	

▼M6

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ Βοτανική ονομασία του είδους (κοινή ονομασία στα ελληνικά)	Διάρκεια ζωής ([1]) και ενδιαίτημα	Βάρος σπόρου (mg)	Φωτοπερίοδος για την εκβλάστηση ή την ανάπτυξη ([2])	Βάθος φύτευσης (mm) ([3])	Χρόνος εκβλάστησης (ημέρες) ([4])	Ειδικές αγωγές ([5])	Δοκιμή τοξικότητας ([6])	Προμηθευτές σπόρων ([7])	Άλλες παραπομπές ([8])
Prunella vulgaris (Προυνέλλα η κοινή ή βουτυρόχορτο)	P αρόσιμες εκτάσεις, λειμώνες, διαταραγμένες περιοχές (16, 19)	0,58 — 1,2 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	5 (50 %) (19) 7 (91 %) (18)	αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (18, 19) καλύτερη εκβλάστηση με μεγαλύτερους σπόρους (1) καμία ειδική αγωγή (4, 14, 22)	POST (4, 22)	Α, ΣΤ	
Stachys officinalis (Στάχυς ο φαρμακευτικός)	P χορτολιβαδικές εκτάσεις, παρυφές αγρών (19)	14 — 18 (14, 19)	L = D (14)		7 (50 %) (19)	καμία ειδική αγωγή (5, 14, 22)	POST (5, 22)	ΣΤ	
MALVACEAE *Abutilón theophrasti* (Αγριοβαμβακιά ή καμπανάκια)	A αγροί, ανοικτά ενδιαιτήματα (16)	8,8 (14)	L = D (14)	10 — 20 (6, 10, 21)	4 (84 %) (10)	τραυματισμός (14) καμία ειδική αγωγή (5, 10, 21)	PRE & POST (6, 22, 28, 31)	Α, ΣΤ	
Sida spinosa (Σίδη η ακανθώδης)	A αγροί, παρυφές δρόμων (16)	3,8 (14)	L = D (14)	10 — 20 (6, 21)		τραυματισμός (14) η εκβλάστηση δεν επηρεάζεται από την ένταση της ακτινοβολίας (1) καμία ειδική αγωγή (6, 21)	PRE & POST (6, 21, 28, 31)	Α, ΣΤ	
PAPAVERACEAE *Papaver rhoeas* (Παπάβερ η ροϊάς ή παπαρούνα)	A αγροί, αρόσιμες εκτάσεις, διαταραγμένες περιοχές (16, 19)	0,1 — 0,3 (4, 14, 19, 29)	L = D (14)	0 (4, 29)	4 (50 %) (19)	ψυχρή στρωμάτωση και τραυματισμός (1, 19, 32) καμία ειδική αγωγή (4, 14, 29)	POST (4)	Α, Δ, Ε, ΣΤ, Ζ	
POACEAE *Agrostis tenuis* (Αγρώστις η λεπτή)	χλοοτάπητες, βοσκότοποι (16)	0,07 (14)	L > D (ΙΟ)	20 (10)	10 (62 %) (10)	αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (1, 17-19) καμία ειδική αγωγή (10)	POST (10)	Α, Ε	
Alopecurus myosuroides (Αλεποουρά)	A αγροί, ανοικτά ενδιαιτήματα (16)	0,9 — 1,6 (29, 34)	L = D (14)	2 (29)	< 24 (30 %) (34)	τραυματισμός (14) αγωγή με 101 mg/l KNO_3 (14) θερμή στρωμάτωση (1) αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (1) καμία ειδική αγωγή (34)	PRE & POST (28, 34)	Α	32

▼M6

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ Βοτανική ονομασία του είδους (κοινή ονομασία στα ελληνικά)	Διάρκεια ζωής (1) και ενδιαίτημα	Βάρος σπόρου (mg)	Φωτοπερίοδος για την εκβλάστηση ή την ανάπτυξη (2)	Βάθος φύτευσης (mm) (3)	Χρόνος εκβλάστησης (ημέρες) (4)	Ειδικές αγωγές (5)	Δοκιμή τοξικότητας (6)	Προμηθευτές σπόρων (7)	Άλλες παραπομπές (8)
Avena fatua (Αγριοβρώμη)	A καλλιεργούμενες εκτάσεις, ανοικτά ενδιαιτήματα (16)	7 — 37,5 (14, 30)	L = D (14) L > D (6)	10 — 20 (6, 10)	3 (70 %) (18)	τραυματισμός (7, 32) αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (1) ψυχρή στρωμάτωση (1, 18) καμία ειδική αγωγή (6, 10, 14)	PRE & POST (6, 10, 28, 31)	A	
Bromus tectorum (Βρώμος ο στεγοφυής)	A αγροί, παρυφές δρόμων, αρόσιμες εκτάσεις (16)	0,45 — 2,28 (14, 29)	L = D (14)	3 (29)		περίοδος ωρίμανσης (1, 7, 32) αναστολή εκβλάστησης λόγω φωτός (1) καμία ειδική αγωγή (14)	PRE & POST (28, 31)	A	
Cynosurus cristatus (Κυνόσουρα η λοφωτή)	P αγροί, παρυφές δρόμων, ανοικτά ενδιαιτήματα (16, 19)	0,5 — 0,7 (14, 19, 29)	L = D (14)	0 (29)	3 (50 %) (19)	η εκβλάστηση δεν επηρεάζεται από την ένταση της ακτινοβολίας (19) καμία ειδική αγωγή (14, 29)	POST (5)	A	
Digitaria sanguinalis (Αιματόχορτο)	A αγροί, χλοοτάπητες, ανοικτά ενδιαιτήματα (16)	0,52 — 0,6 (14, 30)	L = D (14)	10-20 (21)	7 (75 %) 14 (94 %) (7)	τραυματισμός, ψυχρή στρωμάτωση και ωρίμανση (1, 7, 14, 32) αγωγή με 101 mg/l KNO_3 (14) αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (1) καμία ειδική αγωγή (21)	PRE & POST (18, 25, 31)	A	
Echinochloa crusgalli (Μουχρίτσα)	A (16)	1,5 (14)	L = D (14) L > D (3)	10 — 20 (7, 21)		τραυματισμός (7, 32) η εκβλάστηση δεν επηρεάζεται από την ένταση της ακτινοβολίας (1) καμία ειδική αγωγή (3, 14, 21)	PRE & POST (3, 21, 28, 31)	A	
Elymus canadensis (Έλυμος ή άγρια σίκαλη του Καναδά)	P παραποτάμιες περιοχές, διαταραγμένες περιοχές (16)	4-5 (14, 30)	L = D (11)	1 (11)	14 — 28 (11)	καμία ειδική αγωγή (2, 11)	POST (2)	Γ, Δ, Ε	
Festuca pratensis (Φεστούκα η λειμώνιος)	P αγροί, υγρές περιοχές (16, 19)	1,53 — 2,2 (16, 19)	L = D (14) L > D (10)	20 (10)	9 (74 %) (10) 2 (50 %) (19)	καμία ειδική αγωγή (10, 19)	POST (10)	A	7

▼M6

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ Βοτανική ονομασία του είδους (κοινή ονομασία στα ελληνικά)	Διάρκεια ζωής [1] και ενδιαίτημα	Βάρος σπόρου (mg)	Φωτοπερίοδος για την εκβλάστηση ή την ανάπτυξη [2]	Βάθος φύτευσης (mm) [3]	Χρόνος εκβλάστησης (ημέρες) [4]	Ειδικές αγωγές [5]	Δοκιμή τοξικότητας [6]	Προμηθευτές σπόρων [7]	Άλλες παραπομπές [8]
Hordeum pusillum (Κριθάρι νάνος)	A βοσκότοποι, παρυφές δρόμων, ανοικτά ενδιαιτήματα (16)	3,28 (14)				θερμή στρωμάτωση (1) η εκβλάστηση δεν επηρεάζεται από την ένταση της ακτινοβολίας (1)	PRE (31)		7
Phleum pratense (Φλέως ο λειμώνιος)	P βοσκότοποι, αρόσιμες εκτάσεις, διαταραγμένες περιοχές (16, 19)	0,45 (14, 19)	L > D (10, 14)	0-10 (10, 19)	2 (74 %) (10) 8 (50 %) (19)	αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (19) η εκβλάστηση δεν επηρεάζεται από την ένταση της ακτινοβολίας (17) καμία ειδική αγωγή (10, 14, 17, 19)	POST (10)	A, E	
POLYGONACEAE *Polygonum convolvulus* (Αναρριχώμενο πολύγωνο)	A ανοικτά ενδιαιτήματα, παρυφές δρόμων (16)	5 — 8 (4, 14, 29)	L = D (20)	0-2 (4, 29)		ψυχρή στρωμάτωση για 4 — 8 εβδομάδες (1, 2, 4, 20, 29) η εκβλάστηση δεν επηρεάζεται από την ένταση της ακτινοβολίας (1)	PRE & POST 1, 2, 20, 28, 31	A	32
Polygonum lapathifolium (Λαπάτσα)	A υγρά εδάφη (16)	1,8 — 2,5 (14)	L > D (6)		5 (94 %) (18)	η εκβλάστηση δεν επηρεάζεται από την ένταση της ακτινοβολίας (1) αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (18) ψυχρή στρωμάτωση (1) καμία ειδική αγωγή (5)	PRE & POST (6)	A, E	
Polygonum pennsylvanicum (Πολύγωνο της Πενσυλβανίας)	A αγροί, ανοικτά ενδιαιτήματα (16)	3,6 — 7 (14, 29)		2 (29)		ψυχρή στρωμάτωση για 4 εβδομάδες σε 0 — 5 °C (1, 29) αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (1)	PRE (31)	A, E	
Polygonum periscaria (Αγριοπιπεριά)	A διαταραγμένες περιοχές, αρόσιμες εκτάσεις (16, 19)	2,1 — 2,3 (14, 19)	L > D (13)	0 (19)	< 14 (13) 2 (50 %) (19)	τραυματισμός, ψυχρή στρωμάτωση, αγωγή με GA (14) ψυχρή στρωμάτωση, ωρίμανση (17-19) αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (19) καμία ειδική αγωγή (13)	POST (13)	A	32

▼M6

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ Βοτανική ονομασία του είδους (κοινή ονομασία στα ελληνικά)	Διάρκεια ζωής ([1]) και ενδιαίτημα	Βάρος σπόρου (mg)	Φωτοπερίοδος για την εκβλάστηση ή την ανάπτυξη ([2])	Βάθος φύτευσης (mm) ([3])	Χρόνος εκβλάστησης (ημέρες) ([4])	Ειδικές αγωγές ([5])	Δοκιμή τοξικότητας ([6])	Προμηθευτές σπόρων ([7])	Άλλες παραπομπές ([8])
Rumex crispus (Λάπαθο)	P αρόσιμες εκτάσεις, παρυφές δρόμων, ανοικτά ενδιαιτήματα (16, 19)	1,3 — 1,5 (4, 14, 19)	L = D (14, 33)	0 (4, 19, 33)	3 (50 %) (19) 6 (100 %) (33)	αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (18, 19) η ωρίμανση μπορεί να κρίνεται απαραίτητη (18) καμία ειδική αγωγή (4, 14, 33)	POST (4, 33)	A, E	32
PRIMULACEAE *Anagallis arvensis* (Αναγαλλίς η αρουραία)	A αρόσιμες εκτάσεις, ανοικτά ενδιαιτήματα, διαταραγμένες περιοχές (16, 19)	0,4 — 1,5 (4, 14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	ψυχρή στρωμάτωση, αγωγή με GA (1, 14, 18, 19, 32) απαιτείται φως για την εκβλάστηση (1) καμία ειδική αγωγή (2, 4)	POST (2,4)	A, ΣΤ	
RANUNCULACEAE *Ranunculus acris* (Βατράχιο το κοινό)	P αρόσιμες εκτάσεις, παρυφές δρόμων, ανοικτά ενδιαιτήματα (16, 19)	1,5 — 8 (14, 19, 29)	L = D (14)	1 (29)	41-56 (19, 29)	καμία ειδική αγωγή (5, 14, 22, 24 -26)	POST (5, 22, 24-26)		32
ROSACEAE *Geum urbanum* (Γέο το αστικό)	P θαμνοστοιχίες, υγρές περιοχές (16, 19)	0,8 — 1,5 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 16 (79 %) (18)	αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (18, 19) θερμή στρωμάτωση (1) καμία ειδική αγωγή (5, 14, 22, 25, 26)	POST (5, 22, 25, 26)	A	
RUBIACEAE *Galium aparine* (Γάλιο ή κολλητσίδα)	A αρόσιμες εκτάσεις, υγρές περιοχές, διαταραγμένες περιοχές (16, 19)	7-9 (14, 19)	L = D (14)		5 (50 %) (19) 6 (100 %) (18)	ψυχρή στρωμάτωση (1, 18, 19) η εκβλάστηση δεν επηρεάζεται από την ένταση της ακτινοβολίας (18, 19) αναστολή εκβλάστησης λόγω φωτός (1) καμία ειδική αγωγή (6, 14)	PRE & POST (6, 28)	A	32

▼M6

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ Βοτανική ονομασία του είδους (κοινή ονομασία στα ελληνικά)	Διάρκεια ζωής ([1]) και ενδιαίτημα	Βάρος σπόρου (mg)	Φωτοπερίοδος για την εκβλάστηση ή την ανάπτυξη ([2])	Βάθος φύτευσης (mm) ([3])	Χρόνος εκβλάστησης (ημέρες) ([4])	Ειδικές αγωγές ([5])	Δοκιμή τοξικότητας ([6])	Προμηθευτές σπόρων ([7])	Άλλες παραπομπές ([8])
Galium mollugo (Γάλιο το μόλλουγο)	P θαμνοστοιχίες, ανοικτές περιοχές (8)	7 (29)	L = D (14)	2 (29)		καμία ειδική αγωγή (5, 14, 22, 24, 26, 29)	POST (5, 22, 24, 26)	A	
SCROPHULARIACEAE *Digitalis purpurea* (Διγιταλίς η Πορφυρά)	B, P θαμνοστοιχίες, ανοικτές περιοχές (16, 19)	0,1 — 0,6 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	6 (50 %) (19) 8 (99 %) (18)	αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (1, 17-19) καμία ειδική αγωγή (4, 22-26)	POST (4, 22 — 26)	Δ, Z, ΣΤ	
Veronica persica (Βερόνικα η περσική)	A αρόσιμες εκτάσεις, ανοικτά ενδιαιτήματα, διαταραγμένες περιοχές (16, 19)	0,5 — 0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3(19) 5 (96 %) (18)	αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (18, 19) ψυχρή στρωμάτωση (18) καμία ειδική αγωγή (14)	PRE & POST (28)	A	32

([1]) A = Ετήσια, B = Διετή, P = Πολυετή.

([2]) Οι παραπομπές 11,14 και 33 αφορούν την αναλογία φωτός (L) και σκότους (D) που απαιτείται για την επαγωγή της εκβλάστησης των σπόρων. Οι παραπομπές 3, 6, 9, 10, 13 και 20 αφορούν τις συνθήκες ανάπτυξης στα θερμοκήπια.

([3]) Το 0 mm δηλώνει ότι οι σπόροι φυτεύονται στην επιφάνεια του εδάφους ή ότι απαιτείται φως για την εκβλάστηση των σπόρων.

([4]) Οι παρεχόμενοι αριθμοί αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των ημερών εκβλάστησης ενός ποσοστού σπόρων σύμφωνα με τη σχετική παραπομπή, π.χ. εκβλάστηση διάρκειας 3 ημερών (50 %) (παραπομπή 19).

([5]) Ο χρόνος ωρίμανσης και/ή στρωμάτωσης δεν είναι πάντα διαθέσιμος. Με εξαίρεση τις απαιτήσεις της επεξεργασίας εν ψυχρώ, οι συνθήκες θερμοκρασίας δεν προσδιορίζονται, αφού στις δοκιμές που διενεργούνται σε θερμοκήπια υπάρχει περιορισμένος έλεγχος της θερμοκρασίας. Οι περισσότεροι σπόροι βλασταίνουν σε συνθήκες συνήθους διακύμανσης της θερμοκρασίας που μετράται στα θερμοκήπια.

([6]) Δηλώνει ότι το συγκεκριμένο είδος χρησιμοποιήθηκε σε δοκιμή φυτοτοξικότητας με ζιζανιοκτόνα η οποία διενεργήθηκε πριν από την ανάδυση (PRE) και/ή μετά την ανάδυση (POST).

([7]) Παρέχει παραδείγματα προμηθευτών εμπορικών σπόρων.

([8]) Παρέχει δύο εναλλακτικές παραπομπές που εξετάστηκαν.

▼**M6**

Αναφερόμενοι προμηθευτές σπόρων

Αναγνωριστικό προμηθευτή	Στοιχεία προμηθευτή
A	Herbiseed New Farm, Mire Lane, West End, Twyford RG10 0NJ ΗΝΩΜΕΝΟ ΒΑΣΙΛΕΙΟ +44 (0) 1189 349 464 www.herbiseed.com
B	Tropilab Inc. 8240 Ulmerton Road, Largo, FL 33771-3948 ΗΠΑ (727) 344 — 4050 www.tropilab.com
Γ	Pterophylla — Native Plants & Seeds #316 Regional Road 60, RR#1, Walsingham, ON N0E 1X0 ΚΑΝΑΔΑΣ (519) 586 — 3985
Δ	Applewood Seed Co. 5380 Vivian St., Arvada, CO 80002 ΗΠΑ (303) 431 — 7333 www.applewoodseed.com
E	Ernst Conservation Seeds 9006 Mercer Pike, Meadville, PA 16335 ΗΠΑ (800) 873 — 3321 www.ernstseed.com
ΣΤ	Chiltern Seeds Bortree Stile, Ulverston, Cumbria LA12 7PB ΗΝΩΜΕΝΟ ΒΑΣΙΛΕΙΟ +44 1229 581137 www.chiltemseeds.co.uk
Z	Thompson & Morgan P.O. Box 1051, Fort Erie, ON L2A 6C7 ΚΑΝΑΔΑΣ (800) 274 — 7333 www.thompson-morgan.com

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Baskin, C.C. & Baskin, J.M. 1998. Seeds. Academic Press, Toronto

(2) Blackburn, L.G. & Boutin, C. 2003. Subtle effects of herbicide use in the context of genetically modified crops: a case study with glyphosate (Round-UpÒ). Ecotoxicology, 12:271-285.

(3) Boutin, C., Lee, H-B., Peart, T., Batchelor, P.S., & Maguire, R.J. 2000. Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. Environmental Toxicology & Chemistry, 19(10):2532-2541.

(4) Boutin, C., Elmegaard, N., & Kjaer, C. 2004. Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: implications for risk assessment. Ecotoxicology, 13:349-369.

(5) Breeze, V., Thomas, G., & Butler, R. 1992. Use of a model and toxicity data to predict the risks to some wild plant species from drift of four herbicides. Annals of Applied Biology, 121:669-677.

(6) Brown, R.A., & Farmer, D. 1991. Track-sprayer and glasshouse techniques for terrestrial plant bioassays with pesticides. In: Plants for toxicity assessment: 2nd volume. ASTM STP 1115, J.W. Gorsuch, W.R. Lower, W.Wang, & M.A. Lewis, eds. American Society for Testing & Materials, Philadelphia. σ. 197-208.

▼**M6**

(7) Buhler, D.D. & Hoffman, M.L. 1999. Anderson's guide to practical methods of propagating weeds and other plants. Weed Science Society of America, Lawrence, K.

(8) Clapham, A.R., Tutin, T.G., & Warburg, E.F. 1981. Excursion flora of the British Isles, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge

(9) Clay, P.A. & Griffin, J.L. 2000. Weed seed production and seedling emergence response to late-season glyphosate applications. Weed Science, 48:481-486.

(10) Cole, J.F.H. & Canning, L. 1993. Rationale for the choice of species in the regulatory testing of the effects of pesticides on terrestrial non-target plants. BCPC — Weeds. σ. 151-156.

(11) Fiely, M. (Ernst Conservation Seeds). 2004. Προσωπική ανακοίνωση. (www.ernstseed.com)

(12) Fletcher, J.S., Johnson, F.L., & McFarlane, J.C. 1990. Influence of greenhouse versus field testing and taxonomic differences on plant sensitivity to chemical treatment. Environmental Toxicology & Chemistry, 9:769-776.

(13) Fletcher, J.S., Pfleeger, T.G., Ratsch, H.C., & Hayes, R. 1996. Potential impact of low levels of chlorsulfuron and other herbicides on growth and yield of nontarget plants. Environmental Toxicology & Chemistry, 15(7):1189-1196.

(14) Flynn, S., Turner, R.M., and Dickie, J.B. 2004. Seed Information Database (release 6.0, Oct 2004) Royal Botanic Gardens, Kew (www.rbgkew.org.uk/data/sid)

(15) Franzaring, J., Kempenaar, C., & van der Eerden, L.J.M. 2001. Effects of vapours of chlorpropham and ethofumesate on wild plant species. Environmental Pollution, 114:21-28.

(16) Gleason, H.A. & Cronquist, A. 1991. Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada, 2nd ed. New York Botanical Garden, Bronx, NY

(17) Grime, J.P. 1981. The role of seed dormancy in vegetation dynamics. Annals of Applied Biology, 98:555-558.

(18) Grime, J.P., Mason, G., Curtis, A.V., Rodman, J., Band, S.R., Mowforth, M.A.G., Neal, A.M., & Shaw, S. 1981. A comparative study of germination characteristics in a local flora. Journal of Ecology, 69:1017-1059.

(19) Grime, J.P., Hodgson, J.G., & Hunt, R. 1988. Comparative plant ecology: a functional approach to common British species. Unwin Hyman Ltd., Λονδίνο

(20) Kjaer, C. 1994. Sublethal effects of chlorsulfuron on black bindweed (Polygonum convolvulus L.). Weed Research, 34:453-459.

(21) Klingaman, T.E., King, C.A., & Oliver, L.R. 1992. Effect of application rate, weed species, and weed stage of growth on imazethapyr activity. Weed Science, 40:227-232.

(22) Marrs, R.H., Williams, C.T., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1989. Assessment of the effects of herbicide spray drift on a range of plant species of conservation interest. Environmental Pollution, 59:71-86.

(23) Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of herbicide spray drift on selected species of nature conservation interest: the effects of plant age and surrounding vegetation structure. Environmental Pollution, 69:223-235.

(24) Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of mecoprop drift on some plant species of conservation interest when grown in standardized mixtures in microcosms. Environmental Pollution, 73:25-42.

(25) Marrs, R.H., Frost, A.J., Plant, R.A., & Lunnis, P. 1993. Determination of buffer zones to protect seedlings of non-target plants from the effects of glyphosate spray drift. Agriculture, Ecosystems, & Environment, 45:283-293.

▼**M6**

(26) Marrs, R.H. & Frost, A.J. 1997. A microcosm approach to detection of the effects of herbicide spray drift in plant communities. Journal of Environmental Management, 50:369-388.

(27) Marshall, E.J.P. & Bernie, J.E. 1985. Herbicide effects on field margin flora. BCPC — Weeds. σ. 1021-1028.

(28) McKelvey, R.A., Wright, J.P., & Honegger, J.L. 2002. A comparison of crop and non-crop plants as sensitive species for regulatory testing. Pest Management Science, 58:1161-1174.

(29) Morton, S. (Herbiseed). 2004. Προσωπική ανακοίνωση. (http://www.herbiseed.com)

(30) USDA, NRCS. 2004. The Plants Database, version 3.5. (http://plants.usda.gov). National Plant Data Centre, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA

(31) USEPA. 1999. One-Liner Database. [U.S. E.P.A./Office of Pesticide Programs/Environmental Fate and Effects Division/Environmental Epidemiology Branch].

(32) Webster, R.H. 1979. Technical Report No. 56: Growing weeds from seeds and other propagules for experimental purposes. Agricultural Research Council Weed Research Organization, Oxford.

(33) White, A. L. & Boutin, C. (National Wildlife Research Centre, Environment Canada). 2004. Προσωπική ανακοίνωση.

(34) Zwerger, P. & Pestemer, W. 2000. Testing the phytotoxic effects of herbicides on higher terrestrial non-target plants using a plant life-cycle test. Z. PflKrankh. PflSchutz, Sonderh., 17:711-718.

▼**M6**

Προσάρτημα 4

Παραδείγματά κατάλληλων συνθηκών ανάπτυξής για ορισμένα είδη καλλιεργειών

Οι ακόλουθες συνθήκες διαπιστώθηκε ότι είναι κατάλληλες για 10 είδη καλλιεργειών και μπορούν να χρησιμοποιούνται ως κατεύθυνση για τις δοκιμές σε θαλάμους ανάπτυξης μαζί με ορισμένα άλλα είδη:

Συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα: 350 ± 50 ppm·

Σχετική υγρασία: 70 ± 5 % κατά τις περιόδους φωτισμού και 90 ± 5 % κατά τις περιόδους σκότους·

Θερμοκρασία: 25 ± 3 °C κατά την ημέρα, 20 ± 3 °C κατά τη νύκτα·

Φωτοπερίοδος: 16 ώρες φωτός / 8 ώρες σκότους, με την παραδοχή μέσου μήκους κύματος 400 έως 700 nm·

Φως: φωτεινότητα 350 ± 50 μE/m^2/s, μετρούμενη στην κορυφή του φυλλώματος.

Τα είδη καλλιεργειών είναι τα εξής:

— τομάτα (*Solanum lycopersicon*)·

— αγγούρι (*Cucumis sativus*)·

— μαρούλι (*Lactuca sativa*)·

— σόγια (*Glycine max*)·

— λάχανο (*Brassica oleracea var. capitata*)·

— καρότο (*Daucus carota*)·

— βρώμη (*Avena sativa*)·

— λόλιο το πολυετές (*Lolium perenne*)·

— αραβόσιτος (*Zea mays*)·

— κρεμμύδι (*Allium cepa*).

▼M6

Γ.32. ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΣΕ ENCHYTRAEIDAE

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 220 του ΟΟΣΑ (2004). Έχει σχεδιαστεί με σκοπό να εκτιμηθούν οι επιδράσεις των χημικών ουσιών στις αναπαραγωγικές επιδόσεις του λευκού σκώληκα, *Enchytraeus albidus* Henle 1873, στο έδαφος. Η δοκιμή βασίζεται, κατά κύριο λόγο, σε μέθοδο που έχει αναπτυχθεί από την Ομοσπονδιακή Υπηρεσία Περιβάλλοντος (Umweltbundesamt) της Γερμανίας (1) και έχει υποβληθεί σε δοκιμή δακτυλίου (ring test) (2). Εξετάστηκαν και άλλες μέθοδοι για την εκτίμηση της τοξικότητας των χημικών ουσιών στα Enchytraeidae και στους γαιοσκώληκες (3)(4)(5)(6)(7)(8).

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

2. Οι αννελίδες που διαβιούν στο έδαφος και ανήκουν στο γένος *Enchytraeus* είναι οικολογικά σημαντικά είδη για τις δοκιμές οικοτοξικότητας. Αν και τα Enchytraeidae απαντούν συχνά σε εδάφη που περιέχουν γαιοσκώληκες, είναι εξίσου αληθές ότι συχνά αφθονούν σε πολλά εδάφη από τα οποία απουσιάζουν οι γαιοσκώληκες. Τα Enchytraeidae μπορούν να χρησιμοποιούνται σε εργαστηριακές δοκιμές, καθώς και σε μελέτες σε συνθήκες προσομοίωσης αγρού και σε συνθήκες αγρού. Από πρακτική άποψη, πολλά είδη *Enchytraeus* είναι εύκολα στον χειρισμό και την εκτροφή, και ο χρόνος γενεάς είναι σημαντικά μικρότερος από τον αντίστοιχο για τους γαιοσκώληκες. Για τον λόγο αυτό, η διάρκεια μιας δοκιμής αναπαραγωγής με Enchytraeidae είναι μόνο 4-6 εβδομάδες, ενώ για τους γαιοσκώληκες (*Eisenia fetida*) είναι 8 εβδομάδες.

3. Βασικές πληροφορίες σχετικά με την οικολογία και την οικοτοξικολογία των Enchytraeidae στο χερσαίο περιβάλλον περιλαμβάνονται στις παραπομπές (9)(10)(11)(12).

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

4. Οι ενήλικοι σκώληκες Enchytraeidae εκτίθενται σε ένα εύρος συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που έχει αναμειχθεί σε τεχνητό έδαφος. Η δοκιμή μπορεί να διαιρεθεί σε δύο στάδια: α) σε περίπτωση που δεν είναι διαθέσιμες επαρκείς πληροφορίες, μια δοκιμή προσδιορισμού του εύρους τιμών, κατά την οποία η θνησιμότητα είναι το βασικό τελικό σημείο που εκτιμάται έπειτα από έκθεση δύο εβδομάδων, και β) μια οριστική δοκιμή αναπαραγωγής, κατά την οποία εκτιμώνται ο συνολικός αριθμός νεαρών σκωλήκων ανά γεννήτορα και η επιβίωση των γεννητόρων. Η οριστική δοκιμή διαρκεί έξι εβδομάδες. Μετά τις πρώτες τρεις εβδομάδες, οι ενήλικοι σκώληκες απομακρύνονται και καταγράφονται οι μορφολογικές μεταβολές. Μετά την πάροδο ακόμα τριών εβδομάδων, υπολογίζεται ο αριθμός απογόνων που έχουν εκκολαφθεί από τα κουκούλια τα οποία παρήγαγαν οι ενήλικοι σκώληκες. Οι αναπαραγωγικές επιδόσεις των ζώων που έχουν εκτεθεί στην υπό δοκιμή χημική ουσία συγκρίνονται με τις αντίστοιχες επιδόσεις του(των) μάρτυρα(-ων), ώστε να προσδιοριστούν (i) η συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC) και/ή (ii) η EC_x (π.χ. EC_{10}, EC_{50}) με τη βοήθεια ενός μοντέλου παλινδρόμησης για να εκτιμηθεί η συγκέντρωση που θα προκαλούσε μείωση των αναπαραγωγικών επιδόσεων κατά x %. Οι συγκεντρώσεις δοκιμής θα πρέπει να περικλείουν την EC_x (π.χ. EC_{10}, EC_{50}), ώστε η EC_x να προκύπτει από παρεμβολή παρά από προεκβολή.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

5. Η υδατοδιαλυτότητα, ο log K_{ow}, ο συντελεστής κατανομής εδάφους/νερού (π.χ. κεφάλαιο Γ.18 ή Γ.19 του παρόντος παραρτήματος) και η τάση ατμών της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει, κατά προτίμηση, να είναι γνωστά. Θα ήταν επιθυμητό να υπάρχουν επιπλέον πληροφορίες σχετικά με την πορεία της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο έδαφος, όπως η ταχύτητα φωτόλυσης και η ταχύτητα υδρόλυσης.

6. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών μπορεί να χρησιμοποιείται για υδατοδιαλυτές ή μη υδατοδιαλυτές χημικές ουσίες. Ωστόσο, ο τρόπος εφαρμογής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα διαφέρει ανάλογα. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε πτητικές χημικές ουσίες, δηλ. σε χημικές ουσίες για τις οποίες η σταθερά του Henry ή ο συντελεστής κατανομής αέρα/νερού είναι μεγαλύτερα από τη μονάδα, ή σε χημικές ουσίες για τις οποίες η τάση ατμών υπερβαίνει τα 0,0133 Pa στους 25 °C.

▼M6

ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

7. Η δοκιμή θεωρείται έγκυρη, εάν διαπιστώνεται κατόπιν ελέγχων ότι ικανοποιούνται τα ακόλουθα κριτήρια επιδόσεων:

— η θνησιμότητα στον ενήλικο πληθυσμό δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 20 % στο τέλος της δοκιμής προσδιορισμού του εύρους τιμών και μετά τις πρώτες τρεις εβδομάδες της δοκιμής αναπαραγωγής·

— με την παραδοχή ότι χρησιμοποιήθηκαν 10 ενήλικοι σκώληκες ανά δοχείο κατά την έναρξη της δοκιμής, θα πρέπει να έχουν παραχθεί, κατά μέσο όρο, τουλάχιστον 25 νεαροί σκώληκες ανά δοχείο στο τέλος της δοκιμής·

— ο συντελεστής μεταβολής που προσεγγίζει τον μέσο αριθμό νεαρών σκωλήκων δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 50 % στο τέλος της δοκιμής αναπαραγωγής.

Εάν η δοκιμή δεν ικανοποιεί τα ανωτέρω κριτήρια εγκυρότητας, θα πρέπει να τερματίζεται, εκτός εάν μπορεί να δικαιολογηθεί η συνέχισή της. Η αιτιολογία θα πρέπει να περιλαμβάνεται στην έκθεση δοκιμής.

ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

8. Για να επαληθευτεί ότι η απόκριση των οργανισμών δοκιμής δεν έχει μεταβληθεί σημαντικά με την πάροδο του χρόνου, η χημική ουσία αναφοράς θα πρέπει είτε να υποβάλλεται σε δοκιμή σε τακτά χρονικά διαστήματα είτε να περιλαμβάνεται σε κάθε δοκιμή. Κατάλληλη χημική ουσία αναφοράς είναι η καρβενδαζίμη, η οποία έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει την επιβίωση και την αναπαραγωγή των Enchytraeidae (13)(14)· θα μπορούσαν επίσης να χρησιμοποιούνται άλλες χημικές ουσίες για τις οποίες υπάρχουν γνωστά τοξικολογικά δεδομένα. Σε δοκιμή δακτυλίου χρησιμοποιήθηκε σκεύασμα καρβενδαζίμης, γνωστό με την εμπορική ονομασία Derosal ™, το οποίο διατίθεται από την εταιρεία AgrEvo (Φρανκφούρτη, Γερμανία) και περιέχει 360 g/l (32,18 %) δραστικής ουσίας (2). Η τιμή της EC_{50} για την αναπαραγωγή που προσδιορίστηκε στη δοκιμή δακτυλίου κυμάνθηκε μεταξύ 1,2 ± 0,8 mg δραστικού συστατικού ανά κιλό ξηρής μάζας (2). Εάν στη σειρά δοκιμών συμπεριλαμβάνεται μια θετική πρότυπη τοξική ουσία, χρησιμοποιείται μόνο μία συγκέντρωση και ο αριθμός επαναλήψεων θα πρέπει να είναι ίδιος με τον αριθμό των μαρτύρων. Για την καρβενδαζίμη, συνιστάται η δοκιμή 1,2 mg δραστικού συστατικού ανά κιλό ξηρού βάρους (υποβλήθηκε στη δοκιμή με τη μορφή υγρού σκευάσματος).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Εξοπλισμός

9. Τα δοχεία δοκιμής θα πρέπει να είναι κατασκευασμένα από γυαλί ή άλλο χημικώς αδρανές υλικό. Οι γυάλινοι κώδωνες (π.χ. με όγκο 0,20 - 0,25 λίτρα και διάμετρο ≈ 6 cm) είναι κατάλληλοι. Τα δοχεία θα πρέπει να έχουν διαφανή καλύμματα (π.χ. από γυαλί ή πολυαιθυλένιο), τα οποία να είναι σχεδιασμένα ώστε να μειώνουν την εξάτμιση του νερού, επιτρέποντας την ανταλλαγή αερίων μεταξύ του εδάφους και της ατμόσφαιρας. Τα καλύμματα θα πρέπει να είναι διαφανή, ώστε να επιτρέπουν τη μετάδοση του φωτός.

10. Απαιτείται συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός, και ειδικότερα:

— θάλαμος ξήρανσης·

— στερεοσκοπικό μικροσκόπιο·

— πεχάμετρο και φωτόμετρο·

— κατάλληλοι ζυγοί ακριβείας·

— κατάλληλος εξοπλισμός για τη ρύθμιση της θερμοκρασίας·

— κατάλληλος εξοπλισμός για τη ρύθμιση της υγρασίας (δεν είναι σημαντικός, εάν τα δοχεία έκθεσης έχουν καλύμματα)·

— επωαστήρας ή μικρό δωμάτιο με κλιματισμό·

— λαβίδες, άγκιστρα ή βρόχοι·

— λεκάνη εμφάνισης φωτογραφιών.

Παρασκευή του τεχνητού εδάφους

11. Στην παρούσα δοκιμή χρησιμοποιείται τεχνητό έδαφος (5)(7) με την ακόλουθη σύνθεση (με βάση το ξηρό βάρος, που έχει ξηρανθεί μέχρι σταθερού βάρους στους 105 °C):

▼**M6**

— 10 % τύρφη σφάγνων, αερόξηρη και λεπτοαλεσμένη (είναι αποδεκτό το μέγεθος σωματιδίων 2 ± 1 mm)· συνιστάται να ελέγχεται ότι το έδαφος που έχει παρασκευαστεί με πρόσφατη παρτίδα τύρφης είναι κατάλληλο για την καλλιέργεια των σκωλήκων προτού χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή·

— 20 % καολινιτική άργιλος (περιεκτικότητα σε καολινίτη κατά προτίμηση άνω του 30 %)·

— περίπου 0,3 έως 1,0 % ανθρακικό ασβέστιο ($CaCO_3$, κονιοποιημένο, αναλυτικής καθαρότητας), για να επιτευχθεί pH 6,0 ± 0,5· η ποσότητα ανθρακικού ασβεστίου που πρέπει να προστίθεται μπορεί να εξαρτάται, κατά κύριο λόγο, από την ποιότητα/φύση της τύρφης·

— περίπου 70 % αερόξηρη χαλαζιακή άμμος (ανάλογα με την απαιτούμενη ποσότητα $CaCO_3$), πρωτίστως λεπτή άμμος (το μέγεθος του 50 % και άνω των σωματιδίων θα πρέπει να είναι μεταξύ 50 και 200 μm).

Συνιστάται να αποδεικνύεται η καταλληλότητα του τεχνητού εδάφους για την καλλιέργεια των σκωλήκων και για την εκπλήρωση των κριτηρίων εγκυρότητας της δοκιμής πριν από τη χρήση του εδάφους σε οριστική δοκιμή. Συνιστάται ιδίως ο έλεγχος αυτός να διασφαλίζει ότι οι επιδόσεις της δοκιμής δεν αλλοιώνονται σε περίπτωση που η περιεκτικότητα του τεχνητού εδάφους σε οργανικό άνθρακα μειώνεται, π.χ. με μείωση της περιεκτικότητας σε τύρφη στο 4-5 % και με αντίστοιχη αύξηση της περιεκτικότητας σε άμμο. Με αυτή τη μείωση της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα είναι δυνατόν να μειωθούν οι δυνατότητες προσρόφησης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο έδαφος (οργανικός άνθρακας) και να αυξηθεί η διαθεσιμότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας για τους σκώληκες. Έχει αποδειχτεί ότι ο *Enchytraeus albidus* μπορεί να ικανοποιεί τα κριτήρια εγκυρότητας σχετικά με την αναπαραγωγή, όταν υποβάλλεται σε δοκιμές με γεωργικά εδάφη χαμηλότερης περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα απ' ό,τι προαναφέρεται (π.χ. 2,7 %) (15)· η –περιορισμένη– πείρα δείχνει ότι αυτό μπορεί να επιτευχθεί και σε τεχνητό έδαφος με 5 % τύρφη.

Σημείωση: Όταν χρησιμοποιείται φυσικό έδαφος σε επιπλέον δοκιμές (π.χ. ανώτερης βαθμίδας), η καταλληλότητα του εδάφους και η ικανοποίηση των κριτηρίων εγκυρότητας της δοκιμής θα πρέπει επίσης να αποδεικνύονται.

12. Τα ξηρά συστατικά του εδάφους αναμειγνύονται πλήρως (π.χ. σε εργαστηριακό αναμείκτη μεγάλης κλίμακας). Αυτό θα πρέπει να γίνεται τουλάχιστον μία εβδομάδα πριν από την έναρξη της δοκιμής. Το αναμειγμένο έδαφος θα πρέπει να φυλάσσεται για δύο ημέρες, για την εξισορρόπηση/σταθεροποίηση της οξύτητας. Για τον προσδιορισμό του pH χρησιμοποιείται μείγμα εδάφους και διάλυμα 1 M χλωριούχου καλίου (KCl) ή 0,01 M χλωριούχου ασβεστίου ($CaCl_2$) σε αναλογία 1:5 [βλ. (16) και προσάρτημα 3]. Εάν η οξύτητα του εδάφους υπερβαίνει το απαιτούμενο εύρος τιμών (βλ. σημείο 11), μπορεί να προσαρμόζεται με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας $CaCO_3$. Εάν το έδαφος είναι υπερβολικά αλκαλικό, μπορεί να προσαρμόζεται με την προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας του μείγματος που αναφέρεται στο σημείο 11, αλλά χωρίς $CaCO_3$.

13. Η μέγιστη υδατοχωρητικότητα του τεχνητού εδάφους προσδιορίζεται σύμφωνα με τις διεργασίες που περιγράφονται στο προσάρτημα 2. Μία ή δύο ημέρες πριν από την έναρξη της δοκιμής, το ξηρό τεχνητό έδαφος προϋγραίνεται με την προσθήκη επαρκούς ποσότητας απιονισμένου νερού, ώστε να επιτευχθεί περίπου το ήμισυ της τελικής περιεκτικότητας σε υγρασία, η οποία θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 40 % και 60 % της μέγιστης υδατοχωρητικότητας. Κατά την έναρξη της δοκιμής, το προϋγραθέν έδαφος διαρείται σε δόσεις οι οποίες αντιστοιχούν στον αριθμό των συγκεντρώσεων δοκιμής (και, κατά περίπτωση, των χημικών ουσιών αναφοράς) και των

▼M6

μαρτύρων που χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή. Η περιεκτικότητα σε υγρασία προσαρμόζεται στο 40-60 % της μέγιστης υδατοχωρητικότητας με την προσθήκη του διαλύματος της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και/ή με την προσθήκη απεσταγμένου ή απιονισμένου νερού (βλ. σημεία 19-21). Η περιεκτικότητα σε υγρασία προσδιορίζεται στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής (με ξήρανση μέχρι σταθερού βάρους στους 105 °C) και θα πρέπει να κυμαίνεται εντός του βέλτιστου εύρους για την επιβίωση των σκωλήκων. Η περιεκτικότητα του εδάφους σε υγρασία μπορεί να εκτιμηθεί κατά προσέγγιση με την ήπια συμπίεση του εδάφους με το χέρι: εάν η περιεκτικότητα σε υγρασία είναι σωστή, θα πρέπει να εμφανίζονται μικρές σταγόνες νερού μεταξύ των δακτύλων.

Επιλογή και προετοιμασία των ζώων δοκιμής

14. Το συνιστώμενο για τη δοκιμή είδος είναι το *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (λευκός σκώληκας), μέλος της οικογένειας των Enchytraeidae (τάξη Ολιγόχαιτων, συνομοταξία Αννελιδών). Το είδος *E. albidus* είναι ένα από τα μεγαλύτερα είδη Enchytraeidae· έχουν καταγραφεί δείγματα μήκους έως 35 mm (17)(18). Το *E. albidus* εμφανίζει παγκόσμια κατανομή και εντοπίζεται σε θαλάσσια, λιμναία και χερσαία ενδιαιτήματα, κυρίως σε αποσυντιθέμενη οργανική ύλη (φύκη, κομπόστ) και σπανίως σε λειμώνες (9). Η ευρεία οικολογική ανοχή του και ορισμένες μορφολογικές παραλλαγές μπορεί να αποτελούν ένδειξη ότι υπάρχουν διαφορετικές φυλές.

15. Το *E. albidus* διατίθεται στο εμπόριο ως ιχθυοτροφή. Θα πρέπει να ελέγχεται αν η καλλιέργεια είναι μολυσμένη από άλλα, συνήθως μικρότερα, είδη (1)(19). Σε περίπτωση μόλυνσης, όλοι οι σκώληκες θα πρέπει να εκπλύνονται με νερό σε τρυβλίο Petri. Στη συνέχεια, θα πρέπει να επιλέγονται μεγάλα δείγματα ενηλίκων *E. albidus* (με τη βοήθεια στερεοσκοπικού μικροσκοπίου) για την έναρξη νέας καλλιέργειας και όλοι οι άλλοι σκώληκες να απορρίπτονται. Το *E. albidus* μπορεί να αναπαράγεται εύκολα σε μεγάλο εύρος οργανικών υλών (βλ. προσάρτημα 4). Ο κύκλος ζωής του *E. albidus* είναι σύντομος, καθώς φθάνει σε ωρίμανση εντός διαστήματος από 33 ημέρες (στους 18 °C) έως 74 ημέρες (στους 12 °C) (1). Για τη δοκιμή θα χρησιμοποιούνται μόνο καλλιέργειες που έχουν παραμείνει στο εργαστήριο για τουλάχιστον 5 εβδομάδες (μία γενεά), χωρίς να έχουν παρουσιαστεί προβλήματα.

16. Κατάλληλα είναι και άλλα είδη του γένους *Enchytraeus*, όπως το *E. buchholzi* Vejdovsky 1879 ή το *E. crypticus* Westheide & Graefe 1992 (βλ. προσάρτημα 5). Εάν χρησιμοποιούνται άλλα είδη *Enchytraeus*, πρέπει να προσδιορίζονται σαφώς και να αιτιολογείται το σκεπτικό της επιλογής τους.

17. Τα ζώα που χρησιμοποιούνται στις δοκιμές είναι ενήλικοι σκώληκες. Θα πρέπει να έχουν αυγά (με κηλίδες) στον δακτυλιοειδή ωοφόρο σάκο και να έχουν περίπου το ίδιο μέγεθος (μήκος περίπου 1 cm). Ο συγχρονισμός της καλλιέργειας αναπαραγωγής δεν είναι απαραίτητος.

18. Εάν τα Enchytraeidae δεν αναπαράγονται στον ίδιο τύπο εδάφους και υπό τις συνθήκες που χρησιμοποιούνται για την τελική δοκιμή (συμπεριλαμβανομένων των συνθηκών σίτισης), πρέπει να εγκλιματίζονται για τουλάχιστον 24 ώρες και έως τρεις ημέρες. Αρχικά, θα πρέπει να εγκλιματίζεται μεγαλύτερος αριθμός ενήλικων σκωλήκων από εκείνον που απαιτείται για την εκτέλεση της δοκιμής, ώστε να υπάρχει το περιθώριο απόρριψης των δειγμάτων που έχουν υποστεί βλάβη ή έχουν καταστεί ακατάλληλα με άλλον τρόπο. Στο τέλος της περιόδου εγκλιματισμού, επιλέγονται για τη δοκιμή μόνο οι σκώληκες που περιέχουν αυγά και δεν εμφανίζουν ανωμαλίες στη συμπεριφορά τους (π.χ. επιχειρούν να αποδράσουν από το έδαφος). Οι σκώληκες απομακρύνονται προσεκτικά με τη χρήση λαβίδων εργαστηρίου, αγκίστρων ή βρόχων και τοποθετούνται σε τρυβλίο Petri που περιέχει μικρή ποσότητα γλυκού νερού. Για τον συγκεκριμένο σκοπό προτιμάται ανασυσταθέν γλυκό νερό, όπως προτείνεται στο κεφάλαιο Γ.20 του παρόντος παραρτήματος (Δοκιμασία αναπαραγωγής *Daphnia magna*), αφού το απιονισμένο νερό, το απομεταλλοποιημένο νερό ή το νερό βρύσης θα μπορούσε να είναι επιβλαβές για τους σκώληκες. Οι σκώληκες επιθεωρούνται στο στερεοσκοπικό μικροσκόπιο και απομακρύνονται όσοι δεν περιέχουν αυγά. Λαμβάνεται μέριμνα ώστε να απομακρύνονται και να απορρίπτονται τυχόν ακάρεα ή κολλέμβολα που ενδέχεται να έχουν μολύνει τις καλλιέργειες. Οι υγιείς σκώληκες που δεν έχουν χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή επιστρέφουν στη μητρική καλλιέργεια.

▼M6

Παρασκευή των συγκεντρώσεων δοκιμής

Υδατοδιαλυτή υπό δοκιμή χημική ουσία

19. Παρασκευάζεται διάλυμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε απιονισμένο νερό σε ποσότητα επαρκή για όλες τις επαναλήψεις μίας συγκέντρωσης δοκιμής. Συνιστάται να χρησιμοποιείται κατάλληλη ποσότητα νερού ώστε να επιτυγχάνεται η απαιτούμενη περιεκτικότητα σε υγρασία, δηλ. 40 έως 60 % της μέγιστης υδατοχωρητικότητας (βλ. σημείο 13). Κάθε διάλυμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας αναμειγνύεται πλήρως με μία παρτίδα του προϋγραθέντος εδάφους πριν από την εισαγωγή του στο δοχείο δοκιμής.

Υπό δοκιμή χημική ουσία αδιάλυτη στο νερό

20. Όταν πρόκειται για χημικές ουσίες αδιάλυτες στο νερό αλλά διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες, η υπό δοκιμή χημική ουσία μπορεί να διαλύεται στον μικρότερο δυνατό όγκο κατάλληλου φορέα (π.χ. ακετόνης). Μόνο πτητικοί διαλύτες θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Ο φορέας ψεκάζεται ή αναμειγνύεται με μικρή ποσότητα, π.χ. 2,5 g, λεπτής χαλαζιακής άμμου. Ο φορέας απομακρύνεται με εξάτμιση κάτω από απαγωγό επί τουλάχιστον μία ώρα. Αυτό το μείγμα χαλαζιακής άμμου και υπό δοκιμή χημικής ουσίας προστίθεται στο προϋγραθέν έδαφος και αναμειγνύεται πλήρως μετά την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας απιονισμένου νερού για να επιτευχθεί η απαιτούμενη περιεκτικότητα σε υγρασία. Το τελικό μείγμα εισάγεται στα δοχεία δοκιμής.

21. Εάν πρόκειται για χημικές ουσίες που είναι δυσδιάλυτες στο νερό και σε οργανικούς διαλύτες, αναμειγνύεται το ισοδύναμο 2,5 g λεπτοαλεσμένης χαλαζιακής άμμου ανά δοχείο δοκιμής με την ποσότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, για να ληφθεί η επιθυμητή συγκέντρωση δοκιμής. Αυτό το μείγμα χαλαζιακής άμμου και υπό δοκιμή χημικής ουσίας προστίθεται στο προϋγραθέν έδαφος και αναμειγνύεται πλήρως μετά την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας απιονισμένου νερού για να επιτευχθεί η απαιτούμενη περιεκτικότητα σε υγρασία. Το τελικό μείγμα κατανέμεται στα δοχεία δοκιμής. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για κάθε συγκέντρωση δοκιμής και παρασκευάζεται επίσης κατάλληλος μάρτυρας.

22. Κατά κανόνα, οι χημικές ουσίες δεν θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμές σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από 1 000 mg/kg ξηρής μάζας εδάφους. Ωστόσο, οι δοκιμές σε υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορεί να απαιτούνται ανάλογα με τους στόχους της εκάστοτε δοκιμής.

ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ

Ομάδες δοκιμής και ελέγχου

23. Για κάθε συγκέντρωση δοκιμής, εισάγεται στο δοχείο δοκιμής ποσότητα του εδάφους δοκιμής η οποία αντιστοιχεί σε 20 g ξηρού βάρους (βλ. σημεία 19-21). Παρασκευάζονται επίσης μάρτυρες, χωρίς την υπό δοκιμή χημική ουσία. Σε κάθε δοχείο δοκιμής τοποθετείται τροφή σύμφωνα με τις διεργασίες που περιγράφονται στο σημείο 29. Δέκα σκώληκες κατανέμονται τυχαία σε κάθε δοχείο δοκιμής. Οι σκώληκες μεταφέρονται προσεκτικά σε κάθε δοχείο δοκιμής και τοποθετούνται στην επιφάνεια του εδάφους με τη χρήση, π.χ., λαβίδων εργαστηρίου, αγκίστρων ή βρόχων. Ο αριθμός επαναλήψεων για τις συγκεντρώσεις δοκιμής και για τους μάρτυρες εξαρτάται από τον σχεδιασμό της δοκιμής που εκτελείται (βλ. σημείο 34). Τα δοχεία δοκιμής τοποθετούνται τυχαία στον επωαστήρα δοκιμής, και αυτές οι θέσεις αλλάζουν τυχαία σε εβδομαδιαία βάση.

24. Εάν χρησιμοποιείται φορέας για την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, θα πρέπει να υποβάλλεται σε δοκιμή, εκτός από τη σειρά με την υπό δοκιμή ουσία, και μία σειρά μαρτύρων που περιέχουν χαλαζιακή άμμο ψεκασμένη ή αναμειγμένη με διαλύτη. Η συγκέντρωση του διαλύτη ή του μέσου διασποράς πρέπει να είναι η ίδια με εκείνη που χρησιμοποιείται στα δοχεία δοκιμής που περιέχουν την υπό δοκιμή χημική ουσία. Σε δοκιμή θα πρέπει επίσης να υποβάλλεται μια σειρά μαρτύρων που περιέχουν επιπλέον χαλαζιακή άμμο (2,5 g ανά δοχείο) για τις ουσίες που απαιτούν χορήγηση σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφονται στο σημείο 21.

▼M6

Συνθήκες δοκιμής

25. Η θερμοκρασία δοκιμής είναι 20 ± 2 °C. Για να αποτρέπεται η διαφυγή σκωλήκων από το έδαφος, η δοκιμή διενεργείται σε ελεγχόμενους κύκλους φωτός-σκότους (κατά προτίμηση, 16 ώρες φωτός και 8 ώρες σκότους) με φωτισμό έντασης 400 έως 800 lux στην περιοχή των δοχείων δοκιμής.

26. Για τον έλεγχο της υγρασίας τους εδάφους, τα δοχεία ζυγίζονται στην αρχή της δοκιμής και, στη συνέχεια, μία φορά την εβδομάδα. Η απώλεια βάρους αποκαθίσταται με την προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας απιονισμένου νερού. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η απώλεια νερού μπορεί να μειωθεί με τη διατήρηση υψηλής υγρασίας του αέρα (> 80 %) στον επωαστήρα δοκιμής.

27. Η περιεκτικότητα σε υγρασία και το pH θα πρέπει να μετρώνται στην αρχή και στο τέλος τόσο της δοκιμής προσδιορισμού του εύρους τιμών όσο και της οριστικής δοκιμής. Οι μετρήσεις θα πρέπει να διενεργούνται τόσο σε δείγματα εδάφους που έχουν υποβληθεί σε αγωγή (όλες οι συγκεντρώσεις) όσο και σε δείγματα εδάφους ελέγχου, τα οποία έχουν παρασκευαστεί και φυλάσσονται με τον ίδιο τρόπο όπως οι καλλιέργειες δοκιμής, αλλά δεν περιέχουν σκώληκες. Η τροφή θα πρέπει να προστίθεται μόνο σε αυτά τα δείγματα εδάφους στην αρχή της δοκιμής, ώστε να διευκολύνεται η μικροβιακή δραστηριότητα. Η ποσότητα προστιθέμενης τροφής θα πρέπει να είναι ίδια με εκείνη που προστίθεται στις καλλιέργειες δοκιμής. Δεν είναι αναγκαίο να προστίθεται επιπλέον τροφή σε αυτά τα δοχεία κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

Σίτιση

28. Μπορεί να χρησιμοποιείται τροφή ικανή να διατηρεί τον πληθυσμό των Enchytraeidae. Έχει διαπιστωθεί ότι οι νιφάδες βρώμης –κατά προτίμηση, θερμασμένες σε αυτόκαυστο πριν από τη χρήση, ώστε να προλαμβάνεται η μικροβιακή επιμόλυνση (ενδείκνυται επίσης η θέρμανση)– αποτελούν κατάλληλο υλικό σίτισης.

29. Αρχικά, η τροφή χορηγείται με την ανάμειξη 50 mg αλεσμένων νιφάδων βρώμης με το έδαφος σε κάθε δοχείο πριν από την εισαγωγή των σκωλήκων. Στη συνέχεια, η τροφή χορηγείται σε εβδομαδιαία βάση έως την 21η ημέρα. Η σίτιση δεν πραγματοποιείται την 28η ημέρα, αφού οι ενήλικοι σκώληκες έχουν απομακρυνθεί σε αυτό το στάδιο και οι νεαροί σκώληκες χρειάζονται σχετικά μικρή ποσότητα επιπλέον τροφής από το στάδιο αυτό και μετά. Η σίτιση κατά τη διάρκεια της δοκιμής περιλαμβάνει 25 mg αλεσμένων νιφάδων βρώμης ανά δοχείο, που τοποθετούνται προσεκτικά στην επιφάνεια του εδάφους, ώστε να αποφεύγεται η πρόκληση βλάβης στους σκώληκες. Για να μειωθεί η ανάπτυξη μυκήτων, οι νιφάδες βρώμης θα πρέπει να θάβονται στο έδαφος, δηλ. να καλύπτονται με μικρές ποσότητες εδάφους. Εάν παραμένουν υπολείμματα τροφής, θα πρέπει να μειώνεται το σιτηρέσιο.

Σχεδιασμός της δοκιμής προσδιορισμού του εύρους τιμών

30. Όταν κρίνεται αναγκαίο, διενεργείται η δοκιμή προσδιορισμού του εύρους τιμών, π.χ. με πέντε συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας των 0,1, 1,0, 10, 100 και 1 000 mg/kg (ξερό βάρος εδάφους). Μία επανάληψη για κάθε αγωγή και μάρτυρα είναι αρκετή.

31. Η δοκιμή προσδιορισμού του εύρους τιμών διαρκεί δύο εβδομάδες. Στο τέλος της δοκιμής, αξιολογείται η θνησιμότητα των σκωλήκων. Ένας σκώληκας θεωρείται νεκρός, εάν δεν αντιδρά σε μηχανικό ερέθισμα στο πρόσθιο άκρο. Επιπλέον πληροφορίες σχετικά με τη θνησιμότητα μπορεί να είναι χρήσιμες και για να καθοριστεί το εύρος των συγκεντρώσεων που θα χρησιμοποιηθούν στην οριστική δοκιμή. Κατά συνέπεια, οι μεταβολές στη συμπεριφορά των ενηλίκων (π.χ. εάν δεν είναι σε θέση να σκάπτουν το έδαφος ή εάν μένουν ακίνητοι στο γυάλινο τοίχωμα του δοχείου δοκιμής) και στη μορφολογία τους (π.χ. η ύπαρξη ανοικτών πληγών) θα πρέπει επίσης να καταγράφονται, παράλληλα με την παρουσία τυχόν νεαρών σκωλήκων. Η παρουσία αυτή μπορεί να προσδιορίζεται με την εφαρμογή της μεθόδου χρωματισμού που περιγράφεται στο προσάρτημα 6.

32. Η LC_{50} μπορεί να προσδιοριστεί κατά προσέγγιση με τον υπολογισμό του γεωμετρικού μέσου των δεδομένων θνησιμότητας. Κατά τον προσδιορισμό του εύρους συγκεντρώσεων για την οριστική δοκιμή, λαμβάνεται η παραδοχή ότι οι επιδράσεις στην αναπαραγωγή είναι χαμηλότερες από την LC_{50} κατά έναν παράγοντα έως 10. Ωστόσο, πρόκειται για εμπειρική συσχέτιση, η οποία σε οποιαδήποτε συγκεκριμένη περίπτωση ενδέχεται να είναι διαφορετική. Οι επιπλέον παρατηρήσεις που διατυπώνονται στο πλαίσιο της

▼M6

δοκιμής προσδιορισμού του εύρους τιμών, όπως η παρουσία νεαρών σκωλήκων, μπορεί να συμβάλουν στον λεπτομερέστερο προσδιορισμό του εύρους συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που θα χρησιμοποιηθούν στην οριστική δοκιμή.

33. Για τον ακριβή προσδιορισμό της LC_{50}, συνιστάται να εκτελείται η δοκιμή με τη χρήση τουλάχιστον τεσσάρων επαναλήψεων ανά συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και επαρκούς αριθμού συγκεντρώσεων, ώστε να προκαλούνται τουλάχιστον τέσσερις διαφορετικές στατιστικώς σημαντικές μέσες αποκρίσεις σε αυτές τις συγκεντρώσεις. Κατά περίπτωση, χρησιμοποιείται ανάλογος αριθμός συγκεντρώσεων και επαναλήψεων για τους μάρτυρες.

Σχεδιασμός της οριστικής δοκιμής αναπαραγωγής

34. Προτείνονται τρεις σχεδιασμοί με βάση τις συστάσεις που προκύπτουν από μια δοκιμή δακτυλίου (2):

— Για τον προσδιορισμό της NOEC, θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις σε γεωμετρική πρόοδο. Συνιστώνται τέσσερις επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση δοκιμής συν οκτώ μάρτυρες. Οι συγκεντρώσεις θα πρέπει να απέχουν μεταξύ τους κατά έναν παράγοντα που να μην υπερβαίνει το 1,8.

— Για τον προσδιορισμό της EC_x (π.χ. EC_{10}, EC_{50}), θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις και οι συγκεντρώσεις θα πρέπει να περικλείουν την EC_x, ώστε η EC_x να προκύπτει από παρεμβολή παρά από προεκβολή. Συνιστώνται τουλάχιστον τέσσερις επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση δοκιμής και τέσσερις επαναλήψεις ελέγχου. Ο παράγοντας διαστήματος μπορεί να ποικίλλει, δηλ. να είναι μικρότερος ή ίσος με 1,8 στο εύρος των αναμενόμενων επιδράσεων, και άνω του 1,8 στις υψηλότερες και χαμηλότερες συγκεντρώσεις.

— Η συνδυασμένη προσέγγιση καθιστά εφικτό τον προσδιορισμό τόσο της NOEC όσο και της EC_x. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οκτώ συγκεντρώσεις αγωγής σε γεωμετρική πρόοδο. Συνιστώνται τέσσερις επαναλήψεις για κάθε αγωγή συν οκτώ μάρτυρες. Οι συγκεντρώσεις θα πρέπει να απέχουν μεταξύ τους κατά έναν παράγοντα που να μην υπερβαίνει το 1,8.

35. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται δέκα ενήλικοι σκώληκες ανά δοχείο δοκιμής (βλ. σημείο 23). Στα δοχεία δοκιμής προστίθεται τροφή στην αρχή της δοκιμής και, στη συνέχεια, μία φορά την εβδομάδα (βλ. σημείο 29) έως και την 21η ημέρα. Την 21η ημέρα τα δείγματα εδάφους αναμοχλεύονται προσεκτικά με το χέρι, οι ζώντες ενήλικοι σκώληκες εξετάζονται και μετρώνται, και καταγράφονται οι μεταβολές στη συμπεριφορά τους (π.χ. εάν δεν είναι σε θέση να σκάπτουν το έδαφος ή εάν μένουν ακίνητοι στο γυάλινο τοίχωμα του δοχείου δοκιμής) και στη μορφολογία τους (π.χ. ανοικτές πληγές). Στη συνέχεια, όλοι οι ενήλικοι σκώληκες απομακρύνονται από τα δοχεία δοκιμής και το έδαφος δοκιμής. Το έδαφος δοκιμής που περιέχει τυχόν κουκούλια τα οποία είχαν παραχθεί εκκολάπτεται για τρεις επιπλέον εβδομάδες υπό τις ίδιες συνθήκες δοκιμής, με τη διαφορά ότι η σίτιση πραγματοποιείται μόνο κατά την 35η ημέρα (δηλ. 25 mg αλεσμένες νιφάδες βρώμης ανά δοχείο).

36. Έπειτα από έξι εβδομάδες, γίνεται η μέτρηση των νεοεκκολαφθέντων σκωλήκων. Συνιστάται η μέθοδος χρωματισμού με κόκκινο της Βεγγάλης (βλ. προσάρτημα 6), αν και έχουν αποδειχθεί κατάλληλες και άλλες τεχνικές υγρής (αλλά όχι θερμής) εκχύλισης και επίπλευσης (βλ. προσάρτημα 6) (4)(10)(11)(20). Η μέθοδος χρωματισμού με κόκκινο της Βεγγάλης συνιστάται επειδή η υγρή εκχύλιση από το έδαφος μπορεί να παρεμποδίζεται από τη θολερότητα που οφείλεται στα αιωρούμενα σωματίδια αργίλου.

Οριακή δοκιμή

37. Εάν δεν παρατηρούνται επιδράσεις στην υψηλότερη συγκέντρωση κατά τη δοκιμή προσδιορισμού του εύρους τιμών (δηλ. 1 000 mg/kg), η δοκιμή αναπαραγωγής μπορεί να διενεργείται ως οριακή δοκιμή με τη χρήση 1 000 mg/kg, ώστε να αποδεικνύεται ότι η NOEC για την αναπαραγωγή είναι μεγαλύτερη από τη συγκεκριμένη τιμή.

▼**M6**

Περίληψη και χρονοδιάγραμμα της δοκιμής

38. Τα βήματα της δοκιμής συνοψίζονται ως εξής:

Χρόνος	Δοκιμή προσδιορισμού του εύρους τιμών	Οριστική δοκιμή
Ημέρα –7 ή προγενέστερη	— Προετοιμασία τεχνητού εδάφους (ανάμειξη ξηρών συστατικών)	— Προετοιμασία τεχνητού εδάφους (ανάμειξη ξηρών συστατικών)
Ημέρα –5	— Έλεγχος του pH του τεχνητού εδάφους — Μέτρηση της μέγιστης υδατοχωρητικότητας του εδάφους	— Έλεγχος του pH του τεχνητού εδάφους — Μέτρηση της μέγιστης υδατοχωρητικότητας του εδάφους
Ημέρα –5 έως –3	— Διαλογή σκωλήκων για εγκλιματισμό	— Διαλογή σκωλήκων για εγκλιματισμό
Ημέρα — 3 έως 0	— Εγκλιματισμός σκωλήκων για τουλάχιστον 24 ώρες	— Εγκλιματισμός σκωλήκων για τουλάχιστον 24 ώρες
Ημέρα –1	— Προϋγρανση του τεχνητού εδάφους και κατανομή σε παρτίδες	— Προϋγρανση του τεχνητού εδάφους και κατανομή σε παρτίδες
Ημέρα 0	— Παρασκευή διαλυμάτων παρακαταθήκης — Εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας — Ζύγιση του υποστρώματος δοκιμής στα δοχεία δοκιμής — Ανάμειξη στην τροφή — Εισαγωγή των σκωλήκων — Μέτρηση του pH του εδάφους και της περιεκτικότητας σε υγρασία	— Παρασκευή διαλυμάτων παρακαταθήκης — Εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας — Ζύγιση του υποστρώματος δοκιμής στα δοχεία δοκιμής — Ανάμειξη στην τροφή — Εισαγωγή των σκωλήκων — Μέτρηση του pH του εδάφους και της περιεκτικότητας σε υγρασία
Ημέρα 7	— Έλεγχος της περιεκτικότητας του εδάφους σε υγρασία	— Έλεγχος της περιεκτικότητας του εδάφους σε υγρασία — Σίτιση
Ημέρα 14	— Προσδιορισμός της θνησιμότητας στον ενήλικο πληθυσμό — Εκτίμηση του αριθμού των νεαρών σκωλήκων — Μέτρηση του pH του εδάφους και της περιεκτικότητας σε υγρασία	— Έλεγχος της περιεκτικότητας του εδάφους σε υγρασία — Σίτιση
Ημέρα 21		— Παρατήρηση της συμπεριφοράς των ενηλίκων — Απομάκρυνση των ενηλίκων — Προσδιορισμός της θνησιμότητας στον ενήλικο πληθυσμό — Έλεγχος της περιεκτικότητας του εδάφους σε υγρασία — Σίτιση
Ημέρα 28		— Έλεγχος της περιεκτικότητας του εδάφους σε υγρασία — Διακοπή σίτισης
Ημέρα 35		— Έλεγχος της περιεκτικότητας του εδάφους σε υγρασία — Σίτιση
Ημέρα 42		— Μέτρηση των νεαρών σκωλήκων — Μέτρηση του pH του εδάφους και της περιεκτικότητας σε υγρασία

▼M6

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΕΙΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

39. Επισκόπηση των αποτελεσμάτων παρέχεται στο προσάρτημα 7. Ωστόσο, στην παρούσα μέθοδο δοκιμών δεν δίνεται καμία οριστική στατιστική κατεύθυνση όσον αφορά την ανάλυση των αποτελεσμάτων της δοκιμής.

40. Στη δοκιμή προσδιορισμού του εύρους τιμών, το βασικό τελικό σημείο είναι η θνησιμότητα. Ωστόσο, οι μεταβολές στη συμπεριφορά των ενήλικων σκωλήκων (π.χ. εάν δεν είναι σε θέση να σκάπτουν το έδαφος ή εάν μένουν ακίνητοι στο γυάλινο τοίχωμα του δοχείου δοκιμής) και στη μορφολογία τους (π.χ. η ύπαρξη ανοικτών πληγών) θα πρέπει επίσης να καταγράφονται, παράλληλα με την παρουσία τυχόν νεαρών σκωλήκων. Η ανάλυση Probit (21) ή η λογιστική παλινδρόμηση θα πρέπει, κατά κανόνα, να εφαρμόζονται για τον προσδιορισμό της LC_{50}. Ωστόσο, σε περιπτώσεις που η συγκεκριμένη μέθοδος ανάλυσης είναι ακατάλληλη (π.χ. εάν είναι διαθέσιμες λιγότερες από τρεις συγκεντρώσεις με μερική θνησιμότητα), μπορούν να χρησιμοποιούνται εναλλακτικές μέθοδοι. Αυτές οι μέθοδοι θα μπορούσαν να περιλαμβάνουν κινητούς μέσους όρους (22), την απλοποιημένη μέθοδο Spearman-Karber (23) ή την απλή παρεμβολή (π.χ. γεωμετρικός μέσος της LC_0 και της LC_{100}, όπως υπολογίζεται με την τετραγωνική ρίζα της LC_0 πολλαπλασιαζόμενη με την LC_{100}).

41. Στην οριστική δοκιμή, το τελικό σημείο είναι η γονιμότητα (δηλ. ο αριθμός των νεαρών σκωλήκων που παράγονται). Ωστόσο, όπως και στη δοκιμή προσδιορισμού του εύρους τιμών, όλα τα άλλα σημεία νοσηρότητας θα πρέπει να καταγράφονται στην τελική έκθεση. Η στατιστική ανάλυση απαιτεί να υπολογίζονται η αριθμητική μέση τιμή και η τυπική απόκλιση ανά αγωγή και ανά μάρτυρα για την αναπαραγωγή.

42. Εάν έχει διενεργηθεί ανάλυση διασποράς, η τυπική απόκλιση, s, και οι βαθμοί ελευθερίας, df, μπορούν να αντικατασταθούν από τη συνολική εκτίμηση της διασποράς που λαμβάνεται από την ANOVA και από τους βαθμούς ελευθερίας της, αντίστοιχα — με τον όρο ότι η διασπορά δεν εξαρτάται από τη συγκέντρωση. Σ' αυτή την περίπτωση, χρησιμοποιούνται οι χωριστές διασπορές των μαρτύρων και των δειγμάτων που έχουν υποβληθεί σε αγωγή. Κατά κανόνα, οι τιμές αυτές υπολογίζονται με τη βοήθεια εμπορικού λογισμικού στατιστικής ανάλυσης που χρησιμοποιεί τα ανά δοχείο αποτελέσματα ως επαναλήψεις. Εάν η συνένωση δεδομένων για τον αρνητικό μάρτυρα και τον μάρτυρα με τον διαλύτη εμφανίζεται καταλληλότερη από τη διενέργεια των δοκιμών σε σύγκριση με έναν από αυτούς τους μάρτυρες, θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή για να διαπιστώνεται ότι δεν διαφέρουν σημαντικά (για κατάλληλες δοκιμές, βλ. σημείο 45 και προσάρτημα 7).

43. Η διεξαγωγή περαιτέρω στατιστικών δοκιμών και συναγωγών εξαρτάται από το κατά πόσον οι επαναληπτικές τιμές κατανέμονται κανονικά και παρουσιάζουν ομοιογένεια ως προς τη διασπορά τους.

Εκτίμηση NOEC

44. Θα πρέπει να προτιμάται η εφαρμογή ισχυρών δοκιμών. Για να διαπιστωθεί κατά πόσον η κατανομή των δεδομένων είναι κανονική, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται στοιχεία, π.χ., από προηγούμενες εμπειρίες με δοκιμές δακτυλίου ή άλλα ιστορικά δεδομένα. Η ομοιογένεια ως προς τη διασπορά (ομοσκεδαστικότητα) είναι κρισιμότερο στοιχείο. Έχει διαπιστωθεί εμπειρικά ότι η διασπορά συχνά αυξάνεται όταν αυξάνεται ο μέσος όρος. Σ' αυτές τις περιπτώσεις, ο μετασχηματισμός των δεδομένων θα μπορούσε να έχει ως αποτέλεσμα την ομοσκεδαστικότητα. Ωστόσο, αυτός ο μετασχηματισμός θα πρέπει να βασίζεται στην πείρα με ιστορικά δεδομένα παρά με τα υπό εξέταση δεδομένα. Εάν υπάρχουν ομοιογενή δεδομένα, θα πρέπει να διενεργούνται πολλές δοκιμασίες t, όπως η δοκιμασία Williams ($\alpha = 0,05$, μονόπλευρη δοκιμή) (24)(25) ή, σε ορισμένες περιπτώσεις, η δοκιμασία Dunnett (26)(27). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, στην περίπτωση άνισης αναπαραγωγής, οι τιμές t του πίνακα πρέπει να διορθώνονται όπως υποδεικνύεται από τους Dunnett και Williams. Μερικές φορές, λόγω μεγάλης μεταβολής, οι αποκρίσεις δεν αυξάνονται/μειώνονται με κανονικούς ρυθμούς. Σ' αυτή την περίπτωση αισθητής απόκλισης από την μονοτονικότητα, η δοκιμασία Dunnett είναι καταλληλότερη. Εάν παρατηρούνται αποκλίσεις από την ομοσκεδαστικότητα, μπορεί να είναι εύλογο να διερευνηθούν προσεκτικότερα πιθανές επιδράσεις στις διασπορές, ώστε να αποφασιστεί εάν οι δοκιμασίες t μπορούν να εφαρμοστούν χωρίς να αλλοιωθεί σημαντικά η

▼M6

ισχύς τους (28). Εναλλακτικά, μια δοκιμασία U πολλαπλής σύγκρισης, π.χ. η δοκιμασία U Bonferroni κατά Holm (29), ή όταν αυτά τα δεδομένα παρουσιάζουν ετεροσκεδαστικότητα αλλά συμφωνούν, κατά τα άλλα, με μια υποκείμενη μονότονη σχέση δόσης-απόκρισης, μπορεί να εφαρμοστεί μια άλλη μη παραμετρική δοκιμασία [π.χ. Jonckheere-Terpstra (30) (31) ή Shirley (32) (33)], η οποία θα ήταν, κατά κανόνα, προτιμότερη από τις δοκιμασίες t άνισης διασποράς (βλ. επίσης το σχήμα στο προσάρτημα 7).

45. Εάν έχει διενεργηθεί οριακή δοκιμή και εάν πληρούνται οι προϋποθέσεις των διαδικασιών για τις παραμετρικές δοκιμασίες (κανονικότητα, ομοιογένεια), μπορεί να χρησιμοποιηθεί η δοκιμασία t του Student κατά ζεύγη ή, διαφορετικά, η δοκιμασία U των Mann-Whitney (29).

Εκτίμηση της EC_x

46. Για τον υπολογισμό οποιασδήποτε τιμής EC_x, οι μέσοι όροι για κάθε αγωγή χρησιμοποιούνται για την ανάλυση (γραμμικής ή μη γραμμικής) παλινδρόμησης, αφού έχει αποκτηθεί κατάλληλη συνάρτηση δόσης-απόκρισης. Όσον αφορά την ανάπτυξη των σκωλήκων ως συνεχή απόκριση, οι τιμές EC_{x-} μπορούν να υπολογιστούν κατ' εκτίμηση με τη βοήθεια της κατάλληλης ανάλυσης παλινδρόμησης (35). Μεταξύ των κατάλληλων συναρτήσεων για τα δεδομένα που δέχονται μόνο δύο τιμές (θνησιμότητα/επιβίωση) και αριθμός παραγόμενων απογόνων είναι οι κανονικές σιγμοειδείς συναρτήσεις, οι λογιστικές συναρτήσεις ή οι συναρτήσεις Weibull, που περιέχουν δύο έως τέσσερις παραμέτρους, ορισμένες από τις οποίες μπορούν επίσης να μοντελοποιήσουν αποκρίσεις όρμησης. Εάν η συνάρτηση δόσης-απόκρισης προσαρμόστηκε μέσω ανάλυσης γραμμικής παλινδρόμησης, θα πρέπει να βρεθούν ένας σημαντικός r^2 (συντελεστής προσδιορισμού) και/ή μια κλίση με την ανάλυση παλινδρόμησης πριν από την εκτίμηση της EC_x με την εισαγωγή μιας τιμής που αντιστοιχεί στο x % του μέσου όρου του μάρτυρα στην εξίσωση που λαμβάνεται με την ανάλυση παλινδρόμησης. Τα όρια εμπιστοσύνης 95 % υπολογίζονται σύμφωνα με τη μέθοδο Fieller [όπως αναφέρεται στον Finney (21)] ή άλλες σύγχρονες κατάλληλες μεθόδους.

47. Εναλλακτικά, η απόκριση μοντελοποιείται ως ποσοστό ή αναλογία της παραμέτρου του μοντέλου που ερμηνεύεται ως η μέση απόκριση του μάρτυρα. Σ' αυτές τις περιπτώσεις, η κανονική σιγμοειδής καμπύλη (λογιστική, Weibull) μπορεί συχνά να προσαρμόζεται άνετα στα αποτελέσματα με την εφαρμογή της μεθόδου παλινδρόμησης probit (21). Σ' αυτές τις περιπτώσεις, η συνάρτηση στάθμισης πρέπει να προσαρμόζεται για τις μετρικές αποκρίσεις κατά Christensen (36). Ωστόσο, εάν έχει διαπιστωθεί όρμηση, η ανάλυση probit θα πρέπει να αντικαθίσταται από λογιστική συνάρτηση ή συνάρτηση Weibull τεσσάρων παραμέτρων, προσαρμοσμένη από μια μέθοδο μη γραμμικής παλινδρόμησης (36). Εάν μια κατάλληλη συνάρτηση δόσης-απόκρισης δεν μπορεί να προσαρμόζεται στα δεδομένα, είναι δυνατόν να χρησιμοποιούνται εναλλακτικές μέθοδοι για την εκτίμηση της EC_x και των ορίων εμπιστοσύνης της, όπως η μέθοδος των κινητών μέσων όρων κατά Thompson (22) και η απλοποιημένη μέθοδος Spearman-Karber (23).

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

48. Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

— φυσικές ιδιότητες και, κατά περίπτωση, φυσικοχημικές ιδιότητες (π.χ. υδατοδιαλυτότητα, τάση ατμών)·

— χημική ταυτότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σύμφωνα με την ονοματολογία IUPAC, τον αριθμό CAS, την παρτίδα, τον συντακτικό τύπο και την καθαρότητα·

— ημερομηνία λήξης του δείγματος.

Ζωικό είδος δοκιμής:

— ζώα που χρησιμοποιήθηκαν στη δοκιμή: είδος, επιστημονική ονομασία, πηγή των οργανισμών και συνθήκες αναπαραγωγής.

Συνθήκες δοκιμής:

— συστατικά και παρασκευή του τεχνητού εδάφους·

▼M6

— μέθοδος εφαρμογής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας·

— περιγραφή των συνθηκών δοκιμής, όπως θερμοκρασία, περιεκτικότητα σε υγρασία, pH κ.λπ.·

— πλήρης περιγραφή του σχεδιασμού και των διαδικασιών της δοκιμής.

Αποτελέσματα της δοκιμής:

— θνησιμότητα των ενήλικων σκωλήκων έπειτα από δύο εβδομάδες, και αριθμός των νεαρών σκωλήκων στο τέλος της δοκιμής προσδιορισμού του εύρους τιμών·

— θνησιμότητα των ενήλικων σκωλήκων έπειτα από τρεις εβδομάδες και πλήρης καταγραφή των νεαρών σκωλήκων στο τέλος της οριστικής δοκιμής·

— τυχόν παρατηρούμενα φυσικά ή παθολογικά συμπτώματα και μεταβολές στη συμπεριφορά των οργανισμών δοκιμής·

— η LC_{50}, η NOEC και/ή η EC_x (π.χ. EC_{50}, EC_{10}) για την αναπαραγωγή, εάν ορισμένες από αυτές μπορούν να εφαρμοστούν εντός των διαστημάτων εμπιστοσύνης, καθώς και γράφημα του προσαρμοσμένου μοντέλου που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό τους· όλες οι πληροφορίες και παρατηρήσεις που είναι χρήσιμες για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Αποκλίσεις από τις διαδικασίες που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών και τυχόν ασυνήθιστα συμβάντα κατά τη δοκιμή.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Römbke, J. (1989). Entwicklung eines Reproduktionstests an Bodenorganismen — Enchytraeen. Abschlußbericht des Battelle-Instituts e.V. Frankfurt für das Umweltbundesamt (Berlin), FE-Vorhaben 106 03 051/01.

(2) Römbke, J. and Moser, T. (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the Validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150 + 223 σελίδες.

(3) Westheide, W. and Bethge-Beilfuss, D. (1991). The sublethal enchytraeid test system: guidelines and some results, In: Modern Ecology: Basic and Applied Aspects. Ed. by Esser, G. and Overdieck, D. pp 497-508. Elsevier, Άμστερνταμ.

(4) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. and Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Annelida) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 σελίδες.

(5) Κεφάλαιο Γ.8 του παρόντος παραρτήματος, Τοξικότητα για τους γαιοσκώληκες.

(6) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using Artificial Soil substrate, No. 11268-1. ISO, Γενεύη.

(7) ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Γενεύη.

(8) Rundgren, S. and A.K. Augustsson (1998). Test on the enchytraeid *Cognettia sphagnetorum* (Vejdovsky 1877). In: Løkke, H. and C.A.M. Van Gestel, Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley and Sons, Chichester, 73-94.

(9) Kasprzak, K. (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23, 217-232.

(10) Römbke, J. (1995). Enchytraeen (Oligochaeta) als Bioindikator, UWSF — Z. Umweltchem. Ökotox. 7, 246-249.

(11) Dunger, W. and Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie. G. Fischer Verlag, Στουτγάρδη, Νέα Υόρκη.

▼**M6**

(12) Didden, W.A.M. (1993). Ecology of terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37, 2-29.

(13) Becker, H. (1991). Bodenorganismen — Prüfungskategorien der Forschung. UWSF — Z. Umweltchem. Ökotox. 3, 19-24.

(14) Römbke, J. and Federschmidt, A. (1995). Effects of the fungicide Carbendazim on Enchytraeidae in laboratory and field tests, Newsletter on Enchytraeidae 4, 79-96.

(15) Römbke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Enchytraeen als Testorganismen. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.

(16) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Γενεύη.

(17) Bell, A.W. (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus.* Ann. Mus. Novitat. 1902, 1-13.

(18) Nielsen, C.O. and Christensen, B. (1959). The Enchytraeidae, critical revision and taxonomy of European species. Natura Jutlandica 8-9, 1-160.

(19) Bouguenec, V. and Giani, N. (1987). Deux nouvelles especes d'*Enchytraeus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) et rediscription d'*E. bigeminus*. Remarques sur le genre *Enchytraeus*. Ann. Limnol. 23, 9-22.

(20) Korinkova, J. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke 32, 300-305.

(21) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3^{rd} ed.), σ. 19-76. Cambridge Univ. Press.

(22) Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. — Charles Griffin & Company Ltd, Λονδίνο.

(23) Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.

(24) Williams, D.A., (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.

(25) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.

(26) Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

(27) Dunnett, C.W., (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.

(28) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? Ecotoxicology 7: 355-361

(29) Holm, S., (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

(30) Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133-145.

(31) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327-333.

(32) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144-151.

▼**M6**

(33) Williams, D.A. (1986); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183-186.

(34) Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. Νέα Υόρκη.

(35) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213-221.

(36) Van Ewijk, P.H. and J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25-32.

▼M6

Προσάρτημα 1

Ορισμοί

Για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου δοκιμών χρησιμοποιούνται οι ακόλουθοι ορισμοί:

Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα.

EC_x (αποτελεσματική συγκέντρωση για επίδραση x %): η συγκέντρωση που προκαλεί επίδραση x % σε οργανισμούς δοκιμής εντός συγκεκριμένης περιόδου έκθεσης σε σύγκριση με μάρτυρα. Στην εν λόγω δοκιμή οι αποτελεσματικές συγκεντρώσεις εκφράζονται ως μάζα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ανά ξηρή μάζα του εδάφους δοκιμής.

LC_0 (μη θανατηφόρος συγκέντρωση): η συγκέντρωση μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας με την οποία δεν θανατώνεται κανένας από τους εκτιθέμενους οργανισμούς δοκιμής εντός δεδομένου χρονικού διαστήματος. Στην παρούσα δοκιμή η LC_0 εκφράζεται ως μάζα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ανά ξηρή μάζα εδάφους δοκιμής.

LC_{50} (μέση θανατηφόρος συγκέντρωση): η συγκέντρωση μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας που προκαλεί τον θάνατο του 50 % των εκτιθέμενων οργανισμών δοκιμής εντός δεδομένου χρονικού διαστήματος. Στην παρούσα δοκιμή η LC_{50} εκφράζεται ως μάζα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ανά ξηρή μάζα του εδάφους δοκιμής.

LC_{100} (ολικά θανατηφόρος συγκέντρωση): η συγκέντρωση μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας που προκαλεί τον θάνατο του 100 % των εκτιθέμενων οργανισμών δοκιμής εντός δεδομένου χρονικού διαστήματος. Στην παρούσα δοκιμή η LC_{100} εκφράζεται ως μάζα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ανά ξηρή μάζα του εδάφους δοκιμής.

LOEC (κατώτατη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης): η κατώτατη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που έχει στατιστικώς σημαντική επίδραση ($p < 0,05$). Στην παρούσα δοκιμή η LOEC εκφράζεται ως μάζα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ανά ξηρή μάζα του εδάφους δοκιμής. Όλες οι συγκεντρώσεις δοκιμής άνω της LOEC θα πρέπει κανονικά να παρουσιάζουν επίδραση στατιστικώς διαφορετική από τον μάρτυρα. Τυχόν αποκλίσεις από τα παραπάνω για τον προσδιορισμό της LOEC πρέπει να αιτιολογούνται στην έκθεση της δοκιμής.

NOEC (συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης): η μέγιστη αμέσως χαμηλότερη της LOEC συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρούνται επιδράσεις. Στην παρούσα δοκιμή, η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στη NOEC δεν έχει στατιστικώς σημαντική επίδραση ($p < 0,05$) εντός δεδομένης περιόδου έκθεσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα.

Ρυθμός αναπαραγωγής: ο μέσος αριθμός των νεαρών σκωλήκων που γεννιούνται ανά αριθμό ενήλικων κατά την περίοδο δοκιμής.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

▼**M6**

Προσάρτημα 2

Προσδιορισμός της μέγιστης υδατοχωρητικοτητασ

Προσδιορισμός της υδατοχωρητικότητας του τεχνητού εδάφους

Η ακόλουθη μέθοδος κρίθηκε κατάλληλη. Περιγράφεται στο παράρτημα C του ISO DIS 11268-2.

Συλλέγεται συγκεκριμένη ποσότητα (π.χ. 5 g) από το υπόστρωμα του υπό δοκιμή εδάφους με τη χρήση κατάλληλη συσκευής (ελικοειδής σωλήνας κ.λπ). Το κάτω μέρος του σωλήνα καλύπτεται με ένα κομμάτι διηθητικού χαρτιού και, αφού γεμίσει με νερό, τοποθετείται στη βάση δοκιμαστικού σωλήνα σε υδατόλουτρο. Ο σωλήνας προοδευτικά βυθίζεται έως ότου το επίπεδο του νερού καλύψει το πάνω μέρος του εδάφους. Θα πρέπει να μείνει στο νερό επί τρεις ώρες περίπου. Δεδομένου ότι δεν μπορεί να απορροφηθεί όλο το νερό από τα τριχοειδή του εδάφους, το δείγμα εδάφους θα πρέπει να αφεθεί να στραγγίξει για δύο ώρες με την τοποθέτηση του σωλήνα σε επιφάνεια πολύ υγρής λεπτοαλεσμένης χαλαζιακής άμμου που περιέχεται σε κλειστό δοχείο (ώστε να αποφεύγεται η ξήρανση). Στη συνέχεια το δείγμα ζυγίζεται, ξηραίνεται σε σταθερή μάζα στους 105 °C. Η υδατοχωρητικότητα μπορεί στη συνέχεια να υπολογιστεί ως εξής:

$$\text{WHC (σε \% ξηρής μάζας)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

όπου:

S = υπόστρωμα κορεσμένο από νερό + μάζα σωλήνα + μάζα διηθητικού χαρτιού

T = απόβαρο (μάζα σωλήνα + μάζα διηθητικού χαρτιού)

D = ξηρή μάζα υποστρώματος

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality -Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Γενεύη.

▼**M6**

Προσάρτημα 3

Προσδιορισμός του pH του εδάφους

Η ακόλουθη μέθοδος προσδιορισμού του pH ενός δείγματος εδάφους βασίζεται στην περιγραφή στο ISO 10390 (Ποιότητα εδάφους — προσδιορισμός του pH).

Συγκεκριμένη ποσότητα εδάφους ξηραίνεται σε θερμοκρασία δωματίου επί 12 ώρες τουλάχιστον. Κατόπιν, παρασκευάζεται εναιώρημα του εδάφους (που περιέχει τουλάχιστον 5 g εδάφους) σε πενταπλάσιο όγκο είτε διαλύματος 1 M χλωριούχου καλίου (KCl) αναλυτικής καθαρότητας είτε διαλύματος 0,01 M χλωριούχου ασβεστίου ($CaCl_2$) αναλυτικής καθαρότητας. Το εναιώρημα ανακινείται ζωηρά επί πέντε λεπτά και στη συνέχεια αφήνεται σε ηρεμία επί 2 τουλάχιστον ώρες, το πολύ όμως 24 ώρες. Το pH της υγρής φάσης μετριέται με χρήση πεχάμετρου, το οποίο βαθμονομείται κάθε φορά πριν από τη μέτρηση, με τη χρήση κατάλληλης σειράς ρυθμιστικών διαλυμάτων (π.χ. pH 4,0 και 7,0).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Γενεύη.

▼**M6**

Προσάρτημα 4

Συνθηκεσ καλλιεργειασ του *enchytraeus* sp.

Οι σκώληκες του είδους *Enchytraeus albidus* (καθώς και άλλα είδη *Enchytraeus*) μπορούν να καλλιεργηθούν σε μεγάλα πλαστικά κουτιά (π.χ. 30 × 60 × 10 cm) γεμάτα με μείγμα 1:1 τεχνητού εδάφους και φυσικού, μη μολυσμένου χώματος κηπουρικής. Το υλικό κομποστοποίησης θα πρέπει να αποφεύγεται, δεδομένου ότι μπορεί να περιέχει τοξικές χημικές ουσίες, όπως βαρέα μέταλλα. Πριν από τη χρήση θα πρέπει να αφαιρείται η πανίδα από το έδαφος (π.χ. με βαθεία κατάψυξη). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί υπόστρωμα που θα περιέχει μόνο τεχνητό έδαφος, αλλά ο ρυθμός αναπαραγωγής μπορεί να είναι χαμηλότερος από ό,τι αν είχαμε μεικτό υπόστρωμα εδάφους. Το χρησιμοποιούμενο για την καλλιέργεια υπόστρωμα θα πρέπει να έχει pH 6,0 ± 0,5.

Η καλλιέργεια γίνεται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία 15 έως 20 °C ± 2 °C. Θερμοκρασίες υψηλότερες από 23 °C πρέπει να αποφεύγονται. Το έδαφος πρέπει να διατηρείται υγρό αλλά όχι μουσκεμένο. Όταν εμφανίζονται μικρές σταγόνες νερού όταν συμπιέζεται το έδαφος ήπια με το χέρι, τότε το έδαφος έχει τη σωστή περιεκτικότητα σε υγρασία. Οι ανοξικές συνθήκες θα πρέπει να αποφεύγονται με τον εξής τρόπο: τα καλύμματα των δοχείων της καλλιέργειας πρέπει να επιτρέπουν επαρκή ανταλλαγή αερίων μεταξύ δοχείων και ατμόσφαιρας. Για τη διευκόλυνση του αερισμού, το έδαφος πρέπει να θραύεται προσεκτικά κάθε εβδομάδα.

Οι σκώληκες μπορούν να τρέφονται με νιφάδες βρώμης. Οι νιφάδες βρώμης, οι οποίες θα πρέπει να φυλάσσονται σε σφραγισμένα δοχεία, να αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο ή να θερμαίνονται πριν από τη χρήση, ώστε να αποφεύγονται μολύνσεις από ακάρεα σιτηρών (π.χ. *Glyzyphagus* sp., *Astigmata*, *Acarina*) ή αρπακτικά ακάρεα [π.χ. *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, *Gamasida*, *Acarina*]. Μετά τη θερμική επεξεργασία, η τροφή αλέθεται ώστε να μπορεί εύκολα να διασκορπιστεί στην επιφάνεια του εδάφους. Από καιρό σε καιρό, οι νιφάδες μπορούν να συμπληρώνονται με βιταμίνες, γάλα και μουρουνέλαιο. Μια άλλη πιθανή πηγή τροφής είναι οι ζύμες αρτοποιίας και η τροφή ψαριών «TetraMin».

Η σίτιση γίνεται περίπου δύο φορές την εβδομάδα. Κατάλληλη ποσότητα νιφάδων βρώμης διασκορπίζεται στην επιφάνεια του εδάφους ή αναμειγνύεται προσεκτικά στο υπόστρωμα κατά τη θραύση του εδάφους για να διευκολυνθεί ο αερισμός. Η απόλυτη ποσότητα της τροφής που χορηγείται εξαρτάται από τον αριθμό των σκωλήκων που είναι παρόντες στο υπόστρωμα. Γενικά, η ποσότητα της τροφής πρέπει να αυξηθεί αν καταναλώνεται μέσα στην ημέρα την οποία χορηγείται. Αντιστρόφως, αν η τροφή παραμένει στην επιφάνεια τη στιγμή της δεύτερης σίτισης (μια εβδομάδα αργότερα), θα πρέπει να μειωθεί. Σε περίπτωση που έχουν αναπτυχθεί μύκητες στην τροφή, αυτή πρέπει να αφαιρεθεί και να αντικατασταθεί. Ύστερα από τρεις μήνες, οι σκώληκες πρέπει να μεταφερθούν σε προσφάτως παρασκευασμένο υπόστρωμα.

Οι συνθήκες καλλιέργειας κρίνονται ικανοποιητικές, αν οι σκώληκες: α) δεν προσπαθούν να εγκαταλείψουν το υπόστρωμα, β) κινούνται γρήγορα μέσα στο έδαφος, γ) παρουσιάζουν στιλπνή εξωτερική επιφάνεια χωρίς προσκολλημένα σωματίδια του εδάφους, δ) έχουν περισσότερο ή λιγότερο υπόλευκο χρώμα, ε) εάν είναι ορατοί σκώληκες διαφόρων ηλικιών και στ) αναπαράγονται συνεχώς.

▼M6

Προσάρτημα 5

Επιδοσεισ δοκιμησ με αλλα ειδη *enchytraeus*

Επιλογή είδους

Άλλα είδη εκτός του *E. albidus* μπορούν να χρησιμοποιηθούν, αλλά η διαδικασία της δοκιμής και τα κριτήρια εγκυρότητας πρέπει να προσαρμοστούν ανάλογα. Επειδή πολλά είδη *Enchytraeus* είναι ευχερώς διαθέσιμα και μπορούν να διατηρηθούν ικανοποιητικά στο εργαστήριο, το σημαντικότερο κριτήριο για την επιλογή είδους πλην του *E. albidus* είναι η οικολογική σημασία και, επιπροσθέτως, η συγκρίσιμη ευαισθησία. Ενδεχομένως να υπάρχουν και τυπικοί λόγοι για την αλλαγή είδους. Για παράδειγμα, σε χώρες όπου δεν εμφανίζεται το είδος *E. albidus* και δεν μπορεί να εισαχθεί (λόγω περιορισμών καραντίνας), θα χρειαστεί να χρησιμοποιηθεί άλλο είδος *Enchytraeus*.

Παραδείγματα κατάλληλων εναλλακτικών ειδών

— *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe 1992): Κατά τα τελευταία έτη, το είδος αυτό έχει συχνά χρησιμοποιηθεί σε οικοτοξικολογικές μελέτες, λόγω της απλής αναπαραγωγής και δοκιμής του. Ωστόσο, είναι μικρό και αυτό καθιστά ακόμη δυσκολότερο τον χειρισμό σε σύγκριση με το *E. albidus* (ιδίως σε στάδιο πριν από τη χρήση της μεθόδου χρώσης). Δεν έχει διαπιστωθεί με βεβαιότητα αν απαντά στο έδαφος, δεδομένου ότι έχει περιγραφεί μόνο η παρουσία του σε καλλιέργειες γαιοσκωλήκων. Επομένως, δεν είναι γνωστές οι οικολογικές απαιτήσεις του.

— *Enchytraeus buchholzi* (Vejdovsky 1879): Η ονομασία αυτή καλύπτει προφανώς ομάδα πολύ συγγενικών ειδών που είναι δύσκολο να διακριθούν μορφολογικά. Δεν συνιστάται η χρήση τους για δοκιμές έως ότου οι μονάδες που χρησιμοποιούνται σε μια δοκιμή να μπορέσουν να προσδιοριστούν κατά είδος. Ο σκώληκας *E. buchholzi* βρίσκεται συνήθως σε λειμώνες και πολυσύχναστα μέρη όπως ρείθρα δρόμων.

— *Enchytraeus luxuriosus*: Το είδος αυτό ήταν αρχικά γνωστό ως *E.«minutus»*, αλλά πρόσφατα έγινε η περιγραφή του (1). Βρέθηκε πρώτα από τον U. Graefe (Αμβούργο) σε έναν λειμώνα κοντά στο St. Peter-Ording (Schleswig-Holstein, Γερμανία). Ο σκώληκας *E. luxuriosus* έχει περίπου το μισό μέγεθος από τον *E. Albidus*, αλλά είναι μεγαλύτερος από άλλα είδη που εξετάζονται εδώ· αυτό θα μπορούσε να αποτελεί καλή εναλλακτική λύση για το *E. albidus*.

— *Enchytraeus bulbosus* (Nielsen & Christensen 1963): Το είδος αυτό αναφέρεται έως σήμερα από γερμανικά και ισπανικά ανόργανα εδάφη, όπου είναι σύνηθες αλλά δεν απαντά σε πληθώρα. Σε σύγκριση με άλλα μικρόσωμα είδη αυτού του γένους, είναι σχετικά εύκολο να ταυτοποιηθεί. Δεν είναι τίποτα γνωστό για τη συμπεριφορά του στις εργαστηριακές δοκιμές ή την ευαισθησία του σε χημικές ουσίες. Ωστόσο, έχει διαπιστωθεί ότι καλλιεργείται εύκολα (E. Belotti, προσωπική ανακοίνωση).

Συνθήκες καλλιέργειας

Όλα τα είδη *Enchytraeus* που αναφέρονται παραπάνω μπορούν να καλλιεργηθούν στα ίδια υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για τον σκώληκα *E. albidus*. Το μικρότερο μέγεθός τους σημαίνει ότι τα δοχεία καλλιέργειας μπορεί να είναι μικρότερα και ότι, ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ίδια τροφή, το μέγεθός της πρέπει να προσαρμοστεί κατάλληλα. Ο κύκλος ζωής των ειδών αυτών είναι μικρότερος από αυτόν του *E. albidus* και πρέπει να τρέφονται συχνότερα.

Συνθήκες δοκιμής

Οι συνθήκες δοκιμής είναι γενικά οι ίδιες με αυτές που εφαρμόζονται στον *E. albidus*, εκτός από:

— το μέγεθος του δοχείου δοκιμής μπορεί (αλλά δεν είναι απαραίτητο) να είναι μικρότερο·

— η διάρκεια της δοκιμής αναπαραγωγής μπορεί (αλλά δεν είναι απαραίτητο) να είναι μικρότερη, δηλ. τέσσερις αντί για έξι εβδομάδες· ωστόσο, η διάρκεια της δοκιμασίας προσδιορισμού του εύρους δεν πρέπει να αλλάξει·

— λόγω του μικρού μεγέθους των νεαρών σκωλήκων, η χρήση της μεθόδου χρώσης συνιστάται ιδιαιτέρως για την καταμέτρηση·

— το κριτήριο της εγκυρότητας σχετικά με τον «αριθμό νεαρών ατόμων ανά δοχείο δοκιμής στον μάρτυρα» πρέπει να αλλάξει σε «50».

▼**M6**

ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

(1) Schmelz, R.M. and Collado, R. (1999). Enchytraeus luxuriosus sp.nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeidae, Clitellata, Annelida). Carolinea 57, 93-100.

▼M6

Προσάρτημα 6

Λεπτομερής περιγραφή των τεχνικών εκχύλισης

Χρώση με ερυθρό της Βεγγάλης

Η εν λόγω μέθοδος, που στην πρώτη της μορφή αναπτύχθηκε στη λιμναία οικολογία (1), είχε αρχικά προταθεί για την καταμέτρηση των νεαρών enchytraeids στη δοκιμασία αναπαραγωγής των Enchytraeidae από τον W. de Coen (Πανεπιστήμιο της Γάνδης, Βέλγιο). Παράλληλα, μια τροποποιημένη έκδοση (το ερυθρό της Βεγγάλης αναμείχθηκε με φορμαλδεΰδη αντί για αιθανόλη) αναπτύχθηκε από τον RIVM Bilthoven (2)(3).

Στο τέλος της οριστικής δοκιμασίας (δηλ. ύστερα από έξι εβδομάδες), το έδαφος στα δοχεία της δοκιμής μεταφέρεται σε ένα ρηχό κιβώτιο. Χρήσιμα για τον σκοπό αυτό είναι ένα πλαστικό ποτήρι τύπου Bellaplast ή ένα δοχείο εμφάνισης φωτογραφικών φιλμ με αυλακωτό πυθμένα, το τελευταίο επειδή οι «αύλακες» περιορίζουν την κίνηση των σκωλήκων εντός του πεδίου παρατήρησης. Οι νεαροί σκώληκες ακινητοποιούνται με αιθανόλη (περίπου 5 ml ανά επανάληψη). Τα δοχεία στη συνέχεια γεμίζονται με νερό έως ένα στρώμα από 1 έως 2 cm. Προστίθενται λίγες σταγόνες (200 έως 300 μl) ερυθρού της Βεγγάλης (1 % διάλυμα σε αιθανόλη) (εναλλακτικά 0,5 % ηωσίνης) και τα δύο συστατικά αναμειγνύονται προσεκτικά. Ύστερα από 12 ώρες, οι σκώληκες θα πρέπει να έχουν χρωματιστεί με κοκκινωπό χρώμα και πρέπει να είναι εύκολη η καταμέτρησή τους λόγω του ότι θα κείτονται στην επιφάνεια του υποστρώματος. Εναλλακτικά, το μείγμα υποστρώματος-αλκοόλης μπορεί να εκπλυθεί με κόσκινο (βροχίδες διαμέτρου 0,250 mm) πριν από την καταμέτρηση των σκωλήκων. Με τη διαδικασία αυτή, ο καολινίτης, η τύρφη και κάποια ποσότητα άμμου θα εκπλυθούν και θα είναι πιο ορατοί και ευκολότερα μετρήσιμοι οι σκώληκες που θα έχουν χρωματιστεί με κοκκινωπό χρώμα. Η χρήση φωτισμένων φακών (μέγεθος φακού τουλάχιστον 100 × 75 mm με συντελεστή μεγέθυνσης 2 έως 3×) θα διευκολύνει επίσης τη μέτρηση.

Η τεχνική της χρώσης μειώνει τον χρόνο που απαιτείται για τη μέτρηση σε λίγα λεπτά ανά δοχείο και, γενικά, θα πρέπει να είναι δυνατόν να αξιολογεί ένα άτομο όλα τα δοχεία από μια δοκιμασία εντός δύο ημερών το πολύ.

Υγρή εκχύλιση

Η υγρή εκχύλιση πρέπει να ξεκινήσει αμέσως μετά το τέλος της δοκιμής. Το έδαφος από κάθε δοχείο δοκιμής τοποθετείται σε πλαστικά κόσκινα με διάμετρο βροχίδας περίπου 1mm. Στη συνέχεια τα κόσκινα προσαρμόζονται σε πλαστικές λεκάνες χωρίς να αγγίζουν τον πυθμένα. Οι λεκάνες γεμίζουν προσεκτικά με νερό έως ότου τα δείγματα στα κόσκινα βρεθούν εντελώς κάτω από την επιφάνεια του νερού. Για να εξασφαλιστεί ποσοστό ανάκτησης πάνω από 90 % των σκωλήκων που είναι παρόντες, πρέπει να χρησιμοποιηθεί περίοδος εκχύλισης 3 ημερών στους 20 ± 2 °C. Στο τέλος της περιόδου εκχύλισης τα κόσκινα αφαιρούνται και το νερό (εκτός από μικρή ποσότητα) αποχύνεται αργά κατά τρόπο ώστε να μην ανακατευτεί το ίζημα στον πυθμένα των λεκανών. Οι πλαστικές λεκάνες ανακινούνται ελαφρώς ώστε το ίζημα να αιωρηθεί στο υπερκείμενο νερό. Το νερό μεταφέρεται σε τρυβλίο Petri και, αφού τα σωματίδια του εδάφους κατακαθίσουν, μπορούν να ταυτοποιηθούν, να αφαιρεθούν και να μετρηθούν τα enchytraeids με τη χρήση στερεομικροσκοπίου και λαβίδων μαλακού χάλυβα.

Επίπλευση

Μια μέθοδος που βασίζεται σε επίπλευση περιγράφεται σε σημείωμα του R. Kuperman (4). Αφού οριστεί το περιεχόμενο ενός δοχείου δοκιμής με αιθανόλη, το έδαφος κατακλύζεται με Ludox (διοξείδιο του πυριτίου AM-30, εναιώρημα 30 % κ.β. σε νερό) έως και 10 με 15 mm πάνω από την επιφάνεια του εδάφους. Αφού ανακατευτεί πολύ καλά το έδαφος με τον παράγοντα επίπλευσης για 2 - 3 λεπτά, οι νεαροί σκώληκες που επιπλέουν στην επιφάνεια μπορούν εύκολα να μετρηθούν.

ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

(1) Korinkova, J. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke 32, 300-305.

▼**M6**

(2) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. and Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (*Oligochaeta*, *Annelida*) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 σελίδες.

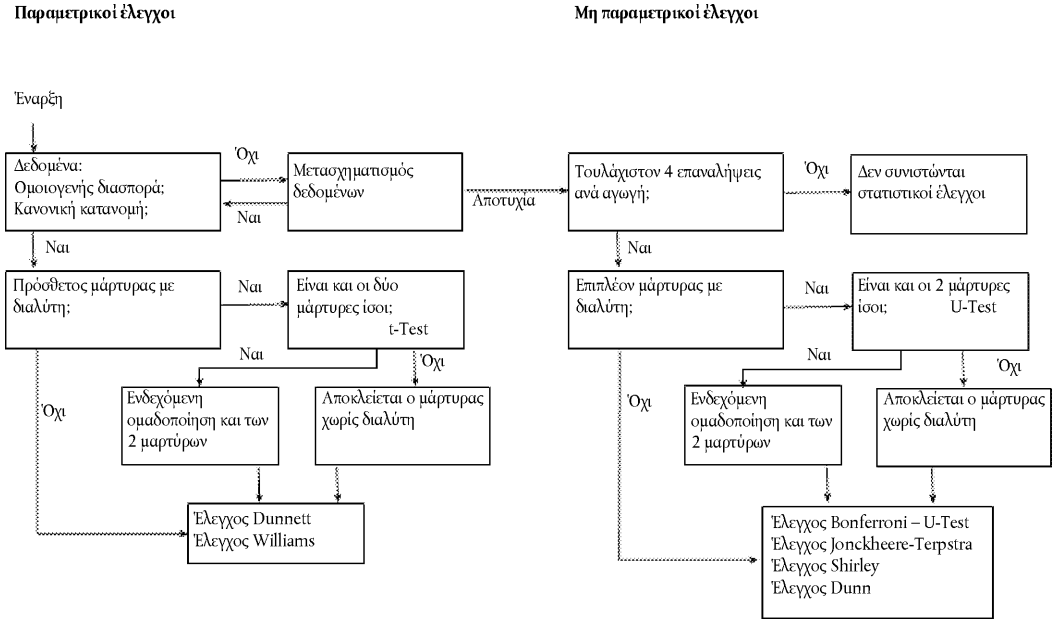
(3) Posthuma, L., Baerselmann, R., Van Veen, R.P.M. and Dirven-Van Breemen, E.M. (1997). Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. Ecotox. Envir. Safety 38, 108-121.

(4) Phillips, C.T., Checkai, R.T. and Kuperman, R.G. (1998). An alternative to the O'Connor Method for Extracting Enchytraeids from Soil. SETAC 19th Annual Meeting, Charlotte, USA. Abstract Book No. PMP069, p. 157.

▼**M6**

Προσάρτημα 7

Επισκοπηση τησ στατιστικησ εκτιμησησ των δεδομενων (προσδιορισμοσ NOEC)



▼M6

Γ.33. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΙΟΣΚΩΛΗΚΩΝ (*EISENIA FETIDA / EISENIA ANDREI*)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 222 του ΟΟΣΑ (2004). Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση των επιδράσεων που προκαλούν στην αναπαραγωγή του είδους γαιοσκωλήκων *Eisenia fetida* (Savigny 1826) ή *Eisenia andrei* (Andre 1963) (1)(2) (και άλλα σχεδόν θανατηφόρα τελικά σημεία) οι χημικές ουσίες στο έδαφος. Η δοκιμασία έχει υποβληθεί σε δοκιμή δακτυλίου (ring test) (3). Μια μέθοδος δοκιμών για τη δοκιμασία οξείας τοξικότητας στους γαιοσκώληκες υπάρχει ήδη (4). Έχουν δημοσιευτεί πολλές άλλες διεθνείς και εθνικές κατευθυντήριες γραμμές για τις δοκιμασίες οξείας και χρόνιας τοξικότητας σε γαιοσκώληκες (5)(6)(7)(8).

2. Τα είδη *Eisenia fetida / Eisenia andrei* θεωρούνται αντιπροσωπευτικά της πανίδας του εδάφους και των γαιοσκωλήκων ιδιαιτέρως. Υπάρχουν πληροφορίες τεκμηρίωσης για την οικολογία των γαιοσκωλήκων και τη χρήση τους στις οικοτοξικολογικές δοκιμασίες (7)(9)(10)(11)(12).

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

3. Ενήλικοι γαιοσκώληκες εκτίθενται σε εύρος συγκεντρώσεων της υπό δοκιμής χημικής ουσίας είτε αναμεμειγμένης με το έδαφος είτε, στην περίπτωση των φυτοφαρμάκων, εφαρμοζόμενης μέσα ή πάνω στο έδαφος με διαδικασίες συνεπείς με τον τρόπο χρήσης της χημικής ουσίας. Η μέθοδος εφαρμογής είναι ανάλογη με τον σκοπό της δοκιμής. Το εύρος των συγκεντρώσεων δοκιμής επιλέγεται κατά τρόπο ώστε να περικλείονται εκείνες που είναι πιθανό να προκαλέσουν θανατηφόρες ή υποθανατηφόρες επιδράσεις σε περίοδο οκτώ εβδομάδων. Η θνησιμότητα και οι αυξητικές συνέπειες σε ενήλικους γαιοσκώληκες προσδιορίζονται ύστερα από έκθεση 4 εβδομάδων. Οι ενήλικοι γαιοσκώληκες αφαιρούνται στη συνέχεια από το έδαφος και γίνεται εκτίμηση των επιδράσεων στην αναπαραγωγή ύστερα από 4 ακόμη εβδομάδες με μέτρηση του αριθμού των απογόνων στο έδαφος. Η αναπαραγωγική απόδοση των σκωλήκων που εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία συγκρίνεται με αυτήν του/των μάρτυρα/-ων, ώστε να προσδιοριστεί i) η συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC) και/ή ii) η EC_x (π.χ. EC_{10}, EC_{50}) με τη χρήση ενός μοντέλου παλινδρόμησης ώστε να εκτιμηθεί η συγκέντρωση η οποία θα μπορούσε να προκαλέσει x % μείωση της αναπαραγωγικής επίδοσης. Η τιμή της EC_x (π.χ. EC_{10}, EC_{50}) θα πρέπει να περικλείεται από τις συγκεντρώσεις δοκιμής ώστε εξασφαλίζεται ότι η EC_x προέρχεται από παρεμβολή και όχι από προεκβολή (βλ. προσάρτημα 1 για ορισμούς).

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

4. Πρέπει να διατίθενται οι ακόλουθες πληροφορίες για την υπό δοκιμή χημική ουσία, οι οποίες είναι χρήσιμες για τον σχεδιασμό των κατάλληλων διαδικασιών δοκιμής:

   — διαλυτότητα στο νερό·

   — log K_{ow}·

   — τάση ατμών·

   — και πληροφορίες για την πορεία και τη συμπεριφορά στο περιβάλλον, όπου είναι δυνατόν (π.χ. ταχύτητα φωτόλυσης και ταχύτητα υδρόλυσης, όπου αυτό έχει σημασία για τον τρόπο εφαρμογής).

5. Αυτή η μέθοδος δοκιμών εφαρμόζεται σε όλες τις χημικές ουσίες ανεξάρτητα από τη διαλυτότητά τους στο νερό. Η μέθοδος δοκιμών δεν εφαρμόζεται σε πτητικές χημικές ουσίες, που εδώ ορίζονται ως χημικές ουσίες για τις οποίες η σταθερά του νόμου του Henry ή ο συντελεστής κατανομής αέρα/νερού είναι μεγαλύτερος από ένα, ή σε χημικές ουσίες με τάση ατμών που υπερβαίνει τα 0,0133 Pa στους 25 °C.

6. Στη συγκεκριμένη μέθοδο δοκιμών δεν μπορεί να γίνει δεκτή ενδεχόμενη αποικοδόμηση της υπό δοκιμής χημικής ουσίας κατά την περίοδο της δοκιμής. Κατά συνέπεια δεν μπορεί να υποτεθεί ότι οι συγκεντρώσεις έκθεσης θα διατηρηθούν στις αρχικές τιμές σε όλη τη δοκιμή. Η χημική ανάλυση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής συνιστάται στην εν λόγω περίπτωση.

▼M6

ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

7. Πρέπει να προσδιοριστούν η NOEC και/ή η EC_x μιας χημικής ουσίας αναφοράς ώστε να εξασφαλιστεί ότι οι συνθήκες της εργαστηριακής δοκιμής είναι κατάλληλες και για να επαληθευτεί ότι η απόκριση των οργανισμών δοκιμής δεν αλλάζει στατιστικώς με την πάροδο του χρόνου. Είναι σκόπιμο να υποβάλλεται η ουσία αναφοράς σε δοκιμή τουλάχιστον μία φορά ετησίως ή, στην περίπτωση των δοκιμών που διεξάγονται με μικρότερη συχνότητα, παράλληλα με τον προσδιορισμό της τοξικότητας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Οι ουσίες carbendazim ή benomyl είναι κατάλληλες ουσίες αναφοράς, για τις οποίες έχει αποδειχθεί ότι έχουν επίδραση στην αναπαραγωγή (3). Μεταξύ α) 1 και 5 mg δραστικού συστατικού/kg ξηρής μάζας ή β) 250-500 g/ha ή 25-50 mg/m^2 θα πρέπει να παρατηρηθούν σημαντικά αποτελέσματα. Σε περίπτωση που συμπεριληφθεί πρότυπη τοξική ουσία στη σειρά δοκιμών, χρησιμοποιείται μία συγκέντρωση και ο αριθμός των επαναλήψεων θα πρέπει να είναι ο ίδιος με αυτόν των μαρτύρων.

ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

8. Για να θεωρηθεί έγκυρο ένα αποτέλεσμα δοκιμής, τα ακόλουθα κριτήρια θα πρέπει να ικανοποιούνται για τους μάρτυρες:

— σε κάθε επανάληψη (που περιέχει 10 ενήλικα άτομα) να αναπαράγονται ≥ 30 νεαρά άτομα έως το τέλος της δοκιμής·

— ο συντελεστής μεταβολής της αναπαραγωγής να είναι ≤ 30 %·

— η θνησιμότητα των ενήλικων ατόμων τις πρώτες 4 εβδομάδες της δοκιμής να είναι ≤10 %.

Όταν μια δοκιμή δεν ανταποκρίνεται στα παραπάνω κριτήρια εγκυρότητας η δοκιμή θα πρέπει να τερματίζεται, εκτός αν μπορεί να δικαιολογηθεί η συνέχισή της. Η αιτιολόγηση πρέπει να περιέχεται στην έκθεση.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Εξοπλισμός

9. Είναι δέον να χρησιμοποιηθούν δοχεία από γυαλί ή άλλο αδρανές χημικά υλικό χωρητικότητας ενός έως δύο λίτρων. Τα δοχεία θα πρέπει να έχουν επιφάνεια διατομής περίπου 200 cm^2, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται υγρό βάθος υποστρώματος περίπου 5-6 cm όταν προστίθενται 500 έως 600 g ξηρής μάζας υποστρώματος. Το σχέδιο του δοχείου θα πρέπει να επιτρέπει την κυκλοφορία αερίων μεταξύ του υποστρώματος και της ατμόσφαιρας και την πρόσβαση του φωτός (π.χ. μέσω διάτρητου διαφανούς καλύμματος) ενώ θα εμποδίζει τους σκώληκες να διαφύγουν. Αν η ποσότητα του υποστρώματος δοκιμής που χρησιμοποιείται είναι αισθητά πάνω από 500 - 600 g ανά δοχείο δοκιμής, ο αριθμός των σκωλήκων θα πρέπει να αυξηθεί αναλογικά.

10. Απαιτείται συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός, και ειδικότερα:

— θάλαμος ξήρανσης·

— στερεοσκοπικό μικροσκόπιο·

— πεχάμετρο και φωτόμετρο·

— κατάλληλοι ζυγοί ακριβείας·

— κατάλληλος εξοπλισμός για τον έλεγχο της θερμοκρασίας·

— κατάλληλος εξοπλισμός για τον έλεγχο της υγρασίας (δεν είναι απαραίτητο, αν τα δοχεία έκθεσης καλύπτονται με πώματα)·

— επωαστήρας ή μικρό δωμάτιο με κλιματισμό·

— λαβίδες, άγκιστρα ή θηλιές/βρόχοι·

— υδρόλουτρο.

▼M6

Παρασκευή του τεχνητού εδάφους

11. Στην παρούσα δοκιμή (5)(7) χρησιμοποιείται τεχνητό έδαφος με την ακόλουθη σύνθεση (με βάση ξηρό βάρος, το έδαφος ξηραίνεται στους 105 ° C μέχρι σταθερού βάρους):

— 10 % τύρφης σφάγνων (με pH όσο το δυνατό πλησιέστερα στο 5,5-6,0, χωρίς ορατά υπολείμματα φυτού, λεπτοαλεσμένης, αποξηραμένης έως τη μετρηθείσα περιεκτικότητα σε υγρασία)·

— 20 % καολινιτικής αργίλου (περιεκτικότητα σε καολινίτη κατά προτίμηση πάνω από 30 %)·

— 0,3 έως 1,0 % ανθρακικού ασβεστίου ($CaCO_3$, κονιοποιημένο, αναλυτικής καθαρότητας) για την επίτευξη αρχικού pH 6,0 ± 0,5·

— 70 % αερόξηρης χαλαζιακής άμμου (ανάλογα με την ποσότητα του $CaCO_3$ που απαιτείται), θα πρέπει να επικρατεί η λεπτή άμμος με ποσοστό σωματιδίων μεγέθους μεταξύ 50 και 200 μm πάνω από 50 %.

Σημείωση 1: Η απαραίτητη ποσότητα $CaCO_3$ θα εξαρτάται από τα συστατικά του εδαφικού υποστρώματος, συμπεριλαμβανομένης της τροφής, και θα πρέπει να προσδιορίζεται με μετρήσεις των μερικών δειγμάτων του εδάφους αμέσως πριν από τη δοκιμή. Το pH μετριέται σε μεικτό δείγμα σε διάλυμα 1 M χλωριούχου καλίου (KCl) ή σε διάλυμα 0,01 M χλωριούχου ασβεστίου ($CaCl_2$) (13).

Σημείωση 2: Προαιρετικά, μπορεί να μειωθεί η περιεκτικότητα του τεχνητού εδάφους σε οργανικό άνθρακα, π.χ. με ελάττωση της περιεκτικότητας σε τύρφη σε 4-5 % και ανάλογη αύξηση της περιεκτικότητας σε άμμο. Με αυτή τη μείωση της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα, είναι δυνατόν να μειωθούν οι δυνατότητες προσρόφησης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο έδαφος (οργανικός άνθρακας) και να αυξηθεί η διαθεσιμότητά της για τους σκώληκες. Έχει καταδειχθεί ότι τα είδη Eisenia fetida μπορούν να πληρούν τα κριτήρια εγκυρότητας σχετικά με την αναπαραγωγή, όταν υποβάλλονται σε δοκιμές με γεωργικά εδάφη χαμηλότερης περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα, π.χ. 2,7 % (14), και η πείρα δείχνει ότι αυτό μπορεί να επιτευχθεί και σε τεχνητό έδαφος με 5 % τύρφης. Συνεπώς, δεν είναι ανάγκη, προτού χρησιμοποιηθεί τέτοιο έδαφος σε οριστική δοκιμή, να καταδειχθεί η καταλληλότητα του τεχνητού εδάφους για να καταστεί δυνατή η συμμόρφωση της δοκιμής με τα κριτήρια εγκυρότητας, εκτός αν η περιεκτικότητα σε τύρφη ελαττωθεί περισσότερο από όσο ορίζεται παραπάνω.

Σημείωση 3: Όταν χρησιμοποιείται φυσικό έδαφος σε πρόσθετες δοκιμές (π.χ. ανώτερης βαθμίδας), η καταλληλότητα του εδάφους και η συμμόρφωση με τα κριτήρια εγκυρότητας της δοκιμής πρέπει επίσης να καταδεικνύονται.

12. Τα ξηρά συστατικά του εδάφους αναμειγνύονται επιμελώς (π.χ. σε εργαστηριακό αναμείκτη μεγάλης κλίμακας) σε επαρκώς αεριζόμενη επιφάνεια. Προτού ξεκινήσει η δοκιμή, το ξηρό τεχνητό έδαφος υγραίνεται με την προσθήκη επαρκούς ποσότητας απιονισμένου νερού ώστε να επιτευχθεί περίπου το ήμισυ της τελικής υγρασίας, η οποία θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 40 % και 60 % της μέγιστης υδατοχωρητικότητας (αντιστοιχεί στο 50 ± 10 % υγρασίας ξηρής μάζας). Αυτό θα δημιουργήσει ένα υπόστρωμα που δεν έχει στάσιμο ή ελεύθερο νερό όταν πιέζεται στο χέρι. Η μέγιστη υδατοχωρητικότητα (WHC) του τεχνητού εδάφους προσδιορίζεται σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφονται στο προσάρτημα 2, το ISO 11274 (15) ή ισοδύναμο πρότυπο της ΕΕ.

13. Αν η υπό δοκιμή χημική ουσία εφαρμόζεται στην επιφάνεια του εδάφους ή αναμειγνύεται με το έδαφος χωρίς νερό, η τελική ποσότητα του νερού μπορεί να αναμειχθεί στο τεχνητό έδαφος κατά την παρασκευή του εδάφους. Αν η υπό δοκιμή χημική ουσία εφαρμόζεται στο έδαφος μαζί με κάποια ποσότητα νερού, το επιπλέον νερό μπορεί να προστεθεί μαζί με την υπό δοκιμή χημική ουσία (βλ. σημείο 19).

14. Η υγρασία του εδάφους προσδιορίζεται στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής σύμφωνα με το πρότυπο ISO 11465 (16) ή το ισοδύναμο πρότυπο της ΕΕ και το pH του εδάφους σύμφωνα με το προσάρτημα 3 ή το πρότυπο ISO 10390 (13) ή ισοδύναμο πρότυπο της ΕΕ. Οι μετρήσεις αυτές θα

▼M6

πρέπει να εκτελούνται σε δείγμα μάρτυρα και σε δείγμα από κάθε συγκέντρωση δοκιμής εδάφους. Το pH του εδάφους δεν πρέπει να ρυθμίζεται όταν υποβάλλονται σε δοκιμή οξέα ή βάσεις. Η υγρασία θα πρέπει να παρακολουθείται σ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής με περιοδική ζύγιση των δοχείων (βλ. παραγράφους 26 και 30).

Επιλογή και προετοιμασία των ζώων δοκιμής

15. Το είδος που χρησιμοποιείται στη δοκιμή είναι το *Eisenia fetida* ή *Eisenia andrei* (1)(2). Για την έναρξη της δοκιμής χρειάζονται ενήλικοι σκώληκες, ηλικίας μεταξύ δύο μηνών και ενός έτους, που διαθέτουν δακτυλιοειδή τμήματα. Οι σκώληκες θα πρέπει να επιλέγονται από μια συγχρονισμένη καλλιέργεια με σχετικά ομοιογενή ηλικιακή δομή (προσάρτημα 4). Τα άτομα σε μια ομάδα δοκιμής δεν θα πρέπει να διαφέρουν ηλικιακά κατά περισσότερο από 4 εβδομάδες.

16. Οι σκώληκες που έχουν επιλεγεί θα πρέπει να εγκλιματιστούν επί μία ημέρα τουλάχιστον με το υπόστρωμα του τεχνητού εδάφους για να μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή. Σ' αυτό το χρονικό διάστημα οι σκώληκες θα πρέπει να τρέφονται με την ίδια τροφή που χρησιμοποιείται στη δοκιμή (βλ. παραγράφους 31 έως 33).

17. Οι γαιοσκώληκες ζυγίζονται ξεχωριστά και τοποθετούνται τυχαία ανά ομάδες των 10 σε δοχεία στην αρχή της δοκιμής. Οι σκώληκες πλένονται πριν από το ζύγισμα (με απιονισμένο νερό) και το πλεονάζον νερό αφαιρείται με τη στιγμιαία τοποθέτηση των σκωλήκων σε διηθητικό χαρτί. Το υγρό βάρος κάθε σκώληκα χωριστά θα πρέπει να είναι μεταξύ 250 και 600 mg.

Παρασκευή των συγκεντρώσεων δοκιμής

18. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν δύο μέθοδοι εφαρμογής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας: ανάμειξη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας με το έδαφος (βλ. παραγράφους 19-21) ή εφαρμογή στην επιφάνεια του εδάφους (βλ. παραγράφους 22-24). Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εξαρτάται από τον σκοπό της δοκιμής. Γενικά, συνιστάται η ανάμειξη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας με το έδαφος. Ωστόσο, μπορεί να απαιτηθούν διαδικασίες εφαρμογής που είναι συνεπείς με τις συνήθεις γεωργικές πρακτικές (π.χ. ψεκασμός με παρασκεύασμα υγρής σύνθεσης ή χρήση ειδικών φυτοφαρμάκων με τη μορφή κόκκων ή σποροαπολύμανσης). Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται για να βοηθήσουν στην κατεργασία του εδάφους με την υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να επιλέγονται βάσει της δικής τους χαμηλής τοξικότητας ως προς τους γαιοσκώληκες και στον σχεδιασμό της δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνεται ο κατάλληλος μάρτυρας με τον διαλύτη (βλ. σημείο 27).

Ανάμειξη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο έδαφος

Υπό δοκιμή χημική ουσία διαλυτή στο νερό

19. Παρασκευάζεται διάλυμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε απιονισμένο νερό αμέσως πριν από την έναρξη της δοκιμής, σε ποσότητα επαρκή για όλες τις επαναλήψεις μιας συγκέντρωσης. Μπορεί να χρειαστεί συνδιαλύτης για να διευκολύνει την παρασκευή του δοκιμαστικού διαλύματος. Εξυπηρετεί η παρασκευή ποσότητας διαλύματος που χρειάζεται για να επιτευχθεί η τελική υγρασία (40 έως 60 % της μέγιστης υδατοχωρητικότητας). Το μείγμα αναμειγνύεται καλά με το υπόστρωμα εδάφους πριν εισαχθεί σε δοχείο δοκιμής.

Υπό δοκιμή χημική ουσία αδιάλυτη στο νερό

20. Η υπό δοκιμή χημική ουσία διαλύεται σε μικρό όγκο κατάλληλου οργανικού διαλύτη (π.χ. ακετόνης) και στη συνέχεια ψεκάζεται, ή αναμειγνύεται, με μικρή ποσότητα λεπτοαλεσμένης χαλαζιακής άμμου. Ο διαλύτης στη συνέχεια αφαιρείται με εξάτμιση σε απαγωγό επί λίγα τουλάχιστον λεπτά. Η άμμος στη συνέχεια αναμειγνύεται καλά με το τεχνητό έδαφος που έχει προηγουμένως υγρανθεί. Προστίθεται και αναμειγνύεται απιονισμένο νερό (η ποσότητα που απαιτείται) για να επιτευχθεί η τελική περιεκτικότητα σε υγρασία, δηλ. 40 έως 60 % της μέγιστης υδατοχωρητικότητας. Το έδαφος στη συνέχεια είναι έτοιμο για την τοποθέτηση στα πειραματικά δοχεία. Πρέπει να υπάρξει μέριμνα ώστε ο διαλύτης να μην είναι τοξικός για τους γαιοσκώληκες.

▼M6

Υπό δοκιμή χημική ουσία αδιάλυτη στο νερό και σε οργανικούς διαλύτες

21. Παρασκευάζεται μείγμα που αποτελείται από 10 g λεπτοαλεσμένης βιομηχανικής χαλαζιακής άμμου με την ποσότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ώστε να επιτευχθεί η συγκέντρωση δοκιμής στο έδαφος. Το μείγμα στη συνέχεια αναμειγνύεται καλά με το τεχνητό έδαφος προτού αυτό υγρανθεί. Προστίθεται η ποσότητα απιονισμένου νερού που απαιτείται για να επιτευχθεί η τελική υγρασία, δηλ. 40 έως 60 % της μέγιστης υδατοχωρητικότητας, και αναμειγνύεται. Το έδαφος στη συνέχεια είναι έτοιμο για την τοποθέτηση στα δοχεία δοκιμής.

Εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην επιφάνεια του εδάφους

22. Το έδαφος υφίσταται αγωγή αφότου προστεθούν οι σκώληκες. Τα δοκιμαστικά δοχεία πληρούνται πρώτα με το υπόστρωμα υγρού εδάφους και οι ζυγισμένοι σκώληκες τοποθετούνται στην επιφάνεια. Οι υγιείς σκώληκες συνήθως φωλιάζουν αμέσως στο υπόστρωμα και, κατά συνέπεια, όσοι μείνουν στην επιφάνεια ύστερα από 15 λεπτά θεωρείται ότι έχουν υποστεί βλάβη και πρέπει να αντικαθίστανται. Αν οι σκώληκες αντικατασταθούν, οι νέοι και οι παλιοί πρέπει να ζυγίζονται έτσι ώστε το συνολικό βάρος της ομάδας σκωλήκων που εκτίθενται και το συνολικό βάρος του δοχείου με τους σκώληκες να είναι γνωστά από την αρχή.

23. Εφαρμόζεται η υπό δοκιμή χημική ουσία. Δεν θα πρέπει να προστεθεί στο έδαφος το πρώτο μισάωρο μετά την εισαγωγή των σκωλήκων (ή αν οι σκώληκες είναι παρόντες στην επιφάνεια του εδάφους), ώστε να αποφευχθεί τυχόν άμεση έκθεση στην υπό δοκιμή χημική ουσία λόγω επαφής με το δέρμα. Όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι φυτοφάρμακο, ίσως είναι δέον να εφαρμόζεται στην επιφάνεια του εδάφους με ψεκασμό. Η υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να εφαρμοστεί στην επιφάνεια του εδάφους όσο το δυνατόν πιο ομοιογενώς με τη χρήση κατάλληλου ψεκαστήρα εργαστηριακής κλίμακας για την προσομοίωση του ψεκασμού σε αγρό. Πριν από την εφαρμογή, το κάλυμμα του δοχείου δοκιμής θα πρέπει να αφαιρεθεί και να αντικατασταθεί με επένδυση που προστατεύει τα τοιχώματα του δοχείου από τον ψεκασμό. Η επένδυση μπορεί να είναι κατασκευασμένη από ένα δοχείο δοκιμής του οποίου αφαιρέθηκε η βάση. Η εφαρμογή θα πρέπει να πραγματοποιηθεί σε θερμοκρασία μεταξύ 20 ± 2 °C και για υδατικά διαλύματα, γαλακτώματα ή διασπορές σε ποσότητα εφαρμογής μεταξύ 600 και 800 μl/m^2. Η ποσότητα εφαρμογής πρέπει να ελέγχεται με την κατάλληλη τεχνική βαθμονόμησης. Ειδικά σκευάσματα όπως σκευάσματα με τη μορφή κόκκων ή σποροαπολύμανσης θα πρέπει να εφαρμόζονται κατά τρόπο συνεπή με τη γεωργική χρήση.

24. Τα δοχεία δοκιμής πρέπει να μένουν ακάλυπτα για περίοδο μίας ώρας, ώστε να είναι δυνατόν να εξατμιστεί τυχόν πτητικός διαλύτης που έχει σχέση με την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Πρέπει να υπάρξει μέριμνα ώστε να μη διαφύγει κανένας σκώληκας από τα δοκιμαστικά δοχεία στο διάστημα αυτό.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Ομάδες δοκιμής και μάρτυρες

25. Συνιστάται η χρήση 10 σκωλήκων σε 500 - 600 g ξηρής μάζας τεχνητού εδάφους (δηλ. 50-60 g εδάφους ανά σκώληκα). Αν χρησιμοποιηθούν μεγαλύτερες ποσότητες εδάφους, όπως μπορεί να συμβεί αν πρόκειται για φυτοφάρμακα ειδικής εφαρμογής όπως αυτά της σποροαπολύμανσης, θα πρέπει να διατηρηθεί η χρήση 50-60 g εδάφους ανά σκώληκα, με αύξηση του αριθμού των σκωλήκων. Για κάθε μάρτυρα και δοχείο αγωγής ετοιμάζονται δέκα σκώληκες. Οι σκώληκες πλένονται με νερό και σκουπίζονται και στη συνέχεια τοποθετούνται σε απορροφητικό χαρτί για σύντομη περίοδο ώστε να στραγγιστεί το πλεονάζον νερό.

26. Για να αποφευχθούν συστηματικά σφάλματα στην κατανομή των σκωλήκων στα δοχεία δοκιμής, η ομοιογένεια του πληθυσμού δοκιμής θα πρέπει να προσδιοριστεί με ατομική ζύγιση 20 σκωλήκων που έχουν ληφθεί τυχαία από τον πληθυσμό από τον οποίο θα ληφθούν οι σκώληκες δοκιμής. Αφού εξασφαλιστεί η ομοιογένεια, επιλέγονται παρτίδες σκωλήκων και τοποθετούνται στα δοχεία δοκιμής με διαδικασία τυχαιοποίησης. Μετά την προσθήκη των σκωλήκων δοκιμής, μετριέται το βάρος κάθε δοχείου δοκιμής

▼M6

ώστε να εξασφαλιστεί ότι υπάρχει ένα αρχικό βάρος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βάση για την παρακολούθηση της περιεκτικότητας του εδάφους σε υγρασία, όπως περιγράφεται στο σημείο 30. Τα δοχεία δοκιμής καλύπτονται στη συνέχεια, όπως περιγράφεται στο σημείο 9 και τοποθετούνται στον θάλαμο δοκιμής.

27. Ετοιμάζονται οι κατάλληλοι μάρτυρες για καθεμία από τις μεθόδους εφαρμογής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που περιγράφονται στις παραγράφους 18 έως 24. Για την ετοιμασία των μαρτύρων εφαρμόζονται οι αντίστοιχες διαδικασίες που περιγράφονται, χωρίς όμως να προστίθεται η υπό δοκιμή χημική ουσία. Συνεπώς, εφαρμόζονται στους μάρτυρες, ανάλογα με την περίπτωση, οργανικοί διαλύτες, χαλαζιακή άμμος ή άλλοι φορείς στις ίδιες συγκεντρώσεις/ποσότητες όπως στις διάφορες αγωγές. Όταν χρησιμοποιείται διαλύτης ή άλλος φορέας για την προσθήκη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, θα πρέπει επίσης να ετοιμάζεται και να ελέγχεται ένας επιπλέον μάρτυρας χωρίς τον φορέα ή την υπό δοκιμή χημική ουσία, ώστε να διασφαλιστεί ότι ο φορέας δεν έχει επίπτωση στο αποτέλεσμα.

Συνθήκες της δοκιμής

28. Η θερμοκρασία δοκιμής είναι 20 ± 2 °C. Η δοκιμή διεξάγεται υπό ελεγχόμενους κύκλους φωτός/σκότους (κατά προτίμηση 16 ώρες φως και 8 ώρες σκοτάδι) με φωτεινή ισχύ 400 έως 800 lux στην περιοχή των δοχείων δοκιμής.

29. Τα δοχεία δοκιμής δεν αερίζονται κατά τη διάρκεια της δοκιμής αλλά ο σχεδιασμός των καλυμμάτων των δοχείων δοκιμής θα πρέπει να δίνει τη δυνατότητα κυκλοφορίας αερίων, ενώ θα περιορίζει την εξάτμιση της υγρασίας (βλ. σημείο 9).

30. Η περιεκτικότητα του εδαφικού υποστρώματος σε νερό στα δοχεία δοκιμής διατηρείται σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής με επαναζύγιση των δοχείων δοκιμής (χωρίς τα καλύμματα) περιοδικώς. Οι απώλειες αναπληρώνονται, όταν χρειάζεται, με απιονισμένο νερό. Η περιεκτικότητα σε νερό δεν θα πρέπει να διαφέρει περισσότερο από το ± 10 % από αυτήν στην αρχή της δοκιμής.

Σίτιση

31. Οποιαδήποτε τροφή κατάλληλη για τη διατήρηση του βάρους των σκωλήκων στη διάρκεια της δοκιμής θεωρείται αποδεκτή. Η πείρα δείχνει ότι το άλευρο βρώμης, η κοπριά αγελάδας ή αλόγου είναι κατάλληλη τροφή. Πρέπει να γίνονται έλεγχοι για να εξασφαλιστεί ότι οι αγελάδες ή τα άλογα από τα οποία προέρχεται η κοπριά δεν έχουν υποβληθεί σε φαρμακευτική αγωγή ή αγωγή με χημικές ουσίες, όπως αυξητικούς παράγοντες, νηματωδοκτόνα ή παρόμοια κτηνιατρικά προϊόντα που θα μπορούσαν να επιδράσουν αρνητικά στους σκώληκες κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Συνιστάται η κοπριά αγελάδας που έχει συλλεχθεί από τους ενδιαφερόμενους, διότι η πείρα δείχνει ότι η κοπριά αγελάδας που είναι διαθέσιμη στο εμπόριο και χρησιμοποιείται ως λίπασμα για τους κήπους μπορεί να έχει δυσμενείς επιδράσεις στους σκώληκες. Η κοπριά θα πρέπει να ξηραίνεται στον αέρα, να είναι λεπτοαλεσμένη και παστεριωμένη πριν από τη χρήση.

32. Κάθε νέα παρτίδα τροφής θα πρέπει να χορηγείται, προτού χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή, σε καλλιέργεια σκωλήκων που δεν συμμετέχει στη δοκιμή, ώστε να εξασφαλιστεί ότι έχει τα κατάλληλα χαρακτηριστικά. Η ανάπτυξη και η παραγωγή κουκουλιών δεν θα πρέπει να είναι μειωμένες σε σύγκριση με τους σκώληκες που φυλάσσονται σε υπόστρωμα που δεν περιέχει τη νέα παρτίδα τροφής [συνθήκες σαν αυτές που περιγράφονται στη μέθοδο δοκιμών Γ.8 (4)].

33. Η τροφή χορηγείται πρώτα μία ημέρα μετά την προσθήκη των σκωλήκων και την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο έδαφος. Περίπου 5 g τροφής απλώνονται στην επιφάνεια του εδάφους σε κάθε δοχείο και βρέχονται με απιονισμένο νερό (περίπου 5 ml έως 6 ml ανά δοχείο). Στη συνέχεια, η τροφή δίνεται μια φορά την εβδομάδα σε περίοδο δοκιμής 4

▼M6

εβδομάδων. Αν η τροφή δεν καταναλωθεί, το σιτηρέσιο θα πρέπει να μειωθεί ώστε να αποφευχθεί η ανάπτυξη μυκήτων ή η μούχλα. Οι ενήλικοι σκώληκες αφαιρούνται από το έδαφος την 28η ημέρα της δοκιμής. Στη συνέχεια χορηγούνται άλλα 5 g τροφής σε κάθε δοχείο δοκιμής. Τις υπόλοιπες 4 εβδομάδες της δοκιμής δεν χορηγείται τροφή.

Επιλογή των συγκεντρώσεων δοκιμής

34. Αν είναι εκ των προτέρων γνωστή η τοξικότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, διευκολύνεται η επιλογή κατάλληλων συγκεντρώσεων δοκιμής, π.χ. από μελέτες οξείας τοξικότητας (4) και/ή από μελέτες προσδιορισμού εύρους τιμών. Αν είναι ανάγκη, πραγματοποιείται δοκιμή προσδιορισμού του εύρους τιμών, για παράδειγμα με πέντε συγκεντρώσεις δοκιμής 0,1, 1,0, 10, 100 και 1 000 mg/kg (ξηρή μάζα εδάφους). Για κάθε αγωγή και μάρτυρα αρκεί μία επανάληψη. Η διάρκεια της δοκιμής για τον προσδιορισμό του εύρους τιμών και η θνησιμότητα αξιολογούνται στο τέλος της δοκιμής.

Σχεδιασμός του πειράματος

35. Δεδομένου ότι δεν μπορεί να προβλεφθεί για την παρούσα δοκιμή ένα μόνο σύνολο συνοπτικών στατιστικών στοιχείων, η παρούσα μέθοδος δοκιμών προβλέπει τον προσδιορισμό της NOEC και της EC_x. Είναι πιθανόν να απαιτηθεί NOEC από τις κανονιστικές αρχές για το προσεχές μέλλον. Στο εγγύς μέλλον ενδέχεται να θεσπιστεί η πιο διαδεδομένη χρήση του EC_x, ως απόρροια στατιστικών και οικολογικών προβληματισμών. Συνεπώς, προτείνονται τρεις σχεδιασμοί, βάσει των συστάσεων που προκύπτουν από τη δοκιμή δακτυλίου (ring test) μιας μεθόδου δοκιμών για την αναπαραγωγή Enchytraeidae (17).

36. Κατά τον καθορισμό του εύρους συγκεντρώσεων θα πρέπει να ληφθούν υπόψη τα ακόλουθα:

— Για τον προσδιορισμό της NOEC θα πρέπει να ελέγχονται τουλάχιστον πέντε/δώδεκα συγκεντρώσεις σε γεωμετρική σειρά. Συνιστώνται τέσσερις επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση δοκιμής συν οκτώ μάρτυρες. Οι συγκεντρώσεις πρέπει να απέχουν κατά συντελεστή που δεν υπερβαίνει το 2,0.

— Για τον προσδιορισμό της EC_x (π.χ. EC10, EC50) συνιστάται επαρκής αριθμός συγκεντρώσεων για την πρόκληση τουλάχιστον τεσσάρων μέσων τιμών απόκρισης με σημαντική στατιστικά διαφορά μεταξύ τους στις εν λόγω συγκεντρώσεις. Συνιστώνται τουλάχιστον δύο επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση δοκιμής και έξι επαναλήψεις με μάρτυρες. Ο συντελεστής διαστήματος μπορεί να διαφέρει, δηλ. να είναι μικρότερος ή ίσος με 1,8 στο αναμενόμενο εύρος συγκεντρώσεων επίδρασης και πάνω από 1,8 στην υψηλότερη και χαμηλότερη συγκέντρωση.

— Με μια συνδυαστική προσέγγιση είναι δυνατός ο προσδιορισμός και της NOEC και της EC_x. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οκτώ συγκεντρώσεις αγωγής σε γεωμετρική σειρά. Συνιστώνται τέσσερις επαναλήψεις για κάθε αγωγή συν οκτώ μάρτυρες. Οι συγκεντρώσεις πρέπει να απέχουν κατά συντελεστή που δεν υπερβαίνει το 1,8.

Διάρκεια της δοκιμής και μετρήσεις

37. Την 28η ημέρα γίνεται παρατήρηση και καταμέτρηση των ενήλικων σκωλήκων που είναι ζωντανοί. Καταγράφονται, επίσης, οποιαδήποτε ασυνήθιστη συμπεριφορά (π.χ. αδυναμία να χωθούν στο έδαφος· ακινησία) και ανωμαλία στη μορφολογία (π.χ. ανοικτές πληγές). Όλοι οι ενήλικοι σκώληκες αφαιρούνται από τα δοχεία δοκιμής, καταμετρώνται και ζυγίζονται. Η μεταφορά του εδάφους που περιέχει τους σκώληκες σε καθαρό τελάρο πριν από την αξιολόγηση μπορεί να διευκολύνει την αναζήτηση των ενήλικων σκωλήκων. Οι σκώληκες που έχουν βγει από το έδαφος πλένονται πριν από το ζύγισμα (με απιονισμένο νερό) και το πλεονάζον νερό αφαιρείται με την τοποθέτηση των σκωλήκων για λίγη ώρα σε διηθητικό χαρτί. Οι σκώληκες που δεν έχουν βρεθεί καταγράφονται ως νεκροί, με την παραδοχή ότι οι σκώληκες αυτοί πέθαναν και αποσυντέθηκαν πριν από την αξιολόγηση.

▼M6

38. Αν το έδαφος έχει αφαιρεθεί από τα δοχεία, στη συνέχεια επιστρέφεται (αφού αφαιρεθούν οι ενήλικοι σκώληκες αλλά με τα κουκούλια που παρήγαγαν). Το έδαφος μετά επωάζεται επί τέσσερις ακόμη εβδομάδες με τις ίδιες συνθήκες δοκιμής, εκτός από το ότι η σίτιση γίνεται μόνο στην αρχή αυτού του σταδίου της δοκιμής (βλ. σημείο 33).

39. Στο τέλος της δεύτερης περιόδου των 4 εβδομάδων, προσδιορίζεται ο αριθμός των νεαρών σκωλήκων που εξέρχονται από τα κουκούλια στο έδαφος δοκιμής και ο αριθμός των κουκουλιών με τις διαδικασίες που περιγράφονται στο προσάρτημα 5. Σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής θα πρέπει να καταγράφονται όλα τα σημεία βλάβης ή ζημίας στους σκώληκες.

Οριακή δοκιμή

40. Αν δεν παρατηρηθούν επιδράσεις στην ανώτατη συγκέντρωση κατά τη δοκιμή προσδιορισμού εύρους τιμών (1 000 mg/kg), η δοκιμή αναπαραγωγής θα πρέπει να εκτελείται ως οριακή δοκιμή, με τη χρήση συγκέντρωσης δοκιμής με 1 000 mg/kg. Η οριακή δοκιμή δίνει τη δυνατότητα να καταδειχθεί ότι η NOEC για την αναπαραγωγή είναι μεγαλύτερη από την οριακή συγκέντρωση, ενώ ελαχιστοποιείται ο αριθμός των σκωλήκων που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οκτώ επαναλήψεις τόσο για το έδαφος αγωγής όσο και για τον μάρτυρα.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

41. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών δεν δίνονται στατιστικές οδηγίες για την ανάλυση των αποτελεσμάτων δοκιμής, αν και παρέχεται επισκόπηση στο προσάρτημα 6.

42. Ένα τελικό σημείο είναι η θνησιμότητα. Οι αλλαγές στη συμπεριφορά (π.χ. αδυναμία των σκωλήκων να χωθούν στο έδαφος· ακινησία πάνω στο γυάλινο τοίχο του δοχείου δοκιμής) και οι ανωμαλίες στη μορφολογία (π.χ. ανοικτές πληγές) των ενήλικων σκωλήκων θα πρέπει, ωστόσο, να καταγράφονται όπως και η παρουσία τυχόν νεαρών σκωλήκων. Η ανάλυση Probit (18) ή η λογιστική παλινδρόμηση θα πρέπει κανονικά να εφαρμοστούν για τον προσδιορισμό της LC_{50}. Ωστόσο, σε περιπτώσεις που αυτή η μέθοδος ανάλυσης δεν είναι κατάλληλη (π.χ. αν υπάρχουν λιγότερες από τρεις συγκεντρώσεις εν μέρει με θανάτους), μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικές μέθοδοι. Οι μέθοδοι αυτές θα μπορούσαν να περιλαμβάνουν κινητούς μέσους όρους (19), την απλοποιημένη μέθοδο Spearman-Karber ή απλή παρεμβολή (π.χ. γεωμετρικός μέσος όρος της LC_0 και LC_{100}, όπως υπολογίζεται με την τετραγωνική ρίζα της LC_0 πολλαπλασιασμένη με την LC_{100}.

43. Το άλλο τελικό σημείο είναι η γονιμότητα (π.χ. αριθμός των νεαρών σκωλήκων). Ωστόσο, όπως στη δοκιμή για τον προσδιορισμό του εύρους τιμών, όλα τα άλλα επιβλαβή σημεία θα πρέπει να καταγράφονται στην τελική έκθεση. Για τη στατιστική ανάλυση απαιτείται να υπολογιστεί ο αριθμητικός μέσος όρος $\bar{x}$ και η τυπική απόκλιση ανά αγωγή και ανά μάρτυρα για την αναπαραγωγή.

44. Αν έχει γίνει ανάλυση διασποράς, η τυπική απόκλιση, s, και οι βαθμοί ελευθερίας (df) μπορούν να αντικατασταθούν από εκτιμήσεις ομαδοποιημένης διακύμανσης που έχουν προέλθει από την ANOVA και τους βαθμούς ελευθερίας αντίστοιχα, υπό την προϋπόθεση ότι η διακύμανση δεν εξαρτάται από τη συγκέντρωση. Στην περίπτωση αυτή, χρησιμοποιούνται οι διακυμάνσεις μόνο μάρτυρα και αγωγών. Οι εν λόγω τιμές υπολογίζονται συνήθως με το εμπορικό στατιστικό λογισμικό με τη χρήση των ανά δοχείο αποτελεσμάτων ως πανομοιότυπων. Αν η ομαδοποίηση των δεδομένων για τα αρνητικά και τους μάρτυρες με τον διαλύτη φαίνεται πιο λογική από το να γίνονται δοκιμές για καθένα από αυτά, θα πρέπει να ελέγχονται για να διαπιστωθεί ότι δεν έχουν σημαντική διαφορά (για την κατάλληλη δοκιμή, βλ. σημείο 47 και προσάρτημα 6).

45. Η εκτέλεση περαιτέρω στατιστικών ελέγχων και η επαγωγική άντληση συμπερασμάτων εξαρτάται από το αν οι τιμές των επαναλήψεων έχουν κανονική κατανομή και είναι ομοιογενείς ως προς τη διασπορά τους.

▼M6

Εκτίμηση NOEC

46. Προτιμώνται οι ανθεκτικές δοκιμές. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πληροφορίες από προηγούμενα πειράματα με δοκιμές δακτυλίου ή άλλα ιστορικά στοιχεία για να διαπιστωθεί αν υπάρχει κατά προσέγγιση κανονική κατανομή. Η ομοιογένεια διασποράς (ομοσκεδαστικότητα) έχει πιο κρίσιμη σημασία. Από την εμπειρία φαίνεται ότι η διακύμανση αυξάνεται συχνά όταν αυξάνεται και ο μέσος όρος. Στις περιπτώσεις αυτές, ο μετασχηματισμός των δεδομένων θα μπορούσε να οδηγήσει σε ομοσκεδαστικότητα. Ωστόσο, τέτοιου είδους μετασχηματισμός θα πρέπει να βασίζεται σε ιστορικά δεδομένα και όχι στα δεδομένα υπό διερεύνηση. Με τα ομοιογενή δεδομένα, θα πρέπει να διενεργηθούν πολλαπλοί έλεγχοι όπως η δοκιμασία Williams (α = 0,05, ενός άκρου) (21)(22) ή σε ορισμένες περιπτώσεις ο έλεγχος Dunnett (23)(24). Να σημειωθεί ότι, στην περίπτωση άνισων επαναλήψεων, ο πίνακας με τις τιμές t πρέπει να διορθωθεί όπως προτείνουν οι Dunnett και Williams. Μερικές φορές, λόγω της μεγάλης διασποράς οι αποκρίσεις δεν αυξάνονται/μειώνονται τακτικά. Στην περίπτωση αυτή μεγάλης απόκλισης από τη μονοτονικότητα, ο έλεγχος Dunnett είναι καταλληλότερος. Αν υπάρχουν αποκλίσεις από την ομοσκεδαστικότητα, μπορεί να είναι λογικότερο να διερευνηθούν πιο στενά ενδεχόμενες επιδράσεις στις διακυμάνσεις, ώστε να αποφασιστεί αν οι έλεγχοι t μπορούν να εφαρμοστούν χωρίς μεγάλη απώλεια ισχύος (25). Εναλλακτικά, ένας πολλαπλός έλεγχος U, π.χ. ο έλεγχος Bonferroni-U κατά Holm (26), ή όταν τα στοιχεία αυτά παρουσιάζουν ετεροσκεδαστικότητα αλλά είναι, από άλλη άποψη, συνεπή με τη μονοτονική σχέση δόσης-απόκρισης, μπορεί να πραγματοποιηθεί ένας άλλος μη παραμετρικός έλεγχος [π.χ. Jonckheere-Terpstra (27)(28) ή Shirley (29) (30)] και προτιμάται, σε γενικές γραμμές, σε σχέση με τη δοκιμασία t άνισης διασποράς (βλ. επίσης το διάγραμμα στο προσάρτημα 6).

47. Αν έχει πραγματοποιηθεί οριακή δοκιμή και πληρούνται οι προϋποθέσεις των διαδικασιών παραμετρικής δοκιμασίας (κανονικότητα, ομοιογένεια), μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο έλεγχος Student με συγκρίσεις κατά ζεύγη ή διαφορετικά η διαδικασία Mann-Whitney-U-test (31).

Εκτίμηση της EC_x

48. Για να υπολογιστεί οποιαδήποτε τιμή EC_x, οι μέσες τιμές προ αγωγής χρησιμοποιούνται για ανάλυση της παλινδρόμησης (γραμμικής ή μη γραμμικής), αφού έχει επιτευχθεί η κατάλληλη λειτουργία δόσης-απόκρισης. Για την ανάπτυξη των σκωλήκων ως συνεχή απόκριση, οι τιμές EC_{x-} μπορούν να εκτιμηθούν με χρήση της κατάλληλης ανάλυσης παλινδρόμησης (32). Μεταξύ των κατάλληλων συναρτήσεων για τα δυαδικά δεδομένα (θνησιμότητα/επιβίωση και αριθμός των απογόνων) είναι η κανονική σιγμοειδής καμπύλη, η λογιστική συνάρτηση ή η συνάρτηση Weibull, που περιέχουν δύο ή τέσσερις παραμέτρους, μερικές από τις οποίες μπορούν επίσης να διαμορφώσουν αποκρίσεις όρμησης. Αν η συνάρτηση δόσης-απόκρισης έχει προσαρμοστεί με ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης, θα πρέπει να βρεθεί ένας σημαντικός r^2 (συντελεστής προσδιορισμού) και/ή κλίση με την ανάλυση παλινδρόμησης προτού εκτιμηθεί η EC_x, με εισαγωγή τιμής που αντιστοιχεί στο x % του μέσου όρου μάρτυρα στην εξίσωση που βρέθηκε με την ανάλυση παλινδρόμησης. Τα όρια εμπιστοσύνης 95 % υπολογίζονται σύμφωνα με Fieller [αναφέρεται από τον Finney (18)] ή με άλλες σύγχρονες κατάλληλες μεθόδους.

49. Εναλλακτικά, η απόκριση διαμορφώνεται ως ποσοστό ή αναλογία της παραμέτρου του μοντέλου που ερμηνεύεται ως η μέση απόκριση του μάρτυρα. Στις περιπτώσεις αυτές, η κανονική σιγμοειδής καμπύλη (λογιστική συνάρτηση, συνάρτηση Weibull) μπορούν εύκολα να προσαρμοστούν στα αποτελέσματα με τη διαδικασία παλινδρόμησης probit (18). Στις περιπτώσεις αυτές η συνάρτηση στάθμισης πρέπει να προσαρμόζεται για μετρικές αποκρίσεις σύμφωνα με Christensen (33). Ωστόσο, αν έχει παρατηρηθεί όρμηση, η ανάλυση probit θα πρέπει να αντικατασταθεί με λογιστική συνάρτηση τεσσάρων παραμέτρων ή συνάρτηση Weibull, αφού γίνει προσαρμογή με διαδικασία μη γραμμικής παλινδρόμησης (34). Αν δεν μπορεί να προσαρμοστεί η κατάλληλη συνάρτηση δόσης-απόκρισης στα δεδομένα, τότε μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικές μέθοδοι για την εκτίμηση της EC_x και των ορίων εμπιστοσύνης, όπως οι κινητοί μέσοι όροι κατά Thompson (19) και η διαδικασία Trimmed Spearman-Karber (20).

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

50. Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

▼**M6**

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

— οριστική περιγραφή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, αριθμός φορτίου, παρτίδας και αριθμός CAS, καθαρότητα·

— ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας [π.χ. log Kow, υδατοδιαλυτότητα, τάση ατμών, σταθερά του Henry (H) και πληροφορίες για την πορεία και τη συμπεριφορά].

Οργανισμοί δοκιμής:

— ζώα που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή: είδος, επιστημονική ονομασία, πηγή των οργανισμών και συνθήκες αναπαραγωγής·

— ηλικία, εύρος μεγέθους (μάζα) των οργανισμών δοκιμής.

Συνθήκες δοκιμής

— λεπτομέρειες για την παρασκευή του εδάφους δοκιμής·

— μέγιστη υδατοχωρητικότητα του εδάφους·

— περιγραφή της τεχνικής που χρησιμοποιείται για την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο έδαφος·

— λεπτομέρειες των βοηθητικών χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται για τη χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας·

— λεπτομέρειες βαθμονόμησης του ψεκαστικού εξοπλισμού, εφόσον χρησιμοποιείται·

— περιγραφή του πειραματικού σχεδιασμού και διαδικασία·

— μέγεθος των δοχείων δοκιμής και όγκος του εδάφους δοκιμής·

— συνθήκες δοκιμής: ένταση του φωτός, διάρκεια των κύκλων φωτός-σκότους, θερμοκρασία·

— περιγραφή του καθεστώτος σίτισης, του είδους και της ποσότητας της τροφής που χρησιμοποιείται στη δοκιμή, ημερομηνίες σίτισης·

— pH και περιεκτικότητα του εδάφους σε νερό στην αρχή και το τέλος της δοκιμής.

Αποτελέσματα της δοκιμής:

— θνησιμότητα ενηλίκων (%) σε κάθε δοχείο δοκιμής στο τέλος των πρώτων 4 εβδομάδων της δοκιμής·

— συνολική μάζα των ενηλίκων στην αρχή της δοκιμής σε κάθε δοχείο δοκιμής·

— μεταβολές του βάρους των ζώντων ενήλικων σκωλήκων (% του αρχικού βάρους) σε κάθε δοχείο δοκιμής μετά τις πρώτες τέσσερις εβδομάδες της δοκιμής·

— αριθμός των νεαρών σκωλήκων που γεννήθηκαν σε κάθε δοχείο δοκιμής στο τέλος της δοκιμής·

— περιγραφή των εμφανών ή παθολογικών συμπτωμάτων ή των διακριτών αλλαγών συμπεριφοράς·

— τα αποτελέσματα που ελήφθησαν με την υπό δοκιμή χημική ουσία αναφοράς·

— τις LC_{50}, NOEC και/ή EC_x (π.χ. EC_{50}, EC_{10}) για την αναπαραγωγή, αν μερικές από αυτές ισχύουν με διαστήματα εμπιστοσύνης, και γράφημα του προσαρμοσμένου μοντέλου που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό τους μαζί με όλες τις πληροφορίες και τις παρατηρήσεις που είναι χρήσιμες για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων·

— διάγραμμα της σχέσης δόσης-απόκρισης·

— τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από κάθε δοχείο δοκιμής·

Οι αποκλίσεις από τις διαδικασίες που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών και τυχόν ασυνήθιστα συμβάντα κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Jaenicke, J. (1982). '*Eisenia foetida*' is two biological species. Megadrilogica 4, 6-8.

(2) Oien, N. and J. Stenerson (1984). Esterases of earthworm — III. Electrophoresis reveals that *Eisenia foetida* (Savigny) is two species. Comp. Biochem. Physiol. 78c (2), 277 — 282.

▼**M6**

(3) Kula, C. (1996). Development of a test method on sublethal effects of pesticides on the earthworm species *Eisenia fetida/Eisenia andrei* — comparison of two ringtests. In: Riepert, F., Kula, C. (1996): Development of laboratory methods for testing effects of chemicals and pesticides on collembola and earthworms. Mitt. Biol. Bundesamst. f. Land- Forstwirtsch. Berlin-Dahlem, 320, p. 50-82.

(4) Κεφάλαιο Γ.8 του παρόντος παραρτήματος, Δοκιμή οξείας τοξικότητας για τους γαιοσκώληκες.

(5) ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Γενεύη.

(6) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate, No.11268-1. ISO, Γενεύη.

(7) SETAC (1998). Advances in Earthworm Ecotoxicology. Sheppard, S.C., Bembridge, J.D., Holmstrup, M., and L. Posthuma, (eds). SETAC Press, 456 σελίδες.

(8) EPA (1996). Ecological effects test guidelines. Earthworm Subchronic Toxicity Test (850.62.00). United States Environmental Protection Agency. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. EPA712-C-96-167, April 1996.

(9) Bouché, M.B. (1972). Lombriciens de France, Ecologie et systématique. Publication de l'Institut National de la Recherche Agronomique.

(10) Edwards, C.A. (1983). Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms. Report EUR 8714 EN, Commission of European Communities.

(11) Greig-Smith, P.W., H. Becker, P.J. Edwards and F. Heimbach (eds.) (1992). Ecotoxicology of Earthworms. Intercept.

(12) Edwards, C.A. and J. P. Bohlen, (1996). Biology and ecology of Earthworms, 3rd Edition. Chapman and Hall, London.

(13) (ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Γενεύη.

(14) Hund-Rinke, K, Römbke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.

(15) ISO (International Organization for Standardization) (1992). Soil Quality –Determination of water retention characteristics –Laboratory methods, No. 11274. ISO, Γενεύη.

(16) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality –Determination of dry matter and water content on a mass basis — Gravimetric method, No. 11465. ISO, Γενεύη.

(17) Römbke, J. and Th. Moser (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150+ 223 σελίδες.

▼**M6**

(18) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), σ. 19-76. Cambridge Univ. Press.

(19) Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. — Charles Griffin & Company Ltd, London.

(20) Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.

(21) Williams, D.A., (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.

(22) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.

(23) Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

(24) Dunnett, C.W., (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.

(25) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? Ecotoxicology 7: 355-361

(26) Holm, S., (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

(27) Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133-145.

(28) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327-333.

(29) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144-151.

(30) Williams, D.A. (1986); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183-186.

(31) Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. Νέα Υόρκη.

(32) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485-1494

(33) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213-221.

(34) Van Ewijk, P.H. and J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25-32.

▼M6

Προσάρτημα 1

Ορισμοί

Για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου δοκιμών χρησιμοποιούνται οι ακόλουθοι ορισμοί:

Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα.

EC_x (αποτελεσματική συγκέντρωση για επίδραση x %): η συγκέντρωση που προκαλεί επίδραση x % σε οργανισμούς δοκιμής εντός συγκεκριμένης περιόδου έκθεσης σε σύγκριση με μάρτυρα. Στην εν λόγω δοκιμή οι αποτελεσματικές συγκεντρώσεις εκφράζονται ως μάζα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ανά ξηρή μάζα του εδάφους δοκιμής.

LC_0 (μη θανατηφόρος συγκέντρωση): η συγκέντρωση μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας με την οποία δεν θανατώνεται κανένας από τους εκτιθέμενους οργανισμούς δοκιμής εντός δεδομένου χρονικού διαστήματος. Στην παρούσα δοκιμή η LC_0 εκφράζεται ως μάζα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ανά ξηρή μάζα εδάφους δοκιμής.

LC_{50} (μέση θανατηφόρος συγκέντρωση): η συγκέντρωση μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας που προκαλεί τον θάνατο του 50 % των εκτιθέμενων οργανισμών δοκιμής εντός δεδομένου χρονικού διαστήματος. Στην παρούσα δοκιμή η LC_{50} εκφράζεται ως μάζα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ανά ξηρή μάζα του εδάφους δοκιμής.

LC_{100} (ολικά θανατηφόρος συγκέντρωση): η συγκέντρωση μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας που προκαλεί τον θάνατο του 100 % των εκτιθέμενων οργανισμών δοκιμής εντός δεδομένου χρονικού διαστήματος. Στην παρούσα δοκιμή η LC_{100} εκφράζεται ως μάζα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ανά ξηρή μάζα του εδάφους δοκιμής.

LOEC (κατώτατη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης): η κατώτατη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που έχει στατιστικώς σημαντική επίδραση ($p < 0,05$). Στην παρούσα δοκιμή η LOEC εκφράζεται ως μάζα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ανά ξηρή μάζα του εδάφους δοκιμής. Όλες οι συγκεντρώσεις δοκιμής άνω της LOEC θα πρέπει κανονικά να παρουσιάζουν επίδραση στατιστικώς διαφορετική από τον μάρτυρα. Τυχόν αποκλίσεις από τα παραπάνω για τον προσδιορισμό της LOEC πρέπει να αιτιολογούνται στην έκθεση της δοκιμής.

NOEC (συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης): η μέγιστη αμέσως χαμηλότερη της LOEC συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρούνται επιδράσεις. Στην παρούσα δοκιμή, η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στη NOEC δεν έχει στατιστικώς σημαντική επίδραση ($p < 0,05$) εντός δεδομένης περιόδου έκθεσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα.

Ρυθμός αναπαραγωγής: ο μέσος αριθμός των νεαρών σκωλήκων που γεννιούνται ανά αριθμό ενήλικων κατά την περίοδο δοκιμής.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

▼**M6**

Προσάρτημα 2

Προσδιορισμός της υδατοχωρητικότητας του τεχνητού εδάφους

Η ακόλουθη μέθοδος κρίθηκε κατάλληλη. Περιγράφεται στο παράρτημα C του ISO DIS 11268-2.

Συλλέγεται συγκεκριμένη ποσότητα (π.χ. 5 g) από το υπόστρωμα του υπό δοκιμή εδάφους με τη χρήση κατάλληλη συσκευής (ελικοειδής σωλήνας κ.λπ). Το κάτω μέρος του σωλήνα καλύπτεται με ένα κομμάτι διηθητικού χαρτιού και, αφού γεμίσει με νερό, τοποθετείται στη βάση δοκιμαστικού σωλήνα σε υδατόλουτρο. Ο σωλήνας προοδευτικά βυθίζεται έως ότου το επίπεδο του νερού καλύψει το πάνω μέρος του εδάφους. Θα πρέπει να μείνει στο νερό επί τρεις ώρες περίπου. Δεδομένου ότι δεν μπορεί να απορροφηθεί όλο το νερό από τα τριχοειδή του εδάφους, το δείγμα εδάφους θα πρέπει να αφεθεί να στραγγίξει για δύο ώρες με την τοποθέτηση του σωλήνα σε επιφάνεια πολύ υγρής λεπτοαλεσμένης χαλαζιακής άμμου που περιέχεται σε κλειστό δοχείο (ώστε να αποφεύγεται η ξήρανση). Στη συνέχεια το δείγμα ζυγίζεται, ξηραίνεται σε σταθερή μάζα στους 105 °C. Η υδατοχωρητικότητα μπορεί στη συνέχεια να υπολογιστεί ως εξής:

$$\text{WHC (σε \% ξηρής μάζας)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

όπου:

S = υπόστρωμα κορεσμένο από νερό + μάζα σωλήνα + μάζα διηθητικού χαρτιού

T = απόβαρο (μάζα σωλήνα + μάζα διηθητικού χαρτιού)

D = ξηρή μάζα υποστρώματος

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality -Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Γενεύη.

▼**M6**

Προσάρτημα 3

Προσδιορισμός του pH του εδάφους

Η ακόλουθη μέθοδος προσδιορισμού του pH ενός δείγματος εδάφους βασίζεται στην περιγραφή στο ISO 10390 (Ποιότητα εδάφους — προσδιορισμός του pH).

Συγκεκριμένη ποσότητα εδάφους ξηραίνεται σε θερμοκρασία δωματίου επί 12 ώρες τουλάχιστον. Κατόπιν, παρασκευάζεται εναιώρημα του εδάφους (που περιέχει τουλάχιστον 5 g εδάφους) σε πενταπλάσιο όγκο είτε διαλύματος 1 M χλωριούχου καλίου (KCl) αναλυτικής καθαρότητας είτε διαλύματος 0,01 M χλωριούχου ασβεστίου ($CaCl_2$) αναλυτικής καθαρότητας. Το εναιώρημα ανακινείται ζωηρά επί πέντε λεπτά και στη συνέχεια αφήνεται σε ηρεμία επί 2 τουλάχιστον ώρες, το πολύ όμως 24 ώρες. Το pH της υγρής φάσης μετριέται με χρήση πεχάμετρου, το οποίο βαθμονομείται κάθε φορά πριν από τη μέτρηση, με τη χρήση κατάλληλης σειράς ρυθμιστικών διαλυμάτων (π.χ. pH 4,0 και 7,0).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Γενεύη.

▼M6

Προσάρτημα 4

Καλλιεργεια των eisenia fetida / eisenia andrei

Η καλλιέργεια διεξάγεται κατά προτίμηση σε κλιματιζόμενο θάλαμο σε θερμοκρασία 20 ± 2 °C. Στην εν λόγω θερμοκρασία και με την παροχή επαρκούς τροφής, οι σκώληκες ωριμάζουν ύστερα από 2 έως 3 μήνες περίπου.

Τα δύο είδη μπορούν να αναπαράγονται σε ευρύ φάσμα ζωικών αποβλήτων. Το συνιστώμενο μέσο αναπαραγωγής είναι ένα μείγμα κοπριάς αλόγου ή βοοειδών και τύρφης σε αναλογία 50:50. Πρέπει να γίνονται έλεγχοι για να εξασφαλιστεί ότι οι αγελάδες ή τα άλογα από τα οποία προέρχεται η κοπριά δεν έχουν υποβληθεί σε φαρμακευτική αγωγή ή αγωγή με χημικές ουσίες, όπως αυξητικούς παράγοντες, νηματωδοκτόνα ή παρόμοια κτηνιατρικά προϊόντα που θα μπορούσαν να επιδράσουν αρνητικά στους σκώληκες κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Συνιστάται η κοπριά αγελάδας που έχει συλλεγεί από τους ενδιαφερόμενους και είναι «βιολογικής» προέλευσης, διότι η πείρα δείχνει ότι η κοπριά αγελάδας που είναι διαθέσιμη στο εμπόριο και χρησιμοποιείται ως λίπασμα για τους κήπους μπορεί να έχει δυσμενείς επιδράσεις στους σκώληκες. Το θρεπτικό μέσο θα πρέπει να έχει τιμή pH περίπου 6 έως 7 (ρυθμίζεται με ανθρακικό ασβέστιο), χαμηλή ιοντική αγωγιμότητα (κάτω των 6 mS/cm ή συγκέντρωση άλατος κάτω του 0,5 %) και να μην είναι υπερβολικά μολυσμένο από αμμωνία ή ούρα ζώων. Το υπόστρωμα πρέπει να είναι υγρό αλλά όχι μουσκεμένο. Κατάλληλα για χρήση είναι τα κουτιά αναπαραγωγής των 10 έως 50 λίτρων.

Για να ληφθούν σκώληκες κανονικής ηλικίας και μεγέθους (μάζας), είναι προτιμότερο να αρχίσει η καλλιέργεια με κουκούλια. Μόλις η καλλιέργεια τοποθετηθεί, διατηρείται με την τοποθέτηση ενήλικων σκωλήκων σε κουτί αναπαραγωγής με φρέσκο υπόστρωμα ώστε να δημιουργηθούν κουκούλια επί 14 - 28 ημέρες. Οι ενήλικοι σκώληκες στη συνέχεια αφαιρούνται και οι νεαροί που έχουν βγει από τα κουκούλια χρησιμοποιούνται ως βάση για τη νέα καλλιέργεια. Οι σκώληκες σιτίζονται διαρκώς με ζωικά απόβλητα και μεταφέρονται σε φρέσκο υπόστρωμα από καιρό σε καιρό. Η πείρα δείχνει ότι η αερόξηρη, λεπτοαλεσμένη κοπριά αγελάδος ή αλόγου ή το άλευρο βρώμης είναι κατάλληλη τροφή. Πρέπει να εξασφαλιστεί ότι οι αγελάδες ή τα άλογα από τα οποία προέρχεται η κοπριά δεν έχουν υποβληθεί σε φαρμακευτική αγωγή με χημικές ουσίες, όπως αυξητικούς παράγοντες που θα μπορούσαν να επιδράσουν αρνητικά στους σκώληκες σε μακροχρόνια καλλιέργεια. Οι σκώληκες που εξέρχονται από τα κουκούλια χρησιμοποιούνται για δοκιμές όταν είναι μεταξύ 2 και 12 μηνών και θεωρούνται ενήλικοι.

Οι σκώληκες θεωρούνται υγιείς εάν κινούνται μέσα στο υπόστρωμα, δεν προσπαθούν να το εγκαταλείψουν και αναπαράγονται συνεχώς. Το υπόστρωμα έχει εξασθενήσει αν οι σκώληκες κινούνται πολύ αργά και έχουν κίτρινο οπίσθιο άκρο. Στην περίπτωση αυτή, συνιστώνται η χορήγηση φρέσκου υποστρώματος και/ή η μείωση της πυκνότητας πληθυσμού.

▼M6

Προσάρτημα 5

Τεχνικές μέτρησής νεαρών σκωλήκων που εξέρχονται από τα κουκούλια

Η εξαγωγή των σκωλήκων με το χέρι από το έδαφος είναι χρονοβόρα. Συνεπώς, συνιστώνται δύο εναλλακτικές μέθοδοι:

α) Τα δοχεία τοποθετούνται σε υδρόλουτρο αρχικά σε θερμοκρασία 40 °C, η οποία όμως αυξάνεται σε 60 °C. Μετά περίοδο περίπου 20 λεπτών οι νεαροί σκώληκες θα πρέπει να εμφανιστούν στην επιφάνεια του εδάφους από την οποία εύκολα αφαιρούνται και καταμετρώνται.

β) Το έδαφος δοκιμής μπορεί να εκπλυθεί με κόσκινο με χρήση της μεθόδου van Gestel et al. (1) υπό την προϋπόθεση ότι η τύρφη και η κοπριά ή το άλευρο βρώμης που προστίθενται στο έδαφος είναι πολύ λεπτοαλεσμένα. Δύο κόσκινα (διαμέτρου 30 cm) με βροχίδες διαμέτρου 0,50 mm τοποθετούνται το ένα πάνω στο άλλο. Το περιεχόμενο ενός δοχείου εκπλένεται με τη βοήθεια των κόσκινων με νερό της βρύσης που τρέχει με πίεση, οπότε οι νεαροί σκώληκες και τα κουκούλια τους μένουν κυρίως στο πάνω κόσκινο. Αξίζει να σημειωθεί ότι όλη η επιφάνεια του πάνω κόσκινου πρέπει να παραμένει υγρή κατά τη διαδικασία αυτή, έτσι ώστε οι νεαροί σκώληκες να επιπλέουν σε μια μεμβράνη νερού, ώστε να μην μπορούν να περάσουν μέσα από τις οπές του κόσκινου. Καλύτερα αποτελέσματα επιτυγχάνονται όταν χρησιμοποιείται κεφαλή ντους.

Μόλις πλυθεί το υπόστρωμα εδάφους διαμέσου του κόσκινου, οι νεαροί σκώληκες και τα κουκούλια εκπλύνονται από το επάνω κόσκινο σε μια λεκάνη. Το περιεχόμενο της λεκάνης ηρεμεί ώστε τα άδεια κουκούλια να επιπλεύσουν στην επιφάνεια του νερού και τα κουκούλια με περιεχόμενο όπως και οι νεαροί σκώληκες να βυθιστούν. Το στάσιμο νερό μπορεί στη συνέχεια να χυθεί και οι νεαροί σκώληκες και τα κουκούλια να μεταφερθούν σε τρυβλίο Petri που περιέχει λίγο νερό. Οι σκώληκες αφαιρούνται για μέτρηση με τη χρήση βελόνας ή λαβίδων.

Η πείρα δείχνει ότι η μέθοδος α) είναι πιο κατάλληλη για την εξαγωγή νεαρών σκωλήκων που θα μπορούσαν να εκπλυθούν μέσω οπής διαμέτρου 0,5 mm.

Θα πρέπει πάντα να προσδιορίζεται η αποτελεσματικότητα της μεθόδου που χρησιμοποιείται για την αφαίρεση των σκωλήκων (και των κουκουλιών, αν χρειαστεί) από το υπόστρωμα εδάφους. Αν οι νεαροί σκώληκες συλλέγονται με τεχνική αφαίρεσης με το χέρι, είναι καλύτερα να διεξάγεται η διαδικασία δύο φορές για όλα τα δείγματα.

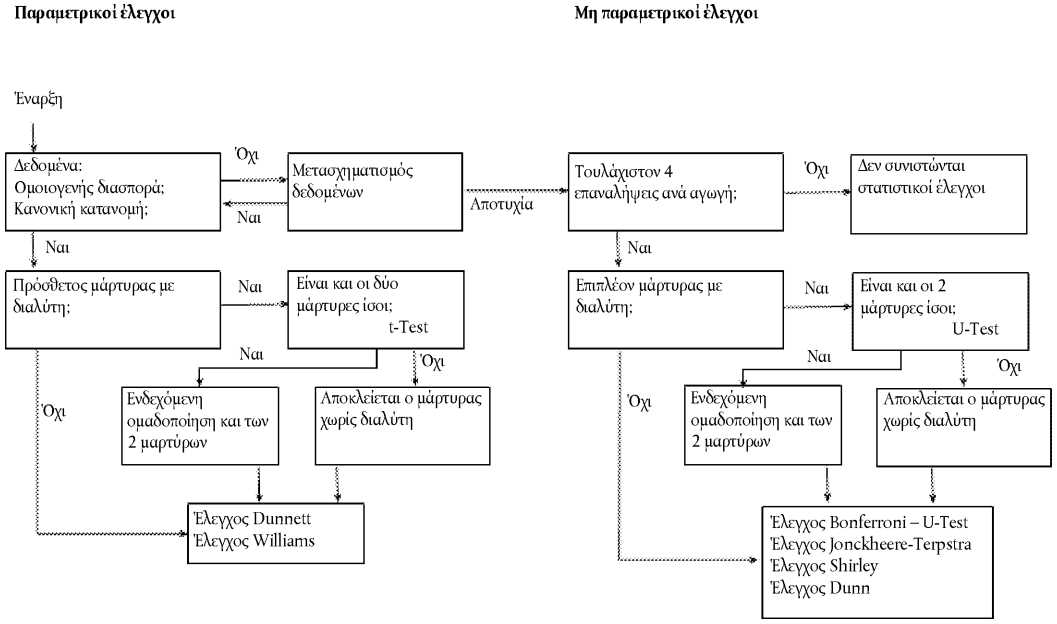
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) Van Gestel, C.A.M., W.A. van Dis, E.M. van Breemen, P.M. Sparenburg (1988). Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments. Pedobiologia 32:367-371.

▼**M6**

Προσάρτημα 6

Επισκόπηση τη στατιστικής εκτίμησής των δεδομένων (προσδιορισμός NOEC)



▼M6

Γ.34. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΑΝΑΕΡΟΒΙΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ — ΜΕΙΩΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΑΕΡΙΟΥ ΑΠΟ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΧΩΝΕΥΣΗ ΙΛΥΟΣ (ΛΥΜΑΤΟΛΑΣΠΗΣ)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 224 του ΟΟΣΑ (2007). Οι χημικές ουσίες που απορρίπτονται στο υδατικό περιβάλλον περνούν μέσω της αερόβιας και της αναερόβιας ζώνης, όπου μπορεί να αποικοδομούνται και/ή να αναστέλλουν τη βακτηριακή δραστηριότητα· σε ορισμένες περιπτώσεις μπορούν να παραμένουν ανενόχλητες στις αναερόβιες ζώνες για δεκαετίες ή και περισσότερο. Στην επεξεργασία υγρών αποβλήτων το πρώτο στάδιο, η πρωτοβάθμια επεξεργασία, είναι αερόβια στο υπερκείμενο υγρό και αναερόβια στην εναπομείνασα ιλύ. Στη δευτεροβάθμια επεξεργασία ακολουθεί η αερόβια ζώνη σε δεξαμενή αερισμού της ενεργοποιημένης ιλύος και η αναερόβια ζώνη στη δευτεροβάθμια δεξαμενή καθίζησης. Η ιλύς και από τα δύο στάδια υπόκειται συνήθως σε αναερόβια επεξεργασία, οπότε παράγεται μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα που κανονικά χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας. Στο ευρύτερο περιβάλλον, οι χημικές ουσίες που καταλήγουν σε ιζήματα σε κόλπους, εκβολές ποταμών και στη θάλασσα είναι πιθανόν να παραμείνουν επ' αόριστον στις εν λόγω αναερόβιες ζώνες, αν δεν είναι βιοαποικοδομήσιμες. Για ορισμένες χημικές ουσίες, οι ποσότητες αυτές θα είναι μεγαλύτερες λόγω των φυσικών ιδιοτήτων τους, όπως χαμηλή υδατοδιαλυτότητα, υψηλή προσρόφηση αιωρούμενων στερεών, αλλά και επειδή δεν βιοαποικοδομούνται αερόβια.

2. Ενώ είναι επιθυμητό οι χημικές ουσίες που απορρίπτονται στο περιβάλλον να βιοαποικοδομούνται υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, έχει μεγάλη σημασία αυτές οι χημικές ουσίες να μην αναστέλλουν τη δραστηριότητα μικροοργανισμών σε καμία από τις δύο ζώνες. Στο Ηνωμένο Βασίλειο υπήρξαν λίγες περιπτώσεις πλήρους αναστολής της παραγωγής μεθανίου, εξαιτίας, για παράδειγμα, της παρουσίας πενταχλωροφαινόλης σε βιομηχανικά απόβλητα, που είχε ως αποτέλεσμα την εξαιρετικά δαπανηρή μεταφορά ανεσταλμένης ιλύος από τους χωνευτές σε «ασφαλείς» τοποθεσίες και την εισαγωγή υγιούς ιλύος για χώνευση από γειτονικές εγκαταστάσεις. Υπήρξαν όμως πολλές περιπτώσεις λιγότερο σοβαρής διαταραχής της χώνευσης από πολλές άλλες χημικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένων αλογονωμένων αλειφατικών υδρογονανθράκων (στεγνό καθάρισμα) και απορρυπαντικών, με αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της αποτελεσματικότητας της χώνευσης.

3. Μόνο μία μέθοδος δοκιμών, η Γ.11 (1), ασχολείται με την αναστολή της δραστηριότητας των βακτηρίων (αναπνοή ενεργοποιημένης ιλύος), που αξιολογεί το αποτέλεσμα των υπό δοκιμή χημικών ουσιών στο ποσοστό πρόσληψης οξυγόνου στην παρουσία του υποστρώματος. Η μέθοδος χρησιμοποιείται ευρέως για έγκαιρη προειδοποίηση των δυνητικών επιβλαβών αποτελεσμάτων των χημικών ουσιών στην αερόβια επεξεργασία των υγρών αποβλήτων, καθώς και για να επισημαίνει μη ανασταλτικές συγκεντρώσεις των υπό δοκιμή χημικών ουσιών προς χρήση σε διάφορες δοκιμές για βιοαποικοδομησιμότητα. Η μέθοδος δοκιμών Γ.43 (2) προσφέρει περιορισμένες δυνατότητες για τον προσδιορισμό της τοξικότητας μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην παραγωγή αερίου από αναερόβια ιλύ, η οποία έχει αραιωθεί στο ένα δέκατο της κανονικής συγκέντρωσης στερεών σε αυτή, ώστε να υπάρξει η απαιτούμενη ακρίβεια στην αξιολόγηση του ποσοστού βιοαποικοδόμησης. Επειδή η αραιωμένη ιλύς μπορεί να είναι πιο ευαίσθητη σε ανασταλτικές χημικές ουσίες, η ομάδα του ISO αποφάσισε να εκπονήσει μέθοδο με τη χρήση μη αραιωμένης ιλύος. Εξετάστηκαν τουλάχιστον τρία κείμενα (της Δανίας, της Γερμανίας και του ΗΒ) και τελικά εκπονήθηκαν δύο πρότυπα ISO, ένα με τη χρήση αναραίωτης ιλύος το ISO 13641-1 (3)- και ένα με τη χρήση ιλύος αραιωμένης σε αναλογία 1:100 -το ISO 13641-2 (4)- για να αντιπροσωπευτούν λάσπες και ιζήματα που έχουν ολιγάριθμους πληθυσμούς βακτηρίων. Και οι δύο μέθοδοι υποβλήθηκαν σε δοκιμή δακτυλίου (5)· το μέρος 1 επιβεβαιώθηκε ως αποδεκτό πρότυπο αλλά υπήρξε ασυμφωνία για το μέρος 2. Το ΗΒ θεώρησε ότι, λόγω μεγάλου ποσοστού συμμετεχόντων που δεν ανέφεραν παραγωγή αερίου ή πολύ μικρή παραγωγή αερίου, μερικώς επειδή το ποσοστό χώρου αερίου ήταν πολύ υψηλό (στο 75 %) για βέλτιστη ευαισθησία, η μέθοδος απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

4. Προηγούμενες εργασίες στο ΗΒ (6) (7) περιγράφουν μια μανομετρική μέθοδο με τη χρήση μη αραιωμένης ιλύος χώνευσης, επιπλέον ακατέργαστης λυματολάσπης ως υποστρώματος, σε φιάλες των 500 ml· η συσκευή ήταν περίπλοκη και η δυσοσμία της ακατέργαστης ιλύος πολύ δυνατή. Αργότερα, εφαρμόστηκε με επιτυχία από τους Wilson et al. (10) η πιο

▼M6

σύνθετη και εύχρηστη συσκευή των Shelton και Tiedje (8), όπως εξελίχθηκε από τους Battersby και Wilson (9). Οι Kawahara et al (11) παρασκεύασαν με επιτυχία πιο τυποποιημένη ιλύ στο εργαστήριο για χρήση σε δοκιμές για αναερόβια βιοαποικοδομησιμότητα και αναστολή με ορισμένες χημικές ουσίες. Επίσης, η ακατέργαστη ιλύς ως υπόστρωμα αντικαταστάθηκε, για τη διενέργεια δοκιμής, είτε με αραιωμένη εκατό φορές αναερόβια ιλύ είτε με λάσπες, ιζήματα κ.λπ. χαμηλής βακτηριακής δραστηριότητας.

5. Η εν λόγω μέθοδος μπορεί να παρέχει πληροφορίες που είναι χρήσιμες στην πρόγνωση της πιθανής επίδρασης μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην παραγωγή αερίου σε αναερόβια χωνευτήρια. Ωστόσο, μόνο από δοκιμές μεγαλύτερης διάρκειας που προσομοιάζουν εν λειτουργία χωνευτήρια μπορεί να φανεί αν είναι δυνατόν να γίνει προσαρμογή των μικροοργανισμών στην υπό δοκιμή χημική ουσία ή αν χημικές ουσίες που είναι πιθανόν να απορροφώνται και να προσροφώνται σε ιλύ μπορούν να καταλήξουν σε τοξική συγκέντρωση σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από ό,τι επιτρέπεται στην εν λόγω δοκιμή.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

6. Κλάσματα μείγματος αναερόβιας ιλύος χώνευσης (20 g/l έως 40 g/l συνολικά στερεά) και αποικοδομήσιμο διάλυμα υποστρώματος επωάζονται μόνα τους και ταυτόχρονα με εύρος συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε σφραγισμένα δοχεία επί 3 ημέρες κατ' ανώτατο όριο. Η παραγόμενη ποσότητα αερίων (μεθάνιο συν διοξείδιο του άνθρακα) μετριέται με την αύξηση της πίεσης (Pa) στις φιάλες. Το ποσοστό αναστολής της παραγωγής αερίου που προκαλείται από τις διάφορες συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας υπολογίζεται από τα ποσά που παράγονται στις αντίστοιχες φιάλες δοκιμής και μάρτυρα. Η EC_{50} και άλλες αποτελεσματικές συγκεντρώσεις υπολογίζονται από διαγράμματα που δείχνουν την ποσοστιαία αναστολή σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση των υπό δοκιμή χημικών ουσιών ή, το συνηθέστερο, με τον λογάριθμό της.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

7. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει κανονικά να χρησιμοποιούνται στην καθαρότερη διαθέσιμη μορφή τους, αφού οι προσμείξεις σε ορισμένες χημικές ουσίες, π.χ. στις χλωροφαινόλες, μπορεί να είναι πολύ πιο τοξικές από την ίδια την υπό δοκιμή χημική ουσία. Ωστόσο, πρέπει να ληφθούν υπόψη οι ανάγκες για έλεγχο των χημικών ουσιών υπό τη μορφή στην οποία παράγονται/διατίθενται εμπορικώς. Η χρήση μορφοποιημένων προϊόντων δεν συνιστάται συνήθως, αλλά για τις δυσδιάλυτες υπό δοκιμή χημικές ουσίεςμπορεί να ενδείκνυται η χρήση μορφοποιημένου υλικού. Οι ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας πρέπει να είναι γνωστές: υδατοδιαλυτότητα και διαλυτότητα σε ορισμένους οργανικούς διαλύτες, τάση ατμών, συντελεστής προσρόφησης, υδρόλυση και βιοαποοικοδομησιμότητα υπό αναερόβιες συνθήκες.

ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

8. Η δοκιμή εφαρμόζεται σε χημικές ουσίες που είναι διαλυτές ή αδιάλυτες στο νερό, συμπεριλαμβανομένων των πτητικών ουσιών. Ωστόσο, χρειάζεται ιδιαίτερη μέριμνα με υλικά χαμηλής υδατοδιαλυτότητας [βλ. παραπομπή (12)] και υψηλής πτητικότητας. Επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν εμβόλια από άλλους αναερόβιους χώρους, π.χ. λάσπες, κεκορεσμένα εδάφη, ιζήματα. Αναερόβια βακτηριακά συστήματα που προηγουμένως είχαν εκτεθεί σε τοξικές χημικές ουσίες μπορούν να προσαρμόζονται και να διατηρούν τη δραστηριότητά τους με την παρουσία ξενοβιοτικών χημικών ουσιών. Εμβόλια από προσαρμοσμένα βακτηριακά συστήματα ενδέχεται να δείχνουν μεγαλύτερη αντοχή στις υπό δοκιμή χημικές ουσίες σε σύγκριση με εμβόλια που λαμβάνονται από μη προσαρμοσμένα συστήματα.

ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

9. Για την επαλήθευση της διαδικασίας, δοκιμάζεται υλικό αναφοράς με την τοποθέτηση κατάλληλων δοχείων παράλληλα ως μέρος της κανονικής εκτέλεσης των δοκιμών· η 3,5-διχλωροφαινόλη έχει αποδειχθεί συνεπής αναστολέας της αναερόβιας παραγωγής αερίου, καθώς και της κατανάλωσης οξυγόνου από ενεργοποιημένη ιλύ και άλλες βιοχημικές αντιδράσεις. Δύο άλλες χημικές ουσίες αποδείχθηκαν ότι είναι περισσότερο ανασταλτικές για την παραγωγή μεθανίου από την 3,5-διχλωροφαινόλη, συγκεκριμένα το διθειοκυανικό μεθυλένιο και η πενταχλωροφαινόλη, αλλά δεν έχουν επικυρωθεί τα αποτελέσματα γι' αυτές τις ουσίες. Η πενταχλωροφαινόλη δεν συνιστάται, αφού δεν είναι ευχερώς διαθέσιμη σε καθαρή μορφή.

▼**M6**

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

10. Σε διεθνή δοκιμή δακτυλίου (5) υπήρξε μόνο μέτρια αναπαραγωγιμότητα σε τιμές EC_{50} μεταξύ των 10 συμμετεχόντων εργαστηρίων για την 3,5-διχλωροφαινόλη και το 2-βρωμοαιθανοσουλφονικό οξύ. (Η περιοχή τιμών για την πρώτη ουσία ήταν 32 mg/l έως 502 mg/l και για τη δεύτερη 220-2 190 mg/l).

Αριθμός εργαστηρίων	Ως mg/l			Ως ιλύς mg/g		
	μέση	s.d. (τυπική απόκλιση)	συντελεστής διακύμανσης (%)	μέση	s.d. (τυπική απόκλιση)	συντελεστής διακύμανσης (%)
	3, 5-διχλωροφαινόλη					
10	153	158	103	5	4,6	92
	2-βρωμοαιθανοσουλφονικό οξύ					
10	1 0-58	896	85	34	26	76

Δεδομένα EC_{50} από τη δοκιμή δακτυλίου — μη αραιωμένη ιλύς

11. Οι υψηλοί συντελεστές διακύμανσης μεταξύ εργαστηρίων αντανακλούν σε μεγάλο βαθμό διαφορές στην ευαισθησία των μικροοργανισμών λόγω είτε προηγηθείσας έκθεσης είτε μη προηγηθείσας έκθεσης στην υπό δοκιμή χημική ουσία ή σε άλλες χημικά συναφείς ουσίες. Η ακρίβεια με την οποία προσδιορίστηκε η τιμή EC_{50} βάσει της συγκέντρωσης ιλύος δεν ήταν πολύ καλύτερη από την ογκομετρική τιμή (mg/l). Τα τρία εργαστήρια που ανέφεραν την ακρίβεια των τιμών τους για την EC_{50} για την 3,5-διχλωροφαινόλη έδειξαν πολύ χαμηλότερους συντελεστές διακύμανσης (22,9 και 18 % αντίστοιχα για EC_{50} mg/g) σε σχέση με τους μέσους όρους και των δέκα εργαστηρίων. Οι επιμέρους μέσοι όροι για τα τρία εργαστήρια ήταν 3,1, 3,2 και 2,8 mg/g, αντίστοιχα. Οι χαμηλότεροι, αποδεκτοί συντελεστές διακύμανσης εντός των εργαστηρίων σε σύγκριση με τους πολύ υψηλότερους συντελεστές μεταξύ εργαστηριακών τιμών, συγκεκριμένα 9-22 % πρβλ. 92 %, δείχνουν ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές στις ιδιότητες των επιμέρους ιλύων.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Εργαστηριακός εξοπλισμός

12. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται ο συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός, καθώς και τα εξής:

α) Επωαστήρας — αντισπινθηριστικός και με ελεγχόμενη θερμοκρασία στους 35 °C ± 2 °C·

β) γυάλινα δοχεία δοκιμής, ανθεκτικά στην πίεση, κατάλληλου ονομαστικού μεγέθους ([1]), με αεροστεγές διάφραγμα που να αντέχει σε πίεση 2 bar ή 2×10^5 Pa (για την επένδυση να χρησιμοποιείται π.χ. PTFE = πολυτετραφθοροαιθυλένιο). Συνιστώνται γυάλινες φιάλες ορού ονομαστικού όγκου 125 ml, με πραγματική χωρητικότητα περίπου 160 ml, σφραγισμένες με πώμα ορού ([2]) και επιπώματα αλουμινίου· μπορούν όμως να χρησιμοποιηθούν επιτυχώς και φιάλες συνολικής χωρητικότητας μεταξύ 0,1 και 1 λίτρου·

([1]) Το συνιστώμενο μέγεθος είναι 0,1 του λίτρου έως 1 λίτρο.

([2]) Συνιστάται η χρήση αεροστεγούς διαφράγματος σιλικόνης. Συνιστάται επιπλέον να ελεγχθεί κατά πόσον τα πώματα είναι αεροστεγή, ιδίως αυτά από βουτυλοκαουτσούκ, επειδή ορισμένα διαφράγματα που διατίθενται στο εμπόριο από βουτυλοκαουτσούκ δεν είναι επαρκώς αεροστεγή έναντι του μεθανίου και μερικά διαφράγματα δεν παραμένουν στεγανά όταν υφίστανται διάτρηση με βελόνα υπό τις συνθήκες της δοκιμής.

— Συνιστώνται αεροστεγή διαφράγματα και πρέπει να χρησιμοποιούνται για πτητικές χημικές ουσίες (ορισμένα πώματα που διατίθενται στο εμπόριο είναι σχετικά λεπτά, με πάχος λιγότερο από 0,5 cm, και δεν παραμένουν αεροστεγή αν τρυπηθούν με βελόνα σύριγγας)·

— συνιστώνται διαφράγματα από βουτυλοκαουτσούκ (περίπου 1 cm), αν οι ουσίες δοκιμής δεν είναι πτητικές (αυτά κανονικά παραμένουν αεροστεγή μετά τη διάτρηση).

— Πριν από τη δοκιμή, συνιστάται να εξετάζονται προσεκτικά τα διαφράγματα, ώστε να διαπιστώνεται αν μπορούν να παραμείνουν αεροστεγή μετά τη διάτρηση.

▼M6

γ) μετρητής πίεσης ακριβείας [1] και προσάρτημα βελόνας·

Ολική παραγωγή αερίου (μεθάνιο συν διοξείδιο του άνθρακα) μετρούμενη με μετρητή πίεσης προσαρμοσμένο ώστε να καθίσταται δυνατή η μέτρηση και η εκτόνωση του παραγόμενου αερίου. Παράδειγμα κατάλληλης μέτρησης είναι ένας χειροκατευθυνόμενος μετρητής πίεσης ακριβείας συνδεδεμένος με βελόνα σύριγγας· μια τριοδική αεροστεγής βαλβίδα διευκολύνει την απελευθέρωση της υπερπίεσης (προσάρτημα 1). Είναι ανάγκη να διατηρηθεί ο εσωτερικός όγκος της σωλήνωσης του μορφοτροπέα πίεσης και της βαλβίδας όσο το δυνατόν μικρότερος, ώστε τα σφάλματα που προκαλούνται λόγω μη υπολογισμού του όγκου του εξοπλισμού να είναι ασήμαντα·

δ) μονωμένοι περιέκτες, για τη μεταφορά της ιλύος χώνευσης·

ε) τριοδικές βαλβίδες πίεσης·

στ) κόσκινο, με τετράγωνες βροχίδες διαμέτρου 1 mm·

ζ) δοχείο, για την ιλύ χώνευσης, φιάλη γυάλινη ή από πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας, χωρητικότητας 5 λίτρων, εφοδιασμένο με αναδευτήρα και τεχνικά μέσα διοχέτευσης ρεύματος αερίου αζώτου (βλ. σημείο 13) διαμέσου του υπερκείμενου χώρου·

η) διηθητικές μεμβράνες (0,2 μm) για την αποστείρωση του υποστρώματος·

θ) μικροσύριγγες, για την αεροστεγή σύνδεση του μορφοτροπέα πίεσης [βλ. σημείο 12 στοιχείο γ)] με τον υπερκείμενο χώρο στις φιάλες [βλ. σημείο 12 στοιχείο β)]· επίσης, για την προσθήκη αδιάλυτων υγρών υπό δοκιμή ουσιών στις φιάλες·

ι) κιβώτιο χειρισμών με γάντια (glove box) προαιρετικά, αλλά συνιστάται, με ελαφρά θετική πίεση αζώτου.

Αντιδραστήρια

13. Χρησιμοποιούνται αντιδραστήρια αναλυτικής καθαρότητας σε όλη τη δοκιμή. Σε όλη τη δοκιμή πρέπει να χρησιμοποιείται αζωτούχο αέριο, υψηλής καθαρότητας, με περιεκτικότητα σε οξυγόνο μικρότερη από 5 μl/l.

Νερό

14. Αν είναι αναγκαία η αραίωση σε κάποιο στάδιο, να χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό που έχει προηγουμένως εξαεριστεί. Δεν είναι αναγκαίοι αναλυτικοί έλεγχοι για το νερό αυτό, αλλά η συσκευή απιονισμού πρέπει να συντηρείται τακτικά. Να χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό και για την παρασκευή διαλυμάτων παρακαταθήκης. Πριν από την προσθήκη του αναερόβιου εμβολίου σε οποιοδήποτε διάλυμα ή αραίωμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, επαληθεύεται ότι αυτά δεν περιέχουν οξυγόνο. Αυτό γίνεται είτε φυσώντας άζωτο στο νερό αραίωσης (ή μέσω των αραιωμάτων) επί 1 ώρα πριν από την προσθήκη εμβολίου, ή εναλλακτικά με τη θέρμανση του νερού αραίωσης στο σημείο βρασμού και με την ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου σε περιβάλλον χωρίς οξυγόνο.

Χωνευμένη ιλύς

15. Συλλέγεται ενεργός χωνευμένη ιλύς από χωνευτήριο σε εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων ή, διαφορετικά, από εργαστηριακό χωνευτήριο που επεξεργάζεται ιλύ κυρίως από οικιακά λύματα. Πρακτικές πληροφορίες για την ιλύ από εργαστηριακό χωνευτήριο είναι διαθέσιμες σε άλλο σημείο (11). Αν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί προσαρμοσμένο εμβόλιο, να εξεταστεί το ενδεχόμενο χρήσης ιλύος χώνευσης από εγκατάσταση επεξεργασίας βιομηχανικών λυμάτων. Πρέπει να χρησιμοποιούνται φιάλες με μεγάλο στόμιο

[1] Ο μετρητής πίεσης θα πρέπει να χρησιμοποιείται και να βαθμονομείται σε τακτά διαστήματα, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αν χρησιμοποιείται μετρητής πίεσης της προδιαγεγραμμένης ποιότητας, π.χ. ενθυλακωμένος σε χαλύβδινη μεμβράνη, δεν είναι αναγκαία η βαθμονόμηση στο εργαστήριο. Θα πρέπει να διακριβώνεται από εγκεκριμένο φορέα στα συνιστώμενα χρονικά διαστήματα. Η ορθότητα της διακρίβωσης μπορεί να ελεγχθεί στο εργαστήριο με μέτρηση ενός σημείου σε 1×10^5 Pa σε σύγκριση με έναν μετρητή πίεσης με μηχανική ένδειξη. Όταν το σημείο αυτό μετριέται σωστά, η γραμμικότητα παραμένει επίσης αμετάβλητη. Αν χρησιμοποιούνται άλλες συσκευές μέτρησης (χωρίς πιστοποιημένη διακρίβωση από τον κατασκευαστή), συνιστάται μετατροπή στο σύνολο των διατάξεων ανά τακτά διαστήματα (προσάρτημα 2).

▼M6

από πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας ή παρόμοιο υλικό, που μπορεί να διασταλεί, για τη συλλογή ιλύος. Στις φιάλες δείγματος προστίθεται ιλύς ώστε να γεμίσουν έως 1 cm από το πάνω μέρος των φιαλών, σφραγίζονται καλά, κατά προτίμηση με βαλβίδα ασφαλείας [σημείο 12 στοιχείο ε)] και τοποθετούνται σε μονωμένους περιέκτες [σημείο 12 στοιχείο δ)], ώστε να ελαχιστοποιηθεί το θερμικό πλήγμα, έως ότου μεταφερθούν σε επωαστήρα που διατηρεί τη θερμοκρασία στους 35 °C ± 2° C. Κατά το άνοιγμα των φιαλών, πρέπει να εκτονωθεί η υπερβολική πίεση είτε με προσεκτικό άνοιγμα του σφραγίσματος είτε μέσω της τριοδικής βαλβίδας εκτόνωσης της πίεσης [σημείο 12 στοιχείο ε)]. Είναι προτιμητέο να χρησιμοποιηθεί η ιλύς εντός λίγων ωρών από τη συλλογή της, διαφορετικά αποθηκεύεται στους 35 °C ± 2° C κάτω από υπερκείμενο χώρο αζώτου επί 3 το πολύ ημέρες, όταν κανονικά η απώλεια δραστηριότητας είναι μικρή.

Προσοχή — Η ιλύς χώνευσης παράγει εύφλεκτα αέρια τα οποία ενέχουν κίνδυνο πρόκλησης πυρκαγιάς και έκρηξης: περιέχει επίσης δυνητικά παθογόνους οργανισμούς, γι' αυτόν τον λόγο πρέπει να λαμβάνονται οι κατάλληλες προφυλάξεις κατά τον χειρισμό της ιλύος. Για λόγους ασφάλειας, δεν χρησιμοποιούνται γυάλινα δοχεία για τη συλλογή της ιλύος.

Εμβόλιο

16. Ακριβώς πριν από τη χρήση, η ιλύς αναδεύεται απαλά και μεταγγίζεται με τη βοήθεια κόσκινου με βροχίδες διαμέτρου 1 mm^2 [σημείο 12 στοιχείο στ)] σε κατάλληλη φιάλη [σημείο 12 στοιχείο ζ)] διαμέσου του υπερκείμενου χώρου από όπου διοχετεύεται ατμός αζώτου. Μένει κατά μέρος ένα δείγμα για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των συνολικών ξηρών στερεών (βλ. π.χ. το ISO 11 923 (13) ή ισοδύναμο πρότυπο της ΕΕ). Γενικά, η ιλύς χρησιμοποιείται χωρίς αραίωση. Η συγκέντρωση στερεών είναι συνήθως μεταξύ 2 % και 4 % (w/v). Προσδιορίζεται η τιμή pH και, εφόσον χρειάζεται, ρυθμίζεται στο 7 ± 0,5.

Υπόστρωμα δοκιμής

17. Διαλύονται 10 g θρεπτικού ζωμού (π.χ. Oxoid), 10 g εκχυλίσματος ζυμομυκήτων και 10 g D-γλυκόζης σε απιονισμένο νερό και το διάλυμα αραιώνεται μέχρι τα 100 ml. Το διάλυμα αποστειρώνεται με διηθητική μεμβράνη με μέγεθος πόρων 0,2 μm [σημείο 12 στοιχείο η)] και χρησιμοποιείται αμέσως ή αποθηκεύεται στους 4 °C για διάστημα όχι μεγαλύτερο της μίας ημέρας.

Υπό δοκιμή χημική ουσία

18. Ετοιμάζεται ξεχωριστό διάλυμα παρακαταθήκης για κάθε υδατοδιαλυτή υπό δοκιμή χημική ουσία που θα περιέχει, για παράδειγμα, 10 g/l της χημικής ουσίας στο αποξυγονωμένο νερό αραίωσης (σημείο 14). Με τους κατάλληλους όγκους αυτών των διαλυμάτων παρακαταθήκης ετοιμάζονται τα μείγματα της αντίδρασης που περιέχουν συγκεντρώσεις αναλυτικής ποιότητας. Εναλλακτικά, ετοιμάζεται γεωμετρική σειρά αραιώσεων από κάθε διάλυμα αραίωσης, ώστε ο όγκος που προστίθεται στις φιάλες δοκιμής να είναι ο ίδιος για κάθε απαιτούμενη τελική συγκέντρωση. Το pH των διαλυμάτων παρακαταθήκης θα πρέπει να ρυθμίζεται σε 7 ± 0,2, αν χρειαστεί.

19. Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν είναι επαρκώς υδατοδιαλυτές, γίνεται παραπομπή στο πρότυπο ISO 10 634 (12) ή ισοδύναμο πρότυπο της ΕΕ. Αν πρέπει να χρησιμοποιηθεί οργανικός διαλύτης, να αποφεύγονται διαλύτες όπως χλωροφόρμιο και τετραχλωράνθρακας, που είναι γνωστό ότι αναστέλλουν την παραγωγή μεθανίου. Ετοιμάζεται διάλυμα κατάλληλης συγκέντρωσης υδατοδιαλυτής ουσίας σε κατάλληλο πτητικό διαλύτη, για παράδειγμα ακετόνη, διαιθυλεθέρα. Οι απαιτούμενοι όγκοι από το διάλυμα με τον διαλύτη προστίθενται στις άδειες φιάλες δοκιμής (σημείο 12 στοιχείο β)] και ο διαλύτης εξατμίζεται πριν από την προσθήκη της ιλύος. Για άλλες αγωγές χρησιμοποιείται το ISO 10 634 (12) ή ισοδύναμο πρότυπο της ΕΕ, αλλά ως γνωστόν τυχόν επιφανειοδραστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή γαλακτωμάτων μπορεί να αναστέλλουν την αναερόβια παραγωγή αερίων. Αν θεωρηθεί ότι η παρουσία οργανικών διαλυτών και γαλακτωματοποιητών προκαλεί σφάλματα τεχνικής, η υπό δοκιμή χημική ουσία θα μπορούσε να προστεθεί απευθείας στο μείγμα δοκιμής ως σκόνη ή υγρό. Οι πτητικές ουσίες και οι υδατοδιαλυτές υγρές υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορούν να εγχυθούν σε φιάλες εμβολιασμένου ορού, με χρήση μικροσύριγγας [σημείο 12 στοιχείο θ)].

▼M6

20. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες προστίθενται στις φιάλες για να προκύψει γεωμετρική σειρά συγκεντρώσεων, για παράδειγμα, 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l και 15,6 mg/l. Αν το εύρος τιμών τοξικότητας δεν είναι γνωστό από παρόμοιες χημικές ουσίες, πρώτα διεξάγεται προκαταρκτική δοκιμή για τον προσδιορισμό του εύρους τιμών με συγκεντρώσεις 1 000 mg/l, 100 mg/l και 10 mg/l, ώστε να επιβεβαιωθεί το κατάλληλο εύρος.

Χημική ουσία αναφοράς

21. Ετοιμάζεται υδατικό διάλυμα με 3,5-διχλωροφαινόλη (10 g/l) με τη σταδιακή προσθήκη της ελάχιστης ποσότητας 5 mol/l διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου στο στερεό και αναδεύεται έως ότου πραγματοποιηθεί η διάλυση. Στη συνέχεια προστίθεται αποξυγονωμένο νερό αραίωσης (σημείο 14) έως τον απαιτούμενο όγκο· η εφαρμογή ηχητικών κυμάτων μπορεί να βοηθήσει στη διάλυση. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλες χημικές ουσίες αναφοράς όταν το μέσο εύρος τιμών της EC_{50} έχει αποκτηθεί από τουλάχιστον τρεις δοκιμές με διαφορετικά ενοφθαλμίσματα (διαφορετική προέλευση ή διαφορετικός χρόνος συλλογής).

ΠΑΡΕΜΒΟΛΗ/ΣΦΑΛΜΑΤΑ

22. Ορισμένα συστατικά της ιλύος εικάζεται ότι μπορεί να αντιδρούν με δυνητικούς αναστολείς, οπότε καθίστανται μη διαθέσιμα σε μικροοργανισμούς, με αποτέλεσμα χαμηλότερη ή καθόλου αναστολή. Επίσης, αν η ιλύς περιέχει ήδη χημική ουσία που είναι ανασταλτική, θα εξαχθούν εσφαλμένα αποτελέσματα κατά την υποβολή της ουσίας σε δοκιμή. Εκτός απ' αυτές τις δυνατότητες, υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν σε εσφαλμένα αποτελέσματα. Αυτά παρατίθενται στο προσάρτημα 3, μαζί με τις μεθόδους για την εξάλειψη ή τουλάχιστον τη μείωση των σφαλμάτων.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

23. Ο αριθμός των αναγκαίων επαναλήψεων εξαρτάται από τον βαθμό της απαιτούμενης ακρίβειας για τους δείκτες αναστολής. Αν τα πώματα των φιαλών είναι αρκούντως αεροστεγή σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής, ετοιμάζεται μία παρτίδα δοκιμαστικών φιαλών (τουλάχιστον τρεις) για κάθε απαιτούμενη συγκέντρωση. Παράλληλα, ετοιμάζεται μία παρτίδα από φιάλες με την ουσία αναφοράς και μία παρτίδα με μάρτυρες. Ωστόσο, αν τα πώματα των φιαλών είναι αξιόπιστα για μία μόνο ή λίγες διατρήσεις, ετοιμάζεται μια παρτίδα (π.χ. τρεις επαναλήψεις) των φιαλών δοκιμής για κάθε διάστημα (t) για τις οποίες απαιτούνται αποτελέσματα για όλες τις συγκεντρώσεις μια υπό δοκιμή χημικής ουσίας προς δοκιμή. Επίσης, ετοιμάζονται παρτίδες «t» των φιαλών για τη χημική ουσία αναφοράς και για τους μάρτυρες.

24. Συνιστάται η χρήση κιβωτίου χειρισμών με γάντια (glove box) [σημείο 12 στοιχείο ι)]. Τουλάχιστον 30 λεπτά πριν από την έναρξη της δοκιμής, διοχετεύεται αέριο άζωτο με τη χρήση κιβωτίου με γάντια που περιέχει όλο τον αναγκαίο εξοπλισμό. Εξασφαλίζεται ότι η θερμοκρασία της ιλύος είναι μεταξύ 35 °C ± 2 °C κατά τον χειρισμό και τη σφράγιση των φιαλών.

Προκαταρκτική δοκιμή

25. Αν η δραστηριότητα της ιλύος δεν είναι γνωστή, συνιστάται να διεξάγεται προκαταρκτική δοκιμή. Ετοιμάζονται μάρτυρες για την παραγωγή, για παράδειγμα, συγκεντρώσεων στερεών των 10 g/l, 20 g/l και 40 g/l συν το υπόστρωμα αλλά χωρίς υπό δοκιμή χημική ουσία. Επίσης, χρησιμοποιούνται διαφορετικοί όγκοι του μείγματος αντίδρασης, ώστε να υπάρξουν τρεις ή τέσσερις αναλογίες όγκου υπερκείμενου χώρου προς όγκο υγρού. Από τα αποτελέσματα των όγκων αερίου που παράγονται σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα, οι πλέον κατάλληλες συνθήκες που επιτρέπουν δύο μετρήσεις ημερησίως χαρακτηριζόμενες από σημαντικούς όγκους αερίου και ελευθέρωση πίεσης ανά ημέρα με τη βέλτιστη ευαισθησία [1] χωρίς τον κίνδυνο εκρήξεων.

Προσθήκη των υπό δοκιμή ουσιών

26. Υδατοδιαλυτές υπό δοκιμή χημικές ουσίες [σημείο 12 στοιχείο β)] προστίθενται ως υδατικά διαλύματα (σημείο 18). Χρησιμοποιούνται τουλάχιστον

[1] Αυτό ισχύει για την πειραματική διάταξη και τις πειραματικές συνθήκες όπου μπορούν να εκτιμηθούν με αποδεκτά περιθώρια σφάλματος οι όγκοι του παραγόμενου αερίου — από τυφλά και από δοχεία με ένδειξη αναστολής 70 - 80 %.

▼M6

τριπλά σετ φιαλών για κάθε εύρος συγκεντρώσεων (σημείο 20). Στην περίπτωση αδιάλυτων και δυσδιάλυτων υπό δοκιμή χημικών ουσιών, διαλύματά τους χορηγούνται σε οργανικούς διαλύτες με τη χρήση μικροσύριγγας σε άδειες φιάλες ώστε να προκύψουν πανομοιότυπα σετ για καθεμία από τις πέντε συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Ο διαλύτης εξατμίζεται με ψεκασμό με αέριο άζωτο στην επιφάνεια των διαλυμάτων στις φιάλες δοκιμής. Εναλλακτικά, προστίθενται αδιάλυτες ουσίες σε στερεά μορφή ως σταθμισμένες ποσότητες του στερεού απευθείας στις φιάλες δοκιμής.

27. Αν δεν προστεθούν αδιάλυτες και δυσδιάλυτες υδατοδιαλυτές υγρές υπό δοκιμή χημικές ουσίες με τη χρήση διαλύτη, να προστεθούν απευθείας με μικροσύριγγα στις φιάλες δοκιμής μετά την προσθήκη εμβολίου και υποστρώματος δοκιμής (βλ. σημείο 30). Με τον ίδιο τρόπο μπορούν να προστεθούν πτητικές υπό δοκιμή χημικές ουσίες.

Προσθήκη εμβολίου και υποστρώματος

28. Πραγματοποιείται ανάδευση του κατάλληλου όγκου ιλύος χώνευσης που έχει περάσει από κόσκινο (βλ. σημείο 16) σε φιάλη 5 λίτρων [σημείο 12 στοιχείο ζ)], ενώ διοχετεύεται ρεύμα αερίου αζώτου διαμέσου του υπερκείμενου χώρου. Εκπλένονται οι δοκιμαστικές φιάλες, που περιέχουν υδατικά διαλύματα ή τα εξατμισθέντα διαλύματα των υπό δοκιμή χημικών ουσιών με τον διαλύτη, με τη διοχέτευση ρεύματος αερίου αζώτου, επί περίπου δύο λεπτά για την αφαίρεση του αέρος. Γνωστά κλάσματα, π.χ. 100 ml, της καλά αναμεμειγμένης ιλύος κατανέμονται σε δοκιμαστικές φιάλες με τη χρήση ευρύστομου σιφωνίου ή ογκομετρικού κυλίνδρου. Το σιφώνιο πρέπει να γεμίσει με μία κίνηση για την εξαγωγή του όγκου της απαιτούμενης ιλύος επειδή καθιζάνουν εύκολα τα στερεά της ιλύος. Αν λαμβάνεται περισσότερο, το σιφώνιο αδειάζει και γίνεται εκ νέου εκκίνηση.

29. Στη συνέχεια προστίθεται επαρκές διάλυμα υποστρώματος (σημείο 17), ώστε να υπάρξει συγκέντρωση 2 g/l για κάθε θρεπτικό ζωμό, εκχύλισμα ζυμομυκήτων και γλυκόζης-D στο μείγμα, όσο συνεχίζεται ο καταιονισμός με άζωτο. Ακολουθεί κατωτέρω παράδειγμα για παρτίδες δοκιμής.

Τελική κατά μάζα συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στις φιάλες δοκιμής (mg/l)	Όγκος της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (ml)		Αντιδραστήρια και θρεπτικά μέσα (ml)		
	Διάλυμα παρακαταθήκης α) 10 g/l σημείο 18	Διάλυμα παρακαταθήκης β) 1 g/l σημείο 18	Νερό αραίωσης σημείο 14	Εμβόλιο σημείο 16	Υπόστρωμα σημείο 17
0	—	0	1,0	100	2
1	—	0,1	0,9	100	2
3,3	—	0,33	0,67	100	2
10	0,1	—	0,9	100	2
33	0,33	—	0,67	100	2
100	1,0	—	0	100	2

Συνολικός όγκος = 160 ml. Όγκος υγρού = 103 ml
Όγκος αερίου = 57 ml, ή 35,6 % συνολικού όγκου.

30. Παρομοίως εκπλένονται οι άδειες δοκιμαστικές φιάλες με αέριο άζωτο, ώστε να καθαρίσουν από τυχόν πτητικές και αδιάλυτες υγρές υπό δοκιμή χημικές ουσίες (βλ. σημείο 27).

▼M6

Μάρτυρες και χημική ουσία αναφοράς

31. Ετοιμάζονται τουλάχιστον τρία σετ φιαλών που περιέχουν μόνο ιλύ και υπόστρωμα ως μάρτυρες. Ετοιμάζονται και άλλες φιάλες επαναλήψεων που περιέχουν ιλύ και υπόστρωμα μαζί με επαρκή ποσότητα διαλύματος παρακαταθήκης της ουσίας αναφοράς, 3,5-διχλωροφαινόλη (σημείο 21), ώστε να δημιουργηθεί τελική συγκέντρωση 150 mg/l. Η εν λόγω συγκέντρωση θα πρέπει να αναστείλει την παραγωγή αερίου κατά 50 % περίπου. Εναλλακτικά, ετοιμάζεται εύρος συγκεντρώσεων της ουσίας αναφοράς. Ετοιμάζονται επίσης, για τη μέτρηση του pH, τέσσερις επιπλέον φιάλες που περιέχουν ιλύ, αποξυγονωμένο νερό και υπόστρωμα. Η υπό δοκιμή χημική ουσία προστίθεται στις δύο φιάλες στην ανώτατη συγκέντρωση που δοκιμάζεται και προστίθεται αποξυγονωμένο νερό στις υπόλοιπες δύο φιάλες.

32. Εξασφαλίζεται ότι όλες οι φιάλες –ουσίες δοκιμής και αναφοράς και οι μάρτυρες– περιέχουν τον ίδιο όγκο υγρού (V_R)· όπου χρειαστεί, προσθέτετε απιονισμένο νερό (σημείο 14) από το οποίο έχει αφαιρεθεί το οξυγόνο για να συμπληρωθεί ο όγκος. Ο υπερκείμενος χώρος θα πρέπει να είναι μεταξύ 10 % και 40 % του όγκου της φιάλης, η δε πραγματική τιμή επιλέγεται από τα δεδομένα που προκύπτουν από την προκαταρκτική δοκιμή. Αφού προστεθούν όλα τα συστατικά στις φιάλες, αφαιρείται η βελόνα που διοχετεύει το αέριο και σφραγίζεται κάθε φιάλη με πώμα από καουτσούκ και κεφαλή αλουμινίου [σημείο 12 στοιχείο β)], ενώ το πώμα σφραγίζεται με μια σταγόνα απιονισμένου νερού ώστε να διευκολυνθεί η εισδοχή του. Ανακινείται το περιεχόμενο κάθε φιάλης ώστε να αναμειχθεί.

Επώαση φιαλών

33. Οι φιάλες μεταφέρονται σε θερμοστατούμενο επωαστήρα, κατά προτίμηση εξοπλισμένο με τάρακτρο και διατηρούνται στους 35 °C ± 2 °C. Οι φιάλες επωάζονται στο σκοτάδι. Ύστερα από μια ώρα περίπου, εξισορροπείται η πίεση στις φιάλες με την ατμοσφαιρική πίεση με την εισαγωγή βελόνας σύριγγας, που έχει συνδεθεί με τον μετρητή πίεσης [σημείο 12 στοιχείο γ)], διαμέσου του πώματος κάθε φιάλης, η βαλβίδα ανοίγεται έως ότου ο μετρητής πίεσης δείξει μηδέν και τέλος η βαλβίδα κλείνεται. Η βελόνα θα πρέπει να εισαχθεί με κλίση περίπου 45°, ώστε να μην υπάρχει διαρροή αερίου από τις φιάλες. Αν οι φιάλες επωαστούν χωρίς δυνατότητα ανακίνησης, η ανακίνηση γίνεται χειροκίνητα δύο φορές καθημερινώς κατά τη διάρκεια της συνολικής περιόδου επώασης για εξισορρόπηση του συστήματος. Οι φιάλες επωάζονται και ανατρέπονται ώστε να μην υπάρχει απώλεια αερίου διαμέσου του πώματος. Η ανατροπή, ωστόσο, δεν ενδείκνυται σε περιπτώσεις κατά τις οποίες αδιάλυτες υπό δοκιμή ουσίες μπορεί να κολλήσουν στο κάτω μέρος της φιάλης.

Μέτρηση πίεσης

34. Όταν οι φιάλες φτάσουν σε θερμοκρασία 35 °C ± 2 °C, το pH του περιεχομένου των δύο από τις τέσσερις φιάλες που έχουν ετοιμαστεί για τον σκοπό αυτό μετριέται και καταγράφεται, και το περιεχόμενο απορρίπτεται· συνεχίζεται η επώαση των υπόλοιπων φιαλών στο σκοτάδι. Η πίεση στις φιάλες μετριέται και καταγράφεται δύο φορές ημερησίως για τις επόμενες 48 έως 72 ώρες με την εισαγωγή της βελόνας του μετρητή πίεσης διαμέσου του σφραγίσματος κάθε φιάλης, η μία μετά την άλλη με τη σειρά, και η βελόνα στεγνώνεται ανάμεσα στις μετρήσεις. Όλα τα τμήματα της φιάλης διατηρούνται σε θερμοκρασία επώασης κατά τη διάρκεια της μέτρησης, που θα πρέπει να διεξάγεται όσο το δυνατόν ταχύτερα. Η μέτρηση πρέπει να σταθεροποιηθεί και να καταγραφεί. Μετά η βαλβίδα αερισμού ανοίγεται κα κλείνεται όταν η ένδειξη της πίεσης είναι μηδέν. Η δοκιμή συνεχίζεται συνήθως επί 48 ώρες από τη στιγμή της πρώτης εξισορρόπησης της πίεσης, που ονομάζεται «χρόνος 0». Ο αριθμός των αναγνώσεων και των αερισμών θα πρέπει να είναι περιορισμένος για τις πτητικές ουσίες σε μία (στο τέλος της επώασης) ή σε δύο ώστε να ελαχιστοποιείται η απώλεια της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (10).

35. Αν η ανάγνωση της πίεσης είναι αρνητική, η βαλβίδα πρέπει να παραμείνει κλειστή. Ενίοτε συγκεντρώνεται υγρασία στη σύριγγα και στη βελόνα της, η οποία αναγιγνώσκεται ως μικρή αρνητική πίεση. Στην περίπτωση αυτή, η βελόνα αφαιρείται, η σύριγγα ανακινείται, σκουπίζεται με πανί και τοποθετείται νέα βελόνα.

Μέτρηση του pH

36. Μέτρηση και καταγραφή του pH του περιεχομένου κάθε φιάλης μετά την τελική μέτρηση της πίεσης.

▼M6

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Έκφραση των αποτελεσμάτων

37. Υπολογίζεται το άθροισμα και ο μέσος όρος των πιέσεων που καταγράφονται σε κάθε διάστημα για κάθε σετ φιαλών επανάληψης και υπολογίζεται η μέση αθροιστική ολική πίεση αερίου σε κάθε χρονικό διάστημα για κάθε σετ επαναλήψεων. Σχεδιάζονται τα διαγράμματα των μέσων αθροιστικών τιμών παραγωγής αερίου (Pa) συναρτήσει μαρτύρων, φιαλών δοκιμής και φιαλών αναφοράς. Επιλέγεται ένα χρονικό σημείο στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης, συνήθως 48 ώρες, και υπολογίζεται το ποσοστό αναστολής (I) για κάθε συγκέντρωση με την εξίσωση [1]:

$$I = (1 - P_t/P_C) \times 100 \quad [1],$$

όπου

I = ποσοστό αναστολής σε %·

P_t = αέριο που παράγεται με υλικό δοκιμής στον επιλεγέντα χρόνο, σε Pascal (Pa)·

P_c = αέριο που παράγεται στον μάρτυρα στον ίδιο χρόνο, σε Pascal (Pa).

Συνιστάται να χαράσσονται και οι δύο καμπύλες, δηλ. η καμπύλη I συναρτήσει της συγκέντρωσης και επίσης του λογαρίθμου της συγκέντρωσης, έτσι ώστε να μπορεί να επιλεγεί η καμπύλη που είναι εγγύτερα στη γραμμικότητα. Η τιμή EC_{50} (mg/l) αξιολογείται οπτικά ή με ανάλυση παλινδρόμησης από την καμπύλη που είναι εγγύτερα στη γραμμικότητα. Για σκοπούς σύγκρισης μπορεί να είναι πιο χρήσιμο να εκφραστεί η συγκέντρωση της χημικής ουσίας ως mg χημικής ουσίας/g συνολικών ξηρών στερεών. Για να αποκτηθεί η συγκέντρωση αυτή, διαρείται η ογκομετρική συγκέντρωση (mg/l) διά της ογκομετρικής συγκέντρωσης στερεών ξηράς ιλύος (g/l) (σημείο 16).

38. Υπολογίζεται είτε το ποσοστό αναστολής που επιτυγχάνεται μόνο με τη συγκέντρωση της χημικής ουσίας αναφοράς που χρησιμοποιείται ή την EC_{50}, αν έχει διερευνηθεί επαρκής αριθμός συγκεντρώσεων.

39. Μετατρέπεται η μέση πίεση του αερίου που παράγεται στον μάρτυρα P_c (Pa) σε όγκο με αναφορά στην καμπύλη βαθμονόμησης του μετρητή πίεσης (προσάρτημα 2) και από αυτό υπολογίζεται η απόδοση του αερίου, εκφραζόμενη ως ο παραγόμενος σε 48 ώρες όγκος από 100 ml αναραίωτης ιλύος σε συγκέντρωση στερεών 2 % (20 g/l) έως 4 % (40 g/l).

Κριτήρια εγκυρότητας

40. Τα αποτελέσματα από τη διεργαστηριακή δοκιμή ISO (5) έδειξαν ότι η ουσία αναφοράς (3,5-διχλωροφαινόλη) προξένησε αναστολή 50 % της παραγωγής αερίου σε εύρος συγκεντρώσεων από 32 mg/l έως 510 mg/l μέσου153 mg/l (σημείο 10). Το εύρος αυτό είναι τόσο μεγάλο που δεν μπορούν να τεθούν αυστηρά όρια για την αναστολή ως κριτήρια εγκυρότητας· αυτό θα πρέπει να είναι δυνατό όταν χάρη στην τεχνολογία παραχθούν εμβόλια που παρουσιάζουν μικρότερες διακυμάνσεις. Οι όγκοι του αερίου που παράγεται στις φιάλες δοκιμής σε 48 ώρες κυμαίνονται από 21 ml/g ξηράς ουσίας ιλύος σε 149 ml/g (μέση τιμή 72 ml/g). Δεν υπήρξε προφανής σχέση μεταξύ του όγκου του παραγόμενου αερίου και της αντίστοιχης τιμής EC_{50}. Το τελικό pH κυμαίνεται μεταξύ 6,1 και 7,5.

41. Η δοκιμή θεωρείται έγκυρη όταν η αναστολή είναι μεγαλύτερη από 20 % στον μάρτυρα αναφοράς και περιέχει 150 mg/l 3,5-διχλωροφαινόλης, πάνω από 50 ml αερίου ανά γραμμάριο ξηράς ύλης παράγεται στον τυφλό μάρτυρα και η τιμή του pH είναι μεταξύ 6,2 και 7,5 στο τέλος της δοκιμής.

Έκθεση δοκιμής

42. Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Υπό δοκιμή χημική ουσία

— κοινή ονομασία, χημική ονομασία, αριθμός CAS, συντακτικός τύπος και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες·

▼M6

— καθαρότητα (ξένες προσμείξεις) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Συνθήκες δοκιμής

— όγκος του υπερκείμενου χώρου και του υγρού περιεχομένου στα δοχεία δοκιμής·

— περιγραφή των δοχείων της δοκιμής και μέτρηση του αερίου (π.χ. είδος μετρητή πίεσης)·

— εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και της χημικής ουσίας αναφοράς στο σύστημα δοκιμής, συγκεντρώσεις δοκιμής που χρησιμοποιήθηκαν και χρήση διαλυτών·

— στοιχεία του εμβολίου που χρησιμοποιήθηκε: επωνυμία της εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων, περιγραφή της πηγής των λυμάτων που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία (π.χ. θερμοκρασία λειτουργίας, χρόνος κατακράτησης ιλύος, οικιακά λύματα που κυριαρχούσαν ή βιομηχανικά απόβλητα κ.λπ.), συγκέντρωση στερεών, δραστηριότητα παραγωγής αερίου από το χωνευτήριο της αναερόβιας χώνευσης, προηγούμενη έκθεση ή ενδεχόμενη προσαρμογή ή σε τοξικά χημικά ή τόπο συλλογής της ιλύος, των ιζημάτων κ.λπ.·

— θερμοκρασία επώασης και εύρος τιμών·

— αριθμός επαναλήψεων.

Αποτελέσματα

— τιμές pH στο τέλος της δοκιμής·

— όλα τα μετρηθέντα δεδομένα που συγκεντρώθηκαν στη δοκιμή, δοχεία τυφλού και υπό δοκιμή χημικής ουσίας αναφοράς, ανάλογα με την περίπτωση σε πίνακα (π.χ. πίεση σε Pa ή millibars)·

— ποσοστιαία αναστολή σε φιάλες δοκιμής και αναφοράς και καμπύλες συγκέντρωσης-αναστολής·

— υπολογισμός τιμών EC_{50}, εκφραζόμενες ως mg/l και mg/g·

— παραγωγή αερίου ανά γραμμάριο ιλύος σε 48 ώρες·

— αιτιολογία τυχόν απόρριψης των αποτελεσμάτων των δοκιμών·

— συζήτηση των αποτελεσμάτων, συμπεριλαμβανομένων τυχόν αποκλίσεων από τις διαδικασίες στην εν λόγω μέθοδο δοκιμής και συζήτηση τυχόν αποκλίσεων στα αποτελέσματα των δοκιμών λόγω παρεμβολών και σφαλμάτων που θα μπορούσαν να αναμένονται·

— εξετάζεται, επίσης, κατά πόσον ο σκοπός της δοκιμής ήταν η μέτρηση της τοξικότητας σε οργανισμούς που είχαν υποβληθεί ή δεν είχαν υποβληθεί σε προέκθεση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Κεφάλαιο Γ.11 του παρόντος παραρτήματος: Ενεργοποιημένη ιλύς, δοκιμή αναστολής της αναπνοής.

(2) Κεφάλαιο Γ.43 του παρόντος παραρτήματος: Αναερόβια βιοαποικοδομησιμότητα οργανικών ουσιών σε χωνευμένη ιλύ: μέσω μέτρησης της παραγωγής αερίων.

(3) International Organisation for Standardisation (2003) ISO 13 641-1 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 1: General Test.

(4) International Organisation for Standardisation (2003) ISO 13 641-2 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 2: Test for low biomass concentrations.

(5) ISO (2000) Ring test of ISO 13 641-1 and ISO 13 641-2. Determination of inhibition of activity of anaerobic bacteria. BL 6958/A. Evans MR, Painter HA. Brixham Environmental Laboratory, AstraZeneca UK Ltd., Brixham, TQ5 8BA UK.

▼**M6**

(6) Swanwick JD, Foulkes M (1971). Inhibition of anaerobic digestion of sewage sludge by chlorinated hydrocarbons. Wat. Pollut. Control, 70, 58-70.

(7) HMSO (1986) Determination of the inhibitory effects of chemicals and waste waters on the anaerobic digestion of sewage sludge. ISBN 0 117519 43 X, In: Methods for the Examination of Waters and Associated Materials UK.

(8) Shelton DR, Tiedje JM (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. Appl. Env. Microbiol. 47 850-857.

(9) Battersby NS and Wilson V (1988). Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic compounds under methanogenic conditions. Chemosphere 17, 2441-2460.

(10) Wilson V, Painter HA and Battersby NS (1992). A screening method for assessing the inhibition of the anaerobic gas production from sewage sludge. Proc. Int. Symp. on Ecotoxicology. Ecotoxicological Relevance of Test Methods, GSF Forschungzentrum, Neuherberg, Germany (1990). Eds. Steinberg C and Kettrup A, pp117-132 (1992).

(11) Kawahara K, Yakabe Y, Chida T, and Kida K (1999). Evaluation of laboratory-made sludge for an anaerobic biodegradability test and its use for assessment of 13 chemicals. Chemosphere, 39 (12), 2007-2018.

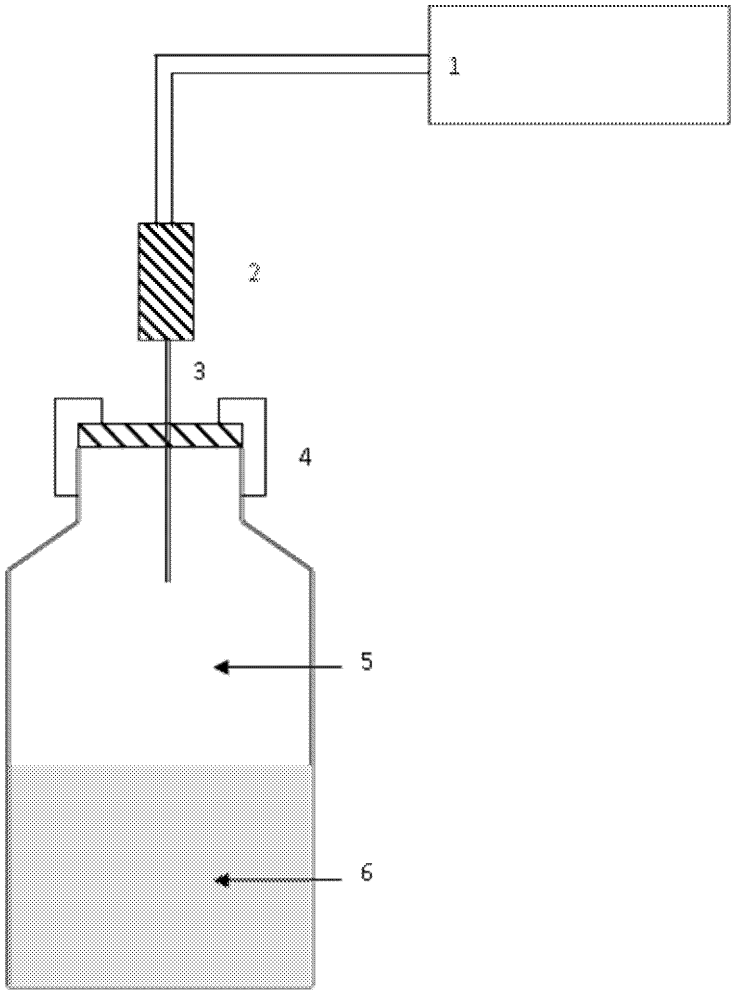
(12) International Organization for Standardization (1995) ISO 10 634 Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

(13) International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality — Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼**M6**

Προσάρτημα 1

Παράδειγμά συσκευής για τη μέτρησή τη παράγωγης βιοαερίου με πίεσή αέριου



Υπόμνημα:

1 — μετρητής πίεσης

2 — τριοδική αεροστεγής βαλβίδα

3 — βελόνα σύριγγας

4 — αεροστεγής σφράγιση (πώμα και διάφραγμα)

5 — υπερκείμενος χώρος

6 — εμβόλιο χωνευμένης ιλύος

Δοχεία δοκιμής σε περιβάλλον 35 °C ± 2 °C

▼**M6**

Προσάρτημα 2

Μετατροπή του μετρητή πίεσης

Οι ενδείξεις του μετρητή πίεσης μπορεί να σχετίζονται με τους όγκους αερίου μέσω μιας πρότυπης καμπύλης και από αυτό μπορεί να υπολογιστεί ο όγκος αερίου που παράγεται ανά γραμμάριο ξηράς ιλύος ανά 48 ώρες. Αυτός ο δείκτης δραστηριότητας χρησιμοποιείται ως ένα από τα κριτήρια με τα οποία αξιολογείται η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων της δοκιμής. Η καμπύλη βαθμονόμησης παράγεται με την έγχυση γνωστών όγκων αερίου στους 35 °C ± 2 °C σε φιάλες ορού που περιέχουν όγκο νερού ίσο με τον όγκο του μείγματος αντίδρασης, V_R·

— Σε πέντε φιάλες ορού κατανέμονται V_R ml κλάσματα νερού, που διατηρούνται σε θερμοκρασία 35 °C ± 2 °C. Οι φιάλες σφραγίζονται και τοποθετούνται σε υδρόλουτρο σε θερμοκρασία 35 °C ± 2 °C επί 1 ώρα για εξισορρόπηση.

— Ενεργοποιείται ο μετρητής πίεσης, αφήνεται να σταθεροποιηθεί και προσαρμόζεται στο μηδέν.

— Η βελόνα της σύριγγας εισάγεται διαμέσου του σφραγίσματος μιας από τις φιάλες, η βαλβίδα ανοίγεται έως ότου ο μετρητής πίεσης δείξει μηδέν και τέλος κλείνεται η βαλβίδα.

— Η διαδικασία επαναλαμβάνεται και με τις λοιπές φιάλες.

— Χορηγείται 1 ml αέρα σε 35 °C ± 2 °C σε κάθε φιάλη. Η βελόνα εισάγεται (στον μετρητή) διαμέσου του σφραγίσματος μιας από τις φιάλες έως ότου η ένδειξη σταθεροποιηθεί. Η πίεση καταγράφεται, η βαλβίδα ανοίγεται έως ότου ο μετρητής πίεσης δείξει μηδέν και τέλος κλείνεται η βαλβίδα.

— Η διαδικασία επαναλαμβάνεται και με τις λοιπές φιάλες.

— Όλη η διαδικασία επαναλαμβάνεται με 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml και 50 ml αέρος.

— Σχεδιάζεται καμπύλη μετατροπής της πίεσης (Pa) συναρτήσει του εγχυόμενου όγκου αερίου (ml). Η απόκριση του οργάνου είναι γραμμική στην περιοχή που περιλαμβάνεται από 0 Pa έως 70 000 Pa, και για παραγωγή αερίου από 0 ml έως 50 ml.

▼M6

Προσάρτημα 3

Παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν σε εσφαλμένα αποτελέσματά

α) *Ποιότητα των πωμάτων των φιαλών*

Στο εμπόριο διατίθενται διάφοροι τύποι διαφραγμάτων για τις φιάλες ορού· πολλά από αυτά, συμπεριλαμβανομένων αυτών από βουτυλοκαουτσούκ, παύουν να είναι στεγανά όταν υφίστανται διάτρηση με βελόνα υπό τις συνθήκες της δοκιμής αυτής. Μερικές φορές η πίεση ελαττώνεται πολύ αργά, μόλις το διάφραγμα τρυπηθεί με τη βελόνα σύριγγας. Συνιστάται η χρήση αεροστεγούς διαφράγματος, ώστε να αποφευχθούν οι διαρροές [σημείο 12 στοιχείο β)].

β) *Υγρασία στη βελόνα της σύριγγας*

Ενίοτε συγκεντρώνεται υγρασία στη σύριγγα και στη βελόνα της, η οποία αναγιγνώσκεται ως μικρή αρνητική πίεση. Στην περίπτωση αυτή, η βελόνα αφαιρείται, η σύριγγα ανακινείται, σκουπίζεται με πανί και τοποθετείται νέα βελόνα [σημείο 12 στοιχείο γ) και σημείο 35].

γ) *Επιμόλυνση από οξυγόνο*

Οι αναερόβιες μέθοδοι υπόκεινται σε σφάλμα λόγω επιμόλυνσης από οξυγόνο που μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα μικρότερη παραγωγή αερίου. Στην εν λόγω μέθοδο, αυτή η πιθανότητα θα πρέπει να ελαχιστοποιείται με τη χρήση αυστηρώς αναερόβιων τεχνικών, όπως η χρήση κιβωτίου χειρισμών με γάντια (glove box).

δ) *Μικτά υποστρώματα στην ιλύ*

Η αναερόβια παραγωγή αερίου και η ευαισθησία της ιλύος επηρεάζονται από υποστρώματα που μεταφέρονται με το εμβόλιο στις φιάλες δοκιμής. Η χωνευμένη ιλύς από οικιακούς χωνευτήρια αναερόβιας χώνευσης περιέχει συχνά αναγνωρίσιμα υλικά όπως τρίχες και φυτικά υπολείμματα κυτταρίνης, γεγονός που καθστά δύσκολη τη λήψη αντιπροσωπευτικών δειγμάτων. Με το κοσκίνισμα της ιλύος μπορούν να απομακρυνθούν οι αδιάλυτες ύλες, οπότε το δείγμα γίνεται πιο αντιπροσωπευτικό (σημείο 16).

ε) *Πτητικές χημικές ουσίες*

Οι υπό δοκιμή πτητικές χημικές ουσίες θα απελευθερωθούν στον υπερκείμενο χώρο των φιαλών δοκιμής. Αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια ορισμένων υλών από το σύστημα κατά την εξαέρωση μετά τις μετρήσεις της πίεση με αποτέλεσμα να εξάγονται εσφαλμένες υψηλές τιμές EC_{50}. Με την κατάλληλη επιλογή αναλογίας όγκου υπερκείμενου χώρου προς όγκο υγρού και με την εξαέρωση μετά τις μετρήσεις της πίεσης, το σφάλμα μπορεί να μειωθεί (10).

στ) *Μη γραμμικότητα της παραγωγής αερίου*

Αν το σχεδιάγραμμα της μέσης αθροιστικής παραγωγής αερίου συναρτήσει του χρόνου επώασης δεν είναι κατά προσέγγιση γραμμικό την περίοδο των 48 ωρών, η ακρίβεια της δοκιμής ελαττώνεται. Για να ξεπεραστεί αυτό, ενδείκνυται ίσως να χρησιμοποιηθεί χωνευμένη ιλύς από διαφορετική πηγή και/ή να αυξηθεί η συγκέντρωση του θρεπτικού ζωμού-υποστρώματος δοκιμής, του εκχυλίσματος ζυμομυκήτων και της γλυκόζης (σημείο 29).

▼M6

Προσάρτημα 4

Εφαρμογή σε περιβαλλοντικά δείγματά χαμηλής συγκέντρωσης βιομάζας — αναερόβιες λάσπες, ιζήματα κ.λπ.

Εισαγωγή

Α.1 Γενικά, η συγκεκριμένη μικροβιακή δραστηριότητα (όγκος του παραγόμενου αερίου ανά γραμμάριο ξηρών στερεών) που παρουσιάζουν αναερόβιες λάσπες που απαντούν στη φύση, ιζήματα, χώματα κ.λπ. είναι πολύ μικρότερη από αυτήν της αναερόβιας ιλύος που προέρχεται από τα λύματα. Λόγω αυτού, όταν πρέπει να μετρηθούν οι ανασταλτικές συνέπειες των χημικών ουσιών στα λιγότερο ενεργά δείγματα πρέπει να τροποποιούνται μερικές από τις πειραματικές συνθήκες. Για τα εν λόγω λιγότερο ενεργά δείγματα, δύο προσεγγίσεις είναι δυνατές:

α) να διεξάγεται τροποποιημένη προκαταρκτική δοκιμή (σημείο 25) με το μη αραιωμένο δείγμα ιλύος, εδάφους κ.λπ. στους 35 °C ± 2 °C ή στη θερμοκρασία που επικρατεί στον τόπο συλλογής του δείγματος, για ακριβέστερη προσομοίωση (όπως στο μέρος 1 του ISO 13 641)·

β) ή να εκτελείται η δοκιμή με αραιωμένη ιλύ χώνευσης (1 σε 100) ώστε να προσομοιώνεται η χαμηλή ενεργότητα που αναμένεται από το δείγμα περιβάλλοντος, αλλά η θερμοκρασία να διατηρείται στους 35 °C ± 2 °C (όπως στο μέρος 2 του ISO 13 641).

Α.2 Η επιλογή α) μπορεί να επιτευχθεί με τη μέθοδο που περιγράφεται εδώ (ισοδύναμη με το μέρος 1 του ISO 13 641), αλλά πρέπει να διεξάγεται προκαταρκτική δοκιμή (σημείο 25), ώστε να διασφαλίζονται οι βέλτιστες συνθήκες, εκτός αν αυτές είναι ήδη γνωστές από προηγούμενες δοκιμές. Το δείγμα ιλύος ή ιζήματος πρέπει να αναμειγνύεται προσεκτικά, π.χ. σε αναμείκτη και, αν χρειαστεί, να αραιώνεται με μικρή αναλογία εξαερισμένου νερού αραίωσης (σημείο 14), ώστε να μπορεί εύκολα να μετακινείται με ευρύστομο σιφώνιο ή ογκομετρικό κύλινδρο. Αν θεωρηθεί ότι μπορεί να λείπουν θρεπτικά στοιχεία, το δείγμα ιλύος μπορεί να φυγοκεντρηθεί (υπό αναερόβιες συνθήκες) και να γίνει εκ νέου εναιώρημα στο ανόργανο μέσο που περιέχει ζυμομύκητες (Α.11).

Α.3 Επιλογή β). Αυτή μιμείται σε ικανοποιητικό βαθμό τη χαμηλή ενεργότητα περιβαλλοντικών δειγμάτων, αλλά δεν διαθέτει την υψηλή συγκέντρωση αιωρούμενων στερεών που περιέχονται σ' αυτά τα δείγματα. Ο ρόλος αυτών των στερεών στην αναστολή δεν είναι γνωστός, αλλά είναι δυνατόν η αντίδραση μεταξύ των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των συστατικών της ιλύος, καθώς και η προσρόφηση των υπό δοκιμή χημικών ουσιών από τα στερεά, να οδηγεί σε μείωση της τοξικότητας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Α.4 Η θερμοκρασία είναι άλλος ένας σημαντικός παράγοντας: για αυστηρή προσομοίωση, οι δοκιμές θα πρέπει να πραγματοποιούνται στη θερμοκρασία του δείγματος, δεδομένου ότι είναι γνωστό ότι διάφορες ομάδες συγκεντρώσεων μεθανογόνων βακτηρίων δραστηριοποιούνται σε διαφορετικές περιοχές τιμών θερμοκρασίας, τα θερμόφιλα (~ 30-35 °C), τα μεσόφιλα (20-25 °C) και τα ψυχρόφιλα (< 20 °C), που μπορεί να παρουσιάζουν διαφορετικές ανασταλτικές συμπεριφορές.

Α.5 Διάρκεια. Στη γενική δοκιμή, μέρος 1, με τη χρήση μη αραιωμένης ιλύος, η παραγωγή αερίου εντός 2-4 ημερών ήταν πάντοτε ικανοποιητική, ενώ στο μέρος 2 με αραιωμένη ένα προς εκατό ιλύ η παραγωγή αερίου ήταν ανεπαρκής, ή ανύπαρκτη, την ίδια περίοδο στη δοκιμή δακτυλίου. Οι Madsen et al (1996) υποδεικνύουν, περιγράφοντας αυτήν την τελευταία δοκιμή, ότι χρειάζονται τουλάχιστον 7 ημέρες.

Δοκιμές με χαμηλή συγκέντρωση βιομάζας (Επιλογή β)

Θα πρέπει να γίνουν οι ακόλουθες αλλαγές και τροποποιήσεις και να προστεθούν ή να αντικατασταθούν ορισμένες παράγραφοι και εδάφια στο κυρίως κείμενο.

▼**M6**

Α.6 Στην παράγραφο 6 προστίθενται οι ακόλουθες λέξεις: Αρχή της δοκιμής·

«Η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί με αραιωμένη αναερόβια ιλύ 1 προς 100, μερικώς για να γίνει προσομοίωση με τη χαμηλή ενεργότητα που έχουν λάσπες και ιζήματα. Η θερμοκρασία επώασης μπορεί να είναι είτε 35 °C είτε η θερμοκρασία του τόπου συλλογής του δείγματος. Επειδή η βακτηριακή δραστηριότητα είναι πολύ μικρότερη από ό,τι στην μη αραιωμένη ιλύ, η περίοδος επώασης θα πρέπει να επεκτίνεται σε 7 τουλάχιστον ημέρες.»

Α.7 Στην παράγραφο 12 στοιχείο α) προστίθενται οι ακόλουθες λέξεις:

«ο επωαστήρας θα πρέπει να είναι σε θέση να λειτουργεί σε θερμοκρασίες έως 15 °C.»

Α.8 Μετά την παράγραφο 13 προστίθεται ένα επιπλέον αντιδραστήριο:

«Φωσφορικό οξύ (H_3PO_4), 85 % κατά βάρος σε νερό».

Α.9 Στο τέλος της παραγράφου 16 προστίθενται οι ακόλουθες λέξεις:

«Χρησιμοποιείται τελική συγκέντρωση 0,20 ± 0,05 g/l ολικών ξηρών στερεών στη δοκιμή.»

Α.10 Παράγραφος 17. Υπόστρωμα δοκιμής

Το υπόστρωμα αυτό δεν χρησιμοποιείται αλλά αντικαθίσταται από εκχύλισμα ζυμομυκήτων (βλέπε παραγράφους 17· Α.11, Α.12, Α.13).

Α.11 Απαιτείται ένα ανόργανο θρεπτικό μέσο, συμπεριλαμβανομένων των ιχνοστοιχείων, για την αραίωση της αναερόβιας ιλύος, και για πρακτικούς λόγους, στο θρεπτικό μέσο προστίθεται το οργανικό υπόστρωμα, οι ζυμομύκητες.

Μετά την παράγραφο 17 προστίθενται τα εξής:

«α) Ανόργανο θρεπτικό μέσο δοκιμής, με εκχύλισμα ζυμομυκήτων.

Παρασκευάζεται από θρεπτικό μέσο δοκιμής δεκαπλάσιας συγκέντρωσης (σημείο 17 στοιχείο β)· Α.12) με διάλυμα ιχνοστοιχείου (σημείο 17 στοιχείο γ)· Α.13). Χρησιμοποιείται εννεαένυδρο θειούχο νάτριο που παρασκευάζεται επιτόπου [σημείο 17 στοιχείο β)· Α.12] ή εκπλένεται και στεγνώνεται πριν από τη χρήση, ώστε να εξασφαλιστεί ότι υπάρχει επαρκής αναγωγική ικανότητα. Αν η δοκιμή αυτή εκτελεστεί χωρίς τη χρήση κιβωτίου χειρισμών με γάντια (glove box) [βλ. σημείος 12 στοιχείο ι)], η συγκέντρωση θειούχου νατρίου στο διάλυμα παρακαταθήκης θα πρέπει να αυξηθεί σε 2 g/l (από1 g/l). Το θειούχο νάτριο μπορεί επίσης να προστεθεί από κατάλληλο διάλυμα παρακαταθήκης διαμέσου του πώματος των κλειστών φιαλών δοκιμής, καθώς η διαδικασία αυτή θα μειώσει τον κίνδυνο της οξείδωσης, για να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση της τάξης των 0,2 g/l. Εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί κιτρικό τιτάνιο (III) [σημείο 17 β)]. Προστίθεται διαμέσου του πώματος των κλειστών φιαλών δοκιμής για να επιτευχθεί συγκέντρωση 0,8 mmol/l έως 1,0 mmol/l. Το κιτρικό τιτάνιο (III) είναι ένα εξαιρετικά αποτελεσματικό και χαμηλής τοξικότητας αναγωγικό, που παρασκευάζεται ως εξής: Διαλύονται 2,94 g διένυδρου κιτρικού νατρίου σε 50 ml νερού αραίωσης ελεύθερου οξυγόνου (σημείο 14) (με αποτέλεσμα διάλυμα 200 mmol/l) και προστίθενται 5 ml διαλύματος χλωριούχου τιτανίου (III) (15 g/100 ml νερό αραίωσης). Εξουδετερώνεται σε pH 7 ± 0,5 με ανθρακικό νάτριο και εκκενώνεται σε κατάλληλη φιάλη ορού υπό ατμό αερίου αζώτου. Η συγκέντρωση του κιτρικού τιτανίου (III) στο εν λόγω διάλυμα παρακαταθήκης είναι 164 mmol/l. Το θρεπτικό μέσο της δοκιμής χρησιμοποιείται αμέσως ή αποθηκεύεται στους 4 °C επί 1 ημέρα το πολύ.

Α.12 β) Δέκα φορές πυκνότερο θρεπτικό μέσο δοκιμής, παρασκευάζεται ως εξής:

άνυδρο δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4)	2,7 g
όξινο φωσφορικό νάτριο (Na_2HPO_4)	4,4 g
(ή 11,2 g δωδεκαένυδρου)	5,3 g
χλωριούχο αμμώνιο (NH_4Cl)	

▼**M6**

διένυδρο χλωριούχο ασβέστιο ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,75 g
εξαένυδρο χλωριούχο μαγνήσιο ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
τετραένυδρος χλωριούχος σίδηρος (II) ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,2 g
resazurin (οξειδοαναγωγικός δείκτης)	0,01 g
εννεαένυδρο θειούχο νάτριο ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	1,0 g
[ή κιτρικό τιτάνιο (III)] τελική συγκέντρωση	0,8 mmol/l έως 1,0 mmol/l
διάλυμα ιχνοστοιχείων [βλ. σημείο 17 στοιχείο γ)· A.13]	10,0 ml
εκχύλισμα ζυμομυκήτων	100 g
Διαλύεται σε νερό αραίωσης (σημείο 14) και παρασκευάζεται έως:	1 000 ml

A.13 γ) Διάλυμα ιχνοστοιχείων, παρασκευαζόμενο με τα εξής:

τετραένυδρο χλωριούχο μαγγάνιο (II) ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,5 g
βορικό οξύ (H_3BO_3)	0,05 g
χλωριούχος ψευδάργυρος ($ZnCl_2$)	0,05 g
χλωριούχος χαλκός (II) ($CuCl_2$)	0,03 g
διένυδρο μολυβδαινικό νάτριο ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0,01 g
εξαένυδρο χλωριούχο κοβάλτιο ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
εξαένυδρο χλωριούχο νικέλιο ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,1 g
σεληνιώδες νάτριο (Na_2SeO_3)	0,05 g
Διαλύεται σε νερό αραίωσης (σημείο 14) και παρασκευάζεται έως:	1 000 ml»

A.14 Παράγραφος 25. Προκαταρκτική δοκιμή

Είναι σημαντικό να γίνεται προκαταρκτική δοκιμή όπως περιγράφεται στο σημείο 24, αλλά η συγκέντρωση των στερεών της ιλύος θα πρέπει να είναι το ένα εκατοστό από τα προτεινόμενα, δηλ. 0,1g/l, 0,2g/l και 0,4g/l. Η διάρκεια της επώασης θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 7 ημέρες.

Σημείωση: Στη δοκιμή δακτυλίου (5) ο όγκος του υπερκείμενου χώρου, που καταλάμβανε το 75 % του συνολικού όγκου ήταν πολύ μεγάλος· θα πρέπει να είναι μεταξύ του 10 % και του 40 %. Το σωστό κριτήριο είναι ότι ο όγκος του παραγόμενου αερίου στο 80 % αναστολής θα πρέπει να μετριέται με αποδεκτή ακρίβεια (π.χ. ± 5 % έως ± 10 %).

A.15 Παράγραφοι 26 έως 30: Προσθήκη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, του εμβολίου και του υποστρώματος

Οι προσθήκες γίνονται με τον ίδιο τρόπο όπως περιγράφεται στις παραγράφους αυτές αλλά το διάλυμα υποστρώματος (σημείο 17) αντικαθίσταται από το θρεπτικό μέσο δοκιμής συν το υπόστρωμα εκχυλίσματος ζυμομυκήτων (A.11).

Επίσης, η τελική συγκέντρωση στερεών ξηράς ιλύος ανάγεται από 2 g/l – 4 g/l σε 0,2 ± 0,05 g/l (A.9). Δύο παραδείγματα της προσθήκης συστατικών στο μείγμα δοκιμής δίνονται στον πίνακα A.1, που αντικαθιστά τον πίνακα της παραγράφου 29.

A.16 Παράγραφος 33. Επώαση φιαλών

Λόγω του αναμενόμενου χαμηλού ποσοστού παραγωγής αερίου, η επώαση διεξάγεται επί τουλάχιστον 7 ημέρες.

▼**M6**

Α.17 Παράγραφος 34. Μετρήσεις πίεσης

Η ίδια διαδικασία για τη μέτρηση της πίεσης στον υπερκείμενο χώρο των φιαλών χρησιμοποιείται όπως περιγράφεται στο σημείο 34, αν οι ποσότητες απαιτηθούν στην αέρια φάση. Αν πρέπει επίσης να μετρηθούν οι συνολικές ποσότητες CO_2 συν CH_4, το pH της υγρής φάσης ανάγεται σε pH 2 περίπου με την έγχυση H_3PO_4 σε κάθε σχετική φιάλη και μετριέται η πίεση ύστερα από 30 λεπτά με ανατάραξη στη θερμοκρασία της δοκιμής. Ωστόσο, περισσότερες πληροφορίες για την ποιότητα του εμβολίου μπορούν να αποκτηθούν με τη μέτρηση της πίεσης σε κάθε φιάλη πριν και μετά την οξίνιση. Για παράδειγμα, όταν η ταχύτητα παραγωγής CO_2 είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή του μεθανίου, η ευαισθησία των ενζυματικών βακτηρίων μπορεί να μεταβληθεί και/ή τα μεθανογόνα βακτήρια να είναι τα πρώτα που θα επηρεαστούν από την υπό δοκιμή χημική ουσία.

Α.18 Παράγραφος 36. Μέτρηση του pH

Αν θα χρησιμοποιηθεί H_3PO_4, θα πρέπει να προβλεφθούν ειδικά για τη μέτρηση του pH μερικές επιπλέον φιάλες, στις οποίες δεν θα προστεθεί H_3PO_4.

Παραπομπή:

Madsen. T, Rasmussen, H.B. and Nilsson, L. (1996), Methods for screening anaerobic biodegradability and toxicity of organic chemicals. Project No.336, Water Quality Institute, Danish Environment Protection Agency, Copenhagen.

Πίνακας Α.1.

Παραδείγματα διάταξης της δοκιμής για παρτίδες δοκιμής

Συστατικά μείγματος αντίδρασης	Παράδειγμα 1	Παράδειγμα 2	Συνήθης σειρά προσθήκης
Πυκνότητα του παρασκευαζόμενου εμβολίου (g/l)	0,42	2,1	—
Όγκος προστιθέμενου εμβολίου (ml)	45	9	4
Συγκέντρωση του εμβολίου στις φιάλες δοκιμής (g/l)	0,20	0,20	—
Όγκος προστιθέμενου θρεπτικού μέσου δοκιμής (ml)	9	9	2
Όγκος προστιθέμενου νερού αραίωσης (ml)	36	72	3
Συγκέντρωση του εκχυλίσματος ζυμομυκήτων στις φιάλες δοκιμής (g/l)	9,7	9,7	—
Όγκος του διαλύματος παρακαταθήκης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (ml)	3	3	1
Συνολικός όγκος υγρού (ml)	93	93	–

▼**M6**

Προσάρτημα 5

Ορισμοί

Για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου δοκιμών χρησιμοποιούνται οι ακόλουθοι ορισμοί:

Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

▼M6

Γ.35. **Δοκιμασια τοξικοτηταs σε *lumbriculus* με τη χρηση εμβολιασμενου ιζηματος**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 225 του ΟΟΣΑ (2007). Τα ενδοβενθικά ζώα που τρέφονται από το ίζημα υπόκεινται σε δυνητικά υψηλή έκθεση λόγω της μεγάλης συγκέντρωσης χημικών ουσιών στο ίζημα και, συνεπώς, θα πρέπει να τους δοθεί αυξημένη προσοχή, π.χ. (1), (2), (3). Οι υδρόβιοι ολιγόχαιτοι είναι, μεταξύ των ζώων που τρέφονται από το ίζημα, αυτοί που έχουν σημαντικό ρόλο στα ιζήματα των υδατικών συστημάτων. Με τη βιοανάδευση (bioturbation) του ιζήματος και λειτουργώντας ως λεία, τα ζώα αυτά μπορούν να ασκούν ισχυρή επίδραση στη βιοδιαθεσιμότητα των χημικών ουσιών για άλλους οργανισμούς, όπως για τα ψάρια που τρέφονται με βενθικούς οργανισμούς. Σε αντίθεση με τους επιβενθικούς οργανισμούς, οι ενδοβενθικοί υδρόβιοι ολιγόχαιτοι (π.χ. *Lumbriculus variegatus*) φωλιάζουν αμέσως στο ίζημα και καταπίνουν σωματίδια του ιζήματος κάτω από το επιφανειακό ίζημα. Αυτό συνεπάγεται έκθεση των οργανισμών δοκιμής στην υπό δοκιμή χημική ουσία μέσω όλων των πιθανών οδών πρόσληψης (π.χ. επαφή με και κατάποση των επιμολυσμένων ιζηματικών σωματιδίων αλλά και μέσω του ενδοπορικού νερού και του υπερκείμενου νερού).

2. Αυτή η μέθοδος δοκιμών είναι σχεδιασμένη για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της παρατεινόμενης έκθεσης των ενδοβενθικών ολιγοχαιτών *Lumbriculus variegatus* (Müller) σε χημικές ουσίες που προσροφώνται από το ίζημα. Βασίζεται στα υφιστάμενα πρωτόκολλα δοκιμής για την τοξικότητα του ιζήματος και τη βιοσυσσώρευση, π.χ. (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10). Η μέθοδος περιγράφεται για στατικές συνθήκες δοκιμής. Το σενάριο έκθεσης που εφαρμόζεται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών είναι ο εμβολιασμός του ιζήματος με την υπό δοκιμή χημική ουσία. Η χρήση του εμβολιασμένου ιζήματος αποσκοπεί στην προσομοίωση ιζήματος που έχει επιμολυνθεί με την υπό δοκιμή χημική ουσία.

3. Οι χημικές ουσίες που χρειάζεται να ελέγχονται ως προς τους οργανισμούς που διαβιούν σε ιζήματα συνήθως παραμένουν σε αυτό το διαμέρισμα για μεγάλες χρονικές περιόδους. Οι οργανισμοί που διαβιούν σε ιζήματα ενδέχεται να εκτίθενται μέσω διαφόρων οδών πρόσληψης. Η σχετική σημασία κάθε οδού έκθεσης, καθώς και ο χρόνος που απαιτείται για να συμβάλει στις συνολικές τοξικές επιδράσεις, εξαρτώνται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της εκάστοτε χημικής ουσίας και από την εν τέλει πορεία της στο ζώο. Για ουσίες ισχυρής προσρόφησης (π.χ. με $\log K_{ow} > 5$) ή για ουσίες που συνδέονται με ιζήματα με ομοιοπολικούς δεσμούς, η πρόσληψη μολυσμένων τροφών μπορεί να είναι μια σημαντική οδός έκθεσης. Για να μην υποτιμάται η τοξικότητα τέτοιων χημικών ουσιών, η τροφή που είναι απαραίτητη για την αναπαραγωγή και ανάπτυξη των οργανισμών δοκιμής προστίθεται στο ίζημα πριν από την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (11). Η μέθοδος δοκιμών που περιγράφεται είναι επαρκώς λεπτομερής, ώστε κατά τη διεξαγωγή της δοκιμής να είναι δυνατή η αναπροσαρμογή του πειραματικού σχεδιασμού ανάλογα με τις συνθήκες στα διάφορα εργαστήρια και τα ποικίλα χαρακτηριστικά των υπό δοκιμή χημικών ουσιών.

4. Η μέθοδος δοκιμών έχει ως σκοπό να προσδιορίσει τις επιδράσεις μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην αναπαραγωγή και τη βιομάζα των οργανισμών δοκιμής. Οι μετρούμενες βιολογικές παράμετροι είναι ο ολικός αριθμός των σκωλήκων που επιβίωσαν και η βιομάζα (ξηρό βάρος) στο τέλος της έκθεσης. Τα στοιχεία αυτά αναλύονται είτε με τη χρήση μοντέλου παλινδρόμησης ώστε να εκτιμηθεί η συγκέντρωση που θα είχε επίδραση x % (π.χ. EC_{50}, EC_{25} και EC_{10}), είτε με τη χρήση δοκιμασιών στατιστικής υπόθεσης για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης στην οποία δεν παρατηρείται επίδραση (NOEC) ή της κατώτατης συγκέντρωσης παρατηρούμενης επίδρασης (LOEC).

5. Το κεφάλαιο Γ.27 του παρόντος παραρτήματος «Δοκιμή τοξικότητας σε χειρονομίδες σε σύστημα ιζήματος-νερού με τη χρήση εμβολιασμένου ιζήματος» (6) παρείχε πολλά βασικά και χρήσιμα στοιχεία για την επίδοση της παρούσας μεθόδου δοκιμών για την τοξικότητα του ιζήματος. Οπότε, το εν λόγω έγγραφο χρησιμεύει ως βάση στην οποία έγινε η επεξεργασία των τροποποιήσεων που κρίνονται αναγκαίες για τη διεξαγωγή δοκιμών της τοξικότητας του ιζήματος με *Lumbriculus variegatus*. Άλλα έγγραφα στα οποία γίνεται αναφορά είναι π.χ. ο οδηγός ASTM για τον προσδιορισμό της

▼M6

βιοσυσσώρευσης των ιζηματικών επιμολυντών από βενθικά ασπόνδυλα (3), οι αμερικανικές μέθοδοι EPA για τη μέτρηση της τοξικότητας και της βιοσυσσώρευσης ιζηματικών επιμολυντών με ασπόνδυλα του γλυκού νερού (7) και ο οδηγός ASTM για τη συλλογή, την αποθήκευση, τον χαρακτηρισμό και τον χειρισμό ιζημάτων τοξικολογικών δοκιμασιών και για την επιλογή των δειγματοληπτών που χρησιμοποιούνται για τη συλλογή βενθικών ασπόνδυλων οργανισμών (12). Επιπλέον, η πείρα που έχει αποκτηθεί κατά τις δοκιμές δακτυλίου της συγκεκριμένης μεθόδου δοκιμών [(13), έκθεση δοκιμής δακτυλίου] και η βιβλιογραφία είναι σημαντικές πηγές πληροφοριών για τη σύνταξη του παρόντος εγγράφου.

ΠΡΟΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΚΑΙ ΟΔΗΓΙΕΣ

6. Πληροφορίες για την υπό δοκιμή χημική ουσία όπως προφυλάξεις ασφάλειας, σωστές συνθήκες αποθήκευσης και αναλυτικές μέθοδοι θα πρέπει να αποκτώνται πριν από την έναρξη της μελέτης. Περαιτέρω καθοδήγηση για τις δοκιμές ουσιών με φυσικοχημικές ιδιότητες που δυσχεραίνουν τη διεξαγωγή της δοκιμής παρέχεται στη βιβλιογραφική παραπομπή (14).

7. Πριν από τη διεξαγωγή μιας δοκιμής, θα πρέπει να είναι γνωστά τα ακόλουθα στοιχεία σχετικά με την υπό δοκιμή χημική ουσία:

   — κοινή ονομασία, χημική ονομασία (κατά προτίμηση IUPAC), συντακτικός τύπος, αριθμός μητρώου CAS, καθαρότητα·

   — τάση ατμών·

   — υδατοδιαλυτότητα.

8. Οι ακόλουθες πρόσθετες πληροφορίες θεωρούνται χρήσιμες πριν από την έναρξη της δοκιμής:

   — ο συντελεστής κατανομής σε οκτανόλη-νερό K_{ow}·

   — ο συντελεστής κατανομής σε οργανικό άνθρακα-νερό (K_{oc})·

   — υδρόλυση·

   — η φωτομετατροπή σε νερό·

   — η βιοαποικοδομησιμότητα·

   — η επιφανειακή τάση.

9. Πληροφορίες για ορισμένα χαρακτηριστικά του ιζήματος που θα χρησιμποιηθεί πρέπει να είναι γνωστές πριν από την έναρξη της δοκιμής (7). Για περισσότερες πληροφορίες βλ. σημεία 22 έως 25.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

10. Σκώληκες παρόμοιας φυσιολογικής κατάστασης (συγχρονισμένης καλλιέργειας όπως στο προσάρτημα 5) εκτίθενται σε σειρά τοξικών συγκεντρώσεων που εφαρμόζονται στη φάση του ιζήματος ενός συστήματος ιζήματος-νερού. Ως θρεπτικά μέσα χρησιμοποιούνται τεχνητό ίζημα και ανασυσταθέν νερό. Οι φιάλες δοκιμής χωρίς την προσθήκη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας χρησιμεύουν ως μάρτυρες. Η υπό δοκιμή χημική ουσία εμβολιάζεται στο ίζημα χύδην για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης ώστε να ελαχιστοποιείται η μεταβλητότητα μεταξύ επαναλήψεων για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης, και οι οργανισμοί δοκιμής εισάγονται στη συνέχεια σε φιάλες δοκιμής στις οποίες οι συγκεντρώσεις ιζήματος και νερού έχουν εξισορροπηθεί (βλ. σημείο 29.) Τα ζώα δοκιμής εκτίθενται στα συστήματα ιζήματος-νερού για περίοδο 28 ημερών. Ενόψει της χαμηλής περιεκτικότητας σε θρεπτικά στοιχεία του τεχνητού ιζήματος, το ίζημα θα πρέπει να τροποποιηείται με πηγή τροφής (βλ. παραγράφους 22 έως 23 και προσάρτημα 4), ώστε να εξασφαλιστεί ότι οι σκώληκες αναπτύσσονται και αναπαράγονται υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται ότι τα ζώα δοκιμής εκτίθενται στο νερό και στο ίζημα και διαμέσου της τροφής τους.

11. Το προτιμώμενο τελικό σημείο στη μελέτη αυτού του τύπου είναι η EC_x (π.χ. EC_{50}, EC_{25}, και EC_{10}· η αποτελεσματική συγκέντρωση είναι αυτή που έχει επίδραση x % στους οργανισμούς δοκιμής) για την αναπαραγωγή και τη βιομάζα, αντίστοιχα, σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Πρέπει ωστόσο να

▼M6

σημειωθεί ότι, λόγω της υψηλής αβεβαιότητας της χαμηλής EC_x (π.χ. EC_{10}, EC_{25}) με εξαιρετικά υψηλά όρια εμπιστοσύνης 95 % [π.χ. (15)] και της στατιστικής ισχύος υπολογιζομένης κατά τις δοκιμές υπόθεσης, η EC_{50} θεωρείται το πλέον σταθερό τελικό σημείο. Επιπροσθέτως, η συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC) και η κατώτατη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης (LOEC) μπορούν να υπολογίζονται για τη βιομάζα και την αναπαραγωγή, αν ο σχεδιασμός της δοκιμής και τα δεδομένα υποστηρίζουν αυτούς τους υπολογισμούς (βλ. παραγράφους 34 έως 38). Ο σκοπός της μελέτης, η εξαγωγή της EC_x ή της NOEC, θα καθορίσει τον σχεδιασμό της δοκιμής.

ΔΟΚΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

12. Η επίδοση των οργανισμών-μαρτύρων αναμένεται να αποδείξει επαρκώς την ικανότητα του εργαστηρίου να εκτελεί τη δοκιμή και, αν υπάρχουν διαθέσιμα ιστορικά στοιχεία, την επαναληψιμότητα της δοκιμής. Επιπλέον, οι δοκιμές τοξικότητας αναφοράς μπορούν να διεξάγονται σε τακτά διαστήματα με τη χρήση τοξικής ουσίας αναφοράς για την αξιολόγηση της ευαισθησίας των οργανισμών δοκιμής. Δοκιμές τοξικότητας αναφοράς διάρκειας 96 ωρών στο νερό μόνο μπορούν να αποδείξουν ικανοποιητικά την ευαισθησία και την κατάσταση των ζώων δοκιμής (4) (7). Πληροφορίες για την τοξικότητα της πενταχλωροφαινόλης (PCP) σε πλήρεις δοκιμές (έκθεση 28 ημερών σε εμβολιασμένο ίζημα) περιλαμβάνονται στο προσάρτημα 6 και στην έκθεση για τη δοκιμή δακτυλίου της μεθόδου δοκιμών (13). Η οξεία τοξικότητα μόνο στο νερό του PCP περιγράφεται π.χ. στο (16). Οι πληροφορίες αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για σύγκριση της ευαισθησίας ενός οργανισμού δοκιμής στις δοκιμές αναφοράς με το PCP ως τοξική ουσία αναφοράς. Το KCl (χλωριούχο κάλιο) ή ο θειικός χαλκός ($CuSO_4$) συνιστώνται ως τοξικές ουσίες αναφοράς με *L. variegatus* (4)(7). Έως σήμερα, είναι δύσκολη η καθιέρωση ποιοτικών κριτηρίων βάσει των στοιχείων τοξικότητας για το KCl λόγω έλλειψης βιβλιογραφίας για τον *L. variegatus*. Πληροφορίες για την τοξικότητα του χαλκού για το *L. variegatus* βρίσκονται στα (17) έως (21).

ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

13. Για να είναι έγκυρη η δοκιμή, πρέπει να πληρούνται οι ακόλουθες απαιτήσεις:

— Δοκιμή δακτυλίου έδειξε (13) ότι για τον *Lumbriculus variegatus*, ο μέσος αριθμός ζώντων σκωλήκων ανά επανάληψη στους μάρτυρες θα πρέπει να έχει αυξηθεί με συντελεστή τουλάχιστον 1,8 στο τέλος της έκθεσης σε σύγκριση με τον αριθμό των σκωλήκων ανά επανάληψη στην αρχή της έκθεσης.

— Το pH του υπερκείμενου νερού θα πρέπει να είναι μεταξύ 6 και 9 σε όλη τη δοκιμασία.

— Η συγκέντρωση οξυγόνου στο υπερκείμενο νερό δεν θα πρέπει να είναι κάτω του 30 % της τιμής κορεσμού με αέρα (ASV) σε θερμοκρασία δοκιμής κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Σύστημα δοκιμής

14. Συνιστώνται στατικά συστήματα χωρίς ανανέωση του υπερκείμενου νερού. Αν η αναλογία ιζήματος προς νερό (βλ. σημείο 15) είναι κατάλληλη, ο ήπιος αερισμός κανονικά αρκεί για να παραμείνει η ποιότητα του νερού σε αποδεκτά επίπεδα για τους οργανισμούς δοκιμής (π.χ. μεγιστοποίηση των επιπέδων διαλυμένου οξυγόνου, ελαχιστοποίηση προϊόντων απέκκρισης). Ημιστατικά ή συστήματα συνεχούς ροής με διακεκομμένη ή συνεχή ανανέωση του υπερκείμενου νερού θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο σε εξαιρετικές περιπτώσεις, αφού η τακτική ανανέωση του υπερκείμενου νερού μπορεί να επηρεάσει τη χημική ισορροπία (π.χ. απώλειες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας από το σύστημα δοκιμής).

Δοχεία και συσκευές δοκιμής

15. Η έκθεση θα πρέπει να διεξάγεται σε γυάλινα ποτήρια ζέσεως π.χ. των 250 ml με διάμετρο 6 cm. Κατάλληλα είναι και άλλα γυάλινα δοχεία, αλλά θα πρέπει να εξασφαλίζουν κατάλληλο βάθος υπερκείμενου νερού και ιζήματος. Σε κάθε δοχείο τοποθετείται στρώμα μορφοποιημένου ιζήματος κατά προσέγγιση 1,5 - 3 cm. Η αναλογία του βάθους του ιζήματος προς το

▼M6

βάθος του υπερκείμενου νερού θα πρέπει να είναι 1:4. Τα δοχεία θα πρέπει να έχουν κατάλληλη χωρητικότητα ανάλογα με το φορτίο που θα δεχθούν, δηλ. τον αριθμό των σκωλήκων δοκιμής που προστίθενται ανά μονάδα βάρους του ιζήματος (βλ. επίσης παράγραφο 39).

16. Τα δοχεία δοκιμής και τα υπόλοιπα σκεύη που πρόκειται να έλθουν σε επαφή με την υπό δοκιμή χημική ουσία πρέπει να είναι κατασκευασμένα εξ ολοκλήρου από γυαλί ή άλλο χημικώς αδρανές υλικό. Πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια ώστε να μην χρησιμοποιούνται, σε οποιοδήποτε τμήμα του εξοπλισμού, υλικά που μπορούν να διαλύσουν ή να προσροφήσουν την υπό δοκιμή χημική ουσία ή να αποπλύνουν άλλες χημικές ουσίες και να έχουν δυσμενή επίδραση στα ζώα δοκιμής. Για τον εξοπλισμό που έρχεται σε επαφή με τα θρεπτικά μέσα της δοκιμής θα πρέπει να χρησιμοποιείται πολυτετραφθοροαιθυλένιο (PTFE), ανοξείδωτος χάλυβας και/ή γυαλί. Για τις οργανικές χημικές ουσίες που είναι γνωστό ότι προσροφώνται στο γυαλί, ενδέχεται να απαιτηθεί σιλανιωμένο γυαλί. Στις περιπτώσεις αυτές ο εξοπλισμός, μετά τη χρήση, πρέπει να απορρίπτεται.

Υπό δοκιμή είδη

17. Τα είδη δοκιμής που χρησιμοποιούνται σ' αυτόν τον τύπο μελέτης είναι οι ολιγόχαιτοι γλυκού νερού *Lumbriculus variegatus* (Müller). Το είδος αυτό είναι ανεκτικό σε ευρύ φάσμα ιζημάτων και χρησιμοποιείται ευρέως για δοκιμές τοξικότητας του ιζήματος και βιοσυσσώρευσης [π.χ. (3), (5), (7), (9), (13), (15), (16), (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28), (29), (30), (31), (32), (33), (34), (35)]. Η προέλευση των ζώων δοκιμής, η επιβεβαίωση της ταυτότητας των ειδών [π.χ. (36)] καθώς και οι συνθήκες καλλιέργειας θα πρέπει αναφέρονται. Η ταυτοποίηση των ειδών δεν απαιτείται πριν από κάθε δοκιμή, αν οι οργανισμοί προέρχονται από εσωτερική καλλιέργεια.

Καλλιέργεια των οργανισμών δοκιμής

18. Για να υπάρξει επαρκής αριθμός σκωλήκων για τη διεξαγωγή των δοκιμών τοξικότητας του ιζήματος, είναι χρήσιμο να παραμένουν οι σκώληκες σε μόνιμη εργαστηριακή καλλιέργεια. Οι οδηγίες για τις μεθόδους εργαστηριακής καλλιέργειας για τον *Lumbriculus variegatus* και οι πηγές για καλλιέργεια εκκίνησης δίνονται στο προσάρτημα 5. Για περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με την καλλιέργεια αυτού του είδους βλ. παραπομπές (3), (7), (27).

19. Για να εξασφαλιστεί ότι οι δοκιμές εκτελούνται με ζώα του ίδιου είδους, συνιστάται ένθερμα η καθιέρωση καλλιεργειών ενός μόνο είδους. Εξασφαλίζεται ότι οι καλλιέργειες και ειδικά οι σκώληκες που χρησιμοποιούνται στις δοκιμές είναι απαλλαγμένοι από εμφανείς νόσους και ανωμαλίες.

Νερό

20. Το ανασυσταθέν νερό σύμφωνα με το κεφάλαιο Γ.1 του παρόντος παραρτήματος (37) συνιστάται για τη χρήση ως υπερκείμενο νερό στις δοκιμές· μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τις εργαστηριακές καλλιέργειες των σκωλήκων (βλ. προσάρτημα 2 για την παρασκευή). Αν χρειαστεί, μπορεί να χρησιμοποιηθεί φυσικό νερό. Το επιλεγμένο νερό πρέπει να είναι τέτοιας ποιότητας ώστε οι οργανισμοί δοκιμής να μπορούν να αναπτύσσονται και να αναπαράγονται καθ' όλη τη διάρκεια του εγκλιματισμού και των περιόδων δοκιμής, χωρίς να παρουσιάζουν ανώμαλη εμφάνιση ή συμπεριφορά. Το είδος *Lumbriculus variegatus* έχει αποδειχθεί ότι επιβιώνει, αναπτύσσεται και αναπαράγεται σ' αυτόν τον τύπο νερού (30), και υπάρχει μέγιστη τυποποίηση των συνθηκών της δοκιμής και της καλλιέργειας. Αν χρησιμοποιείται ανασυσταθέν νερό, η σύνθεσή του θα πρέπει να αναφέρεται και το νερό να χαρακτηρίζεται, προτού χρησιμοποιηθεί, τουλάχιστον από pH, περιεκτικότητα οξυγόνου και σκληρότητα (εκφραζόμενο ως mg $CaCO_3$/l). Η ανάλυση του νερού για μικρορύπους πριν από τη χρήση πρέπει να δίνει χρήσιμες πληροφορίες (βλ. π.χ. προσάρτημα 3).

21. Το pH του υπερκείμενου νερού θα πρέπει να είναι μεταξύ 6,0 και 9,0 (βλ. σημείο 13). Αν αναμένεται αυξημένη παρουσία αμμωνίας, είναι χρήσιμο να διατηρηθεί το pH μεταξύ 6,0 και 8,0. Για τις δοκιμές π.χ. ασθενών οργανικών οξέων, συνιστάται να ρυθμίζεται το pH με την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος στο νερό που θα χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή, όπως περιγράφεται π.χ. στο (16). Η ολική σκληρότητα του νερού που θα χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή θα πρέπει να είναι μεταξύ 90 και 300 mg $CaCO_3$ ανά λίτρο για το φυσικό νερό. Το προσάρτημα 3 συγκεφαλαιώνει πρόσθετα κριτήρια για το αποδεκτό νερό αραίωσης σύμφωνα με την κατευθυντήρια γραμμή του ΟΟΣΑ αριθ. 210 (38).

▼M6

Ίζημα

22. Επειδή ενδέχεται να μην είναι διαθέσιμα καθ' όλη τη διάρκεια του έτους φυσικά ιζήματα μιας συγκεκριμένης πηγής, και επειδή αυτόχθονες οργανισμοί καθώς και η παρουσία μικρορύπων μπορούν να επηρεάσουν τη δοκιμή, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί κατά προτίμηση ένα μορφοποιημένο ίζημα (λέγεται επίσης ανασυσταθέν, τεχνητό ή συνθετικό ίζημα). Η χρήση μορφοποιημένου ιζήματος ελαχιστοποιεί τη μεταβλητότητα των συνθηκών δοκιμής καθώς και την επέμβαση αυτόχθονης πανίδας. Το ακόλουθο μορφοποιημένο ίζημα βασίζεται στο τεχνητό ίζημα σύμφωνα με τα (6), (39) και (40). Συνιστάται για χρήση σ' αυτού του είδους τη δοκιμή [(6), (10), (30), (41), (42), (43)]:

α) 4-5 % (ξηρό βάρος) τύρφης σφάγνων· είναι σημαντικό να χρησιμοποιηθεί τύρφη σε σκόνη, βαθμός αποσύνθεσης: «μεσαίος», λεπτοαλεσμένη (μέγεθος σωματιδίου ≤ 0,5 mm) και μόνο αερόξηρη·

β) 20 ± 1 % (ξηρό βάρος) καολινιτικής αργίλου (περιεκτικότητα σε καολινίτη κατά προτίμηση άνω του 30 %)·

γ) 75-76 % (ξηρό βάρος) χαλαζιακής άμμου (λεπτοαλεσμένη άμμος, μέγεθος σωματιδίου: ≤ 2 mm, αλλά > 50 % των κόκκων θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 50-200 μm)·

δ) απιονισμένο νερό, 30–50 % του ξηρού βάρους του ιζήματος, επιπλέον των συστατικών του ξηρού ιζήματος·

ε) προστίθεται ανθρακικό ασβέστιο χημικώς καθαρό ($CaCO_3$) για τη ρύθμιση του pH του τελικού μείγματος του ιζήματος·

στ) η ολική περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα του τελικού μείγματος θα πρέπει να είναι 2 % (± 0,5 %) του ξηρού βάρους του ιζήματος και να ρυθμίζεται με τη χρήση κατάλληλων ποσοτήτων τύρφης και άμμου, σύμφωνα με τα στοιχεία α) και γ)·

ζ) τροφή, π.χ. λεπτοαλεσμένα φύλλα τσουκνίδας (Urtica sp., σύμφωνα με τα φαρμακευτικά πρότυπα, για κατανάλωση από τον άνθρωπο) ή μείγμα λεπτοαλεσμένων φύλλων του είδους Urtica sp. με άλφα-κυτταρίνη (1:1), σε 0,4 — 0,5 % ιζήματος ξηρού βάρους, επιπλέον των συστατικών του ξηρού ιζήματος· για λεπτομέρειες βλ. προσάρτημα 4.

23. Η πηγή της τύρφης, της καολινιτικής αργίλου, των τροφών και της άμμου θα πρέπει να είναι γνωστή. Επιπλέον του στοιχείου ζ) στο κεφάλαιο Γ.27 του παρόντος παραρτήματος (6) παρατίθενται φυτικά υλικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά ως πηγή διατροφής: αφυδατωμένα φύλλα μουριάς (*Morus alba*), λευκού τριφυλιού (*Trifolium repens*), σπανακιού (*Spinacia oleracea*), ή σιτηρά.

24. Η επιλεγμένη πηγή τροφής θα πρέπει να προστίθεται πριν ή κατά τη διάρκεια του εμβολιασμού του ιζήματος με την υπό δοκιμή χημική ουσία. Η επιλεγμένη πηγή τροφής θα πρέπει να επιτρέψει τουλάχιστον αποδεκτή αναπαραγωγή στους μάρτυρες. Η ανάλυση του τεχνητού ιζήματος ή των συστατικών του για παρουσία μικρορύπων πριν από τη χρήση θα παρείχε χρήσιμες πληροφορίες. Στο προσάρτημα 4 παρατίθεται παράδειγμα παρασκευής μορφοποιημένου ιζήματος. Επίσης, επιτρέπεται η ανάμιξη των ξηρών συστατικών, εάν καταδεικνύεται ότι, μετά την προσθήκη υπερκείμενου νερού, δεν διαχωρίζονται τα συστατικά του ιζήματος (π.χ. επίπλευση σωματιδίων τύρφης) και ότι η τύρφη ή το ίζημα είναι επαρκώς εγκλιματισμένα (βλ. επίσης παράγραφο 25 και προσάρτημα 4). Το τεχνητό ίζημα θα πρέπει να χαρακτηρίζεται τουλάχιστον από την προέλευση των συστατικών, την κατανομή του μεγέθους των κόκκων (ποσοστό άμμου, ιλύος και αργίλου), τη μέγιστη περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (TOC), την υδατοχωρητικότητα και το pH. Η μέτρηση του οξειδοαναγωγικού δείκτη είναι προαιρετική.

25. Αν απαιτείται, π.χ. για ειδικές δοκιμές, φυσικά ιζήματα από μη ρυπασμένες τοποθεσίες μπορούν να χρησιμεύσουν ως ίζημα δοκιμής και/ή καλλιέργειας (3). Ωστόσο, αν χρησιμοποιείται φυσικό ίζημα, θα πρέπει να χαρακτηρίζεται τουλάχιστον από την προέλευση (τόπος συλλογής), το pH και την αμμωνία του ενδοπορικού νερού, τη συνολική περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (TOC) και την περιεκτικότητα σε άζωτο, την κατανομή του μεγέθους

▼M6

σωματιδίων (ποσοστό άμμου, ιλύος και αργίλου), και την ποσοστιαία υδατοχωρητικότητα (7) και θα πρέπει να είναι απαλλαγμένο από τυχόν επιμόλυνση και άλλους οργανισμούς που ενδέχεται να ανταγωνίζονται ή να επιβουλεύονται τους οργανισμούς δοκιμής. Η μέτρηση του οξειδοαναγωγικού δείκτη και της κατιοανταλλακτικής ικανότητας είναι προαιρετική. Επίσης, πριν από τον εμβολιασμό με την υπό δοκιμή χημική ουσία, συνιστάται ο εγκλιματισμός του φυσικού ιζήματος για επτά ημέρες υπό τις ίδιες συνθήκες που θα επικρατούν στην επακόλουθη δοκιμή. Στο τέλος της περιόδου εγκλιματισμού, το υπερκείμενο νερό θα πρέπει να αφαιρεθεί και να απορριφθεί.

26. Το ίζημα που θα χρησιμοποιηθεί πρέπει να είναι τέτοιας ποιότητας ώστε οι οργανισμοί μάρτυρες να μπορούν να επιβιώνουν και να αναπαράγονται καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης, χωρίς να παρουσιάζουν ανώμαλη εμφάνιση ή συμπεριφορά. Οι σκώληκες-μάρτυρες θα πρέπει να φωλιάζουν στο ίζημα και να τρέφονται μ' αυτό. Η αναπαραγωγή στους μάρτυρες θα πρέπει να γίνεται τουλάχιστον με το κριτήριο εγκυρότητας που περιγράφεται στο σημείο 13. Η παρουσία ή απουσία περιττωμάτων στην επιφάνεια του ιζήματος, που είναι ένδειξη κατάποσης του ιζήματος από τους σκώληκες, θα πρέπει να καταγράφεται και μπορεί να είναι χρήσιμη για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμής όσον αφορά τις οδούς έκθεσης. Πρόσθετες πληροφορίες για την πρόσληψη του ιζήματος μπορούν να αποκτηθούν με τη χρήση των μεθόδων που περιγράφονται στα (24), (25), (44) και (45), που προσδιορίζουν την πρόσληψη του ιζήματος ή την επιλογή σωματιδίου στους οργανισμούς δοκιμής.

27. Οι διαδικασίες χειρισμού για τα φυσικά ιζήματα πριν από τη χρήση στο εργαστήριο περιγράφονται στα σημεία (3), (7) και (12). Η προετοιμασία και αποθήκευση του τεχνητού ιζήματος που συνιστάται να χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή σε *Lumbriculus* περιγράφονται στο προσάρτημα 4.

Εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας

28. Η υπό δοκιμή χημική ουσία εμβολιάζεται στο ίζημα. Επειδή οι περισσότερες υπό δοκιμή χημικές ουσίες αναμένεται να έχουν χαμηλή υδατοδιαλυτότητα, θα πρέπει να διαλυθούν σε κατάλληλο οργανικό διαλύτη (π.χ. ακετόνη, n-εξάνιο, κυκλοεξάνιο) σε όγκο όσο το δυνατόν μικρότερο, ώστε να παρασκευαστεί διάλυμα παρακαταθήκης. Το διάλυμα παρακαταθήκης θα πρέπει να αραιωθεί με τον ίδιο διαλύτη για την παρασκευή των διαλυμάτων δοκιμής. Τα βασικά κριτήρια για την επιλογή κατάλληλου μέσου διαλυτοποίησης πρέπει να είναι η τοξικότητα και η πτητικότητα του διαλύτη, καθώς και η διαλυτότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον επιλεγμένο διαλύτη. Για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης πρέπει να χρησιμοποιείται ο ίδιος όγκος από το αντίστοιχο διάλυμα. Το ίζημα θα πρέπει να εμβολιάζεται χύδην για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης ώστε να ελαχιστοποιείται η μεταξύ επαναλήψεων μεταβλητότητα της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Καθένα από τα διαλύματα δοκιμής αναμειγνύεται στη συνέχεια με χαλαζιακή άμμο όπως περιγράφεται στο σημείο 22 (π.χ. 10 g χαλαζιακής άμμου ανά δοχείο δοκιμής). Για να επιτευχθεί ο πλήρης εμποτισμός της χαλαζιακής άμμου αρκούν 0,20 — 0,25 ml ανά g άμμου. Στη συνέχεια, ο διαλύτης πρέπει να εξατμιστεί μέχρι ξηρού. Για να ελαχιστοποιηθούν οι απώλειες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας λόγω συνεξάτμισης (π.χ. ανάλογα με την τάση ατμών της χημικής ουσίας), η επικαλυμμένη άμμος θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί αμέσως μετά την ξήρανση. Η ξηρή άμμος αναμειγνύεται με την κατάλληλη ποσότητα μορφοποιημένου ιζήματος στο αντίστοιχο επίπεδο συγκέντρωσης. Κατά την παρασκευή του ιζήματος, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η ποσότητα της άμμου που παρέχεται από το μείγμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και άμμου (δηλ. το ίζημα θα πρέπει επομένως να παρασκευάζεται με λιγότερη άμμο). Το μεγάλο πλεονέκτημα αυτής της διαδικασίας είναι ότι τελικά δεν εισάγεται διαλύτης στο ίζημα (7). Εναλλακτικά, π.χ. για ίζημα πεδίου, η υπό δοκιμή χημική ουσία μπορεί να προστεθεί με εμβολιασμό ενός αερόξηρου, λεπτοαλεσμένου τμήματος του ιζήματος, όπως περιγράφεται ανωτέρω για τη χαλαζιακή άμμο, ή με ανάδευση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μέσα στο υγρό έδαφος, με επακόλουθη εξάτμιση, εάν χρησιμοποιείται παράγοντας διαλυτοποίησης. Πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να εξασφαλίζεται ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία που προστίθεται στο ίζημα είναι πλήρως και ομοιογενώς κατανεμημένη μέσα στο ίζημα. Αν χρειαστεί, μπορεί να αναλυθούν επιμέρους δείγματα για να επιβεβαιωθούν οι στοχευόμενες συγκεντρώσεις στο ίζημα και να προσδιοριστεί ο βαθμός ομοιογένειας. Μπορεί επίσης να είναι χρήσιμο να αναλυθούν τα επιμέρους δείγματα των διαλυμάτων δοκιμής για να επιβεβαιωθούν οι

▼M6

στοχευόμενες συγκεντρώσεις στο ίζημα. Όταν χρησιμοποιείται διαλύτης για την επικάλυψη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στη χαλαζιακή άμμο, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί μάρτυρας με διαλύτη που είναι παρασκευασμένος με την ίδια ποσότητα διαλύτη όπως τα ιζήματα δοκιμής. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό, καθώς και οι λόγοι για την επιλογή μιας συγκεκριμένης διαδικασίας εμβολιασμού πλην αυτής που περιγράφεται ανωτέρω πρέπει να αναφέρονται. Η μέθοδος εμβολιασμού ενδέχεται να προσαρμόζεται στις φυσικοχημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, π.χ. για να αποφεύγονται απώλειες λόγω της πτητικότητας κατά τον εμβολιασμό ή την εξισορρόπηση. Επιπλέον οδηγίες για τις διαδικασίες εμβολιασμού δίνονται στο «Environment Canada» (1995) (46).

29. Μόλις παρασκευαστεί το εμβολιασμένο ίζημα, αφού διανεμηθεί στα δοχεία των επαναλήψεων και συμπληρωθεί με το νερό δοκιμής, είναι σκόπιμο να επιτραπεί η κατανομή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας από το ίζημα στην υδατική φάση [(π.χ. (3)(7)(9)]. Αυτό θα πρέπει να γίνεται κατά προτίμηση υπό τις συνθήκες θερμοκρασίας και αερισμού που εφαρμόζονται στη δοκιμή. Ο κατάλληλος χρόνος εξισορρόπησης είναι ειδικός για τα ιζήματα και τις χημικές ενώσεις και μπορεί να κυμαίνεται από ώρες έως ημέρες και, σε σπάνιες περιπτώσεις, έως αρκετές εβδομάδες (4-5 εβδομάδες) [π.χ. (27)(47)]. Σ' αυτήν τη δοκιμή, δεν αναμένεται η επίτευξη ισορροπίας, αλλά συνιστάται περίοδος εξισορρόπησης από 48 ώρες έως 7 ημέρες. Συνεπώς, θα ελαχιστοποιηθεί ο χρόνος αποικοδόμησης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Ανάλογα με τον σκοπό της μελέτης, για παράδειγμα όταν πρέπει να προσομοιώνονται περιβαλλοντικές συνθήκες, το εμβολιασμένο ίζημα μπορεί να υποστεί εξισορρόπηση ή παλαίωση για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

30. Στο τέλος της περιόδου εξισορρόπησης, τα δείγματα θα πρέπει να λαμβάνονται τουλάχιστον από το υπερκείμενο νερό και την κύρια μάζα του ιζήματος, τουλάχιστον στη υψηλότερη συγκέντρωση και στην κατώτερη, για ανάλυση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Οι εν λόγω αναλυτικοί προσδιορισμοί της υπό δοκιμής χημικής ουσίας επιτρέπουν τον υπολογισμό του ισοζυγίου μάζας και την έκφραση των αποτελεσμάτων με βάση τις μετρούμενες αρχικές συγκεντρώσεις. Γενικά, η δειγματοληψία διαταράσσει ή καταστρέφει το σύστημα ίζημα-νερό. Συνεπώς, δεν είναι συνήθως δυνατό να χρησιμοποιούνται τα ίδια πανομοιότυπα δοχεία για τη δειγματοληψία ιζήματος και σκωλήκων. Πρόσθετα «αναλυτικά» δοχεία κατάλληλων διαστάσεων πρέπει να τοποθετούνται, των οποίων ο χειρισμός να γίνεται με τον ίδιο τρόπο (συμπεριλαμβανομένης της παρουσίας οργανισμών δοκιμής) αλλά να μη χρησιμοποιούνται για βιολογικές παρατηρήσεις. Οι διαστάσεις του δοχείου θα πρέπει να επιλέγονται ώστε να παρέχονται οι ποσότητες δείγματος που απαιτούνται από την αναλυτική μέθοδο. Λεπτομέρειες σχετικά με τη δειγματοληψία παρέχονται στο προσάρτημα 53.

ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Προκαταρκτική δοκιμή

31. Αν δεν υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες για την τοξικότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο *Lumbriculus variegatus*, είναι ίσως χρήσιμο να διεξαχθεί προκαταρκτικό πείραμα για να προσδιοριστεί το εύρος των συγκεντρώσεων που θα εξεταστούν στην οριστική δοκιμή και για να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες δοκιμής της οριστικής δοκιμής. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιείται μια σειρά από συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας με μεγάλα διαστήματα μεταξύ τους. Οι σκώληκες εκτίθενται σε κάθε συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας για περίοδο (π.χ. 28 ημερών όπως στην οριστική δοκιμή) που επιτρέπει την εκτίμηση των κατάλληλων συγκεντρώσεων δοκιμής· δεν απαιτούνται επαναλήψεις. Η συμπεριφορά των σκωλήκων, για παράδειγμα η αποφυγή του ιζήματος, που μπορεί να προκαλείται από την υπό δοκιμή χημική ουσία και/ή το ίζημα, θα πρέπει να παρατηρείται και να καταγράφεται κατά τη διάρκεια μιας προκαταρκτικής δοκιμής. Συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 1 000 mg/kg ξηρού βάρους ιζήματος δεν θα πρέπει να εξετάζονται στην προκαταρκτική δοκιμή.

Οριστική δοκιμή

32. Στην οριστική δοκιμή, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται και να επιλέγονται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις π.χ. βάσει του αποτελέσματος της προκαταρκτικής δοκιμής καθορισμού εύρους (σημείο 31) και όπως περιγράφεται στις παραγράφους 35, 36, 37 και 38.

▼M6

33. Εκτός από τη σειρά δοκιμής, διεξάγεται δοκιμή ελέγχου (για τις επαναλήψεις βλέπε παραγράφους 36, 37 και 38) που περιέχει όλα τα συστατικά, εκτός από την υπό δοκιμή χημική ουσία. Αν χρησιμοποιείται παράγοντας διαλυτοποίησης για την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, δεν θα πρέπει να έχει σημαντική επίδραση στους οργανισμούς δοκιμής όπως αποκαλύπτει πρόσθετη δοκιμή ελέγχου μόνο με τον διαλύτη.

Σχεδιασμός της δοκιμής

34. Ο σχεδιασμός της δοκιμής αφορά την επιλογή του αριθμού και της κλιμάκωσης των συγκεντρώσεων δοκιμής, του αριθμού των δοχείων για κάθε συγκέντρωση και του αριθμού των σκωλήκων που προστίθενται ανά δοχείο. Οι σχεδιασμοί για την εκτίμηση της EC_x, την εκτίμηση της NOEC και τη διεξαγωγή οριακής δοκιμής περιγράφονται στις παραγράφους 35, 36, 37 και 38.

35. Η συγκέντρωση επίδρασης (π.χ. EC_{50} EC_{25}, EC_{10}) και το εύρος συγκεντρώσεων που ενδιαφέρουν σε σχέση με την επίδραση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, θα πρέπει να καλύπτονται από τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή. Θα πρέπει να αποφεύγεται η προεκβολή πολύ χαμηλότερα από την κατώτατη θετική συγκέντρωση ή πάνω από την ανώτατη συγκέντρωση. Αν — σε εξαιρετικές περιπτώσεις- γίνει τέτοια προεκβολή, πρέπει να δοθεί πλήρης εξήγηση στην έκθεση.

36. Αν πρέπει να εκτιμηθεί η EC_x, πρέπει να διενεργούνται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις και τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση· συνιστώνται έξι επαναλήψεις για τον μάρτυρα ή –αν χρησιμοποιείται– τον μάρτυρα με τον διαλύτη ώστε να βελτιωθεί η εκτίμηση της μεταβλητότητας του μάρτυρα. Σε κάθε περίπτωση, συνιστάται η χρησιμοποίηση επαρκών συγκεντρώσεων για μια ικανοποιητική εκτίμηση βάσει μοντέλου. Ο συντελεστής μεταξύ των συγκεντρώσεων δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερος από δύο (εξαίρεση θα μπορούσε να γίνει σε περιπτώσεις που η καμπύλη δόσης-απόκρισης έχει μικρή κλίση). Ο αριθμός των επαναλήψεων σε κάθε αγωγή μπορεί να μειώνεται, εάν αυξάνεται ο αριθμός των συγκεντρώσεων δοκιμής με διαφορετικές αποκρίσεις στο εύρος των 5–95 %. Η αύξηση του αριθμού των επαναλήψεων ή η μείωση του μεγέθους των διαστημάτων μεταξύ των συγκεντρώσεων δοκιμής τείνει να οδηγεί σε στενότερα διαστήματα εμπιστοσύνης για τη δοκιμή.

37. Αν πρέπει να εκτιμηθούν οι τιμές LOEC/NOEC, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις δοκιμής με τουλάχιστον τέσσερις επαναλήψεις (συνιστώνται έξι επαναλήψεις για τον μάρτυρα ή –αν χρησιμοποιείται– το διάλυμα με τον μάρτυρα, ώστε να βελτιωθεί η εκτίμηση της μεταβλητότητας του μάρτυρα) και ο συντελεστής μεταξύ των συγκεντρώσεων δεν θα πρέπει να είναι μεγαλύτερος από δύο. Ορισμένες πληροφορίες για τη στατιστική ισχύ που διαπιστώνονται κατά τις δοκιμές υπόθεσης στη δοκιμή δακτυλίου της μεθόδου δοκιμών δίνονται στο προσάρτημα 6.

38. Εάν δεν έχει παρατηρηθεί καμία επίδραση σε έως και 1 000 mg/kg ιζήματος ξηρού βάρους, είναι δυνατόν να διεξαχθεί οριακή δοκιμή (μία συγκέντρωση δοκιμής και μάρτυρες). (π.χ. από προκαταρκτική δοκιμή προσδιορισμού εύρους) ή αν οι δοκιμές σε μία μόνη συγκέντρωση θα είναι κατάλληλες για να επιβεβαιώσουν μια τιμή NOEC που να παρουσιάζει ενδιαφέρον. Στην τελευταία περίπτωση, στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιληφθεί αναλυτικό σκεπτικό για την επιλογή οριακής συγκέντρωσης. Σκοπός της οριακής δοκιμής είναι η εκτέλεση της δοκιμής σε επαρκώς υψηλή συγκέντρωση, ώστε να επιτρέπεται στους ιθύνοντες να αποκλείσουν πιθανές τοξικές επιδράσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, ενώ το όριο τίθεται σε συγκέντρωση η οποία δεν αναμένεται να εμφανιστεί σε καμία περίπτωση. Συνιστάται η συγκέντρωση 1 000 mg/kg (ξηρό βάρος). Συνήθως, χρειάζονται τουλάχιστον έξι επαναλήψεις, τόσο για την αγωγή όσο και για τους μάρτυρες. Ορισμένες πληροφορίες για τη στατιστική ισχύ που διαπιστώνονται κατά τις δοκιμές υπόθεσης στη δοκιμή δακτυλίου της μεθόδου δοκιμών δίνονται στο προσάρτημα 6.

Συνθήκες έκθεσης

Οργανισμοί δοκιμής

39. Η δοκιμή διεξάγεται με 10 τουλάχιστον σκώληκες για κάθε επανάληψη για τον προσδιορισμό των βιολογικών παραμέτρων. Αυτός ο αριθμός σκωλήκων αντιστοιχεί σε περίπου 50 — 100 mg υγρής βιομάζας. Αν υποθέσουμε ότι η επί ξηρού περιεκτικότητα είναι 17,1 % (48), αυτό έχει ως αποτέλεσμα

▼M6

9 - 17 mg ξηρής βιομάζας ανά δοχείο. Η EPA των ΗΠΑ [2000 (7)] συνιστά να χρησιμοποιείται ρυθμός πλήρωσης που δεν υπερβαίνει 1:50 (ξηρή βιομάζα: TOC). Για το μορφοποιημένο ίζημα που περιγράφεται στο σημείο 22, αυτό αντιστοιχεί σε κατά προσέγγιση 43 g ιζήματος (ξηρό βάρος) ανά 10 σκώληκες σε περιεχόμενο TOC της τάξης του 2,0 % ξηρού ιζήματος. Σε περιπτώσεις όπου χρησιμοποιούνται πάνω από 10 σκώληκες ανά δοχείο, η ποσότητα ιζήματος και υπερκείμενου νερού θα πρέπει να προσαρμόζεται ανάλογα.

40. Οι σκώληκες που χρησιμοποιούνται σε μια συγκεκριμένη δοκιμή θα πρέπει να προέρχονται όλοι από την ίδια πηγή και να είναι ζώα με παρόμοια φυσιολογική κατάσταση (βλ. προσάρτημα 5). Θα πρέπει να επιλέγονται σκώληκες παρόμοιου μεγέθους (βλ. σημείο 39). Πριν από τη δοκιμή συνιστάται να ζυγίζεται ένα μερικό δείγμα από την παρτίδα ή το απόθεμα των σκωλήκων για να γίνεται εκτίμηση του μέσου βάρους.

41. Οι σκώληκες που θα χρησιμοποιηθούν σε μια δοκιμή απομακρύνονται από την καλλιέργεια (βλ. προσάρτημα 5 για λεπτομέρειες). Μεγάλοι (ενήλικοι) σκώληκες χωρίς σημάδια πρόσφατης κατάτμησης μεταφέρονται σε γυάλινα τρυβλία (π.χ. τρυβλία Petri) που περιέχουν καθαρό νερό. Στη συνέχεια συγχρονίζονται όπως περιγράφεται στο προσάρτημα 5. Μετά την αναγέννηση για περίοδο από 10 έως 14 ημερών, για τη δοκιμή θα πρέπει να χρησιμοποιούνται άθικτοι ολόκληροι σκώληκες παρόμοιου μεγέθους, που κολυμπούν ή σέρνονται ζωηρά μετά από ήπιο μηχανικό ερέθισμα. Αν οι συνθήκες δοκιμής διαφέρουν από τις συνθήκες καλλιέργειας (π.χ. ως προς τη θερμοκρασία, τον φωτισμό και το υπερκείμενο νερό), μια φάση εγκλιματισμού διάρκειας π.χ. 24 ωρών κατά την οποία η θερμοκρασία, ο φωτισμός και το υπερκείμενο νερό θα είναι ίδια με της δοκιμής, θα πρέπει να είναι επαρκής για την προσαρμογή των σκωλήκων στις συνθήκες δοκιμής. Οι προσαρμοσμένοι ολιγόχαιτοι θα πρέπει να κατανέμονται τυχαία στα δοχεία δοκιμής.

Σίτιση

42. Δεδομένου ότι τροφή προστίθεται στο ίζημα πριν από την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (ή κατά τη διάρκεια της), οι σκώληκες δεν σιτίζονται επιπλέον κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

Φως και θερμοκρασία

43. Η φωτοπερίοδος στην καλλιέργεια και στη δοκιμή είναι συνήθως 16 ώρες (3), (7). Η ένταση φωτός θα πρέπει να είναι χαμηλή (π.χ. 100-500 lx), παρόμοια με φυσικές συνθήκες στην επιφάνεια του ιζήματος, και να μετρηθεί τουλάχιστον μία φορά κατά την περίοδο της έκθεσης. Η θερμοκρασία θα πρέπει να είναι 20 °C ± 2 °C καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Σε μια δεδομένη ημερομηνία μέτρησης, η διαφορά της θερμοκρασίας μεταξύ των δοχείων δοκιμής δεν θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από ±1 °C. Τα δοχεία δοκιμής θα πρέπει να τοποθετούνται στον επωαστήρα δοκιμής ή στην περιοχή δοκιμής τυχαία, π.χ. για την ελαχιστοποίηση της μεροληψίας στην αναπαραγωγή λόγω της θέσης του δοχείου.

Αερισμός

44. Το υπερκείμενο νερό των δοχείων δοκιμής θα πρέπει να αερίζεται ήπια (π.χ. 2-4 φυσαλίδες το δευτερόλεπτο) μέσω σιφωνίου Pasteur, το οποίο τοποθετείται περίπου 2 cm πάνω από την επιφάνεια του ιζήματος για την ελαχιστοποίηση της διαταραχής του ιζήματος. Μέριμνα πρέπει να λαμβάνεται ώστε η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου να μην κατεβαίνει κάτω από το 30 % της τιμής κορεσμού με αέρα (ASV). Η παροχή αέρα θα πρέπει να ελέγχεται και -αν είναι ανάγκη- να προσαρμόζεται τουλάχιστον μία φορά ημερησίως τις εργάσιμες ημέρες.

Μετρήσεις ποιότητας νερού

45. Οι ακόλουθες παράμετροι για την ποιότητα του νερού θα πρέπει να μετριούνται στο υπερκείμενο νερό:

Θερμοκρασία:	τουλάχιστον σε ένα δοχείο δοκιμής για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης και ένα δοχείο δοκιμής των μαρτύρων μία φορά την εβδομάδα και στην αρχή και στο τέλος της περιόδου έκθεσης· αν είναι δυνατόν, μπορεί να καταγράφεται επιπλέον η θερμοκρασία στο περιβάλλον μέσο (αέρας περιβάλλοντος ή υδατόλουτρο) π.χ. σε ωριαία διαστήματα·

▼**M6**

Περιεκτικότητα σε διαλυμένο οξυγόνο:	τουλάχιστον σε ένα δοχείο δοκιμής για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης και ένα δοχείο δοκιμής των μαρτύρων μία φορά την εβδομάδα και στην αρχή και στο τέλος της περιόδου έκθεσης· εκφραζόμενη ως mg/l και % ASV (τιμή κορεσμού με αέρα)·
Παροχή αέρα:	θα πρέπει να ελέγχεται τουλάχιστον μία φορά ημερησίως τις εργάσιμες ημέρες και –αν χρειαστεί–να προσαρμόζεται·
pH:	τουλάχιστον σε ένα δοχείο δοκιμής για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης και ένα δοχείο δοκιμής των μαρτύρων μία φορά την εβδομάδα και στην αρχή και στο τέλος της περιόδου έκθεσης·
Συνολική σκληρότητα νερού:	τουλάχιστον σε έναν μάρτυρα και σε ένα δοχείο δοκιμής στην ανώτατη συγκέντρωση στην αρχή και στο τέλος της περιόδου έκθεσης· εκφραζόμενη ως mg/l $CaCO_3$·
Συνολική περιεκτικότητα σε αμμωνία:	τουλάχιστον σε έναν μάρτυρα και σε ένα δοχείο δοκιμής για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης στην αρχή της περιόδου έκθεσης και στη συνέχεια 3 x ανά εβδομάδα· εκφραζόμενη ως mg/l NH_4^+ ή NH_3 ή συνολική αμμωνία -N.

Αν η μέτρηση των παραμέτρων ποιότητας του νερού απαιτεί την αφαίρεση σημαντικών δειγμάτων νερού από τα δοχεία, μπορεί να είναι προτιμητέο να τοποθετηθούν ξεχωριστά δοχεία για τις μετρήσεις ποιότητας του νερού, ώστε να μην αλλοιώνεται η αναλογία όγκος νερού προς ίζημα.

Βιολογικές παρατηρήσεις

46. Κατά την έκθεση, τα δοχεία δοκιμής θα πρέπει να παρατηρούνται για την οπτική εκτίμηση τυχόν διαφορών στη συμπεριφορά των σκωλήκων (π.χ. αποφυγή ιζήματος, περιττώματα εμφανή στην επιφάνεια του ιζήματος) σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Οι παρατηρήσεις θα πρέπει να καταγράφονται.

47. Στο τέλος της δοκιμής, εξετάζεται κάθε δοχείο της δοκιμής (πρόσθετα δοχεία που προορίζονται για χημικές αναλύσεις μπορούν να αποκλείονται από την εξέταση). Θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί κατάλληλη μέθοδος για να ανακτηθούν όλοι οι σκώληκες από το δοχείο δοκιμής. Μέριμνα πρέπει να λαμβάνεται ώστε όλοι οι σκώληκες να ανακτώνται αλώβητοι. Μια πιθανή μέθοδος είναι το κοσκίνισμα των σκωλήκων από το ίζημα. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί πλέγμα ανοξείδωτου χάλυβα με διάμετρο οπών κατάλληλου μεγέθους. Το μεγαλύτερο μέρος του υπερκείμενου νερού μεταγγίζεται προσεκτικά και το εναπομείναν ίζημα και νερό ανακινείται ώστε να προκύψει πολτός που μπορεί να περάσει μέσα από το κόσκινο. Αν χρησιμοποιηθεί κόσκινο με διάμετρο οπής 500 μm, τα περισσότερα σωματίδια του ιζήματος θα περάσουν πολύ γρήγορα από το κόσκινο· ωστόσο, το κοσκίνισμα θα πρέπει να γίνει γρήγορα, ώστε οι σκώληκες να μην μπορούν να ανέβουν στο κόσκινο ή να περάσουν μέσα από τις οπές. Αν χρησιμοποιηθεί κόσκινο με διάμετρο οπής 250 μm οι σκώληκες δεν θα μπορούν να ανέβουν στο κόσκινο ή να περάσουν μέσα από τις οπές· ωστόσο, μέριμνα πρέπει να λαμβάνεται ώστε το κόσκινο να μη συγκρατεί παρά ελάχιστα σωματίδια από το ίζημα. Ο κοσκινισμένος πολτός κάθε δοχείου επαναληπτικής δοκιμής μπορεί να περάσει μέσα από κόσκινο δεύτερη φορά, ώστε να διασφαλίζεται ότι ανακτώνται όλοι οι σκώληκες. Μια εναλλακτική μέθοδος θα ήταν η θέρμανση του ιζήματος με την τοποθέτηση των δοχείων δοκιμής στο υδατόλουτροπο στους 50-60 °C· οι σκώληκες απομακρύνονται από το ίζημα και μπορούν να συλλέγονται από την επιφάνεια του ιζήματος με τη χρήση ευρύστομου σιφωνίου του οποίου τα άκρα έχουν λειανθεί με φλόγα. Μια άλλη μέθοδος θα ήταν η παραγωγή πολτού ιζήματος και η μετάγγιση του πολτού αυτού σε ρηχό σκεύος κατάλληλου μεγέθους. Από το ρηχό επίπεδο, οι σκώληκες μπορούν να ανακτηθούν με χαλύβδινη λαβίδα ή τσιμπίδες με ελατήριο ωρολογοποιών (να χρησιμοποιούνται σαν πηρούνι και όχι ως πένσα ώστε να μην τραυματίζονται οι σκώληκες) και να μεταφερθούν σε καθαρό νερό. Αφού διαχωριστούν οι σκώληκες από τον πολτό ιζήματος, εκπλένονται στο μέσο δοκιμής και καταμετρώνται.

48. Ανεξάρτητα από τη μέθοδο που χρησιμοποιείται, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδείξουν ότι το προσωπικό τους είναι σε θέση να ανακτά τουλάχιστον

▼M6

το 90 % κατά μέσο όρο των οργανισμών από όλο το ίζημα. Για παράδειγμα, θα μπορούσε να προστεθεί ένας συγκεκριμένος αριθμός οργανισμών δοκιμής στο ίζημα-μάρτυρα ή στα ιζήματα δοκιμής και η ανάκτησή τους να καθοριστεί μετά από 1 ώρα (7).

49. Ο συνολικός αριθμός των ζώντων και νεκρών ατόμων ανά δοχείο επανάληψης καταγράφεται και αξιολογείται. Οι ακόλουθες ομάδες σκωλήκων θεωρούνται νεκρές:

α) δεν υπάρχει αντίδραση σε ήπιο μηχανικό ερέθισμα·

β) υπάρχουν σημεία αποσύνθεσης [σε συνδυασμό με το στοιχείο α)]·

γ) αριθμός εκλιπόντων σκωλήκων.

Επιπλέον, οι ζώντες σκώληκες μπορούν να αποδοθούν σε μία από τις τρεις ομάδες:

α) μεγάλοι ολόκληροι σκώληκες (ενήλικοι) χωρίς αναγεννημένα μέρη σώματος·

β) ολόκληροι σκώληκες χωρίς αναγεννημένα μέρη σώματος με ανοιχτότερο χρώμα (δηλ. με νέο οπίσθιο μέρος, με νέο πρόσθιο μέρος, ή και με τα δύο, πρόσθιο και οπίσθιο μέρος)·

γ) ατελείς σκώληκες (δηλ. πρόσφατα κατατετμημένοι με μη αναγεννημένα μέρη σώματος).

Αυτές οι πρόσθετες παρατηρήσεις δεν είναι υποχρεωτικές αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για πρόσθετη ερμηνεία των βιολογικών αποτελεσμάτων (για παράδειγμα, μεγάλος αριθμός σκωλήκων στην ομάδα γ μπορεί να σημαίνει καθυστέρηση αναπαραγωγής ή αναγέννηση σε συγκεκριμένη αγωγή). Επιπροσθέτως, τυχόν διαφορές που παρατηρούνται στην εμφάνιση (π.χ. βλάβες στο καλυπτήριο σύστημα, μέρη του σώματος με οιδήματα) μεταξύ σκωλήκων υπό αγωγή και μαρτύρων πρέπει να καταγράφονται.

50. Αμέσως μετά τη μέτρηση/αξιολόγηση, οι ζώντες σκώληκες που βρίσκονται σε κάθε δοχείο επανάληψης μεταφέρονται σε ξηρά, προζυγισμένα και επισημασμένα ρηχά σκεύη (ένα ανά επανάληψη) και θανατώνονται με μια σταγόνα αιθανόλης ανά σκεύος. Τα σκεύη τοποθετούνται σε κλίβανο ξήρανσης στους 100 ± 5 °C για να ξηρανθούν όλη τη νύκτα και στη συνέχεια ζυγίζονται αφού κρυώσουν σε ξηραντήρα και προσδιορίζεται το ξηρό βάρος των σκωλήκων (κατά προτίμηση σε g, τουλάχιστον με τέσσερα δεκαδικά ψηφία).

51. Εκτός από το συνολικό ξηρό βάρος, το ξηρό βάρος πλην τέφρας μπορεί να προσδιοριστεί όπως περιγράφεται στο (49) ώστε να υπολογιστούν τα ανόργανα συστατικά που προέρχονται από το προσληφθέν ίζημα που είναι παρόν στο πεπτικό σύστημα των σκωλήκων.

52. Η βιομάζα προσδιορίζεται ως συνολική βιομάζα ανά επανάληψη συμπεριλαμβανομένων ενήλικων και νεαρών σκωλήκων. Οι νεκροί σκώληκες δεν θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη για τον προσδιορισμό της βιομάζας ανά επανάληψη.

Επαλήθευση των συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας

Δειγματοληψία

53. Τα δείγματα για τη χημική ανάλυση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να λαμβάνονται τουλάχιστον στην υψηλότερη συγκέντρωση και σε μια χαμηλότερη, τουλάχιστον στο τέλος της φάσης εξισορρόπησης (πριν από την προσθήκη των οργανισμών δοκιμής), και στο τέλος της δοκιμής. Δείγματα θα πρέπει να λαμβάνονται για ανάλυση τουλάχιστον από την κύρια μάζα του ιζήματος και το υπερκείμενο νερό. Θα πρέπει να λαμβάνονται τουλάχιστον δύο δείγματα ανά μήτρα και αγωγή σε κάθε ημερομηνία δειγματοληψίας. Ένα από τα επαναλαμβανόμενα δείγματα μπορεί να αποθηκεύεται ως εφεδρικό (και να αναλύεται π.χ. σε περίπτωση που η αρχική ανάλυση ξεφεύγει από το εύρος του ± 20 % της ονομαστικής συγκέντρωσης). Στην περίπτωση ειδικών χημικών ιδιοτήτων, π.χ. αν αναμένεται ταχεία αποσύνθεση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, μπορεί να τροποποιηθεί το

▼M6

αναλυτικό πρόγραμμα (π.χ. πιο συχνή δειγματοληψία, ανάλυση περισσότερων επιπέδων συγκέντρωσης) βάσει κρίσης εμπειρογνώμονα. Στην περίπτωση αυτή μπορούν να ληφθούν δείγματα σε ενδιάμεσες ημερομηνίες δειγματοληψίας (π.χ. την έβδομη ημέρα μετά την έναρξη της έκθεσης).

54. Η δειγματοληψία από το υπερκείμενο νερό θα πρέπει να γίνεται προσεκτικά με μετάγγιση ή σιφωνισμό του υπερκείμενου νερού, ώστε να ελαχιστοποιείται η διαταραχή του ιζήματος. Καταγράφεται ο όγκος των δειγμάτων.

55. Αφού αφαιρεθεί το υπερκείμενο νερό, το ίζημα θα πρέπει να ομογενοποιείται και να μεταφέρεται σε κατάλληλο περιέκτη. Καταγράφεται το βάρος του δείγματος υγρού ιζήματος.

56. Αν χρειάζεται πρόσθετη ανάλυση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο ενδοπορικό νερό, τα ομογενοποιημένα και σταθμισμένα δείγματα του ιζήματος θα πρέπει να φυγοκεντρούνται για να προκύψει ενδοπορικό νερό. Για παράδειγμα, κατά προσέγγιση 200 ml υγρού ιζήματος μπορούν να γεμίσουν ποτήρια ζέσεως 250 ml. Στη συνέχεια, τα δείγματα θα πρέπει να φυγοκεντρηθούν χωρίς διήθηση για απομόνωση του ενδοπορικού νερού, π.χ. σε 10 000 ± 600 × *g* για 30 - 60 min σε θερμοκρασία που δεν υπερβαίνει τη θερμοκρασία που χρησιμοποιείται στη δοκιμή. Μετά τη φυγοκέντρηση, αυτό που περισσεύει μεταφέρεται προσεκτικά με μετάγγιση ή σιφωνισμό με προσοχή ώστε να μην εισάγονται σωματίδια από το ίζημα, και καταγράφεται ο όγκος. Καταγράφεται το βάρος του εναπομένοντος ιζήματος. Η εκτίμηση του ισοζυγίου μάζας ή η ανάκτηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο σύστημα νερό-ίζημα μπορεί να διευκολυνθεί, αν το ξηρό βάρος ιζήματος προσδιορίζεται σε κάθε ημερομηνία δειγματοληψίας. Σε ορισμένες περιπτώσεις δεν θα είναι δυνατόν να αναλυθούν συγκεντρώσεις στο ενδοπορικό νερό καθώς το μέγεθος δείγματος είναι πολύ μικρό.

57. Αν δεν γίνει αμέσως ανάλυση, όλα τα δείγματα φυλάσσονται με κατάλληλη μέθοδο, π.χ. σε συνθήκες αποθήκευσης που συνιστώνται για ελάχιστη βιοαποικοδόμηση της συγκεκριμένης υπό δοκιμή χημικής ουσίας (π.χ. τα περιβαλλοντικά δείγματα συνήθως αποθηκεύονται σε – 18 °C στο σκοτάδι). Πρέπει να λαμβάνονται πληροφορίες για τις σωστές συνθήκες αποθήκευσης για τη συγκεκριμένη υπό δοκιμή ουσία –για παράδειγμα, διάρκεια και θερμοκρασία αποθήκευσης, διαδικασίες εκχύλισης κ.λπ.– πριν από την έναρξη της μελέτης.

Αναλυτική μέθοδος

58. Επειδή η όλη διαδικασία εξαρτάται βασικά από την ακρίβεια (accuracy), την πιστότητα (precision) και την ευαισθησία της αναλυτικής μεθόδου που χρησιμοποιείται για την υπό δοκιμή χημική ουσία, πρέπει να ελέγχεται πειραματικά αν η ακρίβεια και η αναπαραγωγιμότητα της χημικής ανάλυσης, καθώς επίσης και η ανάκτηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας από τα δείγματα νερού και ιζήματος είναι ικανοποιητικές για τη συγκεκριμένη μέθοδο, τουλάχιστον στην κατώτατη και στην ανώτατη συγκέντρωση δοκιμής. Ομοίως, πρέπει να εξακριβώνεται ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν είναι ανιχνεύσιμη στους θαλάμους-μάρτυρες σε συγκεντρώσεις που υπερβαίνουν το όριο ποσοτικού προσδιορισμού. Αν χρειαστεί, διορθώνονται οι ονομαστικές συγκεντρώσεις για την ανάκτηση των εμβολιασμένων δειγμάτων ελέγχου της ποιότητας (π.χ. όταν η ανάκτηση είναι εκτός του 80 - 120 % της εμβολιασμένης ποσότητας). Ο χειρισμός όλων των δειγμάτων καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής γίνεται με τρόπο ώστε να ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος επιμόλυνσης και απωλειών (π.χ. λόγω προσρόφησης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στη συσκευή δειγματοληψίας).

59. Η ανάκτηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, το όριο του ποσοτικού προσδιορισμού κα το όριο της ανίχνευσης στο ίζημα και το νερό θα πρέπει να καταγράφονται και να αναφέρονται.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

60. Οι κύριες υποχρεωτικές μεταβλητές για την απόκριση της δοκιμής που πρέπει να αξιολογούνται στατιστικώς είναι η βιομάζα και ο συνολικός αριθμός των σκωλήκων ανά επανάληψη. Προαιρετικά, θα μπορούσαν να αξιολογηθούν επίσης η αναπαραγωγή (ως αύξηση του αριθμού των σκωλήκων) και η ανάπτυξη (ως αύξηση της ξηρής βιομάζας). Στην περίπτωση αυτή πρέπει να γίνει η εκτίμηση του ξηρού βάρους των σκωλήκων στην αρχή της έκθεσης π.χ. με μέτρηση του ξηρού βάρους αντιπροσωπευτικού μερικού δείγματος της παρτίδας των συγχρονισμένων σκωλήκων που θα χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή.

▼M6

61. Αν και η θνησιμότητα δεν είναι τελικό σημείο της δοκιμής αυτής, ο αριθμός των νεκρών σκωλήκων πρέπει να αξιολογείται κατά το δυνατόν. Για την εκτίμηση της θνησιμότητας, όσοι σκώληκες δεν αντιδρούν σε ήπιο μηχανικό ερέθισμα ή δείχνουν σημάδια αποικοδόμησης, και οι εκλιπόντες σκώληκες πρέπει να θεωρούνται νεκροί. Οι νεκροί σκώληκες θα πρέπει τουλάχιστον να καταγράφονται και συνεκτιμώνται κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμής.

62. Οι αποτελεσματικές συγκεντρώσεις θα πρέπει να εκφράζονται σε mg/kg ξηρού βάρους ιζήματος. Αν η ανάκτηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που μετριέται στο ίζημα ή στο ίζημα και στο υπερκείμενο νερό στην αρχή της έκθεσης είναι μεταξύ 80 και 120 % των ονομαστικών συγκεντρώσεων, οι αποτελεσματικές συγκεντρώσεις (EC_x, NOEC, LOEC) μπορούν να εκφραστούν βάσει των ονομαστικών συγκεντρώσεων. Αν η ανάκτηση αποκλίνει από τις ονομαστικές συγκεντρώσεις κατά ± 20 % και πλέον των ονομαστικών συγκεντρώσεων, οι αποτελεσματικές συγκεντρώσεις (EC_x, NOEC, LOEC) θα πρέπει να βασίζονται στις αρχικά μετρούμενες συγκεντρώσεις στην αρχή της έκθεσης, π.χ. λαμβανομένου υπόψη του ισοζυγίου μάζας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο σύστημα δοκιμής (βλ. σημείο 30). Στις περιπτώσεις αυτές, πρόσθετες πληροφορίες μπορούν να αποκτηθούν από την ανάλυση των διαλυμάτων παρακαταθήκης και/ή εφαρμογής, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι τα ιζήματα δοκιμής παρασκευάστηκαν σωστά.

EC_x

63. Οι τιμές της EC_x, για τις παραμέτρους που περιγράφονται στο σημείο 60 υπολογίζονται με κατάλληλες στατιστικές μεθόδους (π.χ. ανάλυση Probit, λογιστική συνάρτηση ή συνάρτηση Weibull, απλοποιημένη μέθοδος Spearman-Karber ή απλή παρεμβολή). Οδηγίες για τη στατιστική αξιολόγηση παρέχονται στις παραγράφους (15) και (50). Η EC_x λαμβάνεται εάν εισαχθεί στην εξίσωση τιμή που να αντιστοιχεί στο x % του μέσου όρου του μάρτυρα. Για τον υπολογισμό της EC_{50} ή οποιασδήποτε άλλης EC_x, οι μέσοι όροι ανά αγωγή ($\overline{X}$) θα πρέπει να υποβάλλονται σε ανάλυση παλινδρόμησης.

NOEC/LOEC

64. Εάν μια στατιστική ανάλυση αποσκοπεί στον προσδιορισμό των NOEC/LOEC, απαιτούνται στατιστικά στοιχεία ανά δοχείο (το κάθε δοχείο θεωρείται επανάληψη). Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οι κατάλληλες στατιστικές μέθοδοι. Γενικώς, οι δυσμενείς επιδράσεις του υπό δοκιμή τεμαχίου σε σύγκριση με τον μάρτυρα διερευνώνται μέσω μονόπλευρου (μικρότερου) ελέγχου στατιστικής υπόθεσης με $p \leq 0,05$. Δίνονται στις ακόλουθες παραγράφους. Οδηγίες για την επιλογή των κατάλληλων στατιστικών μεθόδων παρέχονται στα (15) και (50).

65. Η κανονική κατανομή των δεδομένων μπορεί να ελεγχθεί πχ. με τον έλεγχο κανονικότητας Kolmogorov-Smirnov, τον έλεγχο διαστήματος τυπικής απόκλισης (δοκιμή R/s) ή τον έλεγχο Shapiro-Wilk (αμφίπλευρος, $p \leq 0,05$). Για τον έλεγχο της ομοιογένειας της διασποράς μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι έλεγχοι Cochran, Levene ή Bartlett, (αμφίπλευρος, $p \leq 0,05$). Αν ικανοποιούνται τα προαπαιτούμενα των διαδικασιών παραμετρικής δοκιμασίας (κανονικότητα, ομοιογενείς διασπορές), μπορούν να διεξαχθούν μονόδρομη ανάλυση της διασποράς (ANOVA) και επακόλουθες δοκιμασίες πολλαπλών συγκρίσεων. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν συγκρίσεις ανά ζεύγη (π.χ. δοκιμασία Dunnett) ή καθοδικά εφαρμοζόμενες δοκιμασίες τάσεων (π.χ. δοκιμασία Williams) για να υπολογιστεί αν υπάρχουν σημαντικές διαφορές ($p \leq 0,05$) μεταξύ των μαρτύρων και των διαφόρων συγκεντρώσεων του υπό δοκιμή τεμαχίου. Διαφορετικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν μη παραμετρικές μέθοδοι (π.χ. Bonferroni-U κατά τον Holm ή έλεγχος φθίνουσας τάσης κατά Jonckheere-Terpstra) για τον προσδιορισμό των τιμών NOEC και LOEC.

Οριακή δοκιμή

66. Αν έχει διεξαχθεί οριακή δοκιμή (σύγκριση του μάρτυρα και μίας αγωγής μόνο) και πληρούνται οι προϋποθέσεις των διαδικασιών παραμετρικής δοκιμής (κανονικότητα, ομοιογένεια), οι μετρικές αποκρίσεις (συνολικός αριθμός σκωλήκων και βιομάζας ως ξηρό βάρος σκωλήκων) μπορούν να αξιολογούνται με τη δοκιμασία Student (έλεγχος t). Εάν δεν πληρούνται οι απαιτήσεις αυτές, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο έλεγχος t άνισης διασποράς (Welch-t) ή ένας μη παραμετρικός έλεγχος, όπως ο Mann-Whitney-U. Ορισμένες πληροφορίες για τη στατιστική ισχύ που διαπιστώνονται κατά τις δοκιμές υπόθεσης στη δοκιμή δακτυλίου της μεθόδου δοκιμών δίνονται στο προσάρτημα 6.

▼M6

67. Για τον προσδιορισμό σημαντικών διαφορών μεταξύ των μαρτύρων (μάρτυρας και μάρτυρας με διαλύτη), οι επαναλήψεις κάθε μάρτυρα μπορούν να ελέγχονται με τον τρόπο που περιγράφεται για την οριακή δοκιμή. Εάν με τους ελέγχους αυτούς δεν εντοπίζονται σημαντικές διαφορές, μπορεί να γίνει συνένωση όλων των επαναλήψεων του μάρτυρα και του μάρτυρα με διαλύτη. Διαφορετικά, όλες οι αγωγές θα πρέπει να συγκρίνονται με τον μάρτυρα με διαλύτη.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

68. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή αν οι μετρούμενες συγκεντρώσεις των συγκεντρώσεων δοκιμής βρίσκονται σε επίπεδα κοντά στο όριο ανίχνευσης της χρησιμοποιούμενης αναλυτικής μεθόδου. Τυχόν αποκλίσεις από τη μέθοδο αυτή πρέπει να σημειώνονται.

Έκθεση δοκιμής

69. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον τα ακόλουθα στοιχεία:

— *Υπό δοκιμή χημική ουσία:*

— στοιχεία ταυτοποίησης της χημικής ουσίας (κοινή ονομασία, χημική ονομασία, συντακτικός τύπος, αριθμός CAS κ.λπ.), συμπεριλαμβανομένων της καθαρότητας και της αναλυτικής μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό της υπό δοκιμή χημικής ουσίας· πηγή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, ταυτότητα και συγκέντρωση του διαλύτη που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκε·

— άλλες διαθέσιμες πληροφορίες για τις φυσικές ιδιότητες και τις φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως έχουν πριν από την έναρξη της δοκιμής [π.χ. υδατοδιαλυτότητα, τάση ατμών, συντελεστής κατανομής στο έδαφος (ή στο ίζημα, εάν είναι διαθέσιμος), log K_{ow}, σταθερότητα στο νερό κ.λπ.]·

— *Είδος δοκιμής:*

— επιστημονική ονομασία, πηγή, τυχόν προηγηθείσα αγωγή, εγκλιματισμός, συνθήκες καλλιέργειας κ.λπ.

— *Συνθήκες δοκιμής:*

— εφαρμοζόμενη διαδικασία δοκιμής (π.χ. στατική, ημιστατική ή συνεχούς ροής νερού)·

— σχεδιασμός δοκιμής (π.χ. αριθμός, υλικό και μέγεθος θαλάμων δοκιμής, όγκος νερού ανά δοχείο, μάζα και όγκος ιζήματος ανά δοχείο, ρυθμός αντικατάστασης του όγκου νερού (για διαδικασίες συνεχούς ροής νερού ή ημιστατικές διαδικασίες), κάθε αερισμός που χρησιμοποιείται πριν και κατά τη διάρκεια της δοκιμής, αριθμός των επαναλήψεων, αριθμός των σκωλήκων ανά επανάληψη στην αρχή της έκθεσης, αριθμός των συγκεντρώσεων δοκιμής, διάρκεια περιόδων έκθεσης και εξισορρόπησης, συχνότητα δειγματοληψίας)·

— βάθος του ιζήματος και του υπερκείμενου νερού·

— μέθοδος προκατεργασίας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και εμβολιασμού/εφαρμογής·

— οι ονομαστικές συγκεντρώσεις δοκιμής, λεπτομέρειες για τη δειγματοληψία για χημική ανάλυση και τις αναλυτικές μεθόδους με τις οποίες αποκτώνται οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας·

— τα χαρακτηριστικά του ιζήματος όπως περιγράφεται στις παραγράφους 24 — 25 και οποιεσδήποτε άλλες μετρήσεις έγιναν· παρασκευή του μορφοποιημένου ιζήματος·

— παρασκευή του νερού δοκιμής (αν χρησιμοποιείται ανασυσταθέν νερό) και τα χαρακτηριστικά του (συγκέντρωση οξυγόνου, pH, αγωγιμότητα, σκληρότητα και τυχόν άλλες μετρήσεις) πριν από την έναρξη της δοκιμής·

— λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη σίτιση, συμπεριλαμβανομένων του είδους τροφής, της παρασκευής, της ποσότητας και του καθεστώτος σίτισης·

▼**M6**

— ένταση φωτισμού και φωτοπερίοδος/-οι·

— μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για όλες τις βιολογικές παραμέτρους (π.χ. δειγματοληψία, επιθεώρηση, ζύγιση των οργανισμών δοκιμής) και όλες τις αβιοτικές παραμέτρους (π.χ. παράμετροι ποιότητας νερού και ιζήματος)·

— όγκοι και/ή βάρη όλων των δειγμάτων για χημική ανάλυση·

— λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με την κατεργασία όλων των δειγμάτων για χημική ανάλυση, συμπεριλαμβανομένων λεπτομερειών για την παρασκευή, την αποθήκευση, τις διαδικασίες εμβολιασμού, την εκχύλιση και τις αναλυτικές διαδικασίες (και ακρίβεια) για την υπό δοκιμή χημική ουσία, και ανακτήσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

— *Αποτελέσματα:*

— ποιότητα του νερού εντός των δοχείων δοκιμής (pH, θερμοκρασία, συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου, σκληρότητα, συγκεντρώσεις αμμωνίας και τυχόν άλλες μετρήσεις)·

— συνολική περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (TOC), αναλογία ξηρού βάρους προς υγρό βάρος, pH του ιζήματος και τυχόν άλλες μετρήσεις·

— ο συνολικός αριθμός, και αν προσδιοριστεί, ο αριθμός των ολόκληρων και ατελών σκωλήκων σε κάθε θάλαμο δοκιμής στο τέλος της δοκιμής·

— ξηρό βάρος των σκωλήκων σε κάθε θάλαμο δοκιμής στο τέλος της δοκιμής και, αν μετρηθεί, το ξηρό βάρος ενός μερικού δείγματος των σκωλήκων στην αρχή της δοκιμής·

— τυχόν παρατηρούμενη ανώμαλη συμπεριφορά σε σύγκριση με τους μάρτυρες (π.χ. αποφυγή του ιζήματος, παρουσία ή απουσία περιττωμάτων)·

— τυχόν παρατηρούμενη θνησιμότητα στους σκώληκες·

— εκτιμήσεις των τοξικών τελικών σημείων, (π.χ. EC_x, NOEC και/ή LOEC), και οι στατιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό τους·

— ονομαστικές συγκεντρώσεις δοκιμής, μετρούμενες συγκεντρώσεις δοκιμής και τα αποτελέσματα όλων των αναλύσεων για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στα δοχεία δοκιμής·

— τυχόν αποκλίσεις από τα κριτήρια εγκυρότητας.

— *Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων:*

— συμμόρφωση των αποτελεσμάτων με τα κριτήρια εγκυρότητας που αναφέρονται στο σημείο 13·

— συζήτηση των αποτελεσμάτων, συμπεριλαμβανομένων τυχόν αποκλίσεων από την παρούσα μέθοδο δοκιμών στην έκβαση της δοκιμής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) EC (2003). Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I — IV. Office for Official Publications of the EC (European Commission), Λουξεμβούργο.

(2) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Παρίσι.

▼**M6**

(3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(4) ASTM International (2002). Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, E1706-00. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(5) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.

(6) Κεφάλαιο Γ.27 του παρόντος παραρτήματος, «Δοκιμή τοξικότητας σε χειρονομίδες σε σύστημα ιζήματος-νερού με τη χρήση εμβολιασμένου ιζήματος».

(7) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, Μάρτιος 2000.

(8) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

(9) Hill, I.R., Matthiessen, P., Heimbach, F. (eds), 1993, Guidance document on Sediment Toxicity Tests and Bioassays for freshwater and Marine Environments, From the SETAC-Europe Workshop On Sediment Toxicity Assessment, 8-10 November 1993, Renesse (NL).

(10) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

(11) Riedhammer C. & B. Schwarz-Schulz (2001). The Newly Proposed EU Risk Assessment Concept for the Sediment Compartment. J. Soils Sediments 1(2), 105-110.

(12) ASTM International (2004). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1391-03.

(13) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

(14) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(15) Environment Canada (2003). Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests; fifth draft, March 2003; Report EPS 1/RM/

(16) Nikkilä A., Halme A., Kukkonen J.V.K. (2003). Toxicokinetics, toxicity and lethal body residues of two chlorophenols in the oligochaete worm, *Lumbriculus variegatus*, in different sediments. Chemosphere 51: 35-46.

(17) Baily H.C., & Liu D.H.W. (1980). *Lumbriculus variegatus*, a Benthic Oligochaete, as a Bioassay Organism. p. 205-215. In J.C. Eaton, P.R. Parrish, and A.C. Hendricks (eds). Aquatic Toxicology, ASTM STP 707. American Society for Testing and Materials.

▼**M6**

(18) Chapman K. K., Benton M. J., Brinkhurst R. O. & Scheuerman P. R. (1999). Use of the aquatic oligochaetes *Lumbriculus variegatus* and *Tubifex tubifex* for assessing the toxicity of copper and cadmium in a spiked-artificial-sediment toxicity test. Environmental Toxicology. 14(2): 271-278.

(19) Meyer J.S., Boese C.J. & Collyard S.A. (2002). Whole-body accumulation of copper predicts acute toxicity to an aquatic oligochaete (*Lumbriculus variegatus*) as pH and calcium are varied. Comp. Biochem. Physiol. Part C 133:99-109.

(20) Schubauer-Berigan M.K., Dierkes J.R., Monson P.D. & Ankley G.T. (1993). pH-dependent toxicity of cadmium, copper, nickel, lead and zinc to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca* and *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxciol. Chem. 12(7):1261-1266.

(21) West, C.W., V.R. Mattson, E.N. Leonard, G.L. Phipps & G.T. Ankley (1993). Comparison of the relative sensitivity of three benthic invertebrates to copper-contaminated sediments from the Keweenaw Waterway. Hydrobiol. 262:57-63.

(22) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. and Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.

(23) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.

(24) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

(25) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). Hydrobiologia 377: 183-194.

(26) Landrum, P.F., Gedeon, M.L., Burton, G.A., Greenberg. M.S., & Rowland, C.D. (2002). Biological Responses of *Lumbriculus variegatus* Exposed to Fluoranthene-Spiked Sediment. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 42: 292-302.

(27) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191-201.

(28) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty. J. and Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of non-ionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872-885.

(29) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.

(30) Liebig, M., Egeler, Ph. Oehlmann, J., & Knacker, Th. (2005). Bioaccumulation of ^{14}C-17α-ethinylestradiol by the oligochaete *Lumbriculus variegatus* in artificial sediment. Chemosphere 59, 271-280.

(31) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, σ. 2000–2007.

(32) Oetken, M., K.-U. Ludwichowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, Μάρτιος 2000.

▼**M6**

(33) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503-1508.

(34) Dermott R. & Munawar M. (1992). A simple and sensitive assay for evaluation of sediment toxicity using *Lumbriculus variegatus* (Müller). Hydrobiologia 235/236: 407-414.

(35) Drewes C.D. & Fourtner C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. Develop. Biol. 138: 94-103.

(36) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22.

(37) Κεφάλαιο Γ.1 του παρόντος παραρτήματος, Δοκιμή οξείας τοξικότητας σε ψάρια.

(38) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Παρίσι.

(39) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835-852.

(40) Meller, M., P. Egeler, J. Roembke, H. Schallnass, R. Nagel and B. Streit. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulphate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety, 39, 10-20.

(41) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on «Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes», 26.-27.4.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.

(42) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1163-1175.

(43) Naylor, C. and C. Rodrigues. (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

(44) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. Hydrobiologia 11, 181-184.

(45) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* (Müller) reproduction sediment bioassay. Ecotoxicology 8, 111-124.

(46) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(47) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. Environ. Sci. Technol. 23, 588-595.

(48) Brooke, L.T., Ankley, G.T., Call, D.J. & Cook, P.M. (1996). Gut content and clearance for three species of freshwater invertebrates. Environ. Toxicol. Chem. 15, 223-228.

(49) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxicol. Chem. 18, 1244-1249.

▼**M6**

(50) OECD 2006. Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. OECD Series on Testing and Assessment No. 54, OECD, Παρίσι, Γαλλία.

(51) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten — Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Γερμανία, σ. 107-119.

Πρόσθετη βιβλιογραφία για τις στατιστικές διαδικασίες:

Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.

Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), σ. 19-76. Cambridge Univ. Press.

Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. Charles Griffin & Company Ltd, Λονδίνο.

Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction: Environ. Sci. Technol. 12 (1998), 417.

Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981) Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. Νέα Υόρκη.

Miller, R.G., Jr. (1986). Beyond ANOVA, basics of applied statistics. John Wiley & Sons. Νέα Υόρκη.

Shapiro S.S. & Wilk M.B (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika 52: 591-611.

Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.

Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519 531.

▼M6

Προσάρτημα 1

Ορισμοί

Για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου δοκιμών χρησιμοποιούνται οι ακόλουθοι ορισμοί:

Χημική ουσίαμια ουσία ή ένα μείγμα.

Η **περίοδος εγκλιματισμού** χρησιμοποιείται για να σταθεροποιηθεί το μικροβιακό συστατικό του ιζήματος και να αφαιρεθεί π.χ. η αμμωνία που προέρχεται από συστατικά του ιζήματος· λαμβάνει χώρα πριν από τον εμβολιασμό του ιζήματος με την υπό δοκιμή χημική ουσία. Συνήθως, το υπερκείμενο νερό απορρίπτεται μετά τον εγκλιματισμό.

EC_x: η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο ίζημα που έχει επίδραση x % (π.χ. 50 %) σε μια βιολογική παράμετρο εντός συγκεκριμένης περιόδου έκθεσης.

Η **περίοδος εξισορρόπησης** επιτρέπει την κατανομή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μεταξύ της στερεής φάσης, του ενδοπορικού νερού και του υπερκείμενου νερού· λαμβάνει χώρα μετά τον εμβολιασμό του ιζήματος με την υπό δοκιμή χημική ουσία και πριν από την προσθήκη των οργανισμών δοκιμής.

Φάση έκθεσης: το χρονικό διάστημα κατά το οποίο οι οργανισμοί δοκιμής εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία.

Μορφοποιημένο ίζημα ή ανασυσταθέν, τεχνητό ή συνθετικό ίζημα: ένα μείγμα υλικών που χρησιμοποιείται για να απομιμείται τα φυσικά συστατικά ενός φυσικού ιζήματος.

Κατώτατη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης (LOEC): η χαμηλότερη συγκέντρωση μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην οποία παρατηρείται ότι μια ουσία έχει σημαντική τοξική επίδραση (με $p \leq 0,05$), συγκριτικά με τον μάρτυρα. Ωστόσο, όλες οι συγκεντρώσεις δοκιμής που υπερβαίνουν τη LOEC πρέπει να έχουν επίδραση ίση ή μεγαλύτερη από εκείνη που παρατηρείται στη LOEC. Σε περίπτωση όπου δεν είναι δυνατόν να πληρούνται οι δύο αυτοί όροι, πρέπει να εξηγείται πλήρως ο τρόπος επιλογής της LOEC (και, κατ' επέκταση, της NOEC).

Συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC): η αμέσως χαμηλότερη της LOEC συγκέντρωση, η οποία, συγκριτικά με τους μάρτυρες, δεν έχει στατιστικώς σημαντική επίδραση ($p \leq 0,05$) σε συγκεκριμένη χρονική διάρκεια έκθεσης.

Συντελεστής κατανομής οκτανόλης-νερού (K_{ow}· εκφράζεται επίσης μερικές φορές ως P_{ow}): ο λόγος της διαλυτότητας μιας χημικής ουσίας σε n-οκτανόλη και νερό σε ισορροπία και αντιπροσωπεύει τη λιποφιλία μιας χημικής ουσίας (κεφάλαιο A.24 του παρόντος παραρτήματος). Η K_{ow} ή ο λογάριθμος της K_{ow} ($\log K_{ow}$) χρησιμοποιούνται ως ένδειξη του δυναμικού μιας χημικής ουσίας για βιοσυσσώρευση από υδρόβιους οργανισμούς.

Συντελεστής κατανομής σε οργανικό άνθρακα-νερό (K_{oc}): ο λόγος της συγκέντρωσης μιας χημικής ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια του κλάσματος οργανικού άνθρακα ιζήματος προς τη συγκέντρωση της χημικής ουσίας στο νερό, σε κατάσταση ισορροπίας.

Υπερκείμενο νερό: το νερό που καλύπτει το ίζημα στο δοχείο δοκιμής.

Ενδοπορικό ή διάμεσο **νερό**: το νερό που καταλαμβάνει τον χώρο μεταξύ των σωματιδίων του ιζήματος και του εδάφους.

Εμβολιασμένο ίζημα: το ίζημα στο οποίο έχει προστεθεί η υπό δοκιμή χημική ουσία.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

▼**M6**

Προσάρτημα 2

Στελέχη που έχουν αποδειχθεί κατάλληλα για τη δοκιμή

[από το κεφάλαιο Γ.1 του παρόντος παραρτήματος (1)].

α) *Διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου*

Διαλύονται 11,76 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ σε απιονισμένο νερό, συμπληρώνονται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό

β) *Διάλυμα θειικού μαγνησίου*

Διαλύονται 4,93 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ σε απιονισμένο νερό, συμπληρώνονται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό

γ) *Διάλυμα διττανθρακικού νατρίου*

Διαλύονται 2,59 g $NaHCO_3$ σε απιονισμένο νερό, συμπληρώνονται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό

δ) *Διάλυμα χλωριούχου καλίου*

Διαλύονται 0,23 g KCl σε απιονισμένο νερό, συμπληρώνονται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό

Όλες οι χημικές ουσίες πρέπει να είναι αναλυτικής καθαρότητας.

Η αγωγιμότητα του απεσταγμένου ή απιονισμένου νερού δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 10 μScm^{-1}.

Αναμειγνύονται 25 ml κάθε διαλύματος α) έως δ) και ο συνολικός όγκος συμπληρώνεται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό. Το άθροισμα των ιόντων ασβεστίου και μαγνησίου σε αυτά τα διαλύματα είναι 2,5 mmol/l.

Η αναλογία των ιόντων Ca:Mg είναι 4:1 και των ιόντων Na:K είναι 10:1. Η ικανότητα οξέος $K_{S4.3}$ αυτού του διαλύματος είναι 0,8 mmol/l.

Το νερό αραίωσης αερίζεται μέχρι την επίτευξη κορεσμού με οξυγόνο και, στη συνέχεια, αποθηκεύεται για περίπου δύο ημέρες χωρίς περαιτέρω αερισμό πριν από τη χρήση.

ΠΑΡΑΠΟΜΠΗ

(1) Κεφάλαιο Γ.1 του παρόντος παραρτήματος, Δοκιμή οξείας τοξικότητας σε ψάρια.

▼**M6**

Προσάρτημα 3

Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ενόσω αποδεκτού νερού αραίωσης

Συστατικό	Συγκεντρώσεις
Σωματίδια	< 20 mg/l
Ολικός οργανικός άνθρακας	< 2 μg/l
Μη ιονισμένη αμμωνία	< 1 μg/l
Υπολείμματα χλωρίου	< 10 μg/l
Σύνολο οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων	< 50 ng/l
Ολικά οργανοχλωριούχα φυτοφάρμακα μαζί με πολυχλωριωμένα διφαινύλια	< 50 ng/l
Ολικό οργανικό χλώριο	< 25 ng/l
[Εγκρίθηκε από τον ΟΟΣΑ (1992) (1)]	

ΠΑΡΑΠΟΜΠΗ

(1) OECD (1992). Guidelines for Testing of Chemicals Αρ. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. ΟΟΣΑ, Παρίσι.

▼M6

Προσάρτημα 4

Συνιστώμενο τεχνητό ίζημα — οδηγίες για την Παρασκευή και την αποθήκευσή

Συστατικά ιζήματος

Συστατικό	Χαρακτηριστικά	% ξηρού βάρους του ιζήματος
Τύρφη	Τύρφη σφάγνων, βαθμός αποικοδόμησης: «μέτρια», αερόξηρη, χωρίς ορατά υπολείμματα φυτών, λεπτοαλεσμένη (μέγεθος σωματιδίων ≤ 0,5 mm) ≤	5 ± 0,5
Χαλαζιακή άμμος	Μέγεθος κόκκων: ≤ 2 mm, αλλά > 50 % των σωματιδίων θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 50-200 m	75 - 76
Καολινιτική άργιλος	Περιεκτικότητα σε καολινίτη ≥ 30 %	20 ± 1
Πηγή τροφής	π.χ. σκόνη Urtica (Folia urticae), φύλλα από Urtica dioica (τσουκνίδα), λεπτοαλεσμένη (μέγεθος σωματιδίων ≤ 0,5 mm)· σύμφωνα με φαρμακευτικά πρότυπα, για ανθρώπινη κατανάλωση· επιπλέον του ξηρού ιζήματος	0,4 - 0,5 %
Οργανικός άνθρακας	Ρυθμίζεται με προσθήκη τύρφης και άμμου	2 ± 0,5
Ανθρακικό ασβέστιο	$CaCO_3$, κονιοποιημένο, χημικώς καθαρό, επιπλέον του ξηρού ιζήματος	0,05 - 1
Απιονισμένο νερό	Αγωγιμότητα ≤ 10 μS/cm, επιπλέον του ξηρού ιζήματος	30 - 50

Σημείωση: Αν αναμένεται αυξημένη συγκέντρωση αμμωνίας, π.χ. αν η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι γνωστό ότι αναστέλλει τη νιτροποίηση, μπορεί να είναι χρήσιμο να αντικατασταθεί το 50 % της πλούσιας σε άζωτο σκόνης Urtica με κυτταρίνη [π.χ. σκόνη α-κυτταρίνης, χημικά καθαρή, μέγεθος σωματιδίων ≤ 0,5 mm· (1) (2)].

Παρασκευή

Η τύρφη ξηραίνεται στον αέρα και αλέθεται σε λεπτή σκόνη. Παρασκευάζεται εναιώρημα της απαιτούμενης ποσότητας σκόνης τύρφης σε απιονισμένο νερό με τη βοήθεια ομοιογενοποιητή υψηλής απόδοσης. Το pH του εν λόγω εναιωρήματος ρυθμίζεται στο 5,5 ± 0,5 με $CaCO_3$. Το εναιώρημα εγκλιματίζεται για τουλάχιστον δύο ημέρες με ήπια ανάδευση στους 20 ± 2 °C, για τη σταθεροποίηση του pH και τη δημιουργία σταθερού μικροβιακού συστατικού. Το pH μετριέται ξανά και θα πρέπει να είναι 6,0 ± 0,5. Στη συνέχεια, το εναιώρημα τύρφης αναμειγνύεται με τα άλλα συστατικά (άμμος και καολινιτική άργιλος) και με απιονισμένο νερό για να ληφθεί ένα ομοιογενές ίζημα με περιεκτικότητα σε νερό 30–50 % επί του ξηρού βάρους του ιζήματος. Το pH του τελικού μείγματος μετράται και πάλι και ρυθμίζεται σε 6,5 έως 7,5 με $CaCO_3$, εάν είναι απαραίτητο. Ωστόσο, εάν αναμένεται παραγωγή αμμωνίας, μπορεί να είναι χρήσιμο να διατηρηθεί το pH του ιζήματος κάτω από 7,0 (π.χ. μεταξύ 6,0 και 6,5). Λαμβάνονται δείγματα του ιζήματος για τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους και της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα. Αν αναμένεται παραγωγή αμμωνίας, το μορφοποιημένο ίζημα μπορεί να εγκλιματιστεί για επτά ημέρες στις ίδιες συνθήκες που επικρατούν στη δοκιμή που ακολουθεί (π.χ. λόγος ιζήματος-νερού 1:4, ύψος στρώματος ιζήματος όπως και στα δοχεία δοκιμής) πριν από τον εμβολιασμό με την υπό δοκιμή χημική ουσία, δηλ. θα πρέπει να συμπληρωθεί με νερό, το οποίο θα πρέπει να έχει υποβληθεί σε αερισμό. Στο τέλος αυτής της περιόδου

▼M6

εγκλιματισμού, το υπερκείμενο νερό θα πρέπει να απομακρύνεται και να απορρίπτεται. Στη συνέχεια, η εμβολιασμένη χαλαζιακή άμμος αναμειγνύεται με το ίζημα για κάθε επίπεδο αγωγής, το ίζημα κατανέμεται στα δοχεία δοκιμής επανάληψης και συμπληρώνεται με νερό δοκιμής. Στη συνέχεια, τα δοχεία επωάζονται υπό τις ίδιες συνθήκες με εκείνες που θα επικρατούν στην επακόλουθη δοκιμή. Στο σημείο αυτό ξεκινάει η περίοδος εξισορρόπησης. Το υπερκείμενο νερό θα πρέπει να αερίζεται.

Η επιλεγμένη πηγή τροφής θα πρέπει να προστίθεται πριν ή κατά τη διάρκεια του εμβολιασμού του ιζήματος με την υπό δοκιμή χημική ουσία. Μπορεί να αναμειγνύεται αρχικά με το εναιώρημα τύρφης (βλ. ανωτέρω). Ωστόσο, είναι δυνατό να αποφεύγεται η υπερβολική αποικοδόμηση της πηγής τροφής πριν από την προσθήκη των οργανισμών δοκιμής –π.χ. στην περίπτωση μεγάλης χρονικής περιόδου εξισορρόπησης– με διατήρηση της χρονικής περιόδου μεταξύ της προσθήκης τροφής και της έναρξης της έκθεσης όσο το δυνατό πιο σύντομης. Για να διασφαλίζεται επαρκής επαφή της τροφής με την υπό δοκιμή χημική ουσία, η πηγή τροφής θα πρέπει να αναμειγνύεται με το ίζημα το αργότερο μέχρι την ημέρα εμβολιασμού της υπό δοκιμής χημικής ουσίας στο ίζημα.

Αποθήκευση

Τα ξηρά συστατικά του τεχνητού ιζήματος μπορούν να φυλάσσονται σε ξηρό και δροσερό χώρο ή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το παρασκευασμένο ίζημα που έχει εμβολιαστεί με την υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να χρησιμοποιείται στη δοκιμή αμέσως. Τα δείγματα του εμβολιασμένου ιζήματος μπορούν να φυλάσσονται στις συνθήκες που συνιστώνται για τη συγκεκριμένη υπό δοκιμή χημική ουσία, μέχρι την ανάλυση.

ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

(1) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

(2) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten — Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Γερμανία. σ. 107-119.

▼M6

Προσάρτημα 5

Μέθοδοί καλλιέργειάς για τον lumbriculus variegatus

Το είδος *Lumbriculus variegatus* (MÜLLER) (Lumbriculidae, Oligochaeta) ζει σε ιζήματα γλυκών νερών και χρησιμοποιείται ευρέως σε οικοτοξικολογικές δοκιμές. Η καλλιέργεια του γίνεται και σε εργαστηριακές συνθήκες. Περίληψη των μεθόδων καλλιέργειας δίνεται στη συνέχεια.

Μέθοδοι καλλιέργειας

Οι συνθήκες καλλιέργειας για το *Lumbriculus variegatus* περιγράφονται λεπτομερώς στα έγγραφα Phipps et al. (1993) (1), Brunson et al. (1998) (2), ASTM (2000) (3), U.S. EPA (2000) (4). Μια σύντομη σύνοψη αυτών των συνθηκών παρέχεται παρακάτω. Ένα μεγάλο πλεονέκτημα του *L. variegatus* είναι η ταχεία αναπαραγωγή, που έχει ως αποτέλεσμα ταχέως αυξανόμενη βιομάζα σε πληθυσμούς εργαστηριακής καλλιέργειας [π.χ. (1), (3), (4), (5)].

Οι σκώληκες μπορούν να αναπαράγονται σε μεγάλα ενυδρεία (57-80 l) στους 23 °C με φωτοπερίοδο 16 L:8 D (100-1 000 lux) με τη χρήση φυσικού νερού που ανανεώνεται ημερησίως (45-50 l ανά ενυδρείο). Το υπόστρωμα παρασκευάζεται με κοπή αλεύκαστων καφέ χαρτιών σε λωρίδες, οι οποίες στη συνέχεια αναμειγνύονται με νερό καλλιέργειας για λίγα δευτερόλεπτα με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός υποστρώματος αποτελούμενου από μικρά κομμάτια χαρτιού. Το υπόστρωμα αυτό μπορεί κατόπιν να χρησιμοποιηθεί άμεσα στα ενυδρεία της καλλιέργειας *Lumbriculus* και να καλύψει το κάτω μέρος της δεξαμενής, ή μπορεί να αποθηκευτεί κατεψυγμένο σε απιονισμένο νερό για μετέπειτα χρήση. Το νέο υπόστρωμα στη δεξαμενή γενικά διαρκεί για περίπου δύο μήνες.

Κάθε καλλιέργεια σκωλήκων ξεκινάει με 500-1 000 σκώληκες, ενώ ως τροφή παρέχονται 10 ml εναιωρήματος που περιέχουν 6 g αρχικής τροφής για πέστροφες, 3 φορές την εβδομάδα κάτω από συνθήκες ανανέωσης νερού ή συνεχούς ροής νερού. Ο ρυθμός σίτισης στις στατικές ή ημιστατικές καλλιέργειες θα πρέπει να είναι χαμηλότερος για την αποφυγή ανάπτυξης βακτηρίων και μυκήτων.

Κάτω από αυτές τις συνθήκες, ο αριθμός των ατόμων στην καλλιέργεια γενικά διπλασιάζεται σε περίπου 10 έως 14 ημέρες.

Εναλλακτικά, ο *Lumbriculus variegatus* μπορεί επίσης να καλλιεργηθεί σε σύστημα που αποτελείται από ένα στρώμα χαλαζιακής άμμου όπως χρησιμοποιείται για το τεχνητό ίζημα (βάθος 1 - 2 cm), και ανασυσταθέν νερό. Ως δοχεία καλλιέργειας μπορούν να χρησιμοποιούνται γυάλινοι περιέκτες ή περιέκτες από ανοξείδωτο χάλυβα ύψους 12 έως 20 cm. Η υδάτινη μάζα υποβάλλεται σε ήπιο αερισμό (π.χ. 2 φυσαλίδες το δευτερόλεπτο) μέσω σιφωνίου Pasteur, το οποίο τοποθετείται περίπου 2 cm πάνω από την επιφάνεια του ιζήματος. Για την αποφυγή συσσώρευσης π.χ. αμμωνίας, το υπερκείμενο νερό θα πρέπει να αλλάζεται με χρήση συστήματος συνεχούς ροής νερού, ή χειροκίνητα τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα. Οι ολιγόχαιτοι μπορούν να διατηρηθούν σε θερμοκρασία δωματίου με φωτοπερίοδο 16 ωρών φωτός (έντασης 100 - 1 000 lx) και 8 ώρες σκότους. Στην ημιστατική καλλιέργεια (ανανέωση νερού τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα), οι σκώληκες σιτίζονται με TetraMin δύο φορές την εβδομάδα (π.χ. 0,6 - 0,8 mg ανά cm^2 επιφάνειας ιζήματος), που μπορούν να δίνονται ως εναιώρημα 50 mg TetraMin ανά ml απιονισμένου νερού.

Ο *Lumbriculus variegatus* μπορεί να απομακρύνεται από τις καλλιέργειες, π.χ. με μεταφορά σε ένα ξεχωριστό ποτήρι ζέσεως υποστρώματος μέσω ενός δικτυού λεπτού πλέγματος ή οργανισμών μέσω γυάλινου σιφωνίου με ευρύ στόμιο (διάμετρος περίπου 5 mm) που έχει υποστεί γυάλισμα με φλόγα. Εάν οι σκώληκες μεταφερθούν στο ποτήρι ζέσεως μαζί με υπόστρωμα, το ποτήρι ζέσεως που περιέχει σκώληκες και υπόστρωμα παραμένει όλη τη νύχτα κάτω από συνθήκες συνεχούς ροής νερού, διαδικασία με την οποία απομακρύνεται το υπόστρωμα από το ποτήρι ζέσεως ενώ οι σκώληκες παραμένουν στο κάτω μέρος του δοχείου. Στη συνέχεια, μπορούν να τοποθετηθούν σε προσφάτως παρασκευασμένες δεξαμενές καλλιέργειας ή να υποστούν περαιτέρω κατεργασία για τη δοκιμή, όπως περιγράφεται στα σημεία (3) και (4).

Ένα ζήτημα που πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη κατά τη χρήση του *L. variegatus* σε δοκιμές ιζήματος είναι ο τρόπος αναπαραγωγής του [αρχιτομία ή μορφάλλαξη, π.χ. (6)]. Αυτός ο ασεξουαλικός τρόπος αναπαραγωγής έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό δύο τμημάτων, τα οποία δεν τρέφονται για ορισμένη χρονική περίοδο μέχρι την αναγέννηση του μέρους του κεφαλιού ή της ουράς [π.χ. (7)(8)]. Αυτό σημαίνει ότι στον *L. variegatus* η έκθεση μέσω της πρόσληψης μολυσμένου ιζήματος δεν πραγματοποιείται συνεχώς.

▼M6

Επομένως, θα πρέπει να πραγματοποιείται συγχρονισμός για την ελαχιστοποίηση της μη ελεγχόμενης αναπαραγωγής και αναγέννησης και, κατ' επέκταση, της υψηλής μεταβλητότητας στα αποτελέσματα δοκιμής. Η εν λόγω μεταβλητότητα μπορεί να προκύψει, όταν ορισμένα άτομα, τα οποία έχουν υποστεί κατάτμηση και επομένως δεν τρέφονται για ορισμένη χρονική περίοδο, είναι λιγότερο εκτεθειμένα στην υπό δοκιμή χημική ουσία σε σχέση με άλλα άτομα, τα οποία δεν υφίστανται κατάτμηση κατά τη διάρκεια της δοκιμής, π.χ. (9), (10), (11). Οι σκώληκες θα πρέπει να υποστούν τεχνητή κατάτμηση 10 έως 14 ημέρες πριν από την έναρξη της έκθεσης (συγχρονισμός). Μεγαλόσωμοι (ενήλικοι) σκώληκες, που δεν δείχνουν κατά προτίμηση σημεία πρόσφατης μορφάλλαξης θα πρέπει να επιλέγονται για συγχρονισμό. Αυτοί οι σκώληκες μπορούν να τοποθετούνται σε γυάλινες αντικειμενοφόρες πλάκες σε μια σταγόνα νερού καλλιέργειας και να διατέμνονται στην περιοχή του μέσου σώματος με ένα νυστέρι. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε τα οπίσθια άκρα να είναι παρόμοιου μεγέθους. Στη συνέχεια, τα οπίσθια άκρα θα πρέπει να παραμένουν για να αναγεννηθούν νέα κεφάλια μέσα σε ένα δοχείο καλλιέργειας που περιέχει το ίδιο υπόστρωμα με αυτό που χρησιμοποιείται στην καλλιέργεια και ανασυσταθέν νερό μέχρι την έναρξη της έκθεσης. Η αναγέννηση νέων κεφαλιών υποδεικνύεται από το φώλιασμα των συγχρονισμένων σκωλήκων μέσα στο υπόστρωμα (η παρουσία αναγεννημένων κεφαλιών μπορεί να επιβεβαιώνεται με επιθεώρηση ενός αντιπροσωπευτικού επιμέρους δείγματος με διοφθάλμιο μικροσκόπιο). Μετά τη διαδικασία αυτή, οι οργανισμοί δοκιμής αναμένεται ότι βρίσκονται σε παρόμοια φυσιολογική κατάσταση. Αυτό σημαίνει ότι όταν προκύψει αναπαραγωγή μέσω μορφάλλαξης σε συγχρονισμένους σκώληκες κατά τη διάρκεια της δοκιμής, αναμένεται ότι σχεδόν όλα τα ζώα θα είναι εκτεθειμένα εξίσου στο εμβολιασμένο ίζημα. Η σίτιση των συγχρονισμένων σκωλήκων θα πρέπει να πραγματοποιείται μία φορά μόλις οι σκώληκες αρχίσουν να φωλιάζουν στο υπόστρωμα ή 7 ημέρες μετά τη διατομή τους. Το καθεστώς σίτισης θα πρέπει να είναι συγκρίσιμο με αυτό των κανονικών καλλιεργειών, ωστόσο ίσως θα ήταν σκόπιμο να γίνεται σίτιση των συγχρονισμένων σκωλήκων με την ίδια πηγή τροφής με αυτήν που θα χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή. Οι σκώληκες θα πρέπει να διατηρούνται στη θερμοκρασία δοκιμής, στους 20 ± 2 °C. Μετά την αναγέννηση, για τη δοκιμή θα πρέπει να χρησιμοποιούνται άθικτοι ολόκληροι σκώληκες, που κολυμπούν ή σέρνονται ζωηρά μετά από ήπιο μηχανικό ερέθισμα. Θα πρέπει να αποφεύγονται οι τραυματισμοί ή η αυτοτομία των σκωλήκων, π.χ. με τη χρήση σιφωνίων με άκρα που έχουν υποστεί γυάλισμα με φλόγα ή με τη χρήση βελονών από ανοξείδωτο χάλυβα για τον χειρισμό αυτών των σκωλήκων.

Πηγές για εναρκτήριες καλλιέργειες του Lumbriculus variegatus [οι διευθύνσεις στις ΗΠΑ από το (4)]

Ευρώπη

ECT Oekotoxikologie GmbH
Böttgerstr. 2-14
D-65439 Flörsheim/Main
Γερμανία

Bayer Crop Science AG
Development — Ecotoxicology
Alfred-Nobel-Str. 50
D-40789 Monheim
Γερμανία

University of Joensuu
Laboratory of Aquatic Toxicology
Dept. of Biology
Yliopistokatu 7, P.O. Box 111
FIN-80101 Joensuu
Φινλανδία

Dresden University of Technology
Institut für Hydrobiologie
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften
Mommsenstr. 13
D-01062 Dresden
Γερμανία

C.N.R.- I.R.S.A.
Italian National Research Council
Water Research Institute
Via Mornera 25
I-20047 Brugherio MI
Ιταλία

ΗΠΑ

U.S. Environmental Protection Agency
Mid-Continent Ecological Division
6201 Congdon Boulevard
Duluth, MN 55804

Michigan State University
Department of Fisheries and Wildlife
No. 13 Natural Resources Building
East Lansing, MI 48824-1222

▼**M6**

U.S. Environmental Protection Agency
Environmental Monitoring System Laboratory
26 W. Martin Luther Dr.
Cincinnati, OH 45244

Wright State University
Institute for Environmental Quality
Dayton, OH 45435

Columbia Environmental Research Center
U.S. Geological Survey
4200 New Haven Road
Columbia, MO 65201

Great Lakes Environmental Research Laboratory, NOAA
2205 Commonwealth Boulevard
Ann Arbor, MI 48105-1593

ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

(1) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.

(2) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed Lumbriculus variegatus. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191-201.

(3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(4) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, Μάρτιος 2000.

(5) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to Lumbriculus variegatus (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.

(6) Drewes C.D. & Fourtner C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, Lumbriculus variegatus: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. Develop. Biol. 138: 94-103.

(7) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of Lumbriculus variegatus (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

(8) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete Lumbriculus variegatus (Müller). Hydrobiologia 377: 183-194.

(9) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and Lumbriculus variegatus in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, σ. 2000–2007.

(10) Oetken, M., K.-U. Ludwichowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with Lumbriculus variegatus and Chironomus riparius and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, Μάρτιος 2000.

(11) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (Lumbriculus variegatus, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503-1508.

▼**M6**

Προσάρτημα 6

Περίληψή των αποτελεσμάτων της δοκιμής δακτυλίου (ring test)

«Τεστ τοξικότητας ιζήματος σε *Lumbriculus variegatus*»

Πίνακας 1

Αποτελέσματα των επιμέρους δοκιμών δακτυλίου: Μέσος αριθμός σκωλήκων στους μάρτυρες και στους μάρτυρες με διαλύτη στο τέλος της δοκιμής· SD = τυπική απόκλιση· CV = συντελεστής μεταβλητότητας.

	μέσος αριθμός σκωλήκων στους μάρτυρες	SD	CV (%)	n	μέσος αριθμός σκωλήκων στους μάρτυρες με διαλύτη	SD	CV (%)	n
	32,3	7,37	22,80	3	**39,0**	3,61	9,25	3
	40,8	6,55	16,05	6	**36,0**	5,29	14,70	3
	41,5	3,54	8,52	2	**38,5**	7,05	18,31	4
	16,3	5,99	36,67	6	**30,8**	6,70	21,80	4
	24,3	10,69	43,94	3	**26,3**	3,06	11,60	3
	28,5	8,29	29,08	4	**30,7**	1,15	3,77	3
	28,3	3,72	13,14	6	**28,8**	2,56	8,89	6
	25,3	5,51	21,74	3	**27,7**	1,53	5,52	3
	23,8	2,99	12,57	4	**21,3**	1,71	8,04	4
	36,8	8,80	23,88	6	**35,0**	4,20	11,99	6
	33,0	3,58	10,84	6	**33,5**	1,73	5,17	4
	20,7	2,73	13,22	6	**15,0**	6,68	44,56	4
	42,0	7,07	16,84	6	**43,7**	0,58	1,32	3
	18,2	3,60	19,82	6	**21,7**	4,04	18,65	3
	32,0	3,95	12,34	6	**31,3**	4,79	15,32	4
διεργα-στηριακός μέσος	**29,59**		**20,10**		**30,61**		**13,26**	
SD	**8,32**		**10,03**		**7,57**		**10,48**	
n	**15**				**15**			
min	**16,3**				**15,0**			
max	**42,0**				**43,7**			
CV (%)	**28,1**				**24,7**			

▼**M6**

Πίνακας 2

Αποτελέσματα των επιμέρους δοκιμών δακτυλίου: Μέσο συνολικό ξηρό βάρος σκωλήκων ανά επανάληψη στους μάρτυρες και στους μάρτυρες με διαλύτη στο τέλος της δοκιμής· SD = τυπική απόκλιση· CV = συντελεστής μεταβλητότητας.

	συνολικό ξηρό βάρος σκωλήκων ανά επανάληψη (μάρτυρες)	SD	CV (%)	n	συνολικό ξηρό βάρος σκωλήκων ανά επανάληψη (μάρτυρες με διαλύτη)	SD	CV (%)	n
	24,72	6,31	25,51	3	27,35	4,08	14,93	3
	30,17	2,04	6,75	6	33,83	10,-40	30,73	3
	23,65	3,61	15,25	2	28,78	4,68	16,28	4
	12,92	6,83	52,91	6	24,90	6,84	27,47	4
	21,31	4,17	19,57	3	25,87	5,30	20,49	3
	22,99	4,86	21,16	4	24,64	5,09	20,67	3
	18,91	1,91	10,09	6	19,89	1,77	8,89	6
	24,13	1,63	6,75	3	25,83	2,17	8,41	3
	22,15	3,18	14,34	4	22,80	2,60	11,40	4
	35,20	8,12	23,07	6	31,42	8,45	26,90	6
	41,28	5,79	14,02	6	41,42	4,37	10,55	4
	15,17	5,78	38,09	6	10,50	3,42	32,53	4
	35,69	8,55	23,94	6	38,22	1,23	3,21	3
	19,57	5,21	26,65	6	28,58	6,23	21,81	3
	29,40	2,16	7,34	6	31,15	2,70	8,67	4
διεργα-στηριακός μέσος	**25,15**		**20,36**		**27,68**		**17,53**	
SD	**7,87**		**12,56**		**7,41**		**9,10**	
n	**15**				**15**			
min	**12,9**				**10,5**			
max	**41,3**				**41,4**			
CV (%)	**31,3**				**26,8**			

▼**M6**

Πίνακας 3

Τοξικότητα του PCP: Περίληψη των τελικών σημείων στη δοκιμή δακτυλίου· διεργαστηριακός μέσος για EC_{50}, NOEC και LOEC· SD = τυπική απόκλιση· CV = συντελεστής μεταβλητότητας.

βιολογική παράμετρος		Διεργαστηριακός μέσος (mg/kg)	min	max	Διεργαστηριακός συντελεστής	SD	CV (%)	γεωμετρικός μέσος (mg/kg)
συνολικός αριθ. σκωλήκων	**EC_{50}**	**23,0**	4,0	37,9	9,4	10,7	46,3	19,9
	NOEC	**9,9**	2,1	22,7	10,7	7,2	72,3	7,6
	LOEC	**27,9**	4,7	66,7	14,2	19,4	69,4	20,9
	MDD (%)	**22,5**	7,1	39,1				
συνολικό ξηρό βάρος σκωλήκων	**EC_{50}**	**20,4**	7,3	39,9	5,5	9,1	44,5	18,2
	NOEC	**9,3**	2,1	20,0	9,4	6,6	70,4	7,4
	LOEC	**25,7**	2,1	50,0	23,5	16,8	65,5	19,4
	MDD (%)	**24,8**	10,9	44,7				
θνησιμότητα/ επιβίωση	**LC_{50}**	**25,3**	6,5	37,2	5,7	9,4	37,4	23,1
	NOEC	**16,5**	2,1	40,0	18,8	10,3	62,4	12,8
	LOEC	**39,1**	4,7	66,7	14,2	18,1	46,2	32,6
αναπαραγωγή (αύξηση του αριθμού των σκωλήκων ανά επανάληψη)	**EC_{50}**	**20,0**	6,7	28,9	4,3	7,6	37,9	18,3
	NOEC	**7,9**	2,1	20,0	9,4	5,2	66,0	6,4
	LOEC	**22,5**	2,1	50,0	23,5	15,4	68,6	16,0
	MDD (%)	**29,7**	13,9	47,9				
ανάπτυξη (αύξηση της βιομάζας ανά επανάληψη)	**EC_{50}**	**15,3**	5,7	29,9	5,2	7,1	46,5	13,7
	NOEC	**8,7**	2,1	20,0	9,4	6,0	68,1	6,9
	LOEC	**24,0**	2,1	50,0	23,5	15,7	65,5	17,3
	MDD (%)	**32,2**	13,6	65,2				

MDD: ελάχιστη ανιχνεύσιμη διαφορά από τις τιμές του μάρτυρα κατά τις δοκιμές υπόθεσης· χρησιμοποιείται ως μέτρο στατιστικής ισχύος

ΠΑΡΑΠΟΜΠΗ

Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

▼M6

Γ.36. ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΑΡΠΑΚΤΙΚΟΥ ΑΚΑΡΕΟΣ [*HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER*] ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 226 του ΟΟΣΑ (2008). Δεδομένου ότι προορίζεται να χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση των επιδράσεων χημικών ουσιών που περιέχει το έδαφος στην αναπαραγωγική απόδοση του είδους ακάρεων του εδάφους *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae), επιτρέπει την εκτίμηση της αναστολής του ρυθμού ανάπτυξης του συγκεκριμένου πληθυσμού (1,2). Ως αναπαραγωγική απόδοση νοείται στην παρούσα μέθοδο ο αριθμός νεαρών ακάρεων στο τέλος της περιόδου δοκιμής. Το είδος *H. aculeifer* αντιπροσωπεύει ένα τροφικό επίπεδο επιπλέον των ειδών για τα οποία υπάρχουν ήδη μέθοδοι δοκιμών. Για τον σκοπό της παρούσας μεθόδου δοκιμών κρίνεται κατάλληλη μια δοκιμή αναπαραγωγής χωρίς διάκριση ούτε ποσοτικοποίηση των διαφόρων σταδίων του αναπαραγωγικού κύκλου. Για τις χημικές ουσίες με άλλο σενάριο έκθεσης πλην του εδάφους θα μπορούσαν να ενδείκνυνται άλλες προσεγγίσεις (3).

2. Το άκαρι *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* θεωρείται αντιπροσωπευτικό της πανίδας του εδάφους και, ειδικότερα, των αρπακτικών ακάρεων. Πρόκειται για είδος με παγκόσμια εξάπλωση (5), το οποίο μπορεί εύκολα να συλλέγεται και να εκτρέφεται στο εργαστήριο. Στο προσάρτημα 7 παρέχεται περίληψη των βιολογικών χαρακτηριστικών του *H. aculeifer*. Πληροφορίες τεκμηρίωσης για την οικολογία των ειδών ακάρεων και τη χρήση τους σε οικοτοξικολογικές δοκιμές υπάρχουν στις δημοσιεύσεις (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12).

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

3. Ενήλικα θηλυκά εκτίθενται σε ένα εύρος συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που έχει αναμειχθεί με έδαφος. Η δοκιμή αρχίζει με 10 ενήλικα θηλυκά ανά δοχείο επανάληψης (replicate). Δεν εισάγονται αρσενικά στη δοκιμή, διότι από την πείρα προκύπτει ότι, παρουσία αρσενικών, τα θηλυκά συζεύγνυνται αμέσως ή σχεδόν αμέσως μετά την εκκόλαψη από το δεύτερο νυμφικό στάδιο (δευτερονύμφη). Επιπροσθέτως, η παρουσία αρσενικών θα παρέτεινε τη δοκιμή κατά τρόπο που θα καθιστούσε αναγκαία την απαιτητική διάκριση μεταξύ ηλικιακών σταδίων. Συνεπώς, η σύζευξη δεν συμπεριλαμβάνεται στη δοκιμή. Τα θηλυκά εισάγονται στη δοκιμή 28-35 ημέρες μετά την έναρξη της περιόδου εναπόθεσης των αυγών κατά τον συγχρονισμό (βλ. προσάρτημα 4), διότι τότε μπορεί να θεωρηθεί ότι έχουν ήδη συζευχθεί και έχουν περάσει το στάδιο της προωοτοκίας. Στους 20 °C η δοκιμή τερματίζεται την 14η ημέρα από την εισαγωγή των θηλυκών (ημέρα 0), διάστημα που επιτρέπει στον πρώτο απόγονο-μάρτυρα να φτάσει στο στάδιο της δευτερονύμφης (βλ. προσάρτημα 4). Για την κύρια μετρούμενη μεταβλητή, προσδιορίζονται ο αριθμός νεαρών ατόμων ανά δοχείο δοκιμής και, επιπροσθέτως, ο αριθμός επιζώντων θηλυκών. Η αναπαραγωγική απόδοση των ακάρεων που εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία συγκρίνεται με εκείνη των μαρτύρων ώστε να προσδιοριστεί η τιμή EC_x (e.g. EC_{10}, EC_{50}) ή η συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC) (για τους ορισμούς, βλ. προσάρτημα 1), ανάλογα με τον σχεδιασμό του πειράματος (βλ. σημείο 29). Επισκόπηση του χρονοδιαγράμματος της δοκιμής παρατίθεται στο προσάρτημα 8.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

4. Θα πρέπει, κατά προτίμηση, να είναι γνωστά η υδατοδιαλυτότητα, η τιμή log K_{ow}, ο συντελεστής κατανομής μεταξύ εδάφους και νερού και η τάση ατμών της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Είναι σκόπιμο να υπάρχουν επιπλέον πληροφορίες σχετικά με την πορεία της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο έδαφος, όπως ο ρυθμός βιοτικής και αβιοτικής αποικοδόμησης.

5. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών μπορεί να χρησιμοποιείται για υδατοδιαλυτές ή μη υδατοδιαλυτές χημικές ουσίες. Ωστόσο, ο τρόπος εφαρμογής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας διαφέρει ανάλογα. Η μέθοδος δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε πτητικές χημικές ουσίες, δηλ. σε χημικές ουσίες για τις οποίες η σταθερά του Henry ή ο συντελεστής κατανομής μεταξύ αέρα και νερού είναι μεγαλύτερα από τη μονάδα ή η τάση ατμών υπερβαίνει το 0,0133 Pa στους 25 °C.

▼M6

ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

6. Για να θεωρείται έγκυρο ένα αποτέλεσμα της δοκιμής, θα πρέπει να πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια στους μάρτυρες που δεν έχουν υποβληθεί σε αγωγή:

— Η μέση θνησιμότητα των ενήλικων θηλυκών ατόμων θα πρέπει να μην υπερβαίνει το 20 % στο τέλος της δοκιμής.

— Ο μέσος αριθμός των νεαρών ατόμων ανά δοχείο επανάληψης (όπου έχουν εισαχθεί 10 ενήλικα θηλυκά) θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 50 στο τέλος της δοκιμής.

— Ο συντελεστής μεταβλητότητας που υπολογίζεται για τον αριθμό των νεαρών ακάρεων ανά δοχείο επανάληψης θα πρέπει να μην υπερβαίνει το 30 % στο τέλος της οριστικής δοκιμής.

ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

7. Πρέπει να προσδιορίζονται η EC_x και/ή NOEC μιας χημικής ουσίας αναφοράς ώστε να διασφαλίζεται ότι οι συνθήκες της εργαστηριακής δοκιμής είναι κατάλληλες και να επαληθεύεται ότι η απόκριση των οργανισμών δοκιμής δεν αλλάζει με την πάροδο του χρόνου. Ο εστέρας dimethoate (CAS 60-51-5) είναι κατάλληλη χημική ουσία αναφοράς, η οποία έχει αποδειχθεί ότι επιδρά στο μέγεθος του πληθυσμού (4). Ως εναλλακτική χημική ουσία αναφοράς μπορεί να χρησιμοποιηθεί το βορικό οξύ (CAS 10043-35-3), η εμπειρία με το οποίο είναι μικρότερη. Υπάρχουν δύο εναλλακτικές δυνατότητες σχεδιασμού:

— Η χημική ουσία αναφοράς μπορεί να υποβληθεί στη δοκιμή παράλληλα με τον προσδιορισμό της τοξικότητας κάθε υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε μία συγκέντρωση, για την οποία πρέπει να έχει προηγουμένως καταδειχθεί, σε μελέτη δόσης-απόκρισης, ότι έχει ως αποτέλεσμα μείωση των απογόνων κατά > 50 %. Στην περίπτωση αυτή, ο αριθμός των επαναλήψεων θα πρέπει να είναι ο ίδιος όπως στους μάρτυρες (βλ. σημείο 29).

— Εναλλακτικά, η χημική ουσία αναφοράς ελέγχεται 1 - 2 φορές ετησίως με δοκιμή δόσης-απόκρισης. Ο αριθμός των συγκεντρώσεων και επαναλήψεων και ο συντελεστής διαστήματος (βλ. σημείο 29) διαφέρουν ανάλογα με τον σχεδιασμό που έχει επιλεγεί, αλλά ως απόκριση θα πρέπει να επιτυγχάνεται επίδραση 10-90 % (συντελεστής διαστήματος 1,8). Η τιμή EC_{50} για το dimethoate βάσει του αριθμού νεαρών ατόμων θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 3,0 και 7,0 mg δραστικής ουσίας/kg εδάφους (βάρος ξηρού). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που έχουν ληφθεί με το βορικό οξύ μέχρι σήμερα, η τιμή EC_{50} βάσει του αριθμού νεαρών ατόμων θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 100 και 500 mg/kg βάρους ξηρού εδάφους.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Δοχεία και εξοπλισμός δοκιμής

8. Πρέπει να χρησιμοποιούνται δοχεία δοκιμής διαμέτρου 3-5 cm (ύψος εδάφους ≥ 1,5 cm), κατασκευασμένα από γυαλί ή άλλο χημικά αδρανές υλικό και εφοδιασμένα με κάλυμμα που εφαρμόζει πολύ καλά. Προτιμώνται τα βιδωτά πώματα και, στην περίπτωση αυτή, τα δοχεία είναι δυνατόν να αερίζονται δύο φορές εβδομαδιαίως. Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν καλύμματα που επιτρέπουν την απευθείας ανταλλαγή αερίων μεταξύ του υποστρώματος και της ατμόσφαιρας (π.χ. γάζα). Επειδή πρέπει να διατηρείται υψηλή υγρασία στη διάρκεια της δοκιμής, είναι απαραίτητο να ελέγχεται το βάρος κάθε πειραματικού δοχείου κατά τη διάρκεια της δοκιμής και, αν είναι ανάγκη, να αναπληρώνεται το νερό. Αυτό μπορεί να είναι ιδιαιτέρως σημαντικό, αν δεν υπάρχουν βιδωτά πώματα. Αν χρησιμοποιείται αδιαφανές δοχείο δοκιμής, το πώμα θα πρέπει να είναι κατασκευασμένο από υλικό που επιτρέπει την πρόσβαση στο φως (π.χ. μέσω διάτρητου διαφανούς καλύμματος), εμποδίζοντας ταυτόχρονα τη διαφυγή των ακάρεων. Το μέγεθος και το είδος των δοχείων δοκιμής εξαρτάται από τη μέθοδο εξαγωγής (για λεπτομέρειες, βλ. προσάρτημα 5). Αν εφαρμόζεται θερμική εξαγωγή απευθείας στο δοχείο δοκιμής, είναι δυνατόν να προστεθεί δικτυωτός πυθμένας με κατάλληλο μέγεθος οπών (σφραγισμένος έως την εξαγωγή), ενώ το βάθος του εδάφους θα πρέπει να επαρκεί ώστε να είναι δυνατή η βαθμίδωση της θερμοκρασίας και της υγρασίας.

▼M6

9. Απαιτείται συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός, και ειδικότερα:

— κατά προτίμηση γυάλινα δοχεία με βιδωτά πώματα·

— ξηραντήριο·

— στερεοσκοπικό μικροσκόπιο·

— ψήκτρες για τη μεταφορά των ακάρεων

— πεχάμετρο και φωτόμετρο luxmeter·

— κατάλληλοι ζυγοί ακριβείας·

— κατάλληλος εξοπλισμός για τη ρύθμιση της θερμοκρασίας·

— κατάλληλος εξοπλισμός για τον έλεγχο της υγρασίας του αέρα (δεν είναι απαραίτητος εάν τα δοχεία έκθεσης καλύπτονται με πώματα)·

— επωαστήρας ή μικρό δωμάτιο ελεγχόμενης θερμοκρασίας·

— εξοπλισμός εξαγωγής (βλ. προσάρτημα 5) (13)

— φωτιστικό οροφής τύπου πάνελ με ρυθμιζόμενη φωτεινή ένταση·

— κώδωνες συλλογής των εξαγόμενων ακάρεων.

Παρασκευή του τεχνητού εδάφους

10. Για την παρούσα δοκιμή χρησιμοποιείται τεχνητό έδαφος που αποτελείται από τα ακόλουθα συστατικά (όλες οι τιμές βασίζονται σε ξηρή μάζα):

— 5 % τύρφης σφάγνων, αερόξηρης και λεπτοαλεσμένης (είναι αποδεκτό μέγεθος σωματιδίων 2 ± 1 mm)·

— 20 % καολινιτικής αργίλου (περιεκτικότητα σε καολινίτη κατά προτίμηση πάνω από 30 %)·

— περίπου 74 % αερόξηρης, βιομηχανικής άμμου (ανάλογα με την ποσότητα $CaCO_3$ που απαιτείται), όπου θα πρέπει να επικρατεί η λεπτή άμμος με ποσοστό σωματιδίων μεγέθους μεταξύ 50 και 200 μm πάνω από 50 %. Η ακριβής ποσότητα της άμμου εξαρτάται από την ποσότητα του $CaCO_3$ (βλ. κατωτέρω), ώστε το άθροισμά τους να ισούται με 75 %·

— < 1,0 % ανθρακικού ασβεστίου ($CaCO_3$, κονιοποιημένο, αναλυτικής καθαρότητας), για να επιτευχθεί pH 6,0 ± 0,5· η ποσότητα ανθρακικού ασβεστίου που πρέπει να προστεθεί ενδέχεται να εξαρτάται κυρίως από την ποιότητα/το είδος της τύρφης (βλ. σημείωση 1).

Σημείωση 1: Η απαιτούμενη ποσότητα $CaCO_3$ εξαρτάται από τα συστατικά του εδαφικού υποστρώματος και θα πρέπει να προσδιορίζεται με μέτρηση του pH των μερικών δειγμάτων εδάφους αμέσως πριν από τη δοκιμή (14).

Σημείωση 2: Η περιεκτικότητα του τεχνητού εδάφους σε τύρφη αποκλίνει από άλλες μεθόδους δοκιμών σε οργανισμούς του εδάφους, όπου στις περισσότερες περιπτώσεις χρησιμοποιείται 10 % τύρφης [π.χ. (15)]. Ωστόσο, κατά τον οργανισμό φυτοπροστασίας EPPO (16), ένα τυπικό γεωργικό έδαφος δεν περιέχει πάνω από 5 % οργανικής ύλης και, συνεπώς, η μείωση της περιεκτικότητας σε τύρφη αντικατοπτρίζει τις μειωμένες πιθανότητες προσρόφησης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε οργανικό άνθρακα στο φυσικό έδαφος.

Σημείωση 3: Εάν απαιτείται, π.χ. για συγκεκριμένους σκοπούς δοκιμής, φυσικά εδάφη που προέρχονται από μη ρυπασμένες τοποθεσίες μπορούν επίσης να χρησιμεύσουν ως υπόστρωμα δοκιμής και/ή καλλιέργειας. Ωστόσο, εάν χρησιμοποιηείται φυσικό έδαφος, θα πρέπει να χαρακτηρίζεται με βάση τουλάχιστον την προέλευση (τόπος συλλογής), το pH, την υφή (κατανομή μεγέθους σωματιδίων) και την περιεκτικότητα σε οργανική ύλη. Θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται στον χαρακτηρισμό, εφόσον είναι γνωστά, ο τύπος και το όνομα του εδάφους σύμφωνα με την ταξινόμηση των εδαφών,

▼M6

το δε έδαφος θα πρέπει να είναι απαλλαγμένο από ρύπανση. Στην περίπτωση που η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι μέταλλο ή οργανομεταλλική ένωση, θα πρέπει επίσης να προσδιορίζεται η κατιοανταλλακτική ικανότητα (CEC) του φυσικού εδάφους. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να αποδίδεται στην ικανοποίηση των κριτηρίων εγκυρότητας, δεδομένου ότι κατά κανόνα σπανίζουν οι πληροφορίες τεκμηρίωσης για τα φυσικά εδάφη.

11. Τα ξηρά συστατικά του εδάφους αναμειγνύονται επιμελώς (π.χ. σε εργαστηριακό αναμείκτη μεγάλης κλίμακας). Για τον προσδιορισμό του pH χρησιμοποιείται μείγμα εδάφους και διαλύματος χλωριούχου καλίου (KCl) 1 M ή χλωριούχου ασβεστίου ($CaCl_2$) 0,01 M σε αναλογία 1:5 [βλ. (14) και προσάρτημα 3]. Εάν η οξύτητα του εδάφους υπερβαίνει το απαιτούμενο εύρος τιμών (βλ. σημείο 10), μπορεί να ρυθμιστεί με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας $CaCO_3$. Αν το έδαφος είναι υπερβολικά αλκαλικό, μπορεί να διορθωθεί με την προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας του μείγματος που περιέχει τα πρώτα τρία συστατικά που περιγράφονται στο σημείο 10, εξαιρουμένου του $CaCO_3$.

12. Η μέγιστη υδατοχωρητικότητα (WHC) του τεχνητού εδάφους προσδιορίζεται σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφονται στο προσάρτημα 2. Δύο έως επτά ημέρες πριν από την έναρξη της δοκιμής, το ξηρό τεχνητό έδαφος προϋγραίνεται με την προσθήκη επαρκούς ποσότητας αποσταγμένου ή απιονισμένου νερού ώστε να επιτευχθεί περίπου το ήμισυ της τελικής περιεκτικότητας σε νερό, η οποία θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 40 % και 60 % της μέγιστης WHC. Η υγρασία ρυθμίζεται στο 40-60 % της μέγιστης WHC με την προσθήκη του διαλύματος της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και/ή αποσταγμένου ή απιονισμένου νερού (βλ. παραγράφους 16-18). Επιπροσθέτως, η υγρασία του εδάφους θα πρέπει να ελέγχεται κατά προσέγγιση με ήπια συμπίεση του εδάφους στην παλάμη του χεριού: εάν η υγρασία είναι σωστή, θα πρέπει να εμφανίζονται μικρές σταγόνες νερού μεταξύ των δακτύλων.

13. Η υγρασία του εδάφους προσδιορίζεται στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής με ξήρανση μέχρι σταθερού βάρους στους 105 °C, σύμφωνα με το πρότυπο ISO 11465 (17), και το pH του εδάφους σύμφωνα με το προσάρτημα 3 ή το πρότυπο ISO 10390 (14). Οι μετρήσεις αυτές θα πρέπει να εκτελούνται σε πρόσθετα δείγματα χωρίς ακάρεα, λαμβανόμενα τόσο από το έδαφος-μάρτυρα όσο και από κάθε έδαφος με συγκέντρωση δοκιμής. Το pH του εδάφους δεν πρέπει να ρυθμίζεται όταν υποβάλλονται σε δοκιμή οξέα ή βάσεις. Η υγρασία θα πρέπει να παρακολουθείται σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής με περιοδική ζύγιση των δοχείων (βλ. παραγράφους 20 και 24).

Επιλογή και προετοιμασία των υπό δοκιμή ζώων

14. Το είδος που χρησιμοποιείται στη δοκιμή είναι το *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* (Canestrini, 1883). Για την έναρξη της δοκιμής απαιτούνται ενήλικα θηλυκά ακάρεα από συγχρονισμένη κοόρτη. Τα ακάρεα θα πρέπει να εισάγονται περίπου 7-14 ημέρες μετά την ενηλικίωσή τους, 28–35 ημέρες μετά την έναρξη της εναπόθεσης των αυγών κατά τον συγχρονισμό (βλ. σημείο 3 και προσάρτημα 4). Θα πρέπει να καταγράφεται η πηγή των ακάρεων ή ο προμηθευτής και η διατήρηση της εργαστηριακής καλλιέργειας. Αν διατηρείται εργαστηριακή καλλιέργεια, συνιστάται να επιβεβαιώνεται η ταυτότητα του είδους τουλάχιστον μία φορά ετησίως. Στο προσάρτημα 6 περιλαμβάνεται φύλλο ταυτοποίησης.

Παρασκευή των συγκεντρώσεων δοκιμής

15. Η υπό δοκιμή χημική ουσία αναμειγνύεται με το έδαφος. Οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται για να υποβοηθήσουν την αγωγή του εδάφους με την υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να επιλέγονται βάσει της χαμηλής τους τοξικότητας για τα ακάρεα και στον σχεδιασμό της δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνεται κατάλληλος μάρτυρας με τον διαλύτη (βλ. σημείο 29).

Υπό δοκιμή χημική ουσία διαλυτή στο νερό

16. Παρασκευάζεται διάλυμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε απιονισμένο νερό, σε ποσότητα που επαρκεί για όλες τις επαναλήψεις μίας συγκέντρωσης δοκιμής. Συνιστάται να χρησιμοποιείται η κατάλληλη ποσότητα νερού για την επίτευξη της απαιτούμενης υγρασίας, δηλ. 40 έως 60 % της μέγιστης υδατοχωρητικότητας (βλ. σημείο 12). Κάθε διάλυμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας αναμειγνύεται πλήρως με μία παρτίδα του προϋγραθέντος εδάφους πριν από την εισαγωγή του στο δοχείο δοκιμής.

▼M6

Υπό δοκιμή χημική ουσία αδιάλυτη στο νερό

17. Όταν πρόκειται για χημικές ουσίες αδιάλυτες στο νερό αλλά διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες, η υπό δοκιμή χημική ουσία μπορεί να διαλύεται στον μικρότερο δυνατό όγκο κατάλληλου φορέα (π.χ. ακετόνης). Μόνο πτητικοί διαλύτες θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Όταν χρησιμοποιούνται τέτοιοι φορείς, όλες οι συγκεντρώσεις δοκιμής και ο μάρτυρας θα πρέπει να περιέχουν την ίδια ελάχιστη ποσότητα φορέα. Ο φορέας ψεκάζεται σε μικρή ποσότητα, π.χ. 10 g, λεπτής χαλαζιακής άμμου ή αναμειγνύεται με αυτήν. Η συνολική περιεκτικότητα του υποστρώματος σε άμμο θα πρέπει να διορθώνεται ως προς την ποσότητα αυτή. Ο φορέας απομακρύνεται με εξάτμιση σε απαγωγό επί τουλάχιστον μία ώρα. Αυτό το μείγμα χαλαζιακής άμμου και υπό δοκιμή χημικής ουσίας προστίθεται στο προϋγραθέν έδαφος και αναμειγνύεται πλήρως με αυτό μετά την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας απιονισμένου νερού για να επιτευχθεί η απαιτούμενη υγρασία. Το τελικό μείγμα εισάγεται στα δοχεία δοκιμής. Να σημειωθεί ότι ορισμένοι διαλύτες μπορεί να είναι τοξικοί για τα ακάρεα. Συνεπώς, συνιστάται να χρησιμοποιείται πρόσθετος μάρτυρας με νερό χωρίς φορέα, αν δεν είναι γνωστή η τοξικότητα του διαλύτη για τα ακάρεα. Αν καταδειχθεί επαρκώς η απουσία επίδρασης του διαλύτη (στις συγκεντρώσεις που πρόκειται να εφαρμοστούν), μπορεί να παραλειφθεί ο μάρτυρας με νερό.

Υπό δοκιμή χημική ουσία δυσδιάλυτη στο νερό και σε οργανικούς διαλύτες

18. Όταν πρόκειται για χημικές ουσίες δυσδιάλυτες στο νερό και σε οργανικούς διαλύτες, αναμειγνύεται το ισοδύναμο 2,5 g λεπτοαλεσμένης χαλαζιακής άμμου ανά δοχείο δοκιμής (για παράδειγμα 10 g λεπτής χαλαζιακής άμμου για τέσσερις επαναλήψεις) με την ποσότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, για να ληφθεί η επιθυμητή συγκέντρωση δοκιμής. Η συνολική περιεκτικότητα του υποστρώματος σε άμμο θα πρέπει να διορθώνεται ως προς την ποσότητα αυτή. Αυτό το μείγμα χαλαζιακής άμμου και υπό δοκιμή χημικής ουσίας προστίθεται στο προϋγραθέν έδαφος και αναμειγνύεται πλήρως με αυτό μετά την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας απιονισμένου νερού για να επιτευχθεί η απαιτούμενη υγρασία. Το τελικό μείγμα κατανέμεται στα δοχεία δοκιμής. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για κάθε συγκέντρωση δοκιμής και παρασκευάζεται επίσης κατάλληλος μάρτυρας.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Ομάδες δοκιμής και μάρτυρες

19. Συνιστώνται δέκα ενήλικα θηλυκά σε 20 g ξηρής μάζας τεχνητού εδάφους για κάθε μάρτυρα και δοχείο αγωγής. Οι οργανισμοί δοκιμής θα πρέπει να προστίθενται εντός δύο ωρών από την παρασκευή του τελικού υποστρώματος δοκιμής (δηλ. μετά την εφαρμογή του δοκιμίου). Σε ειδικές περιπτώσεις (π.χ. όταν η γήρανση του εδάφους θεωρείται καθοριστικός παράγοντας), το χρονικό διάστημα μεταξύ της παρασκευής του τελικού υποστρώματος δοκιμής και της προσθήκης των ακάρεων μπορεί να παραταθεί [για λεπτομέρειες σχετικά με τη γήρανση, βλ. (18)]. Ωστόσο, σε τέτοιες περιπτώσεις πρέπει να παρέχεται επιστημονική αιτιολογία.

20. Μετά την προσθήκη τους στο έδαφος, τα ακάρεα σιτίζονται και μετριέται το αρχικό βάρος κάθε δοχείου δοκιμής, ώστε να χρησιμοποιηθεί ως τιμή αναφοράς για την παρακολούθηση της υγρασίας του εδάφους σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής, όπως περιγράφεται στο σημείο 24. Στη συνέχεια, τα δοχεία δοκιμής καλύπτονται όπως περιγράφεται στο σημείο 8 και τοποθετούνται στον θάλαμο δοκιμής.

21. Ετοιμάζονται οι κατάλληλοι μάρτυρες για καθεμία από τις μεθόδους εφαρμογής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που περιγράφονται στις παραγράφους 15 έως 18. Για την ετοιμασία των μαρτύρων εφαρμόζονται οι αντίστοιχες διαδικασίες που περιγράφονται, χωρίς όμως να προστίθεται η υπό δοκιμή χημική ουσία. Συνεπώς, εφαρμόζονται στους μάρτυρες, ανάλογα με την περίπτωση, οργανικοί διαλύτες, χαλαζιακή άμμος ή άλλοι φορείς στις ίδιες συγκεντρώσεις/ποσότητες όπως στις διάφορες αγωγές. Όταν χρησιμοποιείται διαλύτης ή άλλος φορέας για την προσθήκη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, θα πρέπει επίσης να ετοιμάζεται και να ελέγχεται ένας επιπλέον μάρτυρας χωρίς τον φορέα ή την υπό δοκιμή χημική ουσία, σε περίπτωση που η τοξικότητα του διαλύτη δεν είναι γνωστή (βλ. σημείο 17).

▼M6

Συνθήκες δοκιμής

22. Η θερμοκρασία δοκιμής θα πρέπει να είναι 20 ± 2 °C, να καταγράφεται τουλάχιστον σε ημερήσια βάση και να ρυθμίζεται, αν χρειαστεί. Η δοκιμή διεξάγεται υπό ελεγχόμενους κύκλους φωτός-σκότους (κατά προτίμηση, 16 ώρες φως και 8 ώρες σκοτάδι) με φωτεινή ισχύ 400 έως 800 lux κοντά στα δοχεία δοκιμής. Για λόγους συγκρισιμότητας, οι συνθήκες αυτές είναι οι ίδιες όπως σε άλλες οικοτοξικολογικές δοκιμές εδάφους [π.χ. (15)].

23. Η ανταλλαγή αερίων πρέπει να εξασφαλίζεται με αερισμό των δοχείων δοκιμής τουλάχιστον δύο φορές εβδομαδιαίως σε περίπτωση που χρησιμοποιούνται βιδωτά πώματα. Αν χρησιμοποιούνται καλύμματα από γάζα, πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στη διατήρηση της υγρασίας του εδάφους (βλ. παραγράφους 8 και 24).

24. Η περιεκτικότητα του εδαφικού υποστρώματος σε νερό στα δοχεία δοκιμής διατηρείται σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής με ζύγιση και, αν χρειαστεί, με περιοδική προσθήκη νερού στα δοχεία (π.χ. μία φορά εβδομαδιαίως). Οι απώλειες αναπληρώνονται, όταν χρειάζεται, με απιονισμένο νερό. Η υγρασία κατά τη διάρκεια της δοκιμής θα πρέπει να μη διαφέρει περισσότερο από 10 % από την αρχική τιμή.

Σίτιση

25. Τα ακάρεα των τυριών [*Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781)] έχουν αποδειχθεί καλή πηγή σίτισης. Κατάλληλα μπορεί να είναι επίσης (21) μικρά κολλέμβολα [π.χ. *Folsomia* candida Willem, 1902 ή Onychiurus *fimatus* (19), (20)], enchytraeids (π.χ. *Enchytraeus crypticus* Westheide & Graefe, 1992) ή νηματώδεις (π.χ. *Turbatrix silusiae* de Man, 1913). Συνιστάται να ελέγχεται η τροφή πριν από τη χρήση σε δοκιμή. Το είδος και η ποσότητα της τροφής θα πρέπει να καλύπτει επαρκή αριθμό νεαρών ατόμων ώστε να πληρούνται τα κριτήρια εγκυρότητας (σημείο 6). Για την επιλογή της λείας θα πρέπει να εξετάζεται ο τρόπος δράσης του δοκιμίου (π.χ. ένα ακαρεοκτόνο μπορεί να είναι τοξικό και για τα ακάρεα τροφίμων, βλ. σημείο 26).

26. Η τροφή θα πρέπει να παρέχεται κατά βούληση *(ad libitum)*, δηλ. κάθε φορά μικρή ποσότητα (στην άκρη μιας σπάτουλας). Για τον σκοπό αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης συσκευή ροής αέρα με χαμηλή αναρρόφηση, όπως η προτεινόμενη στη δοκιμή σε κολλέμβολα, ή ένα λεπτό πινέλο. Συνήθως αρκεί η χορήγηση τροφής στην αρχή της δοκιμής και, κατόπιν, δύο έως τρεις φορές εβδομαδιαίως. Όταν το δοκίμιο φαίνεται να είναι τοξικό για τη λεία, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο αυξημένου ρυθμού σίτισης και/ή εναλλακτική πηγή τροφής.

Επιλογή των συγκεντρώσεων δοκιμής

27. Αν είναι εκ των προτέρων γνωστή η τοξικότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, π.χ. από μελέτες προσδιορισμού εύρους τιμών, διευκολύνεται η επιλογή κατάλληλων συγκεντρώσεων δοκιμής. Αν χρειαστεί, διεξάγεται δοκιμή προσδιορισμού του εύρους τιμών με πέντε συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μεταξύ 0,1 και 1 000 mg/kg ξηρού εδάφους, με τουλάχιστον μία επανάληψη για τις αγωγές και τον μάρτυρα. Η διάρκεια της δοκιμής προσδιορισμού εύρους τιμών είναι 14 ημέρες, μετά την παρέλευση των οποίων προσδιορίζονται η θνησιμότητα των ενήλικων ακάρεων και ο αριθμός των νεαρών ατόμων. Το εύρος συγκεντρώσεων για την τελική δοκιμή θα πρέπει κατά προτίμηση να επιλέγεται έτσι ώστε να περικλείει συγκεντρώσεις που επιδρούν στον αριθμό των νεαρών ατόμων, αλλά δεν επιδρούν στην επιβίωση της μητρικής γενεάς. Αυτό πάντως δεν είναι ίσως δυνατό όταν πρόκειται για χημικές ουσίες που έχουν θανατηφόρες και υποθανατηφόρες επιδράσεις σε παρόμοιες συγκεντρώσεις. Η συγκέντρωση επίδρασης (π.χ. EC_{50} EC_{25}, EC_{10}) και το εύρος συγκεντρώσεων που ενδιαφέρουν σε σχέση με την επίδραση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, θα πρέπει να καλύπτονται από τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή. Η προεκβολή σε τιμές πολύ χαμηλότερες από την κατώτατη συγκέντρωση που έχει επίδραση στους οργανισμούς δοκιμής ή υψηλότερες από την ανώτατη συγκέντρωση που ελέγχθηκε επιτρέπεται μόνο σε εξαιρετικές περιπτώσεις και θα πρέπει να αιτιολογείται πλήρως στην έκθεση.

Σχεδιασμός του πειράματος

Δοκιμές δόσης-απόκρισης

28. Προτείνονται τρεις σχεδιασμοί, βάσει των συστάσεων που προκύπτουν από άλλη δοκιμή δακτυλίου [δοκιμή αναπαραγωγής enchytraeid (22)]. Η

▼M6

γενική καταλληλότητα όλων αυτών των σχεδιασμών επιβεβαιώθηκε με το αποτέλεσμα της επικύρωσης σε *H. aculeifer*.

29. Κατά τον καθορισμό του εύρους συγκεντρώσεων θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα ακόλουθα:

— Για τον προσδιορισμό της EC_x (π.χ. EC_{10}, EC_{50}), θα πρέπει να ελέγχονται δώδεκα συγκεντρώσεις. Συνιστώνται τουλάχιστον δύο επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση δοκιμής και έξι επαναλήψεις με μάρτυρες. Ο συντελεστής διαστήματος μπορεί να διαφέρει, δηλ. να είναι μικρότερος ή ίσος με 1,8 στο αναμενόμενο εύρος συγκεντρώσεων επίδρασης και πάνω από 1,8 στην υψηλότερη και τη χαμηλότερη συγκέντρωση.

— Για τον προσδιορισμό της NOEC, θα πρέπει να ελέγχονται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις σε γεωμετρική σειρά. Συνιστώνται τέσσερις επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση δοκιμής συν οκτώ μάρτυρες. Οι συγκεντρώσεις πρέπει να απέχουν κατά συντελεστή που δεν υπερβαίνει το 2,0.

— Με μια συνδυαστική προσέγγιση είναι δυνατός ο προσδιορισμός και της NOEC και της ECx. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οκτώ συγκεντρώσεις αγωγής σε γεωμετρική σειρά. Συνιστώνται τέσσερις επαναλήψεις για κάθε αγωγή συν οκτώ μάρτυρες. Οι συγκεντρώσεις θα πρέπει να απέχουν κατά συντελεστή που δεν υπερβαίνει το 1,8.

Οριακή δοκιμή

30. Αν δεν παρατηρηθούν επιδράσεις στην ανώτατη συγκέντρωση κατά τη δοκιμή προσδιορισμού εύρους τιμών (δηλ. 1 000 mg/kg βάρους ξηρού εδάφους), η οριστική δοκιμή αναπαραγωγής είναι δυνατόν να διεξαχθεί ως οριακή δοκιμή, με τη χρήση συγκέντρωσης δοκιμής ίσης με 1 000 mg/kg βάρους ξηρού εδάφους. Η οριακή δοκιμή δίνει τη δυνατότητα να καταδειχθεί ότι η NOEC ή η EC_{10} για την αναπαραγωγή είναι μεγαλύτερη από την οριακή συγκέντρωση, ενώ ελαχιστοποιείται ο αριθμός των ακάρεων που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οκτώ επαναλήψεις, τόσο για το έδαφος αγωγής όσο και για τον μάρτυρα.

Διάρκεια της δοκιμής και μετρήσεις

31. Τυχόν παρατηρούμενες διαφορές ως προς τη συμπεριφορά και τη μορφολογία των ακάρεων μεταξύ των δοχείων-μαρτύρων και των υπό αγωγή δοχείων θα πρέπει να καταγράφονται.

32. Την 14η μέρα τα επιζώντα ακάρεα εξάγονται από το έδαφος με θερμότητα/φωτεινή ακτινοβολία ή με άλλη κατάλληλη μέθοδο (βλ. προσάρτημα 5). Καταμετρώνται ξεχωριστά τα νεαρά άτομα (δηλ. προνύμφες, πρωτονύμφες και δευτερονύμφες) και τα ακμαία. Τυχόν ενήλικα ακάρεα που δεν παρατηρούνται κατά τη χρονική αυτή στιγμή καταγράφονται ως νεκρά, με την παραδοχή ότι πέθαναν και αποσυντέθηκαν πριν από την αξιολόγηση. Η απόδοση της εξαγωγής πρέπει να επικυρώνεται μία ή δύο φορές ετησίως σε μάρτυρες με γνωστό αριθμό ενήλικων και νεαρών ατόμων. Η απόδοση θα πρέπει να είναι πάνω από 90 %, κατά μέσον όρο, για τον συνδυασμό όλων των αναπτυξιακών σταδίων (βλ. προσάρτημα 5). Δεν γίνεται διόρθωση του αριθμού των ενηλίκων και νεαρών ατόμων για να ληφθεί υπόψη η απόδοση.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

33. Στις παραγράφους 36 έως 41 παρατίθενται πληροφορίες για τις στατιστικές μεθόδους που μπορούν να χρησιμοποιηθούν με σκοπό την ανάλυση των αποτελεσμάτων της δοκιμής. Επιπροσθέτως, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το έγγραφο 54 του ΟΟΣΑ «Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application» (31) (Τρέχουσες προσεγγίσεις στη στατιστική ανάλυση των δεδομένων οικοτοξικότητας: οδηγίες για την εφαρμογή).

34. Το κύριο τελικό σημείο της δοκιμής είναι η αναπαραγωγική απόδοση, εν προκειμένω ο αριθμός νεαρών ατόμων ανά δοχείο επαναληπτικής δοκιμής (όπου έχουν εισαχθεί 10 ενήλικα θηλυκά ακάρεα). Η στατιστική ανάλυση

▼M6

απαιτεί να υπολογίζεται ο αριθμητικός μέσος (X) και η διασπορά (s^2) για την αναπαραγωγική απόδοση ανά αγωγή και ανά μάρτυρα. Οι τιμές X και s^2 χρησιμοποιούνται για τις διαδικασίες ANOVA, όπως οι δοκιμασίες Student's t test, Dunnett ή Williams, καθώς και για τον υπολογισμό των διαστημάτων εμπιστοσύνης 95 %.

Σημείωση: Αυτό το κύριο τελικό σημείο είναι ισοδύναμο με τη γονιμότητα που μετριέται ως το πηλίκο του αριθμού των ζώντων νεαρών ατόμων που παράγονται κατά τη δοκιμή δια του αριθμού των γονικών θηλυκών που εισάγονται στην αρχή της δοκιμής.

35. Ο αριθμός των επιζώντων θηλυκών στους μάρτυρες που δεν υποβάλλονται σε αγωγή αποτελεί σημαντικό κριτήριο εγκυρότητας και θα πρέπει να τεκμηριώνεται. Όπως και στη δοκιμή προσδιορισμού εύρους τιμών, κάθε άλλη ένδειξη πρόκλησης βλάβης θα πρέπει να αναφέρεται και στην τελική έκθεση.

ECx

36. Υπολογίζονται οι τιμές EC_x, συμπεριλαμβανομένων των αντίστοιχων κατώτατων και ανώτατων ορίων εμπιστοσύνης 95 % για την παράμετρο που περιγράφεται στο σημείο 34, με τη χρήση κατάλληλων στατιστικών μεθόδων (π.χ. ανάλυση probit, λογιστική καμπύλη ή συνάρτηση Weibull, σταθμισμένη μέθοδος Spearman-Karber ή απλή παρεμβολή). Η EC_x λαμβάνεται με την εισαγωγή στην προκύπτουσα εξίσωση τιμής που να αντιστοιχεί στο x % της μέσης τιμής για τον μάρτυρα. Για τον υπολογισμό της EC_{50} ή οποιασδήποτε άλλης EC_x, οι μέσες τιμές (X) ανά αγωγή θα πρέπει να υποβάλλονται σε ανάλυση παλινδρόμησης.

NOEC/LOEC

37. Εάν πρόκειται να γίνει στατιστική ανάλυση για τον προσδιορισμό των NOEC/LOEC, απαιτούνται στατιστικά στοιχεία ανά δοχείο (το κάθε δοχείο θεωρείται επανάληψη). Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες στατιστικές μέθοδοι (σύμφωνα με το έγγραφο 54 του ΟΟΣΑ «Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application»). Γενικώς, οι δυσμενείς επιδράσεις του δοκιμίου σε σύγκριση με τον μάρτυρα διερευνώνται με δοκιμασία μονόπλευρης (ελάσσονος) υπόθεσης με $p \leq 0,05$. Παραδείγματα παρέχονται στις επόμενες παραγράφους.

38. Η κανονική κατανομή των δεδομένων μπορεί να ελεγχθεί, π.χ. με τη δοκιμασία ποιότητας προσαρμογής Kolmogorov-Smirnov, τη δοκιμασία λόγου εύρους προς τυπική απόκλιση (δοκιμασία R/s) ή τη δοκιμασία Shapiro-Wilk (αμφίπλευρη, $p \leq 0,05$). Για τον έλεγχο της ομοιογένειας της διασποράς μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι δοκιμασίες Cochran, Levene ή Bartlett (αμφίπλευρες, $p \leq 0,05$). Αν πληρούνται οι προϋποθέσεις των διαδικασιών παραμετρικής δοκιμασίας (κανονικότητα, ομοιογενής διασπορά), μπορούν να διεξαχθούν μονόδρομη ανάλυση της διασποράς (ANOVA) και οι επακόλουθες δοκιμασίες πολλαπλών συγκρίσεων. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλαπλές συγκρίσεις (π.χ. Dunnett's t test) ή δοκιμασίες φθίνουσας τάσης (π.χ. δοκιμασία Williams σε περίπτωση μονότονης σχέσης δόσης-απόκρισης) για να υπολογιστεί αν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p \leq 0,05$) μεταξύ των μαρτύρων και των διαφόρων συγκεντρώσεων του δοκιμίου (επιλογή της συνιστώμενης δοκιμασίας σύμφωνα με το έγγραφο 54 του ΟΟΣΑ «Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application»). Διαφορετικά, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μη παραμετρικές μέθοδοι (π.χ. Bonferoni-U test κατά Holm ή δοκιμασία τάσης κατά Jonckheere-Terpstra) για τον προσδιορισμό των τιμών NOEC και LOEC.

Οριακή δοκιμή

39. Εάν έχει διεξαχθεί οριακή δοκιμή (σύγκριση του μάρτυρα και μίας αγωγής μόνο) και πληρούνται οι προϋποθέσεις των διαδικασιών παραμετρικής δοκιμασίας (κανονικότητα, ομοιογένεια), οι μετρικές αποκρίσεις μπορούν να αξιολογούνται με τη δοκιμασία Student (t-test). Εάν δεν πληρούνται οι απαιτήσεις αυτές, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η δοκιμασία t άνισης διασποράς (Welch t-test) ή μια μη παραμετρική δοκιμασία, όπως η Mann-Whitney-U-test.

40. Για τον προσδιορισμό στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των μαρτύρων (μάρτυρας και μάρτυρας με διαλύτη), οι επαναλήψεις κάθε μάρτυρα μπορούν να ελέγχονται με τον τρόπο που περιγράφεται για την οριακή

▼M6

δοκιμή. Εάν με τους ελέγχους αυτούς δεν εντοπιστούν σημαντικές διαφορές, μπορεί να γίνει συνένωση όλων των επαναλήψεων του μάρτυρα και του μάρτυρα με διαλύτη. Διαφορετικά, όλες οι αγωγές θα πρέπει να συγκρίνονται με τον μάρτυρα με διαλύτη.

Έκθεση δοκιμής

41. Η έκθεση της δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον τα ακόλουθα στοιχεία:

— *Υπό δοκιμή χημική ουσία*

— ταυτότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, όνομα, αριθμός φορτίου, αριθμός παρτίδας και αριθμός CAS, καθαρότητα·

— φυσικοχημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας [π.χ. log K_{ow}, υδατοδιαλυτότητα, τάση ατμών, σταθερά του Henry (H) και, κατά προτίμηση, πληροφορίες για την πορεία της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο έδαφος].

— *Οργανισμοί δοκιμής*

— ταυτοποίηση και προμηθευτής των οργανισμών δοκιμής, περιγραφή των συνθηκών καλλιέργειας·

— ηλικία των οργανισμών δοκιμής.

— *Συνθήκες δοκιμής*

— περιγραφή του πειραματικού σχεδιασμού και της πειραματικής διαδικασίας·

— λεπτομέρειες σχετικά με την παρασκευή του εδάφους δοκιμής· λεπτομερείς προδιαγραφές στην περίπτωση που χρησιμοποιείται φυσικό έδαφος (προέλευση, ιστορικό, κατανομή μεγέθους σωματιδίων, pH, περιεκτικότητα σε οργανική ύλη και, αν είναι γνωστή, ταξινόμηση του εδάφους)·

— μέγιστη υδατοχωρητικότητα του εδάφους·

— περιγραφή της τεχνικής που χρησιμοποιείται για την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο έδαφος·

— λεπτομέρειες των βοηθητικών χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται για τη χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας·

— μέγεθος των δοχείων δοκιμής και ξηρή μάζα του εδάφους δοκιμής ανά δοχείο·

— συνθήκες δοκιμής: ένταση του φωτός, διάρκεια των κύκλων φωτός-σκότους, θερμοκρασία·

— περιγραφή του καθεστώτος σίτισης, του είδους και της ποσότητας της τροφής που χρησιμοποιείται στη δοκιμή, ημερομηνίες σίτισης·

— pH και περιεκτικότητα του εδάφους σε νερό στην αρχή και κατά τη διάρκεια της δοκιμής (μάρτυρας και κάθε αγωγή)·

— λεπτομερής περιγραφή της μεθόδου εξαγωγής και της απόδοσης της εξαγωγής.

— *Αποτελέσματα της δοκιμής*

— αριθμός νεαρών ατόμων που προσδιορίστηκε σε κάθε δοχείο δοκιμής στο τέλος της δοκιμής·

— αριθμός ενήλικων θηλυκών ατόμων και θνησιμότητα των ενήλικων (%) σε κάθε δοχείο δοκιμής στο τέλος της δοκιμής·

— περιγραφή των εμφανών συμπτωμάτων ή των διακριτών αλλαγών συμπεριφοράς·

— τα αποτελέσματα που ελήφθησαν με την υπό δοκιμή χημική ουσία αναφοράς·

— συνοπτικά στατιστικά στοιχεία (EC_x και/ή NOEC) συμπεριλαμβανομένων ορίων εμπιστοσύνης 95 % και περιγραφής της μεθόδου υπολογισμού·

▼**M6**

— γραφική παράσταση της σχέσης συγκέντρωσης-απόκρισης·

— αποκλίσεις από τις διαδικασίες που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών και τυχόν ασυνήθιστα συμβάντα κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Casanueva, M.E. (1993). Phylogenetic studies of the free-living and arthropod associated Laelapidae (Acari: Mesostigmata). Gayana Zool. 57, 21-46.

(2) Tenorio, J. M. (1982). Hypoaspidinae (Acari: Gamasida: Laelapidae) of the Hawaiian Islands. Pacific Insects 24, 259-274.

(3) Bakker, F.M., Feije, R., Grove, A. J., Hoogendorn, G., Jacobs, G., Loose, E.D. and van Stratum, P. (2003). A laboratory test protocol to evaluate effects of plant protection products on mortality and reproduction of the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae) in standard soil. JSS — Journal of Soils and Sediments 3, 73-77.

(4) Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. 2nd edition In: Dahl, F. (Hrsg.): Die Tierwelt Deutschlands 59. Teil, G. Fischer, Jena, 523 σελίδες.

(5) Ruf, A. (1991). Do females eat males?: Laboratory studies on the popualation development of *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Parasitiformes). In: F. Dusbabek & V. Bukva (eds.): Modern Acarology. Academia Prague & SPD Academic Publishing bv, The Hague, Vol. 2, 487-492.

(6) Ruf, A. (1995). Sex ratio and clutch size control in the soil inhabiting predatory mite *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Proc. 2nd Symp. EURAAC: σ. 241-249.

(7) Ruf, A. (1996). Life-history patterns in soil-inhabiting mesostigmatid mites. Proc. IXth Internat. Congr. Acarol. 1994, Columbus, Ohio: σ. 621-628.

(8) Krogh, P.H. and Axelsen, J.A. (1998). Test on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* preying on the collembolan *Folsomia fimetaria*. In: Lokke, H. and van Gestel, C.A.M.: Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley Sons, Chichester, σ. 239-251.

(9) Løkke, H., Janssen, C.R., Lanno, R.P., Römbke, J., Rundgren, S. and Van Straalen, N.M. (2002). Soil Toxicity Tests — Invertebrates. In: Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils. Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. (eds.). SETAC Press, Pensacola, USA. 128 σελίδες.

(10) Schlosser, H.-J. and Riepert, F. (1991/92). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 1: Biologie der Bodenraubmilbe Hypoaspis aculeifer Canestrini, 1883 (Gamasina) unter Laborbedingungen. Zool. Beiträge, 34, 395-433.

(11) Schlosser, H.-J. and Riepert, F. (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Boden-raubmilben (Gamasina). Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. N.F. 34, 413-433.

(12) Heckmann, L.-H., Maraldo, K. and Krogh, P. H. (2005). Life stage specific impact of dimethoate on the predatory mite Hypoaspis aculeifer Canestrini (Gamasida: Laelapidae). Environmental Science & Technology 39, 7154-7157.

(13) Petersen, H. (1978). Some properties of two high-gradient extractors for soil microarthropods, and an attempt to evaluate their extraction efficiency. Natura Jutlandica 20, 95-122.

(14) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Γενεύη.

▼**M6**

(15) Κεφάλαιο Γ.8 του παρόντος παραρτήματος — Τοξικότητα για τους γαιοσκώληκες.

(16) EPPO (2003): EPPO Standards. Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 8. Soil Organisms and Functions. Bull. OEPP/EPPO Bull. 33, 195-209.

(17) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality –Determination of dry matter and water content on a mass basis — Gravimetric method, No. 11465. ISO, Γενεύη.

(18) Fairbrother, A., Glazebrock, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. 2002. Test methods to determine hazards of sparingly soluble metal compounds in soils. SETAC Press, Pensacola, FL, USA.

(19) Chi, H. 1981. Die Vermehrungsrate von Hypoaspis aculeifer Canestrini (Acarina, Laelapidae) bei Ernährung mit Onychiurus fimatus Gisin (Collenbola). Ges.allg..angew. Ent. 3:122-125.

(20) Schlosser, H.J., und Riepert, F. 1992. Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilden (Gamasina). Zool.Beitr. N.F. 34(3):395-433.

(21) Heckmann, L.-H., Ruf, A., Nienstedt, K. M. and Krogh, P. H. 2007. Reproductive performance of the generalist predator Hypoaspis aculeifer (Acari: Gamasida) when foraging on different invertebrate prey. Applied Soil Ecology 36, 130-135.

(22) Κεφάλαιο Γ.32 του παρόντος παραρτήματος- Δοκιμή αναπαραγωγής σε Enchytraeid.

(23) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Γενεύη.

(24) Southwood, T.R.E. (1991). Ecological methods. With particular reference to the study of insect populations. (2nd ed.). Chapman & Hall, London, 524 σελίδες.

(25) Dunger, W. and Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie (2nd ed.). G. Fischer, Jena, 539 σελίδες.

(26) Lesna, I. and Sabelis, M.W. (1999). Diet-dependent female choice for males with «good genes» in a soil predatory mite. Nature 401, 581-583.

(27) Ruf, A. (1989). Die Bedeutung von Arrhenotokie und Kannibalismus für die Populationsentwicklung von Hypoaspis aculeifer (Canestrini 1883) (Acari, Gamasina). Mitt. Deut. Ges. Allg. Angew. Ent. 7, 103-107.

(28) Ruf, A. (1993). Die morphologische Variabilität und Fortpflanzungsbiologie der Raubmilbe Hypoaspis aculeifer (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Dissertation, Universität Bremen.

(29) Ignatowicz, S. (1974). Observations on the biology and development of Hypoaspis aculeifer Canestrini, 1885 (Acarina, Gamasides). Zoologica Poloniae 24, 11-59.

(30) Kevan, D.K. McE. and Sharma, G.D. (1964). Observations on the biology of Hypoaspis aculeifer (Canestrini, 1884), apparently new to North America (Acarina: Mesostigmata: Laelaptidae). Acarologia 6, 647-658.

(31) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/MONO(2006)18.

▼**M6**

Προσάρτημα 1

Ορισμοί

Για την παρούσα μέθοδο δοκιμών ισχύουν οι ακόλουθοι ορισμοί (σε αυτήν τη δοκιμή όλες οι συγκεντρώσεις επίδρασης εκφράζονται ως μάζα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ανά ξηρή μάζα του εδάφους δοκιμής):

Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα.

NOEC (συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης): η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην οποία δεν παρατηρείται καμία επίδραση. Στην παρούσα δοκιμή, η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στη NOEC δεν έχει στατιστικώς σημαντική επίδραση ($p < 0,05$) εντός δεδομένης περιόδου έκθεσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα.

LOEC (κατώτατη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης): η κατώτατη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που έχει στατιστικά σημαντική επίδραση ($p < 0,05$) εντός δεδομένης περιόδου έκθεσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα.

EC_x (αποτελεσματική συγκέντρωση για το x % της επίδρασης): η συγκέντρωση που προκαλεί το x % της επίδρασης στους οργανισμούς δοκιμής εντός συγκεκριμένης περιόδου έκθεσης σε σύγκριση με μάρτυρα. Για παράδειγμα, EC_{50} είναι η συγκέντρωση που εκτιμάται ότι, στο τελικό σημείο δοκιμής, έχει επίδραση σε ποσοστό 50 % του εκτιθέμενου πληθυσμού επί καθορισμένη περίοδο έκθεσης.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

▼**M6**

Προσάρτημα 2

Προσδιορισμός τής μέγιστης υδατοχωρητικοτηταϲ του εδάφους

Η ακόλουθη μέθοδος θεωρείται κατάλληλη για τον προσδιορισμό της μέγιστης υδατοχωρητικότητας του εδάφους. Περιγράφεται στο παράρτημα Γ του προτύπου ISO DIS 11268-2 (Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Part 2: Determination of effects on reproduction) [Ποιότητα εδάφους — Επιδράσεις ρυπαντικών ουσιών στους γαιοσκώληκες *(Eisenia fetida)*. Μέρος 2: Προσδιορισμός επιδράσεων στην αναπαραγωγή] (23).

Συλλέγεται συγκεκριμένη ποσότητα (π.χ. 5 g) του υπό δοκιμή εδαφικού υποστρώματος με τη χρήση κατάλληλης συσκευής δειγματοληψίας (σωλήνας ελικοειδούς διάτρησης κ.λπ). Το κάτω άκρο του σωλήνα καλύπτεται με ένα τεμάχιο διηθητικού χαρτιού διαβρεγμένο με νερό και ο σωλήνας, αφού τοποθετηθεί σε στήριγμα, φέρεται σε υδατόλουτρο. Ο σωλήνας θα πρέπει να βυθίζεται προοδευτικά έως ότου η στάθμη του νερού καλύψει την επιφάνεια του εδάφους και, έπειτα, να μένει στο νερό επί τρεις ώρες περίπου. Δεδομένου ότι το έδαφος δεν μπορεί να συγκρατήσει το σύνολο του νερού που απορροφά μέσω των τριχοειδών πόρων του, το δείγμα εδάφους θα πρέπει να αφήνεται να στραγγίξει για δύο ώρες με την τοποθέτηση του σωλήνα σε ένα στρώμα πολύ υγρής λεπτοαλεσμένης χαλαζιακής άμμου που περιέχεται σε καλυμμένο δοχείο (ώστε να αποφεύγεται η ξήρανση). Το δείγμα θα πρέπει στη συνέχεια να ζυγίζεται και να ξηραίνεται μέχρι σταθερής μάζας στους 105 °C. Η υδατοχωρητικότητα (WHC) μπορεί στη συνέχεια να υπολογιστεί ως εξής:

$$\text{WHC (σε \% ξηρής μάζας)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

όπου:

S = υπόστρωμα κορεσμένο από νερό + μάζα σωλήνα + μάζα διηθητικού χαρτιού

T = απόβαρο (μάζα σωλήνα + μάζα διηθητικού χαρτιού)

D = ξηρή μάζα υποστρώματος

▼**M6**

Προσάρτημα 3

Προσδιορισμός του pH του εδάφους

Η ακόλουθη μέθοδος προσδιορισμού του pH του εδάφους βασίζεται στην περιγραφή που παρατίθεται στο πρότυπο ISO DIS 10390: Soil Quality — Determination of pH (Ποιότητα εδάφους — Προσδιορισμός του pH) (16).

Συγκεκριμένη ποσότητα εδάφους ξηραίνεται σε θερμοκρασία δωματίου επί 12 ώρες τουλάχιστον. Κατόπιν, παρασκευάζεται εναιώρημα του εδάφους (που περιέχει τουλάχιστον 5 g εδάφους) σε πενταπλάσιο όγκο είτε διαλύματος 1 M χλωριούχου καλίου (KCl) αναλυτικής καθαρότητας είτε διαλύματος 0,01 M χλωριούχου ασβεστίου ($CaCl_2$) αναλυτικής καθαρότητας. Το εναιώρημα ανακινείται ζωηρά επί πέντε λεπτά και στη συνέχεια αφήνεται σε ηρεμία επί 2 τουλάχιστον ώρες, το πολύ όμως 24 ώρες. Το pH της υγρής φάσης μετριέται με χρήση πεχάμετρου, το οποίο βαθμονομείται κάθε φορά πριν από τη μέτρηση, με τη χρήση κατάλληλης σειράς ρυθμιστικών διαλυμάτων (π.χ. pH 4,0 και 7,0).

▼M6

Προσάρτημα 4

Εκτροφή του *hypoaspis (geolaelaps) aculeifer* και των άκαρδων τροφίμων, συγχρονισμός καλλιέργειάς

Εκτροφή του Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer:

Οι καλλιέργειες μπορούν να διατηρούνται σε πλαστικά δοχεία ή γυάλινους κώδωνες που έχουν πληρωθεί με μείγμα γύψου-σκόνης άνθρακα (9:1). Η γύψος μπορεί να διατηρηθεί υγρή με την προσθήκη λίγων σταγόνων αποσταγμένου ή απιονισμένου νερού, αν χρειαστεί. Οι θερμοκρασίες εκτροφής είναι βέλτιστες στην περιοχή 20 ± 2 °C, ενώ η φωτοπερίοδος δεν έχει σημασία για το συγκεκριμένο είδος. Η λεία μπορεί να είναι τα ακάρεα Tyrophagus putrescentiae ή Caloglyphus sp. (ο χειρισμός των ακάρεων τροφίμων πρέπει να γίνεται με προσοχή, διότι μπορεί να προκαλέσουν αλλεργίες στον άνθρωπο), αλλά κατάλληλα προς τούτο είναι και οι νηματώδεις, οι enchytraeids και τα κολλέμβολα. Η πηγή της λείας θα πρέπει να καταγράφεται. Η ανάπτυξη του πληθυσμού μπορεί να αρχίσει με ένα μόνο θηλυκό, διότι τα αρσενικά αναπτύσσονται σε μη γονιμοποιημένα αυγά. Οι γενεές επικαλύπτονται σε μεγάλο βαθμό. Ένα θηλυκό μπορεί να ζήσει τουλάχιστον 100 ημέρες και να εναποθέσει κατά προσέγγιση 100 αυγά στη διάρκεια της ζωής του. Ο μέγιστος ρυθμός ωοτοκίας επιτυγχάνεται μεταξύ 10ης και 40ής ημέρας (μετά την ενηλικίωση) και ανέρχεται σε 2,2 αυγά ανά θηλυκό άτομο ανά ημέρα. Ο χρόνος ανάπτυξης από το αυγό στο ακμαίο (ενήλικο) θηλυκό είναι κατά προσέγγιση 20 ημέρες στους 20 °C. Θα πρέπει να διατηρούνται πολλές καλλιέργειες πριν από τη δοκιμή.

Εκτροφή του Tyrophagus putrescentiae:

Τα ακάρεα τροφίμων φυλάσσονται σε γυάλινο δοχείο που έχει πληρωθεί με λεπτή σκόνη ζύμης ζυθοποιίας και τοποθετείται σε πλαστικό κάδο με διάλυμα KNO_3, ώστε να αποτρέπεται η διαφυγή τους. Τα ακάρεα τροφίμων φέρονται στην επιφάνεια αυτής της σκόνης. Στη συνέχεια, αναμειγνύονται προσεκτικά με τη σκόνη (που πρέπει να αντικαθίσταται δύο φορές την εβδομάδα) με τη χρήση σπάτουλας.

Συγχρονισμός καλλιέργειας:

Τα δείγματα ακάρεων που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή θα πρέπει να έχουν την ίδια ηλικία (περίπου 7 ημερών αφότου φτάσουν στο στάδιο της ενηλικίωσης). Σε θερμοκρασία εκτροφής 20 °C, αυτό επιτυγχάνεται ως εξής:

Μεταφέρονται θηλυκά άτομα σε καθαρό δοχείο εκτροφής και προστίθεται επαρκής ποσότητα τροφής.

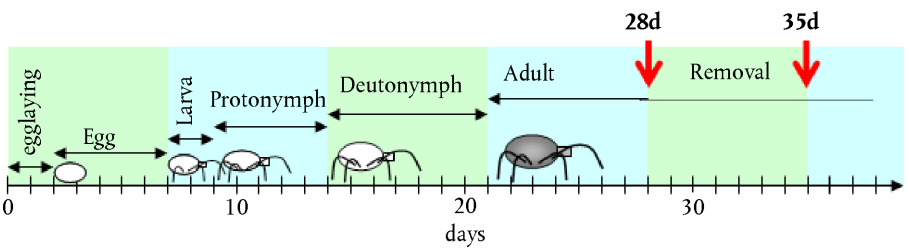
— Δίνεται περιθώριο δύο έως τριών ημερών για την εναπόθεση των αυγών, έπειτα απομακρύνονται τα θηλυκά.

— Λαμβάνονται ενήλικα θηλυκά για τη δοκιμή μεταξύ της 28ης και της 35ης ημέρας από την τοποθέτησή τους στα καθαρά δοχεία εκτροφής.

Τα ενήλικα θηλυκά διακρίνονται εύκολα από τα αρσενικά και τα άλλα αναπτυξιακά στάδια, λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους τους, του διογκωμένου σχήματός τους και του καστανόχρωμου νώτου τους (τα αρσενικά είναι πιο λεπτά και επίπεδα), ενώ τα άωρα είναι λευκά έως υπόλευκα. Η ανάπτυξη των ακάρεων ακολουθεί κατά προσέγγιση το κατωτέρω σχήμα στους 20 °C (σχήμα): αυγό 5 ημ., προνύμφη 2 ημ., πρωτονύμφη 5 ημ., δευτερονύμφη 7 ημ., περίοδος προωοτοκίας του θηλυκού 2 ημ. Στη συνέχεια, τα ακάρεα είναι ακμαία.

Σχήμα

Ανάπτυξη του Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer στους 20 °C. [απομάκρυνση (*removal*) = θηλυκά που χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή]



▼**M6**

Τα ενήλικα υπό δοκιμή ζώα απομακρύνονται από τη συγχρονισμένη καλλιέργεια και εισάγονται στα δοχεία δοκιμής μεταξύ της 28ης και της 35ης ημέρας αφότου αρχίσει η εναπόθεση αυγών από τα γονικά θηλυκά (δηλ. 7 - 14 ημέρες αφότου ενηλικιωθούν). Αυτό εξασφαλίζει ότι έχει ήδη παρέλθει η περίοδος προωοτοκίας των υπό δοκιμή ζώων και ότι αυτά έχουν συζευχθεί με τα αρσενικά που είναι παρόντα στο δοχείο καλλιέργειας. Από παρατηρήσεις σε εργαστηριακές καλλιέργειες έχουν προκύψει ενδείξεις ότι, παρουσία αρσενικών, τα θηλυκά συζεύγνυνται αμέσως ή σχεδόν αμέσως μετά την ενηλικίωσή τους (Ruf, Vaninnen, προσωπικές παρατηρήσεις). Η περίοδος των επτά ημερών έχει επιλεγεί για τη διευκόλυνση της ενσωμάτωσης στην εργαστηριακή ρουτίνα και για την ελαχιστοποίηση της μεταβλητότητας της ανάπτυξης μεταξύ των ατόμων του πληθυσμού των ακάρεων. Η ωοτοκία θα πρέπει να αρχίζει με τον ίδιο τουλάχιστον αριθμό θηλυκών που θα χρειαστούν τελικά για τη δοκιμή. Για παράδειγμα, αν χρειάζονται 400 θηλυκά για τη δοκιμή, θα πρέπει να δοθεί η δυνατότητα ωοτοκίας τουλάχιστον σε 400 θηλυκά για δύο ή τρεις μέρες. Η αφετηρία για τον συγχρονισμένο πληθυσμό θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 1 200 αυγά (αναλογία φύλων περίπου 0,5, θνησιμότητα περίπου 0,2). Για να αποφευχθεί ο κανιβαλισμός, είναι σκοπιμότερο να μην διατηρούνται στο ίδιο δοχείο περισσότερα από 20-30 θηλυκά σε ωοτοκία.

▼**M6**

Προσάρτημα 5

Μέθοδοί εξαγωγής

Για τα μικροαρθρόποδα, η θερμική εξαγωγή είναι κατάλληλη μέθοδος διαχωρισμού των δειγμάτων ζώων από το έδαφος / υπόστρωμα (βλ. σχήμα κατωτέρω). Καθώς η μέθοδος βασίζεται στη δραστηριότητα των οργανισμών, μόνο κινούμενα δείγματα είναι δυνατόν να καταγραφούν. Η αρχή της θερμικής εξαγωγής συνίσταται στη βαθμιαία επιδείνωση των συνθηκών του δείγματος για τους οργανισμούς, ώστε αυτοί να εγκαταλείψουν το υπόστρωμα και να πέσουν σε υγρό καθήλωσης (π.χ. αιθανόλη). Τα κρίσιμα σημεία είναι η διάρκεια της εξαγωγής και η βαθμιαία μεταβολή των συνθηκών για τους οργανισμούς από καλές σε μέτριες και αντίξοες). Η διάρκεια της εξαγωγής στις οικοτοξικολογικές δοκιμές πρέπει να είναι όσο το δυνατόν συντομότερη, επειδή τυχόν αύξηση του πληθυσμού κατά την εξαγωγή θα αλλοίωνε τα αποτελέσματα. Από την άλλη πλευρά, η θερμοκρασία και η υγρασία του δείγματος πρέπει πάντα να κυμαίνονται εντός εύρους που επιτρέπει στα ακάρεα να κινούνται. Η θέρμανση ενός δείγματος εδάφους έχει ως αποτέλεσμα την ξήρανση του υποστρώματος. Αν ο ρυθμός ξήρανσης είναι υπερβολικά ταχύς, ορισμένα ακάρεα ενδέχεται να αφυδατωθούν προτού κατορθώσουν να διαφύγουν.

Συνεπώς, προτείνεται η ακόλουθη διαδικασία (24) (25):

Συσκευή: Χοάνη Tullgren ή παρόμοιες μέθοδοι, όπως π.χ. η μέθοδος McFadyen (θέρμανση από πάνω, τοποθέτηση του δείγματος πάνω από χοάνη)

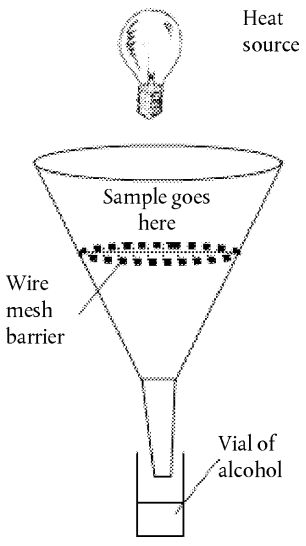
Προγραμματισμός θέρμανσης: 25 °C επί 12 ώρες, 35 °C επί 12 ώρες, 45 °C επί 24 ώρες (συνολικά 48 ώρες). Η θερμοκρασία θα πρέπει να μετριέται στο υπόστρωμα.

Υγρό καθήλωσης: αιθανόλη 70 %

Λεπτομέρειες εκτέλεσης: Χρησιμοποιείται το γυάλινο φιαλίδιο που χρησιμοποιήθηκε για τη δοκιμή. Αφαιρείται το πώμα και γύρω από το στόμιο τυλίγεται ένα τεμάχιο δικτυωτού ή υφάσματος. Το ύφασμα πρέπει να έχει μέγεθος οπών 1,0 έως 1,5 mm. Στερεώνεται το ύφασμα με ελαστική ταινία. Ανατρέπεται με προσοχή το φιαλίδιο και τοποθετείται στη συσκευή εξαγωγής. Το ύφασμα εμποδίζει το υπόστρωμα να εισχωρήσει στο υγρό καθήλωσης, αλλά επιτρέπει στα ακάρεα να εγκαταλείψουν το δείγμα. Η θέρμανση αρχίζει αφού τοποθετηθούν όλα τα φιαλίδια. Η εξαγωγή τερματίζεται σε 48 ώρες. Αφαιρούνται τα φιαλίδια και καταμετρώνται τα ακάρεα με στερεοσκοπικό μικροσκόπιο.

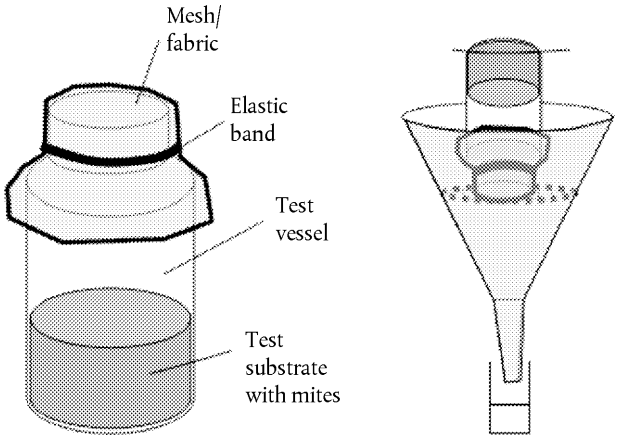
Η απόδοση της επιλεγμένης μεθόδου ως προς την εξαγωγή πρέπει να αποδεικνύεται τουλάχιστον μία ή δύο φορές ετησίως με τη χρήση δοχείων που περιέχουν γνωστό αριθμό νεαρών και ενήλικων ατόμων, διατηρούμενων σε υπόστρωμα δοκιμής χωρίς αγωγή. Η απόδοση θα πρέπει να είναι ≥ 90 % κατά μέσον όρο για τον συνδυασμό όλων των αναπτυξιακών σταδίων.

Συσκευή εξαγωγής τύπου Tullgren



▼**M6**

Ετοιμασία του δοκιμαστικού φιαλιδίου μετά το τέλος της δοκιμής, πριν από την εξαγωγή



▼**M6**

Προσάρτημα 6

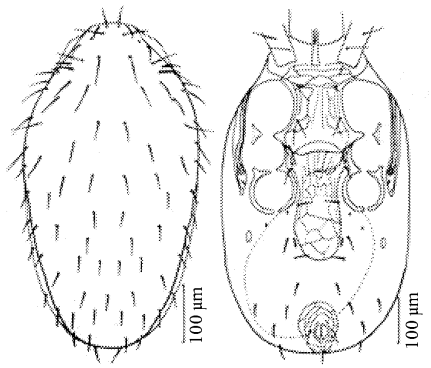
Ταυτοποίηση του hypoaspis (geolaelaps) aculeifer

Υφομοταξία/τάξη/υποτάξη:	Οικογένεια:	Γένος/υπογένος/είδος:
Ακάρεα/Παρασιτόμορφα/Γαμασίδες	Laelapidae	*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

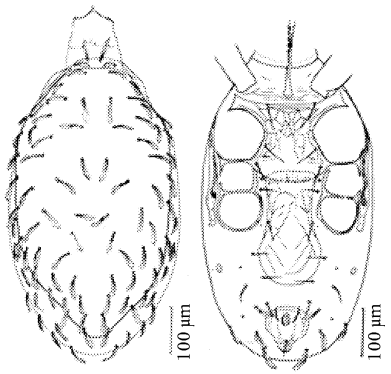
Συγγραφέας και ημερομηνία:	F. Faraji, Ph.D. (MITOX), 23 Ιανουαρίου 2007

Σχετική βιβλιογραφία:	Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. Tierwelt Deutschlands 59, 2nd revised edition: 1-523. Hughes, A.M. (1976). The mites of stored food and houses. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin 9: 400 σελίδες. Krantz, G.W. (1978). A manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc., 509 σελίδες.

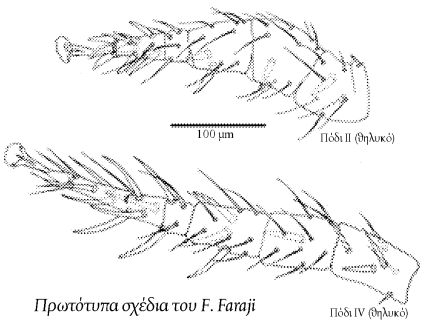
Προσδιοριστικά χαρακτηριστικά:	Τέγος (tectum) με στρογγυλευμένο οδοντωτό περιθώριο· υποστοματικές αύλακες με πάνω από 6 οδοντίσκους· ουραίες νωτιαίες τρίχες Z4 όχι πολύ μακριές· τριχόμορφες νωτιαίες τρίχες· συνήθης γεννητικός θυρεός, όχι πολύ πεπλατυσμένος, που δεν φθάνει μέχρι τον εδρικό θυρεό· οπίσθιο ήμισυ του νώτου χωρίς άζυγες τρίχες· πόδια II και IV με μερικά παχιά μακροτρίχια· νωτιαίες τρίχες Z5 μήκους περίπου διπλάσιου εκείνου των J5· σταθερό δάκτυλο χηλικεραίας με 12-14 δόντια και κινητό δάκτυλο με 2 δόντια· ιδιόσωμα μήκους 520-685 μm. Το Hypoaspis miles χρησιμοποιείται επίσης στον βιολογικό έλεγχο επιβλαβών οργανισμών και μπορεί να δημιουργηθεί σύγχυση με το H. aculeifer. Η κυριότερη διαφορά είναι η εξής: Το Hypoaspis miles ανήκει στο υπογένος Cosmolaelaps και έχει λεπιδόμορφες νωτιαίες τρίχες, ενώ το H. aculeifer ανήκει στο υπογένος Geolaelaps και έχει τριχόμορφες νωτιαίες τρίχες.



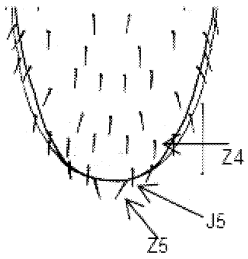
Hypoaspis aculeifer σύμφωνα με τον Hughes, 1976



Hypoaspis miles σύμφωνα με τον Hughes, 1976



Πρωτότυπα σχέδια του F. Faraji



Hypoaspis aculeifer,
ραχιαίος θυρεός με χαρακτηριστικές τριχόμορφες νωτιαίες τρίχες

▼**M6**

Προσάρτημα 7

Βασικές πληροφορίες για τη βιολογία του *hypoaspis (geolaelaps) aculeifer*

Το *Hypoaspis aculeifer* ανήκει στην οικογένεια των Lealapidae, τάξη των Ακάρεων, ομοταξία των Αραχνιδίων (Αραχνόμορφων), άθροισμα των Αρθροπόδων. Ζει σε όλων των ειδών τα εδάφη και τρέφεται με άλλα ακάρεα, νηματώδεις, enchytraeids και κολλέμβολα (26). Σε περίπτωση έλλειψης τροφής παρατηρείται κανιβαλισμός (27). Τα αρπακτικά ακάρεα είναι ταγματωμένα σε ιδιόσωμα και γναθόσωμα. Στο ιδιόσωμα δεν υπάρχει σαφής διαφοροποίηση ανάμεσα σε πρόσωμα (κεφαλή) και οπισθόσωμα (κοιλία). Το γναθόσωμα (κεφαλοθώρακας) φέρει τα εξαρτήματα θρέψης, όπως προσακτρίδες και χηλικεραίες. Οι χηλικεραίες είναι τριχοτομημένες και φέρουν δόντια διαφόρων σχημάτων. Εκτός από την πρόσληψη τροφής, τα αρσενικά χρησιμοποιούν τις χηλικεραίες τους κυρίως για να μεταφέρουν τα σπερματοφόρα στα θηλυκά. Το ιδιόσωμα καλύπτεται σχεδόν τελείως από το νώτο. Μεγάλο τμήμα του ιδιοσώματος των θηλυκών καταλαμβάνουν τα αναπαραγωγικά όργανα, που είναι ιδιαιτέρως διακριτά λίγο πριν από την εναπόθεση των αυγών. Στην κοιλιακή χώρα βρίσκονται δύο θυρεοί, ο στερνικός και ο γεννητικός. Όλα τα πόδια φέρουν σμήριγγες και άκανθες. Οι σμήριγγες χρησιμοποιούνται ως άγκιστρα όταν το άκαρι κινείται στο εσωτερικό ή στην επιφάνεια του εδάφους. Το πρώτο ζεύγος ποδιών χρησιμοποιείται κυρίως ως κεραία. Το δεύτερο ζεύγος ποδιών δεν χρησιμοποιείται μόνο για την κίνηση αλλά και για την ακινητοποίηση της λείας. Οι άκανθες του τέταρτου ζεύγους ποδιών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για προστασία καθώς και ως κινητήριος μοχλός (28). Τα αρσενικά έχουν μήκος 0,55 - 0,65 mm και βάρος 10 - 15 μg. Τα θηλυκά έχουν μήκος 0,8 - 0,9 mm και βάρος 50 - 60 μg (8) (28) (εικόνα 1).

Εικόνα 1

Θηλυκό, αρσενικό, πρωτονύμφη και προνύμφη του H. aculeifer



Στους 23 °C, τα ακάρεα ωριμάζουν προς αναπαραγωγή ύστερα από 16 ημέρες (θηλυκά) και 18 ημέρες (αρσενικά) (6). Τα θηλυκά μεταφέρουν το σπέρμα με το σωληνόστομα, από όπου καταλήγει στην ωοθήκη. Στην ωοθήκη, τα σπερματοζωάρια ωριμάζουν και στη συνέχεια αποθηκεύονται. Η γονιμοποίηση γίνεται μόνο μετά την ωρίμαση των σπερματοζωαρίων στην ωοθήκη. Τα θηλυκά εναποθέτουν γονιμοποιημένα και μη γονιμοποιημένα αυγά σε μάζες ή ξεχωριστά, κατά προτίμηση μέσα σε ρωγμές ή οπές. Τα συζευγμένα θηλυκά μπορούν να γεννήσουν απογόνους και των δύο φύλων, ενώ από τα αυγά των μη συζευγμένων θηλυκών εκκολάπτονται μόνο αρσενικά άτομα. Τέσσερα είναι τα αναπτυξιακά στάδια έως την ενηλικίωση (αυγό — προνύμφη, προνύμφη — πρωτονύμφη (πρώτο νυμφικό στάδιο), πρωτονύμφη — δευτερονύμφη (δεύτερο νυμφικό στάδιο), δευτερονύμφη — ακμαίο).

Το αυγό είναι γαλακτόχρωμο, υαλώδες, ελλειπτικού σχήματος και έχει μήκος περίπου 0,37 mm με συμπαγή μανδύα. Σύμφωνα με τη δημοσίευση (8), η προνύμφη έχει μέγεθος μεταξύ 0,42 - 0,45 mm και μόνο τρία ζεύγη ποδιών. Στην περιοχή της κεφαλής αναπτύσσονται προσακτρίδες και χηλικεραίες. Οι χηλικεραίες, που φέρουν μερικούς οδοντίσκους, χρησιμοποιούνται για την εκκόλαψη από το αυγό. Μετά την πρώτη έκδυση, 1 - 2 ημέρες από την εκκόλαψη,

▼**M6**

αναπτύσσονται οι πρωτονύμφες. Είναι επίσης χρώματος λευκού, μεγέθους 0,45 - 0,62 mm (8) και έχουν τέσσερα ζεύγη ποδιών. Στις χηλικεραίες τα δόντια έχουν πλήρως εμφανιστεί. Ήδη από το στάδιο αυτό τα ακάρεα αρχίζουν να συλλέγουν τροφή. Για τον σκοπό αυτό, διαπερνούν με τις χηλικεραίες τη δερμίδα του εξωσκελετού της λείας τους και καλύπτουν την τελευταία με έκκριση για εξωτερική πέψη. Το άκαρι μπορεί στη συνέχεια να απομυζήσει τον πολτό τροφής. Οι χηλικεραίες μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για τη διάρρηξη βώλων τροφής και την απόσπαση μεγαλύτερων σωματιδίων (28). Ύστερα από μία ακόμη έκδυση, αναπτύσσονται οι δευτερονύμφες. Έχουν μήκος 0,60 - 0,80 mm (8) και χρώμα κίτρινο ως ανοιχτό καστανό. Από το στάδιο αυτό και έπειτα διακρίνονται σε θηλυκά και αρσενικά. Ύστερα από μία ακόμα έκδυση, στη διάρκεια της οποίας τα ζώα είναι αδρανή και αναπτύσσεται το καστανόχρωμο νώτο (περίπου μετά από 14 ημέρες), τα ακάρεα είναι ακμαία (28) (29) (30). Η διάρκεια ζωής τους κυμαίνεται μεταξύ 48 και 100 ημερών στους 25 °C (27).

▼**M6**

Προσάρτημα 8

Περίληψη και χρονοδιάγραμμα των κυριοτέρων ενεργειών για την εκτέλεσή τής δοκιμής με τον hypoaspis

Χρόνος (ημέρες) Έναρξη δοκιμής = ημέρα 0	Ενέργεια / εργασία
Ημέρα -35 μέχρι -28	Μεταφορά θηλυκών από την καλλιέργεια παρακαταθήκης σε καθαρά δοχεία για να αρχίσει ο συγχρονισμός Μετά 2 ημέρες: απομάκρυνση των θηλυκών Δύο έως τρεις φορές εβδομαδιαίως: χορήγηση επαρκούς ποσότητας τροφής
Ημέρα -5 (+/- 2)	Παρασκευή τεχνητού εδάφους
Ημέρα -4 (+/- 2)	Προσδιορισμός της υδατοχωρητικότητας του τεχνητού εδάφους Ξήρανση για μία νύχτα Επόμενη ημέρα: ζύγιση δειγμάτων και υπολογισμός υδατοχωρητικότητας
Ημέρα -4 (+/- 2)	Προϋγρανση του τεχνητού εδάφους για να επιτευχθεί ποσοστό 20 - 30 % της υδατοχωρητικότητας
Ημέρα 0	Έναρξη της δοκιμής: προσθήκη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο τεχνητό έδαφος Εισαγωγή 10 θηλυκών σε κάθε δοχείο επανάληψης (replicate) Ζύγιση κάθε δοχείου επανάληψης Ετοιμασία αβιοτικών μαρτύρων για την υγρασία και το pH, 2 επαναλήψεις ανά αγωγή Ξήρανση των μαρτύρων υγρασίας για μία νύχτα Επόμενη ημέρα: ζύγιση των μαρτύρων υγρασίας Επόμενη ημέρα: μέτρηση του pH των ξηρών αβιοτικών μαρτύρων
Ημέρα 3, 6, 9, 12 (περίπου)	Τροφοδότηση κάθε δοχείου επανάληψης με επαρκή ποσότητα λείας Ζύγιση κάθε δοχείου επανάληψης και ενδεχομένως αναπλήρωση του εξατμισμένου νερού
Ημέρα 14	Λήξη της δοκιμής, εξαγωγή με όλα τα δοχεία επανάληψης συν τους μάρτυρες απόδοσης εξαγωγής Ξήρανση των μαρτύρων υγρασίας για μία νύχτα Επόμενη ημέρα: ζύγιση των μαρτύρων υγρασίας Επόμενη ημέρα: μέτρηση του pH των ξηρών μαρτύρων
Ημέρα 16	Λήξη της εξαγωγής
Ημέρα 16+	Καταγραφή του αριθμού των ενηλίκων και νεαρών ατόμων στο εξαχθέν υλικό Αναφορά των αποτελεσμάτων σε πρότυπους πίνακες Αναφορά της διαδικασίας δοκιμής σε φύλλα πρωτοκόλλου δοκιμής

▼M6

Γ.37. **ΔΟΚΙΜΗ 21-ΗΜΕΡΩΝ ΣΕ ΨΑΡΙΑ: ΜΙΑ ΒΡΑΧΥΠΡΟΘΕΣΜΗ ΔΟΚΙΜΗ ΔΙΑΛΟΓΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΔΡΟΓΟΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ, ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΑΡΩΜΑΤΑΣΗΣ**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 230 του ΟΟΣΑ (2009). Η ανάγκη ανάπτυξης κι επικύρωσης μιας δοκιμής σε ψάρια για την ανίχνευση ορισμένων χημικών ουσιών που έχουν επίδραση στο ενδοκρινικό προέρχεται από τις ανησυχίες ότι τα επίπεδα των χημικών ουσιών στο περιβάλλον ενδέχεται να έχουν δυσμενείς επιδράσεις τόσο στους ανθρώπους όσο και στην άγρια πανίδα και χλωρίδα λόγω της αλληλεπίδρασης των εν λόγω χημικών ουσιών με το ενδοκρινικό σύστημα. Το 1998 ο ΟΟΣΑ δρομολόγησε μια δραστηριότητα πρώτης προτεραιότητας με σκοπό την αναθεώρηση των υφιστάμενων κατευθυντήριων γραμμών και την ανάπτυξη νέων για τη διαλογή και τη δοκιμή δυνητικών ενδοκρινικών διαταρακτών. Ένα στοιχείο της δραστηριότητας ήταν η εκπόνηση κατευθυντήριας γραμμής δοκιμών για τον έλεγχο των χημικών ουσιών που επιδρούν στο ενδοκρινικό σύστημα διαφόρων ειδών ψαριών. Η δοκιμή ενδοκρινικού ελέγχου 21 ημερών σε ψάρια υποβλήθηκε σε εκτενές πρόγραμμα επικύρωσης αποτελούμενο από διεργαστηριακές μελέτες με επιλεγμένες χημικές ουσίες για να επιδειχθεί η συνάφεια και η αξιοπιστία της δοκιμής για την ανίχνευση οιστρογονικών χημικών ουσιών και χημικών ουσιών αναστολής της αρωματάσης (1, 2, 3, 4, 5) στα τρία είδη ψαριών που αποτέλεσαν αντικείμενο έρευνας (τον λιποκέφαλο φοξίνο, το ρυζόψαρο και το ζεβρόψαρο)· η ανίχνευση της ανδρογονικής δράσης είναι εφικτή στον λιποκέφαλο φοξίνο και το ρυζόψαρο, αλλά όχι στο ζεβρόψαρο. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν επιτρέπει την ανίχνευση αντι-ανδρογονικών χημικών ουσιών. Η εργασία επικύρωσης έχει αξιολογηθεί από ομάδα ομότιμων εμπειρογνωμόνων που ορίστηκαν από τους εθνικούς συντονιστές του προγράμματος κατευθυντήριας γραμμής δοκιμών (6). Η δοκιμή δεν έχει σχεδιαστεί για να εντοπίσει συγκεκριμένους μηχανισμούς ορμονικών διαταραχών λόγω του ότι τα πειραματόζωα διατηρούν άθικτο τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων (HPG), ο οποίος μπορεί να ανταποκριθεί σε χημικές ουσίες που επηρεάζουν τον άξονα HPG σε διάφορα επίπεδα. Η βραχυπρόθεσμη δοκιμή αναπαραγωγής σε ψάρια (ΟΟΣΑ TG 229) περιλαμβάνει τις μετρήσεις γονιμότητας και, ανάλογα με την περίπτωση, της γοναδικής ιστοπαθολογίας για τον λιποκέφαλο φοξίνο, καθώς και όλα τα τελικά σημεία που περιλαμβάνονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών. Η κατευθυντήρια γραμμή TG 229 του ΟΟΣΑ προβλέπει έλεγχο των χημικών ουσιών που επηρεάζουν την αναπαραγωγή μέσω διαφόρων μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένων των ενδοκρινικών διαδικασιών. Αυτό θα πρέπει να εξεταστεί πριν από την επιλογή της καταλληλότερης μεθόδου δοκιμών.

2. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών περιγράφει μία *in vivo* δοκιμή ελέγχου όπου σεξουαλικά ώριμα αρσενικά και θηλυκά ψάρια κρατούνται μαζί και εκτίθενται σε μία χημική ουσία κατά ένα μικρό μέρος του κύκλου ζωής τους (21 ημέρες). Κατά τη λήξη της 21ήμερης περιόδου έκθεσης, ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο είδος, μετρούνται ένα ή δύο τελικά σημεία βιοδεικτών σε αρσενικά και θηλυκά ως δείκτες οιστρογονικής ή ανδρογονικής δράσης ή αναστολής της αρωματάσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας· τα τελικά αυτά σημεία είναι η λεκιθογενίνη και τα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου. Η λεκιθογενίνη μετράται στον λιποκέφαλο φοξίνο, στο ρυζόψαρο, και στο ζεβρόψαρο, ενώ τα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου μετρούνται μόνο στον λιποκέφαλο φοξίνο και στο ρυζόψαρο.

3. Η παρούσα βιοδοκιμή λειτουργεί ως δοκιμή διαλογής *in vivo* για συγκεκριμένους τρόπους δράσης στο ενδοκρινικό και η εφαρμογή του θα πρέπει να εντάσσεται στο «Εννοιολογικό πλαίσιο του ΟΟΣΑ για τις δοκιμές και την αξιολόγηση χημικών ενδοκρινικών διαταρακτών» (28).

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

4. Η λεκιθογενίνη παράγεται συνήθως από το ήπαρ των θηλυκών ωοτόκων σπονδυλωτών ως απόκριση στα κυκλοφορούντα ενδογενή οιστρογόνα. Είναι πρόδρομος των πρωτεϊνών του κρόκου του αυγού και, αφού παραχθεί στο ήπαρ, ταξιδεύει μέσα από την κυκλοφορία του αίματος στην ωοθήκη, όπου απορροφάται και τροποποιείται από τα αναπτυσσόμενα αυγά. Η λεκιθογενίνη είναι σχεδόν μη ανιχνεύσιμη στο πλάσμα των μη ώριμων θηλυκών και αρσενικών ψαριών επειδή δεν διαθέτουν επαρκή κυκλοφορούντα οιστρογόνα· ωστόσο, το ήπαρ είναι ικανό να συνθέσει και να εκκρίνει λεκιθογενίνη ως απόκριση σε εξωγενή οιστρογόνο διέγερση.

▼M6

5. Η μέτρηση της λεκιθογενίνης χρησιμεύει για την ανίχνευση χημικών ουσιών με διάφορες οιστρογόνους δράσεις. Η ανίχνευση χημικών οιστρογόνων είναι εφικτή μέσω της μέτρησης της πρόκλησης έκκρισης λεκιθογενίνης στα αρσενικά ψάρια, και έχει τεκμηριωθεί με αφθονία στην επιστημονική βιβλιογραφία που έχει αξιολογηθεί από ομότιμους κριτές (π.χ. (7)). Η πρόκληση έκκρισης λεκιθογενίνης έχει επίσης καταδειχτεί μετά από έκθεση σε αρωματοποιήσιμα ανδρογόνα (8, 9). Μείωση του κυκλοφορούντος επιπέδου των οιστρογόνων σε θηλυκά, για παράδειγμα μέσω της αναστολής της αρωματάσης για τη μετατροπή των ενδογενών ανδρογόνων στο φυσικό οιστρογόνο 17β-οιστραδιόλη, προκαλεί μείωση στο επίπεδο λεκιθογενίνης που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση χημικών ουσιών με ιδιότητες αναστολής της αρωματάσης (10, 11). Η βιολογική συνάφεια της απόκρισης της λεκιθογενίνης μετά από αναστολή της σύνθεσης οιστρογόνων/αναστολή της αρωματάσης έχει καθιερωθεί και έχει τεκμηριωθεί ευρέως. Ωστόσο, η παραγωγή λεκιθογενίνης (VTG) στα θηλυκά μπορεί επίσης να επηρεαστεί από γενική τοξικότητα και μη ενδοκρινικούς τοξικούς τρόπους δράσης, π.χ. ηπατοτοξικότητα.

6. Διάφορες μέθοδοι μέτρησης έχουν αναπτυχθεί με επιτυχία και έχουν τυποποιηθεί για συστηματική χρήση. Αυτό ισχύει για τις ειδικές ανά είδος μεθόδους ενζυμικής δοκιμής ανοσοπροσρόφησης (ELISA) με τη χρήση ανοσοχημείας για την ποσοτικοποίηση της λεκιθογενίνης που παράγεται σε μικρά δείγματα αίματος ή ήπατος που συλλέγονται από μεμονωμένα ψάρια (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Από το αίμα του λιποκέφαλου φοξίνου, το αίμα ή τους ομογενοποιημένους ιστούς κεφαλής και ουράς του ζεβρόψαρου και το συκώτι του ρυζόψαρου λαμβάνονται δείγματα για μέτρηση της VTG. Στο ρυζόψαρο υπάρχει ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ της VTG που μετράται από το αίμα και από το συκώτι (19). Στο προσάρτημα 6 ορίζονται οι συνιστώμενες διαδικασίες για τη συλλογή δειγμάτων για ανάλυση της λεκιθογενίνης. Κιτ για τη μέτρηση της λεκιθογενίνης είναι ευρέως διαθέσιμα· τα εν λόγω κιτ θα πρέπει να βασίζονται σε επικυρωμένη ειδική ανά είδος μέθοδο ELISA.

7. Τα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου στα αρσενικά ψάρια ορισμένων ειδών είναι εξωτερικά ορατά, ποσοτικοποιήσιμα και ανταποκρίνονται στα κυκλοφορούντα επίπεδα ενδογενών ανδρογόνων· αυτό ισχύει για τον λιποκέφαλο φοξίνο και το ρυζόψαρο — αλλά όχι για τα ζεβρόψαρα που δεν διαθέτουν ποσοτικοποιήσιμα δευτερογενή χαρακτηριστικά που αφορούν το φύλο. Τα θηλυκά διατηρούν την ικανότητα ανάπτυξης αρσενικών δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου, όταν εκτεθούν σε ανδρογόνες χημικές ουσίες στο νερό. Διάφορες μελέτες είναι διαθέσιμες στην επιστημονική βιβλιογραφία για να τεκμηριώσουν αυτό το είδος αντίδρασης στο λιποκέφαλο φοξίνο (20) και στο ρυζόψαρο (21). Η μείωση σε δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου σε αρσενικά θα πρέπει να ερμηνεύεται με προσοχή λόγω της χαμηλής στατιστικής αξιοπιστίας, και θα πρέπει να βασίζεται στην κρίση εμπειρογνωμόνων και το βάρος της απόδειξης. Υπάρχουν περιορισμοί στη χρήση ζεβρόψαρου στην παρούσα δοκιμή, λόγω της απουσίας ποσοτικοποιήσιμων δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου που να ανταποκρίνονται σε χημικές ουσίες με ανδρογόνο δράση.

8. Στον λιποκέφαλο φοξίνο, ο κύριος δείκτης της εξωγενούς ανδρογόνου έκθεσης είναι ο αριθμός των γαμήλιων φυματίων που βρίσκονται στο ρύγχος των θηλυκών ψαριών. Στο ρυζόψαρο, ο αριθμός των θηλωδών διεργασιών αποτελεί την κύρια ένδειξη εξωγενούς έκθεσης σε ανδρογόνες χημικές ουσίες σε θηλυκά ψάρια. Στο προσάρτημα 5Α και στο προσάρτημα 5Β αναφέρονται οι συνιστώμενες διαδικασίες που πρέπει να ακολουθούνται για την αξιολόγηση των χαρακτηριστικών του φύλου στον λιποκέφαλο φοξίνο και το ρυζόψαρο αντίστοιχα.

9. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

10. Στη δοκιμή, τα αρσενικά και θηλυκά ψάρια σε αναπαραγωγική κατάσταση εκτίθενται μαζί στα δοχεία δοκιμής. Η ενήλικη και αναπαραγωγική τους κατάσταση επιτρέπει σαφή διαφοροποίηση του κάθε φύλου, και, ως εκ τούτου, μια σχετική ως προς το φύλο ανάλυση για κάθε τελικό σημείο, και διασφαλίζει την ευαισθησία τους έναντι των εξωγενών χημικών ουσιών.

▼M6

Στο τέλος της δοκιμής, το φύλο επιβεβαιώνεται με μακροσκοπική εξέταση των γονάδων από κοιλιακό άνοιγμα της κοιλιακής μοίρας με ψαλίδι. Επισκόπηση των σχετικών προϋποθέσεων βιοδοκιμών περιλαμβάνεται στο προσάρτημα 2. Η δοκιμή δρομολογείται συνήθως με ψάρια που ελήφθησαν ως δείγματα από ένα πληθυσμό που είναι σε αναπαραγωγική κατάσταση· δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται γερασμένα ζώα. Οδηγίες για την ηλικία των ψαριών και την αναπαραγωγική κατάσταση περιλαμβάνονται στην ενότητα για την επιλογή των ψαριών. Η δοκιμή διεξάγεται με τη χρήση τριών συγκεντρώσεων χημικής έκθεσης καθώς και έναν μάρτυρα με νερό, και έναν μάρτυρα με διαλύτη, εάν είναι απαραίτητο. Χρησιμοποιούνται δύο δοχεία ή πανομοιότυπα δείγματα ανά αγωγή (κάθε δοχείο περιέχει 5 αρσενικά και 5 θηλυκά) για ρυζόψαρα και ζεβρόψαρα, ενώ χρησιμοποιούνται τέσσερα δοχεία ή πανομοιότυπα δείγματα ανά αγωγή (κάθε δοχείο περιέχει 2 αρσενικά και 4 θηλυκά) για λιποκέφαλους φοξίνους. Αυτό γίνεται για να συμπεριληφθεί η χωροκατακτητική συμπεριφορά του αρσενικού λιποκέφαλου φοξίνου διατηρώντας παράλληλα επαρκή ισχύ της δοκιμασίας. Η έκθεση αυτή διεξάγεται για 21 ημέρες και η δειγματοληψία των ψαριών πραγματοποιείται κατά την 21η ημέρα της έκθεσης.

11. Για τη δειγματοληψία κατά την 21η ημέρα, τα ζώα θανατώνονται με τρόπο ανώδυνο. Τα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου μετρούνται σε λιποκέφαλους φοξίνους και ρυζόψαρα (βλέπε προσάρτημα 5Α και προσάρτημα 5Β)· Για τον προσδιορισμό της λεκιθογενίνης σε ζεβρόψαρα και λιποκέφαλους φοξίνους συλλέγονται δείγματα αίματος· εναλλακτικά μπορούν να συλλεχθούν κεφαλή/ουρά για τον προσδιορισμό της λεκιθογενίνης στα ζεβρόψαρα (προσάρτημα 6)· για την ανάλυση λεκιθογενίνης στα ρυζόψαρα συλλέγεται το ήπαρ (προσάρτημα 6).

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΠΟΔΟΧΗΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

12. Για να γίνουν αποδεκτά τα αποτελέσματα της δοκιμής, πρέπει να πληρούνται οι ακόλουθες προϋποθέσεις:

— Η θνησιμότητα μαρτύρων σε νερό (ή διαλύτη) δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 10 % στο τέλος της περιόδου έκθεσης·

— η συγκέντρωση του διαλελυμένου οξυγόνου πρέπει να είναι τουλάχιστον το 60 % της τιμής κορεσμού σε αέρα (ΤΚΑ) σε όλη τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης·

— η θερμοκρασία του νερού μεταξύ των δοχείων δοκιμής δεν πρέπει να διαφέρει περισσότερο του ± 1.5 °C σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή κατά τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης και να διατηρείται με δυνατότητα απόκλισης 2 °C στην περιοχή των θερμοκρασιών που ορίζεται για το υπό δοκιμή είδος (προσάρτημα 2)·

— θα πρέπει να υπάρχουν στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο διάλυμα διατηρήθηκαν ικανοποιητικά στα όρια του ± 20 % του μέσου όρου των τιμών που μετρήθηκαν.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Εργαστηριακός εξοπλισμός

13. Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός και, ειδικότερα, τα ακόλουθα:

α) οξυγονόμετρα και pHμετρα·

β) εξοπλισμός για τον προσδιορισμό της σκληρότητας και αλκαλικότητας του νερού·

γ) κατάλληλη συσκευή για τον έλεγχο της θερμοκρασίας με δυνατότητα συνεχούς, κατά προτίμηση, παρακολούθησης·

δ) δεξαμενές κατασκευασμένες από χημικώς αδρανές υλικό και κατάλληλης χωρητικότητας ανάλογα με τη συνιστώμενη φόρτιση και την πυκνότητα πληθυσμού (βλέπε παράρτημα 2)·

ε) υπόστρωμα ωοτοκίας για λιποκέφαλους φοξίνους και ζεβρόψαρα, το παράρτημα 4 παρέχει τα απαραίτητα στοιχεία·

στ) ζυγός κατάλληλης ακρίβειας (δηλαδή ακρίβεια έως ± 0,5mg).

▼M6

Νερό

14. Ως νερό δοκιμής μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε νερό στο οποίο το υπό δοκιμή είδος εμφανίζει την ενδεδειγμένη μακροπρόθεσμη επιβίωση και ανάπτυξη. Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας το νερό θα πρέπει να είναι σταθερής ποιότητας. Το pH του νερού θα πρέπει να είναι της τάξεως του 6,5 έως 8,5, κατά τη διάρκεια όμως μιας δεδομένης δοκιμής δεν θα πρέπει να κυμαίνεται πέραν των ±0,5 μονάδων pH. Για να διασφαλίζεται ότι το νερό της αραίωσης δεν θα επηρεάσει ατόπως το αποτέλεσμα της δοκιμής (π.χ. με τη δημιουργία συμπλόκων με την υπό δοκιμή χημική ουσία) θα πρέπει κατά διαστήματα να λαμβάνονται δείγματα για ανάλυση. Όταν το νερό αραίωσης είναι γνωστό ως σχετικώς σταθερό από ποιοτικής πλευράς, θα πρέπει, π.χ. κάθε τρεις μήνες, να γίνονται μετρήσεις βαρέων μετάλλων (π.χ. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd και Ni), βασικών ανιόντων και κατιόντων (π.χ. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, και SO_4^{2-}), φυτοφαρμάκων (π.χ. ολικών οργανοφωσφορικών και ολικών οργανοχλωριούχων φυτοφαρμάκων), ολικού οργανικού άνθρακα και αιωρούμενων στερεών σωματιδίων. Εάν η ποιότητα του νερού έχει αποδειχθεί ότι είναι σταθερή για ένα τουλάχιστον χρόνο, η συχνότητα των προσδιορισμών μπορεί να περιοριστεί και τα διαστήματα να αυξηθούν (π.χ. κάθε έξι μήνες). Μερικά χημικά χαρακτηριστικά αποδεκτού νερού αραίωσης καταγράφονται στο παράρτημα 3.

Διαλύματα δοκιμής

15. Τα διαλύματα με τις επιθυμητές συγκεντρώσεις παρασκευάζονται συνήθως με αραίωση αρχικού πυκνού διαλύματος. Το διάλυμα παρακαταθήκης θα πρέπει, κατά προτίμηση, να παρασκευάζεται με απλή ανάμειξη ή ανακίνηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε νερό αραίωσης, χρησιμοποιώντας μηχανικά μέσα (π.χ. ανάδευση ή υπερήχους). Για να επιτευχθεί η κατάλληλη συγκέντρωση πυκνού διαλύματος παρακαταθήκης είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν στήλες κορεσμού (στήλες διαλυτότητας). Δεν συνιστάται η χρήση φορέα διαλύτη. Ωστόσο, σε περίπτωση που απαιτείται διαλύτης, ένας μάρτυρας με διαλύτη πρέπει να λειτουργεί παράλληλα, με την ίδια συγκέντρωση διαλύτη όπως οι χημικές αγωγές. Για δύσκολες υπό δοκιμή χημικές ουσίες, ο διαλύτης μπορεί να είναι, από τεχνικής άποψης, η βέλτιστη λύση· θα πρέπει να ανατρέξει κανείς στο έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ σχετικά με τις δοκιμές τοξικότητας στο υδάτινο περιβάλλον για τις δύσκολες ουσίες και μείγματα (Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures) (22). Η επιλογή του διαλύτη θα καθοριστεί από τις χημικές ιδιότητες της χημικής ουσίας. Το έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ συνιστά 100μl/l κατά το μέγιστο, όριο που θα πρέπει να τηρείται. Ωστόσο, μια πρόσφατη έρευνα (23) ανέδειξε πρόσθετες ανησυχίες όταν χρησιμοποιούνται διαλύτες για δοκιμές ενδοκρινικής δράσης. Ως εκ τούτου, συνιστάται η συγκέντρωση του διαλύτη, εφόσον χρειάζεται, να ελαχιστοποιείται όποτε αυτό είναι τεχνικά εφικτό (εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας).

16. Θα χρησιμοποιηθεί σύστημα δοκιμής συνεχούς ροής. Ένα τέτοιο σύστημα παρέχει συνεχώς και αραιώνει ένα διάλυμα παρακαταθήκης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (π.χ. αντλία μετρήσεως, αναλογικός αραιωτής, σύστημα κορεσμού) για την προσαγωγή των διαλυμάτων στους δοκιμαστικούς θαλάμους. Οι ταχύτητες ροής των διαλυμάτων παρακαταθήκης και του νερού αραίωσης θα πρέπει να ελέγχονται κατά διαστήματα, κατά προτίμηση κάθε μέρα, κατά τη διάρκεια της δοκιμής και δεν θα πρέπει να διαφέρουν περισσότερο από 10 % σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια ώστε να αποφεύγεται η χρήση πλαστικών σωληνώσεων χαμηλής ποιότητας ή άλλων υλικών που ενδέχεται να περιέχουν βιολογικά δραστικές χημικές ουσίες. Κατά την επιλογή του υλικού για το σύστημα συνεχούς ροής, θα πρέπει να συνυπολογίζεται η πιθανή προσρόφηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο υλικό αυτό.

Διατήρηση των ψαριών

17. Τα προς δοκιμή ψάρια επιλέγονται από εργαστηριακό πληθυσμό, κατά προτίμηση από μεμονωμένο πληθυσμό παρακαταθήκης, που έχουν εγκλιματιστεί για δύο εβδομάδες τουλάχιστον πριν από τη δοκιμή, υπό συνθήκες ποιότητας νερού και φωτισμού παρόμοιες με εκείνες που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή. Είναι σημαντικό, ο ρυθμός πλήρωσης και η πυκνότητα πληθυσμού (για ορισμούς βλέπε προσάρτημα 1) να είναι κατάλληλα για το χρησιμοποιούμενο είδος ψαριών (βλέπε προσάρτημα 2).

18. Έπειτα από ένα πρώτο χρονικό διάστημα 48 ωρών, καταγράφονται οι θνησιμότητες και εφαρμόζονται τα ακόλουθα κριτήρια:

▼M6

— ποσοστά θνησιμότητας άνω του 10 % του πληθυσμού σε επτά ημέρες: απορρίπτεται ολόκληρη η παρτίδα,

— ποσοστά θνησιμότητας μεταξύ 5 % και 10 % του πληθυσμού: εγκλιματισμός για επτά ακόμη ημέρες. Εάν, κατά τη διάρκεια των επτά επόμενων ημερών, καταγραφεί ποσοστό θνησιμότητας άνω του 5 %, ολόκληρη η παρτίδα απορρίπτεται,

— ποσοστά θνησιμότητας λιγότερο από το 5 % του πληθυσμού σε επτά ημέρες: η παρτίδα γίνεται αποδεκτή

19. Τα ψάρια δεν πρέπει να λαμβάνουν αγωγή για ασθένεια κατά τη διάρκεια της περιόδου εγκλιματισμού, της περιόδου προέκθεσης, ή κατά τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης.

Προέκθεση και επιλογή των ψαριών

20. Συνιστάται περίοδος προέκθεσης μιας εβδομάδας, με τα ζώα να τοποθετούνται σε δοχεία, παρόμοια με εκείνα της πραγματικής δοκιμής. Τα ψάρια θα πρέπει να σιτίζονται κατά βούληση (ad libitum), καθ' όλη την περίοδο διατήρησης και κατά τη διάρκεια της φάσης έκθεσης. Η φάση της έκθεσης ξεκινά με ενήλικα ψάρια με φυλετικό (σεξουαλικό) διμορφισμό από εργαστηριακά αποθέματα ώριμων από αναπαραγωγική άποψη ζώων (π.χ. με σαφή δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου ορατά όσον αφορά τον λιποκέφαλο φοξίνο και το ρυζόψαρο), και σε ενεργή ωοτοκία. Ως γενική κατεύθυνση και μόνο (και να μην ληφθεί υπόψη ανεξάρτητα από την παρατήρηση της τρέχουσας αναπαραγωγικής κατάστασης μιας δεδομένης παρτίδας ή ψαριού) οι λιποκέφαλοι φοξίνοι θα πρέπει να είναι ηλικίας περίπου 20 (± 2) εβδομάδων, υπό την προϋπόθεση ότι έχουν καλλιεργηθεί στους 25 ± 2 °C κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Τα ρυζόψαρα θα πρέπει να είναι ηλικίας περίπου 16 (± 2) εβδομάδων, υπό την προϋπόθεση ότι έχουν καλλιεργηθεί στους 25 ± 2 °C κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Τα ζεβρόψαρα θα πρέπει να είναι ηλικίας περίπου 16 (± 2) εβδομάδων, υπό την προϋπόθεση ότι έχουν καλλιεργηθεί στους 26 ± 2 °C κατά τη διάρκεια της ζωής τους.

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

21. Χρησιμοποιούνται τρεις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, ένας μάρτυρας (νερό) και, εφόσον χρειαστεί, ένας μάρτυρας με διαλύτη. Τα δεδομένα μπορούν να αναλυθούν για να καθοριστούν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των αποκρίσεων αγωγής και των αποκρίσεων μαρτύρων. Οι αναλύσεις αυτές θα δώσουν πληροφορίες σχετικά με το κατά πόσο απαιτείται περαιτέρω μακροπρόθεσμη δοκιμή για δυσμενείς επιδράσεις (δηλαδή, την επιβίωση, την ανάπτυξη, τη μεγέθυνση και την αναπαραγωγή) για την χημική ουσία, παρά για χρήση στην εκτίμηση κινδύνου (24).

22. Για τα ζεβρόψαρα και τα ρυζόψαρα, την 21η ημέρα του πειράματος, αρσενικά και θηλυκά κάθε επιπέδου της αγωγής (5 αρσενικά και 5 θηλυκά σε κάθε ένα από τα δύο αντίγραφα) και από τον(τους) μάρτυρα(ες) υποβάλλονται σε δειγματοληψία για τη μέτρηση της λεκιθογενίνης και των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου, ανάλογα με την περίπτωση. Για τους λιποκέφαλους φοξίνους, την 21η ημέρα της έκθεσης, αρσενικά και θηλυκά (2 αρσενικά και 4 θηλυκά σε κάθε ένα από τα τέσσερα αντίγραφα) και από τον(τους) μάρτυρα(ες) υποβάλλονται σε δειγματοληψία για τη μέτρηση της λεκιθογενίνης και των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου.

Επιλογή συγκεντρώσεων δοκιμής

23. Για τους σκοπούς της δοκιμής αυτής, η υψηλότερη συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να ορίζεται σύμφωνα με τη μέγιστη ανεκτή συγκέντρωση (ΜΑΣ) η οποία θα πρέπει να ορίζεται με βάση προκαταρκτική δοκιμή προσδιορισμού των συγκεντρώσεων της δοκιμής ή από άλλα δεδομένα τοξικότητας, ή 10 mg/l, ή τη μέγιστη διαλυτότητα στο νερό, όποιο είναι χαμηλότερο. Η ΜΑΣ ορίζεται ως η υψηλότερη συγκέντρωση της χημικής ουσίας στη δοκιμή που έχει ως αποτέλεσμα θνησιμότητα μικρότερη από 10 %. Η χρήση αυτής της προσέγγισης προϋποθέτει την ύπαρξη εμπειρικών δεδομένων οξείας τοξικότητας ή άλλων δεδομένων τοξικότητας από τα οποία μπορεί να γίνει εκτίμηση της ΜΑΣ. Η εκτίμηση της ΜΑΣ μπορεί να μην είναι ακριβής και συνήθως απαιτεί τη γνώμη ενός ειδικού.

▼M6

24. Απαιτούνται τρεις συγκεντρώσεις δοκιμής, με σταθερό παράγοντα κλιμάκωσης που δεν υπερβαίνει το 10, και ένα μάρτυρα νερού αραίωσης (και μάρτυρα με διαλύτη, εάν χρειάζεται). Συνιστάται εύρος παραγόντων κλιμάκωσης μεταξύ 3,2 και 10.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Επιλογή και ζύγιση των υπό δοκιμή ψαριών

25. Είναι σημαντικό να ελαχιστοποιείται η διακύμανση του βάρους των ψαριών στην αρχή της δοκιμής. Κατάλληλες περιοχές μεγεθών για τα διάφορα είδη που συνιστώνται για χρήση στη δοκιμή αυτή δίνονται στο προσάρτημα 2. Για το σύνολο της παρτίδας ψαριών που χρησιμοποιείται στη δοκιμή, το εύρος βάρους σώματος ανά άτομο για αρσενικά και θηλυκά ψάρια στην έναρξη της δοκιμής θα πρέπει, εάν είναι δυνατόν, να διατηρείται εντός του ± 20 % του αριθμητικού μέσου βάρους του ιδίου φύλου. Πριν από τη δοκιμή συνιστάται να ζυγίζεται ένα μερικό δείγμα του αποθέματος ψαριών, για να εκτιμάται το μέσο βάρος.

Συνθήκες έκθεσης

Διάρκεια

26. Η διάρκεια της δοκιμασίας είναι 21 ημέρες, μετά από μια περίοδο προέκθεσης. Η συνιστώμενη περίοδος προέκθεσης είναι μία εβδομάδα.

Σίτιση

27. Τα ψάρια θα πρέπει να σιτίζονται κατά βούληση (ad libitum) με κατάλληλη τροφή (προσάρτημα 2) και σε επίπεδα επαρκή για να διατηρηθεί η φυσική κατάσταση. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγεται η ανάπτυξη μικροβίων και η εμφάνιση θολότητας στο νερό. Ως γενική κατεύθυνση, το ημερήσιο σιτηρέσιο μπορεί να διαιρείται σε δύο ή τρεις ίσες μερίδες για πολλαπλές σιτίσεις την ημέρα, διαχωριζόμενες από τουλάχιστον τρεις ώρες ανάμεσα σε κάθε σίτιση. Ένα μόνο μεγαλύτερο σιτηρέσιο είναι αποδεκτό, ιδίως για τα σαββατοκύριακα. Η σίτιση των ψαριών θα πρέπει να διακόπτεται 12 ώρες πριν από τη δειγματοληψία/νεκροψία.

28. Η τροφή των ψαριών θα πρέπει να αξιολογείται για την παρουσία προσμείξεων όπως οργανοχλωριούχα φυτοφάρμακα, πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (ΠΑΥ), πολυχλωριωμένα διφαινυλία (PCB). Τροφές με υψηλό επίπεδο φυτοοιστρογόνων που μπορούν να διακυβεύσουν την απόκριση της δοκιμής σε γνωστό αγωνιστή οιστρογόνων (π.χ. 17β-οιστραδιόλη) θα πρέπει να αποφεύγονται.

29. Τα υπολείμματα των τροφών και τα περιττώματα θα πρέπει να απομακρύνονται από τα δοχεία δοκιμής τουλάχιστον δύο φορές την εβδομάδα, π.χ. με προσεκτικό καθαρισμό του πυθμένα κάθε δεξαμενής με σιφώνιο.

Φως και θερμοκρασία

30. Η φωτοπερίοδος και η θερμοκρασία του νερού θα πρέπει να είναι κατάλληλες για τα είδη δοκιμής (βλ. προσάρτημα 2).

Συχνότητα αναλυτικών προσδιορισμών και μετρήσεων

31. Πριν από την έναρξη της περιόδου έκθεσης, θα πρέπει να διασφαλίζεται η ορθή λειτουργία του συστήματος παροχής της χημικής ουσίας. Όλες οι αναλυτικές μέθοδοι που απαιτούνται, θα πρέπει να έχουν καθιερωθεί, συμπεριλαμβανομένων επαρκών γνώσεων σχετικά με τη χημική σταθερότητα στο σύστημα δοκιμής. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας προσδιορίζονται σε τακτά διαστήματα, ως εξής: οι ταχύτητες ροής του μέσου αραίωσης και του τοξικού διαλύματος παρακαταθήκης θα πρέπει να ελέγχονται κατά προτίμηση καθημερινά ή τουλάχιστον δύο φορές την εβδομάδα και δεν θα πρέπει να διαφέρουν περισσότερο από 10 % καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Συνιστάται οι πραγματικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας να μετρηθούν σε όλα τα δοχεία κατά την έναρξη της δοκιμής, και κατόπιν ανά εβδομάδα.

32. Συνιστάται να βασίζονται τα αποτελέσματα σε μετρηθείσες συγκεντρώσεις. Ωστόσο, εάν η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο διάλυμα έχει διατηρηθεί ικανοποιητικά εντός του ±20 % της ονομαστικής συγκέντρωσης καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής, τα αποτελέσματα μπορούν να βασίζονται στις ονομαστικές ή στις μετρηθείσες τιμές.

33. Ορισμένα δείγματα μπορεί να χρειάζεται να διηθηθούν (π.χ. χρησιμοποιώντας διηθητικό μέσο με πόρους διαμέτρου 0,45 μm) ή να φυγοκεντρηθούν. Εάν χρειάζεται, τότε η συνιστώμενη διαδικασία είναι η φυγοκέντρηση. Πάντως, εφόσον η υπό δοκιμή ουσία δεν προσροφάται στα φίλτρα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η διήθηση.

▼M6

34. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, το διαλυμένο οξυγόνο, η θερμοκρασία και το pH θα πρέπει να μετρώνται σε όλα τα δοχεία δοκιμής τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα. Η συνολική σκληρότητα και αλκαλικότητα θα πρέπει να μετρώνται στους μάρτυρες και σε ένα δοχείο με την υψηλότερη συγκέντρωση τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα. Η θερμοκρασία θα πρέπει, κατά προτίμηση, να παρακολουθείται συνεχώς σε ένα, τουλάχιστον, δοχείο δοκιμής.

Παρατηρήσεις

35. Ορισμένες γενικές (π.χ. επιβίωση) και βασικές βιολογικές αντιδράσεις (π.χ. τα επίπεδα λεκιθογενίνης) αξιολογούνται κατά τη διάρκεια της δοκιμής ή κατά τον τερματισμό της δοκιμής. Η μέτρηση και η αξιολόγηση αυτών των τελικών σημείων και η χρησιμότητά τους περιγράφονται κατωτέρω.

Επιβίωση

36. Τα ψάρια θα πρέπει να εξετάζονται καθημερινά κατά τη διάρκεια της περιόδου της δοκιμής, να καταγράφεται οποιαδήποτε θνησιμότητα και τα νεκρά ψάρια να απομακρύνονται το ταχύτερο δυνατό. Τα νεκρά ψάρια δεν θα πρέπει να αντικαθίσταται ούτε στα δοχεία του μάρτυρα ούτε στα δοχεία αγωγής. Το φύλο των ψαριών που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμής θα πρέπει να προσδιορίζεται με μακροσκοπική αξιολόγηση των γονάδων.

Συμπεριφορά και εμφάνιση

37. Κάθε μη φυσιολογική συμπεριφορά (σε σχέση με τους μάρτυρες) θα πρέπει να σημειώνεται· αυτό μπορεί να περιλαμβάνει ενδείξεις γενικής τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένων υπεραερισμού, μη συγχρονισμένης κολύμβησης, απώλεια ισορροπίας και άτυπης αδράνειας ή άτυπης συμπεριφοράς σίτισης. Επίσης, θα πρέπει να σημειώνονται τυχόν εξωτερικές ανωμαλίες (όπως π.χ. αιμορραγία, αποχρωματισμός). Οι εν λόγω ενδείξεις τοξικότητας θα πρέπει να εξετάζονται με προσοχή κατά την ερμηνεία των στοιχείων, δεδομένου ότι μπορούν να αναφέρουν συγκεντρώσεις στις οποίες οι βιοδείκτες της ενδοκρινικής δραστηριότητας δεν είναι αξιόπιστοι. Τέτοιες παρατηρήσεις σχετικά με τη συμπεριφορά μπορούν ενδεχομένως να παράσχουν χρήσιμες ποιοτικές πληροφορίες για την ενημέρωση των δυνητικών μελλοντικών απαιτήσεων για τις δοκιμές σε ψάρια. Για παράδειγμα, η χωροκατακτητική επιθετικότητα σε κανονικά αρσενικά ή αρρενοποιημένα θηλυκά έχει παρατηρηθεί σε λιποκέφαλους φοξίνους που εκτίθενται σε ανδρογόνα· στα ζεβρόψαρα, η χαρακτηριστική συμπεριφορά ζευγαρώματος και ωοτοκίας μετά την ενεργοποίηση του φωτός για το χάραμα μειώνεται ή παρεμποδίζεται από την έκθεση σε οιστρογόνα ή αντι-ανδρογόνα.

38. Επειδή ορισμένες πτυχές της εμφάνισης (κυρίως το χρώμα) μπορούν να αλλάξουν γρήγορα με τον χειρισμό, είναι σημαντικό οι ποιοτικές παρατηρήσεις να πραγματοποιούνται πριν από την απομάκρυνση των ζώων από το σύστημα δοκιμής. Η μέχρι σήμερα εμπειρία με τον λιποκέφαλο φοξίνο δείχνει ότι μερικές χημικές ουσίες που επιδρούν στο ενδοκρινικό σύστημα ενδέχεται αρχικά να επιφέρουν αλλαγές στα ακόλουθα εξωτερικά χαρακτηριστικά: χρώμα σώματος (ανοιχτό ή σκούρο), μοτίβα χρωματισμού (παρουσία κάθετων λωρίδων), και σχήμα σώματος (κεφάλι και θωρακική περιοχή). Ως εκ τούτου, οι παρατηρήσεις της φυσικής εμφάνισης των ψαριών θα πρέπει να πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της δοκιμής και κατά την ολοκλήρωση της μελέτης

Μη βάναυση θανάτωση των ψαριών

39. Κατά την 21η ημέρα, δηλαδή κατά τον τερματισμό της έκθεσης, τα ψάρια θα πρέπει να υποβάλλονται σε ευθανασία με κατάλληλες ποσότητες τρικαΐνης (μεθανοσουλφονική τρικαΐνη, μετακαΐνη, MS-222 (CAS 886-86-2), 100-500 mg/l όπου έχει προστεθεί ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος 300 mg/l $NaHCO_3$ (διττανθρακικό νάτριο, CAS 144-55-8) για τον περιορισμό του ερεθισμού του βλεννογόνου· στη συνέχεια λαμβάνονται δείγματα ιστών ή αίματος για τον προσδιορισμό της λεκιθογενίνης, όπως εξηγείται στην ενότητα για τη λεκιθογενίνη.

▼M6

Παρατήρηση των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου

40. Μερικές χημικές ουσίες που επιδρούν στο ενδοκρινικό σύστημα μπορούν να επιφέρουν αλλαγές σε εξειδικευμένα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου (αριθμός γαμήλιων φυματίων σε αρσενικούς λιποκέφαλους φοξίνους, θηλώδεις διεργασίες σε αρσενικά ρυζόψαρα). Ιδίως χημικές ουσίες με ορισμένους τρόπους δράσης μπορεί να προκαλέσουν ασυνήθη εμφάνιση δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου σε ζώα του αντίθετου φύλου· Για παράδειγμα, αγωνιστές των υποδοχέων ανδρογόνων, όπως η τρενβολόνη, η μεθυλοτεστοστερόνη και η διυδροτεστοστερόνη, μπορεί να κάνουν τους θηλυκούς λιποκέφαλους φοξίνους να αναπτύξουν προεξέχοντα γαμήλια φυμάτια ή τα θηλυκά ρυζόψαρα να αναπτύξουν θηλώδεις διεργασίες (11, 20, 21). Έχει επίσης αναφερθεί ότι οι αγωνιστές των υποδοχέων οιστρογόνων μπορούν να μειώσουν τον αριθμό των γαμήλιων φυματίων και το μέγεθος του ραχιαίου λιπώματος στα ενήλικα αρσενικά (25, 26). Τέτοιες μακροσκοπικές μορφολογικές παρατηρήσεις μπορούν ενδεχομένως να παράσχουν χρήσιμες ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες για την ενημέρωση των δυνητικών μελλοντικών απαιτήσεων για τις δοκιμές σε ψάρια. Ο αριθμός και το μέγεθος των γαμήλιων φυματίων στους λιποκέφαλους φοξίνους και οι θηλώδεις διεργασίες στα ρυζόψαρα μπορούν να προσδιοριστούν άμεσα ποσοτικά ή πιο ουσιαστικά σε διατηρημένα δείγματα. Συνιστώμενες διαδικασίες για την αξιολόγηση των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου στους λιποκέφαλους φοξίνους και στα ρυζόψαρα διατίθενται από το προσάρτημα 5α και 5β αντίστοιχα.

Λεκιθογενίνη (VTG)

41. Το αίμα συλλέγεται από την ουραία αρτηρία/φλέβα με τριχοειδή ηπαρινισμένα σωληνάρια αιματοκρίτη ή, εναλλακτικά, με καρδιακή παρακέντηση με σύριγγα. Ανάλογα με το μέγεθος των ψαριών, οι ποσότητες αίματος που μπορούν να συλλεγούν κυμαίνονται γενικά από 5 έως 60 μl ανά άτομο για τους λιποκέφαλους φοξίνους και 5-15 μl ανά άτομο για τα ζεβρόψαρα. Το πλάσμα διαχωρίζεται από το αίμα μέσω φυγοκέντρησης, και φυλάσσεται με αναστολείς πρωτεάσης στους – 80°C, μέχρι να αναλυθεί για λεκιθογενίνη. Εναλλακτικά, στα ρυζόψαρα θα χρησιμοποιηθεί το ήπαρ, ενώ στα ζεβρόψαρα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ομογενοποιημένο δείγμα κεφαλής/ουράς για τον προσδιορισμό της λεκιθογενίνης (προσάρτημα 6). Η μέτρηση της λεκιθογενίνης (VTG) θα πρέπει να βασίζεται σε επικυρωμένη ομόλογη μέθοδο ELISA, με χρήση πρότυπων και ομόλογων αντισωμάτων VTG. Συνιστάται η χρήση μιας μεθόδου που να επιτρέπει την ανίχνευση επιπέδων VTG τόσο χαμηλών όσο λίγων ng/ml πλάσματος (ή ng/mg ιστού), που αποτελεί το επίπεδο υποβάθρου σε μη εκτεθειμένα αρσενικά ψάρια.

42. Ο έλεγχος ποιότητας της ανάλυσης της λεκιθογενίνης θα διεξαχθεί με τη χρήση προτύπων, τυφλών δειγμάτων και τουλάχιστον διπλών αναλύσεων. Για κάθε μέθοδο ELISA θα πρέπει να διεξάγεται μια δοκιμή για την επίδραση της μήτρας (επίδραση της αραίωσης του δείγματος) για τον προσδιορισμό του ελάχιστου συντελεστή αραίωσης του δείγματος. Κάθε τρυβλίο ELISA που χρησιμοποιείται για δοκιμές VTG θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα δείγματα ελέγχου της ποιότητας: τουλάχιστον 6 πρότυπα βαθμονόμησης που καλύπτουν το εύρος των αναμενόμενων συγκεντρώσεων λεκιθογενίνης και τουλάχιστον μία τυφλή δοκιμή μη ειδικής δέσμευσης (ανάλυση εις διπλούν). Η απορρόφηση των εν λόγω τυφλών δειγμάτων πρέπει να είναι μικρότερη από το 5 % της μέγιστης απορρόφησης του προτύπου βαθμονόμησης. Αναλύονται τουλάχιστον δύο κλάσματα (διπλές πλάκες βοθρίων) από κάθε αραίωση δείγματος. Διπλές πλάκες βοθρίων που διαφέρουν περισσότερο του 20 % θα πρέπει να επανυποβάλλονται σε ανάλυση.

43. Ο συντελεστής συσχέτισης (R^2) για τις καμπύλες βαθμονόμησης θα πρέπει να είναι μεγαλύτερος του 0,99. Ωστόσο, η υψηλή συσχέτιση δεν αρκεί για να διασφαλιστεί επαρκής πρόβλεψη της συγκέντρωσης σε όλο το εύρος τιμών. Πέρα από την ύπαρξη μίας αρκούντως υψηλής συσχέτισης για την καμπύλη βαθμονόμησης, η συγκέντρωση του κάθε προτύπου, όπως υπολογίζεται από την καμπύλη βαθμονόμησης, θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 70 και 120 % της ονομαστικής συγκέντρωσης. Εάν οι ονομαστικές συγκεντρώσεις τείνουν να απομακρύνονται από τη γραμμή παλινδρόμησης της

▼M6

βαθμονόμησης (π.χ. σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις), μπορεί να είναι απαραίτητο να χωριστεί η καμπύλη βαθμονόμησης σε χαμηλό και υψηλό εύρος τιμών ή να χρησιμοποιηθεί μη γραμμικό μοντέλο για να ενταχθούν επαρκώς τα δεδομένα απορρόφησης. Εάν η καμπύλη διαχωριστεί, αμφότερα τα τμήματα γραμμής θα πρέπει να έχουν $R^2 > 0,99$.

44. Το όριο ανίχνευσης (LOD) ορίζεται ως η συγκέντρωση του χαμηλότερου αναλυτικού προτύπου, και το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) ορίζεται ως η συγκέντρωση του χαμηλότερου αναλυτικού προτύπου πολλαπλασιαζόμενο με τον χαμηλότερο συντελεστή αραίωσης.

45. Για κάθε ημέρα που εκτελούνται δοκιμές λεκιθογενίνης, αναλύεται ένα δείγμα εμπλουτισμού που καταρτίζεται με χρήση ενός προτύπου αναφοράς μεταξύ διαφορετικών δοκιμών (προσάρτημα 7). Ο λόγος της αναμενόμενης συγκέντρωσης προς τη μετρούμενη συγκέντρωση θα πρέπει να αναφέρεται μαζί με τα αποτελέσματα από κάθε σύνολο δοκιμών που διενεργούνται τη συγκεκριμένη ημέρα.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΕΙΣ

Αξιολόγηση των αποκρίσεων των βιοδεικτών με ανάλυση διασποράς (ANOVA)

46. Για τον προσδιορισμό δυνητικής ενδοκρινικής δραστικότητας μιας χημικής ουσίας, οι αποκρίσεις συγκρίνονται μεταξύ των αγωγών και των ομάδων μαρτύρων με ανάλυση διασποράς (ANOVA). Εάν χρησιμοποιείται μάρτυρας με διαλύτη, θα πρέπει να εκτελείται κατάλληλη στατιστική δοκιμή μεταξύ του νερού αραίωσης και των μαρτύρων με διαλύτη για κάθε τελικό σημείο. Οδηγίες για τον τρόπο χειρισμού των στοιχείων του νερού αραίωσης και του μάρτυρα με διαλύτη στη μετέπειτα στατιστική ανάλυση περιέχονται στον ΟΟΣΑ, 2006c (27). Όλα τα δεδομένα βιολογικής απόκρισης θα πρέπει να αναλυθούν και να αναφέρονται χωριστά ανά φύλο. Εάν δεν πληρούνται οι υποθέσεις που απαιτούνται για παραμετρικές μεθόδους — μη κανονική κατανομή (π.χ. δοκιμή Shapiro-Wilk ή δοκιμή Leven) ή ετερογενής μεταβλητότητα (variance) (δοκιμή Bartlett), θα πρέπει να εξεταστεί η μετατροπή των δεδομένων για την ομοιογενοποίηση των βαθμών μεταβλητότητας (variance) πριν από την εκτέλεση της ANOVA ή η εκτέλεση σταθμισμένης ANOVA. Μια δοκιμή Dunnett (παραμετρική) σε πολλαπλές συγκρίσεις με ζεύγη ή μια δοκιμή Mann-Whitney με προσαρμογή Bonferroni (μη παραμετρική) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μη μονοτονική σχέση δόσης-απόκρισης. Άλλες στατιστικές δοκιμές μπορούν να χρησιμοποιηθούν (π.χ. δοκιμή Jonckheere-Terpstra ή δοκιμή Williams) εάν η σχέση δόσης-απόκρισης είναι σχεδόν μονοτονική. Ένα στατιστικό διάγραμμα ροής παρέχεται στο προσάρτημα 8 για να βοηθήσει στην απόφαση σχετικά με την καταλληλότερη στατιστική δοκιμή που πρέπει να χρησιμοποιηθεί. Συμπληρωματικές πληροφορίες διατίθενται επίσης από το έγγραφο του ΟΟΣΑ σχετικά με τις τρέχουσες προσεγγίσεις για στατιστική ανάλυση των δεδομένων οικοτοξικότητας (Current Approaches to Statistical Analysis of Ecotoxicity Data) (27).

Αναφορά των αποτελεσμάτων των δοκιμών

47. Στα δεδομένα της μελέτης θα πρέπει να περιλαμβάνονται τα εξής:

Εγκαταστάσεις δοκιμών:

— υπεύθυνο προσωπικό και οι αρμοδιότητές του στη μελέτη·

— Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να έχει αποδείξει ότι διαθέτει τεχνική ικανότητα χρησιμοποιώντας ένα ευρύ φάσμα αντιπροσωπευτικών χημικών ουσιών

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

— Χαρακτηρισμός της υπό δοκιμή χημικής ουσίας

— Φυσική μορφή και φυσικοχημικές ιδιότητες που άπτονται της δοκιμασίας,

▼**M6**

— Μέθοδος και συχνότητα προετοιμασίας των συγκεντρώσεων δοκιμής

— Πληροφορίες για τη σταθερότητα και τη βιοαποδομησιμότητα

Διαλύτης:

— Χαρακτηρισμός του διαλύτη (φύση, χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση)

— Αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη (εάν δεν πρόκειται για νερό).

Ζώα δοκιμής:

— Είδος και στέλεχος

— Προμηθευτής και συγκεκριμένες εγκαταστάσεις του προμηθευτή

— Ηλικία των ψαριών κατά την έναρξη της δοκιμής και αναπαραγωγική κατάσταση / κατάσταση ωοτοκίας

— Λεπτομέρειες σχετικά με τη διαδικασία εγκλιματισμού των ζώων

— Σωματικό βάρος των ψαριών κατά την έναρξη της έκθεσης (από ένα μερικό δείγμα από το απόθεμα ψαριών)

Συνθήκες δοκιμής:

— Χρησιμοποιηθείσα διαδικασία δοκιμής (είδος δοκιμής, ρυθμός πλήρωσης, πυκνότητα πληθυσμού, κ.λπ.)·

— Μέθοδος παρασκευής των διαλυμάτων παρακαταθήκης και ταχύτητα ροής·

— Ονομαστικές συγκεντρώσεις δοκιμής, εβδομαδιαία μετρούμενες συγκεντρώσεις των διαλυμάτων δοκιμής και αναλυτική μέθοδο που χρησιμοποιείται, μέσες τιμές των μετρηθεισών τιμών και οι τυπικές αποκλίσεις τους στα δοχεία δοκιμής και ενδείξεις που αποδεικνύουν ότι οι μετρήσεις αναφέρονται στις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε αληθές διάλυμα·

— Χαρακτηριστικά του νερού αραίωσης (συμπεριλαμβανομένων του pH, της σκληρότητας, της αλκαλικότητας, της θερμοκρασίας, της συγκέντρωσης διαλελυμένου οξυγόνου, των επιπέδων υπολειμματικού χλωρίου, του ολικού οργανικού άνθρακα, των αιωρούμενων στερεών και τυχόν άλλων μετρήσεων)

— Ποιότητα του νερού στα δοχεία δοκιμής: pH, σκληρότητα, θερμοκρασία και συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου,

— Λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη σίτιση (π.χ. είδος τροφής, πηγή, ποσότητα και συχνότητα χορήγησης) καθώς και αναλύσεις για ανίχνευση σχετικών προσμείξεων, εάν υπάρχουν (π.χ. PCB, PAH και οργανοχλωριούχα φυτοφάρμακα).

Αποτελέσματα

— Στοιχεία ότι οι μάρτυρες πληρούν τα κριτήρια αποδοχής της δοκιμής·

— Στοιχεία για τους θανάτους που προέκυψαν σε κάθε συγκέντρωση δοκιμής και μάρτυρα·

— Χρησιμοποιηθείσες στατιστικές αναλυτικές τεχνικές, επεξεργασία των δεδομένων και αιτιολόγηση των χρησιμοποιηθεισών τεχνικών·

— Στοιχεία σχετικά με τις βιολογικές παρατηρήσεις της μακροσκοπικής μορφολογίας, συμπεριλαμβανομένων των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου και της λεκιθογενίνης·

▼M6

— Αποτελέσματα της ανάλυσης των δεδομένων, κατά προτίμηση σε μορφή πίνακα και γραφική μορφή·

— Στοιχεία για οποιαδήποτε ασυνήθη αντίδραση των ψαριών και κάθε ορατή επίδραση που προκλήθηκε από την υπό δοκιμή χημική ουσία.

ΟΔΗΓΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΟΔΟΧΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

48. Η ενότητα αυτή περιλαμβάνει ορισμένα θέματα που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων των δοκιμών για τα διάφορα τελικά σημεία που μετρήθηκαν. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να ερμηνεύονται με ιδιαίτερη προσοχή όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία φαίνεται να προκαλεί έκδηλη τοξικότητα ή επιδρά στη γενική κατάσταση του ζώου δοκιμής.

49. Στον καθορισμό του πεδίου των συγκεντρώσεων της δοκιμής, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μη υπερβαίνεται η μέγιστη ανεκτή συγκέντρωση για να είναι δυνατή η ουσιαστική ερμηνεία των δεδομένων. Είναι σημαντικό να υπάρχει τουλάχιστον μία αγωγή στην οποία δεν υπάρχουν ενδείξεις τοξικών επιδράσεων. Ενδείξεις νόσου και ενδείξεις τοξικών επιδράσεων θα πρέπει να αξιολογούνται ενδελεχώς και να αναφέρονται. Για παράδειγμα, η παραγωγή λεκιθογενίνης (VTG) στα θηλυκά μπορεί επίσης να επηρεαστεί από γενική τοξικότητα και μη ενδοκρινικούς τοξικούς τρόπους δράσης, π.χ. ηπατοτοξικότητα. Ωστόσο, η ερμηνεία των επιδράσεων μπορεί να ενισχυθεί με άλλα επίπεδα αγωγής στα αποτελέσματα των οποίων δεν επιδρά η συστημική τοξικότητα ως συγχυτικός παράγοντας.

50. Υπάρχουν ορισμένες πτυχές που πρέπει να ληφθούν υπόψη για την αποδοχή των αποτελεσμάτων των δοκιμών. Ενδεικτικά, τα επίπεδα VTG σε ομάδες μαρτύρων αρσενικών και θηλυκών θα πρέπει να είναι διακριτά και χωριστά κατά περίπου τρεις τάξεις μεγέθους στον λιποκέφαλο φοξίνο και το ζεβρόψαρο, και περίπου μία τάξη μεγέθους στο ρυζόψαρο. Παραδείγματα από το φάσμα τιμών που ανέκυψαν στις ομάδες μαρτύρων και αγωγής είναι διαθέσιμες στις εκθέσεις επικύρωσης (1, 2, 3, 4). Υψηλές τιμές VTG σε αρσενικούς μάρτυρες μπορούν να διακυβεύσουν την ικανότητα απόκρισης της δοκιμής και την ικανότητα ανίχνευσης ασθενών αγωνιστών οιστρογόνων. Χαμηλές τιμές VTG σε θηλυκούς μάρτυρες μπορούν να διακυβεύσουν την ικανότητα απόκρισης της δοκιμής και την ικανότητα ανίχνευσης αναστολέων αρωματάσης και αγωνιστών οιστρογόνων. Οι μελέτες επικύρωσης χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία των εν λόγω οδηγιών.

51. Εάν το εργαστήριο δεν έχει πραγματοποιήσει τη δοκιμή στο παρελθόν ή εάν έχουν πραγματοποιηθεί ουσιαστικές αλλαγές (π.χ. αλλαγή του στελέχους ή του προμηθευτή ψαριών) είναι σκόπιμο να διεξαχθεί μελέτη τεχνικής ικανότητας. Συνιστάται η χρήση χημικών ουσιών που καλύπτουν ένα φάσμα τρόπων δράσης ή επιπτώσεων για ορισμένα από τα τελικά σημεία της δοκιμής. Στην πράξη, κάθε εργαστήριο ενθαρρύνεται να δημιουργήσει δικά του ιστορικά δεδομένα μαρτύρων για αρσενικά και θηλυκά και να πραγματοποιήσει μια δοκιμή με θετικό μάρτυρα για οιστρογόνο δράση (π.χ. 17β-οιστραδιόλη σε 100 ng/l, ή έναν γνωστό ασθενή αγωνιστή) που να προκαλεί αύξηση της VTG στα αρσενικά ψάρια, μια δοκιμή με θετικό μάρτυρα για την αναστολή της αρωματάσης (π.χ. φαδροζόλη ή prochloraz σε 300 μg/l) που να προκαλεί μείωση της VTG στα θηλυκά ψάρια, και μια δοκιμή με θετικό μάρτυρα για ανδρογόνο δράση (π.χ. 17β-τρενβολόνη σε 5 μg/l) που να έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου σε θηλυκούς λιποκέφαλους φοξίνους και ρυζόψαρα. Όλα αυτά τα στοιχεία μπορούν να συγκρίνονται με τα διαθέσιμα στοιχεία από τις μελέτες επικύρωσης (1, 2, 3) να διασφαλιστεί η επάρκεια του εργαστηρίου.

52. Σε γενικές γραμμές, οι μετρήσεις λεκιθογενίνης θα πρέπει να θεωρούνται θετικές εάν προκύπτει μια στατιστικά σημαντική αύξηση της VTG στα αρσενικά ($p < 0,05$), ή μια στατιστικά σημαντική μείωση στα θηλυκά ($p < 0,05$) τουλάχιστον στην υψηλότερη δόση δοκιμής σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, και εφόσον δεν υπάρχουν ενδείξεις γενικής τοξικότητας. Το θετικό αποτέλεσμα ενισχύεται περαιτέρω από την απόδειξη βιολογικά ευλογοφανούς σχέσης μεταξύ της δόσης και της καμπύλης απόκρισης. Όπως προαναφέρθηκε, η μείωση της λεκιθογενίνης δεν μπορεί να οφείλεται αποκλειστικά στο ενδοκρινικό σύστημα· ωστόσο, ένα θετικό αποτέλεσμα θα πρέπει εν γένει να ερμηνεύεται ως ένδειξη ενδοκρινικής δραστηριότητας *in vivo*, και θα πρέπει κανονικά να αποτελεί το έναυσμα για ενέργειες με σκοπό την περαιτέρω διασαφήνιση.

▼**M6**

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, ENV/JM/MONO(2006)27.

(2) OECD (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1 B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, ENV/JM/MONO(2006)29.

(3) OECD (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, ENV/JM/MONO(2007)25.

(4) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects (πρόσβαση 18/09/08).

(5) US EPA 2007. Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. Αδημοσίευτη έκθεση με ημερομηνία 15 Δεκεμβρίου 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 pp.

(6) OECD, 2008. Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, ENV/JM/MONO(2008)21.

(7) Sumpter and Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives;103 Suppl 7:173-8 Review.

(8) Pawlowski S, Sauer A, Shears JA, Tyler CR, Braunbeck T (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. Aquatic Toxicology; 68(3):277-91.

(9) Andersen L, Goto-Kazato R, Trant JM, Nash JP, Korsgaard B, Bjerregaard P (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (Danio rerio). Aquatic Toxicology; 76(3-4):343-52.

(10) Ankley GT, Kahl MD, Jensen KM, Hornung MW, Korte JJ, Makynen EA, Leino RL (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (Pimephales promelas). Toxicological Sciences;67(1):121-30.

(11) Panter GH, Hutchinson TH, Hurd KS, Sherren A, Stanley RD, Tyler CR (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (Pimephales promelas) using easily measured endpoints of sexual development. Aquatic Toxicology; 70(1):11-21.

(12) Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV (1999). Fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2):113-25.

▼**M6**

(13) Panter GH, Tyler CR, Maddix S, Campbell PM, Hutchinson TH, Länge R, Lye C, Sumpter JP, 1999. Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (Pimephales promelas) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.

(14) Fenske M., van Aerle, R.B., Brack, S.C., Tyler, C.R., Segner, H., (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (Danio rerio Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. Comp. Biochem. Phys. C 129 (3): 217-232.

(15) Holbech H, Andersen L, Petersen GI, Korsgaard B, Pedersen KL, Bjerregaard P. (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (Danio rerio). Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 130: 119-131

(16) Rose J, Holbech H, Lindholst C, Noerum U, Povlsen A, Korsgaard B, Bjerregaard P. 2002. Vitellogenin induction by 17ß-estradiol and 17ß-ethinylestradiol in male zebrafish (Danio rerio). Comp. Biochem. Physiol. C. 131: 531-539.

(17) Brion F, Nilsen BM, Eidem JK, Goksoyr A, Porcher JM, Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (Danio rerio). Environmental Toxicology and Chemistry; vol 21: 1699-1708.

(18) Yokota H, Morita H, Nakano N, Kang IJ, Tadokoro H, Oshima Y, Honjo T, Kobayashi K. 2001. Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (Oryzias latipes). Jpn J Environ Toxicol 4:87–98.

(19) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T., 2004. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50:301-308.

(20) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Homung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray LE (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environmental Toxicology and Chemistry; 22(6): 1350-60.

(21) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H, Kobayashi K (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (Oryzias latipes). Environmental Toxicology and Chemistry; 23(3):774-81.

(22) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris

(23) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006a. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; pp.69–92.

(24) Hutchinson TH, Ankley GT, Segner H, Tyler CR, 2006b. Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as «signposts,» not «traffic lights,» in risk assessment. Environmental Health Perspectives;114 Suppl 1:106-14.

(25) Miles-Richardson, SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure to 17β-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (Pimephales promelas). Aquat. Toxicol. 47, 129-145.

▼**M6**

(26) Martinovic, D., L.S. Blake, E.J. Durhan, K.J. Greene, M.D. Kahl, K.M., Jensen, E.A. Makynen, D.L. Villeneuve and G.T. Ankley. 2008. Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. Environ. Toxicol. Chem. 27, 478-488.

(27) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/MONO(2006)18

(28) OECD (2012) OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (revised). Annex I to Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Series on Testing and Assessment No 150. ENV/JM/MONO(2012)22

▼**M6**

Προσάρτημα 1

Συντμήσεις και ορισμοί

Χημική ουσία: Μια ουσία ή ένα μείγμα

CV: Συντελεστής μεταβλητότητας.

ELISA: Ενζυμική δοκιμή ανοσοπροσρόφησης

Πληθυσμιακός φόρτος: Το υγρό βάρος των ψαριών κατ' όγκο νερού.

Πυκνότητα πληθυσμού: Ο αριθμός των ψαριών κατ' όγκο νερού.

VTG (Λεκιθογενίνη): Πρόδρομη ουσία των φωσφογλυκολιποπρωτεϊνών της λεκίθου του αυγού σε σεξουαλικά ενεργά θηλυκά όλων των ωοτόκων ειδών.

Άξονας (HPG): Άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων.

ΜΑΣ: Μέγιστη ανεκτή συγκέντρωση, που αντιπροσωπεύει περίπου 10 % της LC_{50}.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

▼M6

Προσάρτημα 2

Πειραματικές συνθήκες για τη δοκιμή ενδοκρινικού έλεγχου σε ψάρια

1. Συνιστώμενα είδη	**Λιποκέφαλος φοξίνος** (*Pimephales promelas*)	**Ρυζόψαρο** (*Oryzias latipes*)	**Ζεβρόψαρο** (*Danio rerio*)
2. Τύπος δοκιμής	Συνεχούς ροής	Συνεχούς ροής	Συνεχούς ροής
3. Θερμοκρασία νερού	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Ποιότητα φωτισμού	Λαμπτήρες φθορισμού (ευρέως φάσματος)	Λαμπτήρες φθορισμού (ευρέως φάσματος)	Λαμπτήρες φθορισμού (ευρέως φάσματος)
5. Ένταση φωτός	10-20 μE/m^2/s, 540-1 000 lux, ή 50-100 ft-c (επίπεδα στο περιβάλλον του εργαστηρίου)	10-20 μE/m^2/s, 540-1 000 lux, ή 50-100 ft-c (επίπεδα στο περιβάλλον του εργαστηρίου)	10-20 μE/m^2/s, 540-1 000 lux, ή 50-100 ft-c (επίπεδα στο περιβάλλον του εργαστηρίου)
6. Φωτοπερίοδος [οι φάσεις μετάβασης (χάραμα/σούρουπο) είναι προαιρετικές, ωστόσο δεν θεωρούνται απαραίτητες]	16 ώρες φως, 8 ώρες σκοτάδι	12-16 ώρες φως, 12-8 ώρες σκοτάδι	12-16 ώρες φως, 12-8 ώρες σκοτάδι
7. Πληθυσμιακός φόρτος	< 5 g ανά l	< 5 g ανά l	< 5 g ανά l
8. Μέγεθος θαλάμου δοκιμής	10 l (τουλάχιστον)	2 l (τουλάχιστον)	5 l (τουλάχιστον)
9. Όγκος διαλύματος δοκιμής	8 l (τουλάχιστον)	1,5 l (τουλάχιστον)	4 l (τουλάχιστον)
10. Ανανεώσεις όγκου διαλυμάτων δοκιμής	Τουλάχιστον 6 ημερησίως	Τουλάχιστον 5 ημερησίως	Τουλάχιστον 5 ημερησίως
11. Ηλικία των οργανισμών δοκιμής	Βλ. σημείο 20	Βλ. σημείο 20	Βλ. σημείο 20
12. Κατά προσέγγιση υγρό βάρος των ενήλικων ψαριών (g)	Θηλυκά 1,5 ± 20 % Αρσενικά: 2,5 ± 20 %	Θηλυκά 0,35 ± 20 % Αρσενικά: 0,35 ± 20 %	Θηλυκά 0,65 ± 20 % Αρσενικά: 0,4 ± 20 %
13. Αριθμός ψαριών ανά δοχείο δοκιμής	6 (2 αρσενικά και 4 θηλυκά)	10 (5 αρσενικά και 5 θηλυκά)	10 (5 αρσενικά και 5 θηλυκά)
14. Αρ. αγωγών	= 3 (συν κατάλληλοι μάρτυρες)	= 3 (συν κατάλληλοι μάρτυρες)	= 3 (συν κατάλληλοι μάρτυρες)
15. Αρ. δοχείων ανά αγωγή	4 κατ' ελάχιστο.	2 κατ' ελάχιστο.	2 κατ' ελάχιστο.
16. Αριθμός ψαριών ανά συγκέντρωση δοκιμής	16 ενήλικα θηλυκά και 8 αρσενικά (4 θηλυκά και 2 αρσενικά σε κάθε δοχείο επανάληψης)	10 ενήλικα θηλυκά και 10 αρσενικά (5 θηλυκά και 5 αρσενικά σε κάθε δοχείο επανάληψης)	10 ενήλικα θηλυκά και 10 αρσενικά (5 θηλυκά και 5 αρσενικά σε κάθε δοχείο επανάληψης)
17. Καθεστώς σίτισης	Ζωντανή ή κατεψυγμένη ενήλικη ή nauplii γαρίδα δύο ή τρεις φορές ημερησίως κατά βούληση (ad libitum), τροφή που διατίθεται στο εμπόριο ή συνδυασμός των παραπάνω	Γαρίδα nauplii δύο ή τρεις φορές ημερησίως κατά βούληση (ad libitum), τροφή που διατίθεται στο εμπόριο ή συνδυασμός των παραπάνω	Γαρίδα nauplii δύο ή τρεις φορές ημερησίως κατά βούληση (ad libitum), τροφή που διατίθεται στο εμπόριο ή συνδυασμός των παραπάνω

▼**M6**

18. Αερισμός	Καθόλου, εκτός εάν η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου (DO) μειωθεί κάτω από το 60 % της τιμής κορεσμού με αέρα	Καθόλου, εκτός εάν η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου (DO) μειωθεί κάτω από το 60 % της τιμής κορεσμού με αέρα	Καθόλου, εκτός εάν η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου (DO) μειωθεί κάτω από το 60 % της τιμής κορεσμού με αέρα
19. Νερό αραίωσης	Καθαρό νερό από επιφανειακά ύδατα, νερό γεώτρησης ή ανασυσταθέν νερό ή αποχλωριωμένο νερό βρύσης	Καθαρό νερό από επιφανειακά ύδατα, νερό γεώτρησης ή ανασυσταθέν νερό ή αποχλωριωμένο νερό βρύσης	Καθαρό νερό από επιφανειακά ύδατα, νερό γεώτρησης ή ανασυσταθέν νερό ή αποχλωριωμένο νερό βρύσης
20. Περίοδος προέκθεσης	Συνιστώμενο διάστημα: 7 ημέρες	Συνιστώμενο διάστημα: 7 ημέρες	Συνιστώμενο διάστημα: 7 ημέρες
21. Διάρκεια έκθεσης στη χημική ουσία	21 ημέρες	21 ημέρες	21 ημέρες
22. Βιολογικά τελικά σημεία	επιβίωση συμπεριφορά δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου λεκιθογενίνη	επιβίωση συμπεριφορά δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου λεκιθογενίνη	επιβίωση συμπεριφορά λεκιθοβενίνη
23. Αποδοχή της δοκιμής	Διαλυμένο οξυγόνο > 60 % της συγκέντρωσης κορεσμού· μέση θερμοκρασία 25 ± 2 °C· 90 % επιβίωση των ψαριών στους μάρτυρες· μετρούμενες συγκεντρώσεις δοκιμής εντός του 20 % των μέσων μετρούμενων τιμών ανά επίπεδο αγωγής.	Διαλυμένο οξυγόνο > 60 % της συγκέντρωσης κορεσμού· μέση θερμοκρασία 24 ± 2 °C· 90 % επιβίωση των ψαριών στους μάρτυρες· μετρούμενες συγκεντρώσεις δοκιμής εντός του 20 % των μέσων μετρούμενων τιμών ανά επίπεδο αγωγής.	Διαλυμένο οξυγόνο > 60 % της συγκέντρωσης κορεσμού· μέση θερμοκρασία 26 ± 2 °C· 90 % επιβίωση των ψαριών στους μάρτυρες· μετρούμενες συγκεντρώσεις δοκιμής εντός του 20 % των μέσων μετρούμενων τιμών ανά επίπεδο αγωγής.

▼**M6**

Προσάρτημα 3

Ορισμένα χημικά χαρακτηριστικά ενόσω αποδεκτού ύδατος αραίωσης

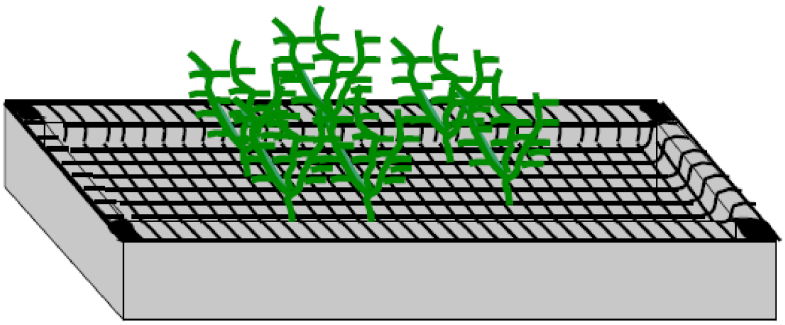
Συστατικό	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ
Σωματίδια	< 20 mg/l
Ολικός οργανικός άνθρακας	< 2 mg/l
Μη ιονισμένη αμμωνία	< 1 μg/l
Υπολείμματα χλωρίου	< 10 μg/l
Ολικά οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα	< 50 ng/l
Ολικά οργανοχλωριούχα φυτοφάρμακα μαζί με πολυχλωριωμένα διφαινύλια	< 50 ng/l
Ολικό οργανικό χλώριο	< 25 ng/l

▼**M6**

Προσάρτημα 4 Α

Υπόστρωμα ωοτοκίας για ζεβροψαρα

Δίσκος ωοτοκίας: εργαστηριακή γυάλινη πλάκα, για παράδειγμα 22 × 15 × 5.5 cm (μήκος x πλάτος x βάθος), καλυμμένη με αφαιρούμενο συρμάτινο πλέγμα από ανοξείδωτο χάλυβα (με ανοίγματα 2mm). Το πλέγμα θα πρέπει να καλύπτει το άνοιγμα του τρυβλίου οργάνων σε επίπεδο κάτω από το χείλος.



Πάνω στο πλέγμα θα πρέπει να στερεωθεί υπόστρωμα ωοτοκίας. Αυτό αποτελεί μια δομή που επιτρέπει στα ψάρια να την διαπερνούν. Για παράδειγμα, κατάλληλα είναι τα τεχνητά φυτά ενυδρείου φτιαγμένα από πράσινο πλαστικό υλικό (σημείωση: θα πρέπει να ληφθεί υπόψη το ενδεχόμενο προσρόφησης της χημικής ουσίας από το πλαστικό υλικό). Το πλαστικό υλικό θα πρέπει να αποπλυθεί με επαρκή ποσότητα θερμού νερού για επαρκές χρονικό διάστημα προκειμένου να διασφαλιστεί ότι δεν πρόκειται να εκλυθούν χημικές ουσίες στο νερό δοκιμής. Όταν χρησιμοποιούνται υλικά από γυαλί θα πρέπει να διασφαλιστεί ότι τα ψάρια δεν θα τραυματιστούν ούτε θα περιορίζονται οι κινήσεις τους κατά τη διάρκεια των δυναμικών τους δράσεων.

Η απόσταση μεταξύ του τρυβλίου και των γυάλινων πλακών πρέπει να είναι τουλάχιστον 3 cm για να εξασφαλιστεί ότι η ωοτοκία δεν πραγματοποιείται εκτός του τρυβλίου. Τα αυγά που προκύπτουν πάνω στο δίσκο πέφτουν μέσα από το πλέγμα και μπορούν να ληφθούν ως δείγμα 45-60 λεπτά μετά την έναρξη του φωτισμού. Τα διάφανα αυγά δεν είναι κολλώδη και μπορεί εύκολα να μετρηθούν με τη χρήση εγκάρσιου φωτός. Με χρήση πέντε θηλυκών ανά δοχείο, ο αριθμός αυγών μέχρι 20 σε μια ημέρα μπορεί να θεωρηθεί χαμηλός, μέχρι 100 θεωρείται μεσαίος, και πάνω από 100 θεωρείται υψηλός αριθμός. Ο δίσκος ωοτοκίας αφαιρείται, συλλέγονται τα αυγά και ο δίσκος επανεισάγεται στο δοχείο δοκιμής, είτε όσο το δυνατόν αργότερα το βράδυ ή πολύ νωρίς το πρωί. Η επανεισαγωγή του δίσκου γίνεται το αργότερο ύστερα από μία ώρα, διαφορετικά το σήμα του υποστρώματος ωοτοκίας μπορεί να επαγάγει μεμονωμένο ζευγάρωμα και ωοτοκία σε ασυνήθη χρόνο. Εάν μια κατάσταση απαιτεί μεταγενέστερη εισαγωγή του δίσκου ωοτοκίας, αυτό θα πρέπει να γίνει τουλάχιστον 9 ώρες μετά την έναρξη του φωτισμού. Σ' αυτό το τελευταίο διάστημα της ημέρας δεν προκαλείται πλέον ωοτοκία.

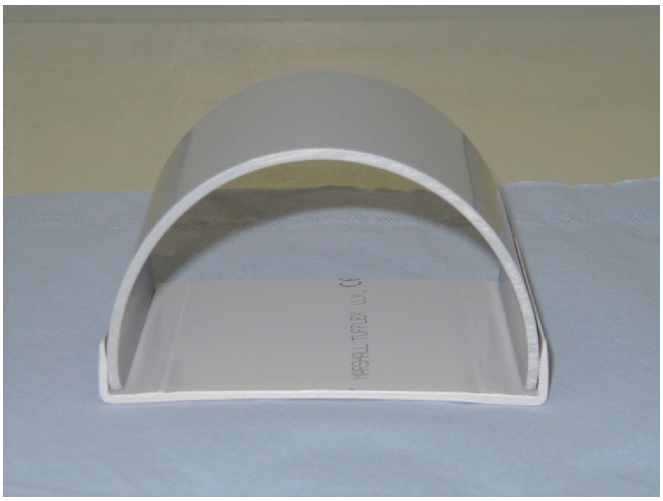
▼**M6**

Προσάρτημα 4 Β

Υπόστρωμα αναπαραγωγής για λιποκεφαλους φοξινους

Δύο ή τρία συνδυασμένα πλαστικά/κεραμικά/γυάλινα ή από ανοξείδωτο χάλυβα πλακίδια και δίσκοι ωοτοκίας τοποθετούνται σε κάθε θάλαμο δοκιμής (π.χ. 80 mm μήκος γκρίζων ημικυκλικών υδρορροών τοποθετούνται σε δίσκο με υπερυψωμένα άκρα μήκους 130 mm) (βλ. εικόνα). Κατάλληλα προετοιμασμένα πλαστικά ή κεραμικά πλακίδια έχουν αποδειχθεί ότι ενδείκνυνται ως υπόστρωμα ωοτοκίας (Thorpe *et al*, 2007).

Συνιστάται τα πλακίδια να έχουν υποβληθεί σε λείανση για να βελτιωθεί η πρόσφυση. Ο δίσκος θα πρέπει επίσης να διαθέτει διαχωριστικό προστασίας ώστε να μην μπορούν τα ψάρια να έχουν πρόσβαση στα πεσμένα αυγά, εκτός εάν έχει αποδειχθεί η ικανότητα προσκόλλησης των αυγών για το χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα ωοτοκίας.



Η βάση είναι σχεδιασμένη έτσι ώστε να περιλαμβάνει τα αυγά που δεν κόλλησαν στην επιφάνεια των πλακιδίων και, ως εκ τούτου, θα έπεσαν στον πυθμένα της δεξαμενής (ή αυτά τα αυγά που εναποτέθηκαν απευθείας επάνω στην επίπεδη πλαστική βάση). Όλα τα υποστρώματα ωοτοκίας πρέπει να αποπλυθούν για τουλάχιστον 12 ώρες, σε νερό αραίωσης, πριν από τη χρήση.

ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. Aquatic Toxicology, 81, 90–98.

▼M6

Προσάρτημα 5 Α

Εκτίμησή των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου στον λιποκεφαλο όξινο για την ανίχνευση ορισμένων χημικών ουσιών που επιδρούν στο ενδοκρινικό σύστημά

Επισκόπηση

Τα δυνητικά σημαντικά χαρακτηριστικά της φυσικής εμφάνισης των ενηλίκων λιποκέφαλων φοξίνων σε δοκιμές ενδοκρινικών διαταρακτών περιλαμβάνουν χρώμα σώματος (π.χ. ανοικτό/σκούρο), μοτίβα χρωματισμού (π.χ. παρουσία ή απουσία κάθετων λωρίδων), σχήμα σώματος (π.χ. σχήμα κεφαλής και θωρακικής περιοχής, διάταση κοιλιακής χώρας), και ειδικά δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου (π.χ. αριθμός και μέγεθος των γαμήλιων φυματίων, μέγεθος του ραχιαίου λιπώματος και του ωοθέτη).

Τα γαμήλια φυμάτια βρίσκονται στο κεφάλι (ραχιαίο λίπωμα) του αναπαραγωγικά ενεργού αρσενικού λιποκέφαλου φοξίνου, και είναι συνήθως διατεταγμένα συμμετρικά στις δύο πλευρές (Jensen et al. 2001). Οι θηλυκοί και οι νεαροί αρσενικοί μάρτυρες δεν παρουσιάζουν ανάπτυξη φυματίων (Jensen et al. 2001). Έως και οκτώ μεμονωμένα φυμάτια μπορούν να υπάρχουν γύρω από τα μάτια και μεταξύ των ρουθουνιών των αρσενικών. Τα περισσότερα και μεγαλύτερα φυμάτια βρίσκονται σε δύο παράλληλες γραμμές ακριβώς κάτω από τα ρουθούνια και πάνω από το στόμα. Σε πολλά ψάρια υπάρχουν ομάδες φυματίων κάτω από την κάτω γνάθο· τα εγγύτερα στο στόμα απαντώνται γενικά ως ένα και μοναδικό ζεύγος, ενώ η ομάδα που βρίσκεται στην κοιλιακή μοίρα μπορεί να αποτελείται από έως και τέσσερα φυμάτια. Οι πραγματικοί αριθμοί των φυματίων σπάνια υπερβαίνουν τα 30 (εύρος 18-28· Jensen et al. 2001). Τα επικρατέστερα φυμάτια (από άποψη αριθμού) περιλαμβάνονται ως ενιαία, σχετικά στρογγυλή δομή, με ύψος περίπου ισοδύναμο με εκείνο της ακτίνας. Τα περισσότερα αναπαραγωγικά ενεργά αρσενικά διαθέτουν επίσης, τουλάχιστον ορισμένα, φυμάτια που είναι τόσο διευρυμένα και προεξέχοντα ώστε να μην είναι μη διακριτά ως επιμέρους δομές.

Ορισμένα είδη ενδοκρινοδιαταρακτικών χημικών ουσιών μπορούν να προκαλέσουν την ανώμαλη εμφάνιση ορισμένων δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου στο αντίθετο φύλο· για παράδειγμα, αγωνιστές των υποδοχέων ανδρογόνων, όπως η 17β-μεθυλοτεστοστερόνη ή η 17β-τρενβολόνη, μπορούν να κάνουν τους θηλυκούς λιποκέφαλους φοξίνους να αναπτύξουν γαμήλια φυμάτια (Smith 1974· Ankley *et al*. 2001· 2003), ενώ οι αγωνιστές των υποδοχέων οιστρογόνων ενδέχεται να μειώσουν τον αριθμό ή το μέγεθος των γαμήλιων φυματίων στα αρσενικά (Miles-Richardson et al. 1999· Harries et al. 2000).

Ακολουθεί περιγραφή του χαρακτηρισμού των γαμήλιων φυματίων σε λιποκέφαλους φοξίνους βάσει των διαδικασιών που χρησιμοποιούνται από το εργαστήριο του οργανισμού για την προστασία του περιβάλλοντος των ΗΠΑ (U.S. Environmental Protection Agency) στο Duluth, MN. Ειδικά προϊόντα και/ή εξοπλισμός μπορούν να αντικατασταθούν με συγκρίσιμα διαθέσιμα υλικά.

Η παρατήρηση επιτυγχάνεται καλύτερα με τη χρήση ενός φωτιζόμενου διοφθάλμιου στερεοσκοπικού μικροσκοπίου με μεγέθυνση 3x. Η εξέταση των ψαριών γίνεται κατά μήκος της ράχης και προσθίως (κεφαλή προς τον εξεταστή).

a) Τοποθετήστε το ψάρι σε μικρό τρυβλίο Petri (π.χ. διαμέτρου 100 mm), με την μπροστινή πλευρά προς τα εμπρός και με την κοιλιά προς τα κάτω. Εστιάστε τον φακό ώστε να είναι δυνατός ο εντοπισμός των φυματίων. Κυλήστε το ψάρι με ήπιο και αργό τρόπο από τη μία πλευρά στην άλλη για να εντοπίσετε τις περιοχές με τα φυμάτια. Καταμετρήστε και βαθμολογήστε τα φυμάτια.

b) Επαναλάβετε την παρατήρηση στην πρόσθια κοιλιακή μοίρα τοποθετώντας το ψάρι επί της ράχης και την μπροστινή πλευρά προς τα εμπρός στο τρυβλίο Petri.

c) Οι παρατηρήσεις πρέπει να ολοκληρώνονται εντός 2 λεπτών για κάθε ψάρι.

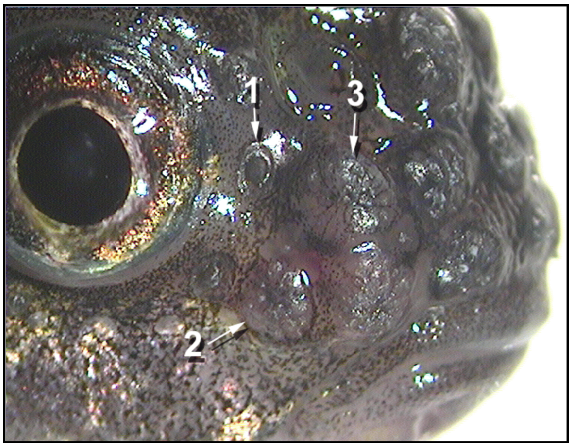
▼M6

Καταμέτρηση και αξιολόγηση φυματίων

Έξι συγκεκριμένοι τομείς έχουν προσδιοριστεί για την αξιολόγηση της παρουσίας και της ανάπτυξης φυματίων στους ενήλικους λιποκέφαλους φοξίνους. Ένα πρότυπο αναπτύχθηκε για να χαρτογραφηθεί η τοποθεσία και η ποσότητα των υπαρχόντων φυματίων (βλ. τέλος του παρόντος προσαρτήματος). Ο αριθμός των φυματίων καταγράφεται και το μέγεθός τους μπορεί να ταξινομηθεί ποσοτικά ως εξής: 0- απουσία, 1-παρόν, 2-διευρυμένο και 3-προεξέχον για κάθε οργανισμό (εικ. 1).

Κλάση 0- απουσία φυματίων. Κλάση 1-παρόν: χαρακτηρίζεται κάθε φυμάτιο που έχει ένα μόνο σημείο του οποίου το ύψος είναι σχεδόν ίσο με την ακτίνα του (διάμετρος). Κλάση 2- διευρυμένο, χαρακτηρίζεται από ιστό που μοιάζει με αστερίσκο στην εμφάνιση, συνήθως με μεγάλη ακτινωτή βάση με ραβδώσεις ή αύλακες που εξέρχονται από το κέντρο. Η κορυφή των φυματίων είναι συχνά πιο οδοντωτή αλλά μπορεί να είναι ελαφρώς στρογγυλεμένη κατά καιρούς. Κλάση 3- προεξέχον, είναι συνήθως πολύ μεγάλο και στρογγυλεμένο με λιγότερο καθορισμένη δομή. Σε μερικές περιπτώσεις τα εν λόγω φυμάτια εμφανίζονται μαζί σχηματίζοντας ενιαία μάζα κατά μήκος μιας μεμονωμένης περιοχής ή ενός συνδυασμού περιοχών (Β, Γ και Δ, όπως περιγράφεται παρακάτω). Χρωματισμός και σχέδιο είναι παρόμοια με την κλάση 2, αλλά κατά περιόδους σχετικώς ασαφή. Η χρήση του εν λόγω συστήματος οδηγεί κατά κανόνα σε συνολική βαθμολογία φυματίων < 50 σε έναν συνήθη αρσενικό μάρτυρα που διαθέτει από 18 έως 20 φυμάτια (Jensen et al. 2001).

Εικόνα 1



Ο πραγματικός αριθμός των φυματίων σε ορισμένα ψάρια μπορεί να είναι μεγαλύτερος από τα διαθέσιμα τετραγωνίδια του υποδείγματος (προσάρτημα Α) για κάθε περιοχή αξιολόγησης. Στην περίπτωση αυτή, επιπλέον αριθμοί κλάσεων μπορούν να σημειωθούν εντός, στα δεξιά ή στα αριστερά του τετραγωνιδίου. Το υπόδειγμα δεν χρειάζεται να εμφανίζει συμμετρία. Πρόσθετη τεχνική για τη χαρτογράφηση φυματίων που είναι κατά ζεύγη ή ενώθηκαν κάθετα κατά μήκος του οριζόντιου επιπέδου του στόματος μπορεί να γίνει σημειώνοντας τις δύο κλάσεις φυματίων στο ίδιο τετραγωνίδιο.

Περιοχές χαρτογράφησης:

Α — Φυμάτια που βρίσκονται γύρω από τον οφθαλμό. Χαρτογράφηση από τη από τη ραχιαία προς την κοιλιακή μοίρα γύρω από το πρόσθιο περίβλημα του οφθαλμού. Πολλαπλά συνήθως σε ώριμους αρσενικούς μάρτυρες, απόντα σε θηλυκούς μάρτυρες, γενικά σε ζεύγη (ένα κοντά σε κάθε οφθαλμό) ή μεμονωμένα σε θηλυκά που έχουν εκτεθεί σε ανδρογόνα.

Β — Φυμάτια που εντοπίζονται ανάμεσα στα ρουθούνια, (αισθητήρια κανάλια-πόροι). Συνήθως σε ζεύγη για τους αρσενικούς μάρτυρες σε πιο υψηλά επίπεδα (2- διευρυμένα ή 3- προεξέχοντα) της ανάπτυξης. Απόντα σε θηλυκούς μάρτυρες με κάποια εμφάνιση και ανάπτυξη σε θηλυκά που έχουν εκτεθεί σε ανδρογόνα.

Γ — Φυμάτια που βρίσκονται ακριβώς μπροστά από τα ρουθούνια, παράλληλα στο στόμα. Γενικά διευρυμένα ή προεξέχοντα σε ώριμους αρσενικούς μάρτυρες. Παρόντα ή διευρυμένα σε λιγότερο ανεπτυγμένα αρσενικά ή σε θηλυκά που έχουν υποστεί αγωγή με ανδρογόνα.

▼**M6**

Δ — Φυμάτια που βρίσκονται παράλληλα κατά μήκος της γραμμής του στόματος. Συνήθως ταξινομημένα ως ανεπτυγμένα σε αρσενικούς μάρτυρες. Απόντα σε θηλυκούς μάρτυρες αλλά παρόντα σε θηλυκά που έχουν εκτεθεί σε ανδρογόνα.

Ε — Φυμάτια που βρίσκονται στην κάτω γνάθο, κοντά στο στόμα, συνήθως μικρά κατά κανόνα σε ζεύγη. Ποικίλουν σε αρσενικούς μάρτυρες ή αρσενικά που έχουν υποστεί αγωγή, και θηλυκά που έχουν υποστεί αγωγή.

ΣΤ — Φυμάτια που βρίσκονται κοιλιακά του Ε. Κατά κανόνα μικρά και σε ζεύγη. Παρόντα σε αρσενικούς μάρτυρες και θηλυκά που έχουν εκτεθεί σε ανδρογόνα.

ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

(1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow *(Pimephales promelas). Environ Toxicol Chem* 20:1276-1290.

(2) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray EL. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17-β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environ Toxicol Chem 22:1350-1360.

(3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA,Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (Pimephales promelas). Environ Sci Technol 34:3003-3011.

(4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (Pimephales promelas). Comp Biochem Physiol C 128:127-141.

(5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. J Fish Biol 59:515-523.

(6) Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (Pimephales promelas). Aquat Toxicol 47:129-145.

(7) Smith RJF. 1974. Effects of 17-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (Pimephales promelas). Can J Zool 52:1031-1038.

Υπόδειγμα φυματίων	**Αριθμητική ταξινόμηση**
ID _____	1-παρόν
Ημερομηνία _____	2-διευρυμένο
Συνολική βαθμολογία _____	3-προεξέχον

	A	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**						
	B	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**						
	Γ	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
	Δ	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
				E	**X1**	**X1**					
	ΣΤ	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**						

▼M6

Προσάρτημα 5 Β

Εκτίμησή των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου στο ρυζόχαρτο για την ανίχνευση ορισμένων χημικών ουσιών που επιδρούν στο ενδοκρινικό σύστημά

Ακολουθεί περιγραφή της μέτρησης των θηλωδών διεργασιών (*), που είναι τα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου στο ρυζόψαρο (*Oryzias latipes*).

(*) Οι θηλώδεις διεργασίες εμφανίζονται συνήθως μόνο σε ενήλικα αρσενικά και απαντώνται στις ακτίνες των πτερυγίων από τη δεύτερη στην έβδομη ή όγδοη μετρώντας από το οπίσθιο άκρο του εδρικού πτερυγίου (εικόνες 1 και 2). Ωστόσο, οι διεργασίες σπάνια εμφανίζονται στην πρώτη ακτίνα του πτερυγίου από το οπίσθιο άκρο του εδρικού πτερυγίου. Αυτή η τυποποιημένη διαδικασία λειτουργίας (ΤΔΛ) καλύπτει τη μέτρηση των διεργασιών στην πρώτη ακτίνα του πτερυγίου (ο αριθμός ακτίνας πτερυγίου παραπέμπει στη διάταξη από το οπίσθιο άκρο του εδρικού πτερυγίου στην εν λόγω ΤΔΛ).

1) Μετά την εκτομή του ήπατος (προσάρτημα 6), το νεκρό σώμα τοποθετείται σε κωνικό σωλήνα που περιέχει περίπου 10 ml ουδέτερου ρυθμιστικού διαλύματος φορμαλδεΰδης (φορμόλη) 10 % (κεφαλή προς τα πάνω, ουρά προς τα κάτω). Εάν η γονάδα έχει μονιμοποιηθεί σε διάλυμα διαφορετικό από το ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμαλδεΰδης (φορμόλη) 10 %, προβείτε με χρήση λεπίδας σε εγκάρσια τομή κατά μήκος του νεκρού σώματος μεταξύ της πρόσθιας περιοχής του εδρικού πτερυγίου και του πρωκτού, προσέχοντας να μην βλάψετε τον γονοπόρο ή την ίδια τη γονάδα (εικ. 3). Τοποθετήστε την κρανιακή πλευρά του σώματος του ψαριού στο μονιμοποιητικό διάλυμα για τη διατήρηση της γονάδας, και την ουραία πλευρά του σώματος του ψαριού σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμαλδεΰδης (φορμόλη) 10 %, όπως περιγράφεται παραπάνω.

2) Μετά την τοποθέτηση του σώματος του ψαριού σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμαλδεΰδης (φορμόλη) 10 %, πιάστε την εμπρόσθια περιοχή του εδρικού πτερυγίου με λαβίδες και διπλώστε το για περίπου 30 δευτερόλεπτα για να διατηρήσετε το εδρικό πτερύγιο ανοικτό. Καθώς πιάνετε το εδρικό πτερύγιο με λαβίδες, πιάστε μερικές ακτίνες του πτερυγίου στην εμπρόσθια περιοχή με προσοχή ώστε να μην γρατζουνίσετε τις θηλώδεις διεργασίες.

3) Αφού έχετε κρατήσει το εδρικό πτερύγιο ανοικτό για περίπου 30 δευτερόλεπτα, αποθηκεύστε το σώμα του ψαριού σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμαλδεΰδης (φορμόλη) 10 % σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι τη μέτρηση των θηλωδών διεργασιών (η μέτρηση θα πρέπει να διενεργείται αφού μονιμοποιηθεί για τουλάχιστον 24 ώρες).

Μέτρηση

(1) Μετά τη μονιμοποίηση του σώματος του ψαριού σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμαλδεΰδης (φορμόλη) 10 % για τουλάχιστον 24 ώρες, πάρτε το νεκρό σώμα του ψαριού από τον κωνικό σωλήνα και σκουπίστε τη φορμαλδεΰδη στο διηθητικό χαρτί (ή σε απορροφητικό χαρτί).

(2) Τοποθετήστε το ψάρι με την κοιλιά προς τα πάνω. Στη συνέχεια κόψτε προσεκτικά το εδρικό πτερύγιο με μικρό ψαλίδι ανατομής (είναι προτιμότερο να κόψετε το εδρικό πτερύγιο μαζί με μικρή ποσότητα πτερυγιοφόρου).

(3) Πιάστε την πρόσθια περιοχή του αποκομμένου εδρικού πτερυγίου με λαβίδες και τοποθετήστε το επάνω σε γυάλινη αντικειμενοφόρα πλάκα μαζί με αρκετές σταγόνες νερού. Στη συνέχεια καλύψτε το εδρικό πτερύγιο με γυάλινο κάλυμμα. Προσέξτε να μην γρατζουνίσετε τις θηλώδεις διεργασίες όταν πιάνετε με τις λαβίδες το εδρικό πτερύγιο.

(4) Μετρήστε τον αριθμό των συμφύσεων που εμφανίζουν θηλώδεις διεργασίες χρησιμοποιώντας βιολογικό μικροσκόπιο (όρθιο μικροσκόπιο ή ανεστραμένο μικροσκόπιο). Οι θηλώδεις διεργασίες αναγνωρίζονται όταν ένας μικρός σχηματισμός διεργασιών είναι ορατός στην οπίσθια μοίρα των συμφύσεων. Σημειώστε τον αριθμό συμφύσεων με θηλώδεις διεργασίες σε κάθε

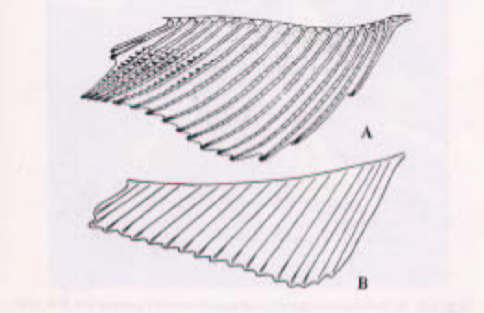
▼**M6**

ακτίνα του πτερυγίου στο φύλλο εργασίας (π.χ. πρώτη ακτίνα του πτερυγίου: 0, δεύτερη ακτίνα του πτερυγίου: 10, τρίτη ακτίνα του πτερυγίου: 12, κ.λπ.) και εισάγετε τον συνολικό αριθμό αυτών στο φύλλο excel για κάθε μεμονωμένο ψάρι. Εάν χρειάζεται, βγάλτε μια φωτογραφία του εδρικού πτερυγίου και μετρήστε τον αριθμό των συμφύσεων με θηλώδεις διεργασίες πάνω στη φωτογραφία.

(5) Μετά τη μέτρηση, τοποθετήστε το εδρικό πτερύγιο στον κωνικό σωλήνα που περιγράφεται στο 1) και αποθηκεύστε το.

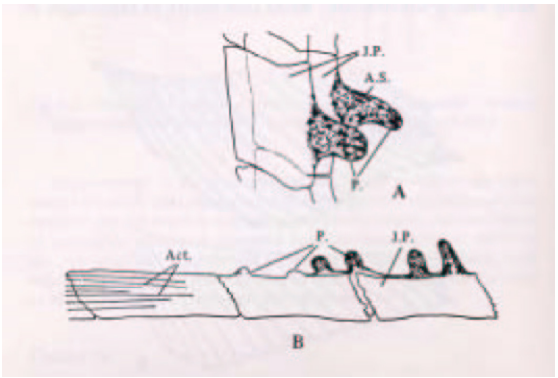
Εικόνα 1.

Διάγραμμα που απεικονίζει τη διαφορά των φύλων ως προς το σχήμα και το μέγεθος του εδρικού πτερυγίου. A, αρσενικό· B, θηλυκό. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



Εικόνα 2.

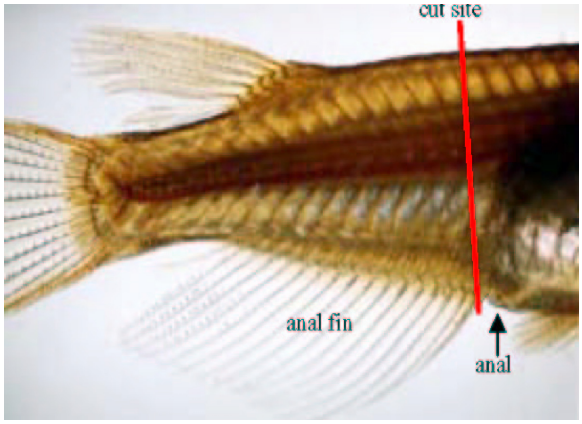
A, διεργασίες πάνω σε συμφύσεις ακτίνας εδρικού πτερυγίου. J.P., σύμφυση· A.S., αξονικός χώρος· P., διεργασία. B, άπω άκρο της ακτίνας του πτερυγίου. Τα ακτινοτρίχια (Act.) βρίσκονται στην άκρη. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of Oryzias latipes and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



▼**M6**

Εικόνα 3.

Φωτογραφία του σώματος του ψαριού που δείχνει το σημείο τομής όταν η γονάδα είναι μονιμοποιημένη σε διάλυμα μονιμοποίησης διαφορετικό του ουδέτερου ρυθμιστικού διαλύματος φορμαλδεΰδης (φορμόλη) 10 %. Σε αυτή την περίπτωση, το εναπομένων σώμα θα κοπεί μεταξύ της πρόσθιας περιοχής του εδρικού πτερυγίου και του πρωκτού με λεπίδα (κόκκινη μπάρα), και η πλευρά της κεφαλής του σώματος του ψαριού τοποθετείται στο μονιμοποιητικό διάλυμα για τη γονάδα και το ουραίο τμήμα του σώματος του ψαριού θα τοποθετηθεί σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμαλδεΰδης (φορμόλη) 10 %.



▼M6

Προσάρτημα 6

Συνιστώμενες διαδικασίες για τη συλλογή δειγμάτων για την ανάλυσή λεκιθογενινησ

Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποτρέπεται η διασταυρούμενη επιμόλυνση μεταξύ των δειγμάτων λεκιθογενίνης (VTG) των αρσενικών και των θηλυκών.

Διαδικασία 1Α: Λιποκέφαλος φοξίνος, αιμοληψία από την ουραία φλέβα/αρτηρία

Μετά την αναισθητοποίηση, ο ουραίος μίσχος αποκόπτεται μερικώς με λεπίδα νυστεριού και το αίμα συλλέγεται από την ουραία φλέβα/αρτηρία με τριχοειδή ηπαρινισμένο σωλήνα αιματοκρίτη. Αφού συλλεχθεί το αίμα, το πλάσμα απομονώνεται γρήγορα με φυγοκέντρηση για 3 λεπτά σε 15 000 *g* (ή εναλλακτικά για 10 λεπτά σε 15 000 g στους 4° C). Εάν κριθεί επιθυμητό, ο αιματοκρίτης μπορεί να προσδιοριστεί μετά τη φυγοκέντρηση. Στη συνέχεια, από τον σωλήνα αιματοκρίτη αφαιρείται το πλάσμα και αποθηκεύεται σε σωλήνα φυγοκέντρου με 0,13 μονάδες απροτινίνης (έναν αναστολέα πρωτεάσης) στους – 80° C ώσπου να μπορεί να καθοριστεί η λεκιθογενίνη. Ανάλογα με το μέγεθος του λιποκέφαλου φοξίνου (το οποίο εξαρτάται από το φύλο) οι όγκοι πλάσματος που μπορούν να συλλεχθούν κυμαίνονται γενικά ανάμεσα σε 5 και 60 μικρόλιτρα ανά ψάρι (Jensen *et al*. 2001).

Διαδικασία 1Β: Λιποκέφαλος φοξίνος, αιμοληψία από την καρδιά

Εναλλακτικά, το αίμα μπορεί επίσης να συλλεχθεί μέσω καρδιακής παρακέντησης με χρήση ηπαρινισμένης σύριγγας (1 000 μονάδες ηπαρίνης ανά ml). Το αίμα μεταφέρεται σε σωλήνες Eppendorf (που διατηρούνται σε πάγο) και στη συνέχεια φυγοκεντρείται (5 λεπτά, 7 000 g, θερμοκρασία δωματίου). Το πλάσμα θα πρέπει να μεταφερθεί σε καθαρούς σωλήνες Eppendorf (σε κλάσματα εφόσον ο όγκος του πλάσματος το καθιστά εφικτό) και να καταψυχθεί άμεσα στους – 80 °C, μέχρι να αναλυθεί (Panter et al., 1998).

Διαδικασία 2Α: Ρυζόψαρο, εκτομή του ήπατος σε ρυζόψαρο

Αφαίρεση των υπό δοκιμή ψαριών από τον θάλαμο δοκιμής

(1) Τα υπό δοκιμή ψάρια θα πρέπει να αφαιρεθούν από τον θάλαμο δοκιμής με χρήση μικρής απόχης. Προσέξτε να μην πέσει το υπό δοκιμή ψάρι σε άλλους θαλάμους δοκιμής.

(2) Κατ' αρχήν, τα υπό δοκιμή ψάρια θα πρέπει να αφαιρεθούν με την ακόλουθη σειρά: μάρτυρας, μάρτυρας με τον διαλύτη (κατά περίπτωση), χαμηλότερης συγκέντρωσης, μεσαίας συγκέντρωσης, υψηλότερης συγκέντρωσης και θετικός μάρτυρας. Επιπλέον, όλα τα αρσενικά θα πρέπει να αφαιρεθούν από έναν θάλαμο δοκιμής προτού αφαιρεθούν τα εναπομείναντα θηλυκά.

(3) Το φύλο κάθε υπό δοκιμή ψαριού προσδιορίζεται με βάση τα εξωτερικά δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου (π.χ. το σχήμα του το εδρικού πτεριγίου).

(4) Τοποθετήστε το υπό δοκιμή ψάρι σε ένα δοχείο για μεταφορά και μεταφέρετε το στον σταθμό εργασίας για εκτομή του ήπατος. Ελέγξτε τις ετικέτες του θαλάμου δοκιμής και του δοχείου μεταφοράς για ακρίβεια και για να επιβεβαιώσετε ότι ο αριθμός των ψαριών που έχουν αφαιρεθεί από τον θάλαμο δοκιμής και ο αριθμός των ψαριών που απομένουν στον θάλαμο είναι ο αναμενόμενος.

(5) Εάν το φύλο δεν μπορεί να διαπιστωθεί από την εξωτερική εμφάνιση του ψαριού, αφαιρέστε όλα τα ψάρια από τον θάλαμο δοκιμής. Σε αυτή την περίπτωση, το φύλο θα πρέπει να διαπιστωθεί με παρατήρηση της γονάδας ή των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου σε στερεοσκοπικό μικροσκόπιο.

▼**M6**

Εκτομή του ήπατος

(1) Μεταφέρετε τα υπό δοκιμή ψάρια από το δοχείο μεταφοράς στο αναισθητικό διάλυμα με τη μικρή απόχη.

(2) Αφού αναισθητοποιηθεί το υπό δοκιμή ψάρι, μεταφέρετε το σε χαρτί διήθησης (ή απορροφητικό χαρτί) χρησιμοποιώντας λαβίδες (κοινού τύπου). Καθώς πιάνετε το υπό δοκιμή ψάρι, τοποθετήστε τις λαβίδες στα πλαϊνά της κεφαλής για να αποφύγετε το σπάσιμο της ουράς.

(3) Σκουπίστε το νερό από την επιφάνεια του υπό δοκιμή ψαριού πάνω στο χαρτί διήθησης (ή το απορροφητικό χαρτί).

(4) Τοποθετήστε το ψάρι με την κοιλιά προς τα πάνω. Στη συνέχεια προβείτε σε μικρή εγκάρσια τομή στη μισή απόσταση μεταξύ της κοιλιακής μοίρας του αυχένα και της μέσης κοιλιακής χώρας χρησιμοποιώντας ψαλίδι ανατομής.

(5) Εισάγετε το ψαλίδι ανατομής στην μικρή τομή και πραγματοποιήστε μια τομή κατά μήκος του μέσου της κοιλιακής χώρας από ένα ουραίο σημείο ως προς τον βρογχικό μανδύα μέχρι την κρανιακή μοίρα του πρωκτού. Προσέξτε να μην εισάγετε το ψαλίδι ανατομής πολύ βαθιά, έτσι ώστε να μην προκαλέσετε ζημιά στο ήπαρ και τη γονάδα.

(6) Πραγματοποιήστε τις ακόλουθες ενέργειες στο στερεοσκοπικό μικροσκόπιο.

(7) Τοποθετήστε το υπό δοκιμή ψάρι πάνω στο απορροφητικό χαρτί (μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί γυάλινο τρυβλίο Petri ή γυάλινη αντικειμενοφόρος πλάκα).

(8) Απομακρύνονται τα τοιχώματα της κοιλιακής κοιλότητας με λαβίδες ακριβείας ώστε να προβάλουν προς τα έξω τα εσωτερικά όργανα. Είναι επίσης αποδεκτό να προβάλετε προς τα έξω τα εσωτερικά όργανα αφαιρώντας τη μία πλευρά του τοιχώματος της κοιλιακής κοιλότητας εάν χρειάζεται.

(9) Προβάλετε προς τα έξω το συνδεδεμένο κομμάτι του ήπατος και της χοληδόχου κύστης χρησιμοποιώντας άλλο ένα ζεύγος λαβίδων ακριβείας. Στη συνέχεια πιάστε τον χοληδόχο πόρο και αποκόψτε τη χοληδόχο κύστη. Προσέξτε να μην σπάσετε τη χοληδόχο κύστη.

(10) Πιάστε τον οισοφάγο και αποκόψτε τον γαστρεντερικό σωλήνα από το συκώτι με τον ίδιο τρόπο. Προσέξτε να μην διαρρεύσει το περιεχόμενο του γαστρεντερικού σωλήνα. Προβείτε σε εκτομή του ουραίου γαστρεντερικού σωλήνα από τον πρωκτό και αφαιρέστε τον σωλήνα από την κοιλιακή κοιλότητα.

(11) Περικόψτε τη μάζα λίπους και άλλων ιστών από την περιφέρεια του ήπατος. Προσέξτε να μην γρατζουνίσετε το ήπαρ.

(12) Πιάστε την περιοχή της ηπατικής πύλης με λαβίδες ακριβείας και αφαιρέστε το ήπαρ από την κοιλιακή κοιλότητα.

(13) Τοποθετήστε το ήπαρ στη γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα. Χρησιμοποιώντας τις λαβίδες ακριβείας, αφαιρέστε τυχόν περίσσεια λίπους και ξένο ιστό (π.χ. κοιλιακή μεμβράνη), εάν χρειάζεται, από την επιφάνεια του ήπατος.

(14) Μετρήστε το βάρος του ήπατος με ηλεκτρονικό αναλυτικό ζυγό, χρησιμοποιώντας μικροσωλήνα 1,5 ml ως απόβαρο. Καταγράψτε την τιμή στο φύλλο εργασίας (διάβαζε: 0,1 mg). Επιβεβαιώστε τις πληροφορίες ταυτοποίησης στην ετικέτα του μικροσωλήνα.

(15) Κλείστε το καπάκι του μικροσωλήνα που περιέχει το ήπαρ. Φυλάξτε το σε βάση ψύξης (ή βάση πάγου).

(16) Μετά την εκτομή ενός ήπατος, καθαρίστε τα εργαλεία ανατομής ή αντικαταστήστε τα με καθαρά.

▼**M6**

(17) Αφαιρέστε το ήπαρ από όλα τα ψάρια που βρίσκονται στο δοχείο μεταφοράς όπως περιγράφεται παραπάνω.

(18) Αφότου έχει πραγματοποιηθεί η εκτομή του ήπατος από όλα τα ψάρια του δοχείου μεταφοράς (δηλαδή όλων των αρσενικών και των θηλυκών ενός θαλάμου δοκιμής), τοποθετήστε όλα τα δείγματα ήπατος στη βάση σωλήνα με ετικέτα για ταυτοποίηση και φυλάξτε το σε κατάψυξη. Όταν τα ήπατα δωρίζονται για προκατεργασία αμέσως μετά την εκτομή, τα δείγματα μεταφέρονται στον επόμενο σταθμό εργασίας σε βάση ψύξης (ή βάση πάγου).

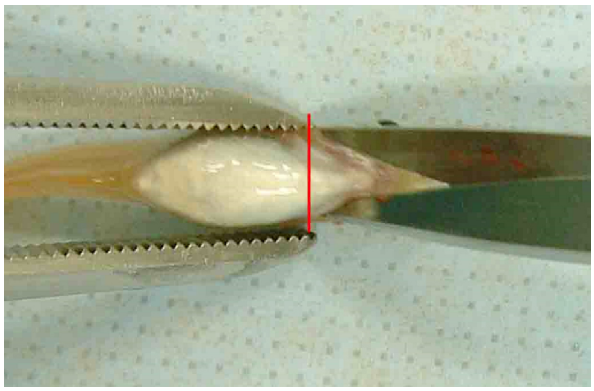
Μετά την εκτομή του ήπατος, το νεκρό σώμα του ψαριού είναι διαθέσιμο για μέτρηση των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου.

Δείγμα

Αποθηκεύστε τα δείγματα ήπατος που πήρατε από το υπό δοκιμή ψάρι στους ≤ – 70 °C εάν δεν χρησιμοποιηθούν για προκατεργασία αμέσως μετά την εκτομή.

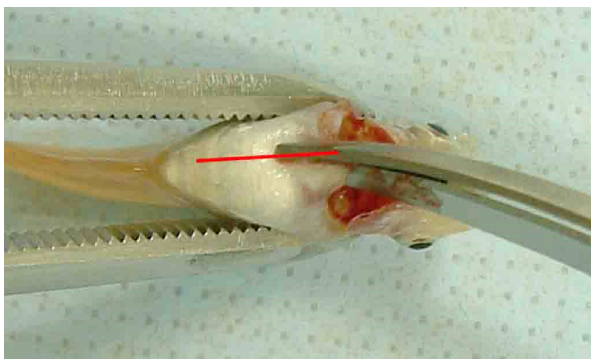
Εικόνα 1

Μία τομή πραγματοποιείται με ψαλίδι ακριβώς μπροστά από τα θωρακικά πτερύγια.



Εικόνα 2

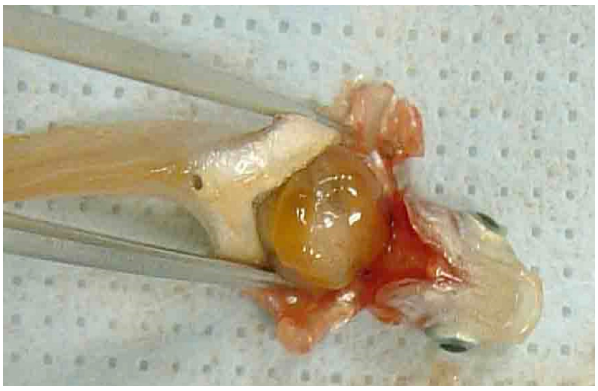
Πραγματοποιείται τομή κατά μήκος της μεσαίας γραμμής της κοιλιακής χώρας με ψαλίδι μέχρι περίπου 2 mm από το πρόσθιο σημείο του πρωκτού.



▼**M6**

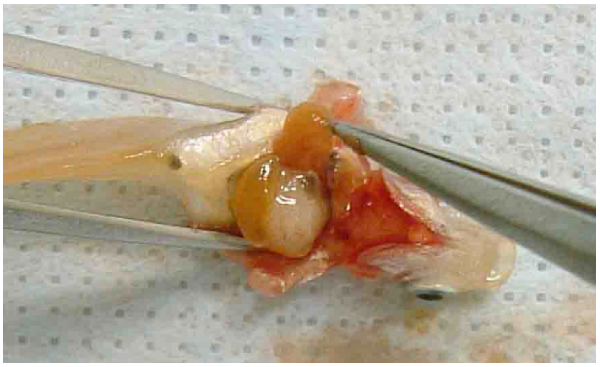
Εικόνα 3

Τα κοιλιακά τοιχώματα ανοίγονται με λαβίδες ώστε να προβληθεί το ήπαρ και τα άλλα εσωτερικά όργανα. (Εναλλακτικά, μπορείτε να καρφιτσώσετε τα κοιλιακά τοιχώματα στα πλάγια).



Εικόνα 4

Ακολουθεί εκτομή και αφαίρεση του ήπατος με λαβίδες.



Εικόνα 5

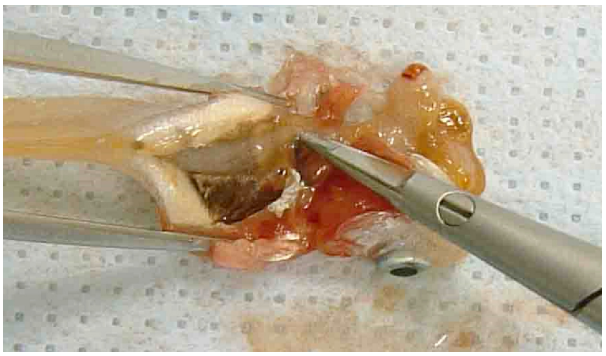
Τα έντερα τραβιούνται προς τα έξω με μαλακές κινήσεις με τη βοήθεια λαβίδων.



▼M6

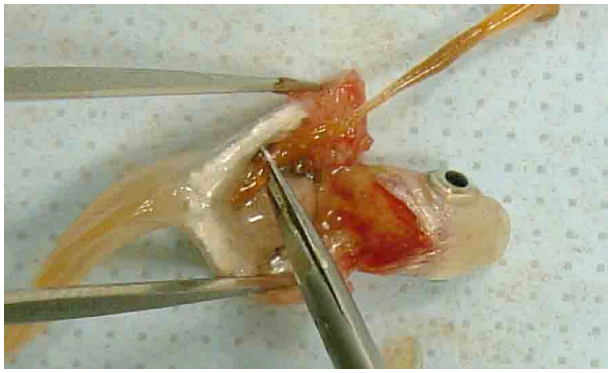
Εικόνα 6

Αμφότερα τα άκρα των εντέρων και τυχών μεσεντερικών προσφύσεων αποκόπτονται με ψαλίδι.



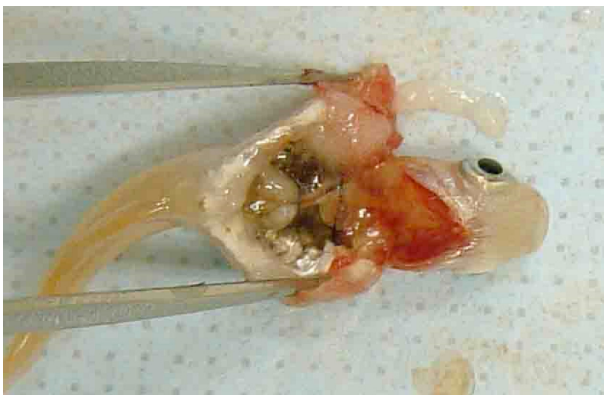
Εικόνα 7 (θηλυκό)

Η διαδικασία είναι πανομοιότυπη για τα θηλυκά.



Εικόνα 8

Η ολοκληρωμένη διαδικασία.



Διαδικασία 2Β: Ρυζόψαρο (Oryzias latipes), Προκατεργασία ήπατος για ανάλυση λεκιθογενίνης

Η φιάλη με το ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης από το κιτ ELISA αφήνεται να ψυχθεί με θρυμματισμένο πάγο (θερμοκρασία του διαλύματος: ≤ 4 °C). Αν χρησιμοποιείτε ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης από το σύστημα EnBio ELISA, αποψύξτε το διάλυμα σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια παγώστε τη φιάλη με θρυμματισμένο πάγο.

▼**M6**

Υπολογίστε τον όγκο του ρυθμιστικού διαλύματος ομογενοποίησης για το ήπαρ βάσει του βάρους του (προσθέστε 50 ml ρυθμιστικού διαλύματος ομογενοποίησης ανά mg βάρους του ήπατος για το ομογενοποιημένο δείγμα). Για παράδειγμα, εάν το βάρος του ήπατος είναι 4,5 mg, ο όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος ομογενοποίησης για το ήπαρ είναι 225 ml. Ετοιμάστε μία λίστα με τον όγκο ρυθμιστικού διαλύματος ομογενοποίησης για όλα τα ήπατα.

Προετοιμασία του ήπατος για την προκατεργασία

(1) Πάρτε τον μικροσωλήνα 1,5 ml που περιέχει το ήπαρ από την κατάψυξη ακριβώς πριν από την προκατεργασία.

(2) Η προκατεργασία του ήπατος των αρσενικών πρέπει να εκτελείται πριν από εκείνη των θηλυκών για την αποφυγή επιμόλυνσης με λεκιθογενίνη. Επιπροσθέτως, η προκατεργασία για τις υπό δοκιμή ομάδες θα πρέπει να διεξάγεται με την ακόλουθη σειρά: μάρτυρας, μάρτυρας με τον διαλύτη (κατά περίπτωση), χαμηλότερης συγκέντρωσης, μεσαίας συγκέντρωσης, υψηλότερης συγκέντρωσης και θετικός μάρτυρας.

(3) Ο αριθμός των μικροσωλήνων 1,5 ml που περιέχουν δείγματα ήπατος που παίρνετε από την κατάψυξη σε μια δεδομένη στιγμή δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τον αριθμό εκείνων που μπορούν να φυγοκεντρηθούν τη συγκεκριμένη στιγμή.

(4) Τακτοποιήστε του μικροσωλήνες 1,5 ml που περιέχουν τα δείγματα ήπατος σύμφωνα με τη σειρά του αριθμού δείγματος πάνω στη βάση πάγου (δεν χρειάζεται να αποψύξετε το ήπαρ).

Διαδικασία προκατεργασίας

1. Προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος ομογενοποίησης

(1) Ελέγξτε τον κατάλογο για τον όγκο του ρυθμιστικού διαλύματος ομογενοποίησης που πρέπει να χρησιμοποιήσετε για το εκάστοτε δείγμα ήπατος και προσαρμόστε το μικροσιφώνιο (εύρος όγκου: 100-1 000 μl) στον κατάλληλο όγκο. Επισυνάψτε μία καθαρή μύτη στο μικροσιφώνιο.

(2) Πάρτε το ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης από τη φιάλη και προσθέστε το ρυθμιστικό διάλυμα στον μικροσωλήνα 1,5 ml που περιέχει το ήπαρ.

(3) Προσθέστε το ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης σε όλους τους μικροσωλήνες 1.5 ml που περιέχουν ήπαρ, σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω. Δεν υπάρχει λόγος αλλαγής της μύτης του μικροσιφωνίου με καινούργια. Ωστόσο, εάν η μύτη έχει επιμολυνθεί ή υπάρχει υπόνοια ότι έχει επιμολυνθεί, η μύτη θα πρέπει να αλλαχτεί.

2. Ομογενοποίηση του ήπατος

(1) Συνδέστε έναν νέο ύπερο για ομογενοποίηση στον ομογενοποιητή του μικροσωλήνα.

(2) Εισάγετε τον ύπερο στον μικροσωλήνα 1,5 ml. Κρατήστε τον ομογενοποιητή του μικροσωλήνα για να πιέσετε το ήπαρ ανάμεσα στην επιφάνεια του ύπερου και το εσωτερικό τοίχωμα του μικροσωλήνα 1,5 ml.

(3) Θέστε τον ομογενοποιητή του μικροσωλήνα σε λειτουργία για 10 με 20 δευτερόλεπτα. Κατά τη διάρκεια της λειτουργίας, παγώστε τον μικροσωλήνα 1,5 ml με θρυμματισμένο πάγο.

(4) Σηκώστε τον ύπερο από τον μικροσωλήνα 1,5 ml και αφήστε το σε αδράνεια για περίπου 10 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια διενεργήστε οπτικό έλεγχο της κατάστασης του διαλύματος.

(5) Εάν παρατηρήσετε κομμάτια ήπατος στο διάλυμα, επαναλάβετε τις διαδικασίες (3) και (4) για να προετοιμάσετε ένα ικανοποιητικό ομογενοποιημένο δείγμα ήπατος.

▼**M6**

(6) Παγώστε το ομογενοποιημένο εναιώρημα ήπατος σε βάση πάγου μέχρι την φυγοκέντρηση.

(7) Αλλάζετε τον ύπερο με έναν νέο για κάθε ομογενοποιημένο δείγμα.

(8) Ομογενοποιήστε όλα τα ήπατα με ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω.

3. Φυγοκέντρηση του ομογενοποιημένου αιωρήματος ήπατος

(1) Επιβεβαιώστε τη θερμοκρασία του ψυχόμενου θαλάμου φυγοκέντρησης στους ≤ 5 °C.

(2) Τοποθετήστε τους μικροσωλήνες 1,5 ml που περιέχουν το ομογενοποιημένο εναιώρημα ήπατος στην ψυχόμενη φυγόκεντρο (προσαρμόστε τον ζυγό αν χρειάζεται).

(3) Υποβάλετε σε φυγοκέντρηση το ομογενοποιημένο εναιώρημα ήπατος σε 13 000 *g* για 10 λεπτά στους ≤ 5 °C. Ωστόσο, εάν τα υπερκείμενα υγρά έχουν διαχωριστεί καταλλήλως, η φυγόκεντρος δύναμη και ο χρόνος μπορούν να προσαρμοστούν αναλόγως.

(4) Μετά τη φυγοκέντρηση, ελέγξτε αν τα υπερκείμενα υγρά έχουν διαχωριστεί καταλλήλως (επιφάνεια: λιπίδια, ενδιάμεσο: υπερκείμενο υγρό, κάτω στρώση: ηπατικός ιστός). Αν ο διαχωρισμός δεν είναι ο κατάλληλος, υποβάλετε εκ νέου το αιώρημα σε φυγκοκέντρηση υπό τις ίδιες συνθήκες.

(5) Αφαιρέστε όλα τα δείγματα από την ψυχόμενη φυγόκεντρο και τοποθετήστε τα με σειρά στη βάση πάγου σύμφωνα με τον αριθμό δείγματος. Προσέξτε να μην αναδιαλυθεί κάθε διαχωρισμένη στρώση μετά τη φυγοκέντρηση.

4. Συλλογή του υπερκείμενου υγρού

(1) Τοποθετήστε τέσσερις μικροσωλήνες 0,5 ml για την αποθήκευση του υπερκείμενου υγρού στη βάση σωλήνων.

(2) Συλλέξτε 30 μl από κάθε υπερκείμενο υγρό (διαχωρισμένο σαν ενδιάμεση στρώση) με το μικροσιφώνιο και μεταφέρετέ το σε έναν μικροσωλήνα 0,5 ml. Προσέξτε να μην συλλέξετε λιπίδια από την επιφάνεια ή ηπατικό ιστό από την κάτω στρώση.

(3) Συλλέξτε το υπερκείμενο υγρό και μεταφέρετέ το σε άλλους δύο μικροσωλήνες 0,5 ml με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται παραπάνω.

(4) Συλλέξτε το υπόλοιπο υπερκείμενο υγρό με το μικροσιφώνιο (αν είναι εφικτό: ≥ 100 μl). Στη συνέχεια μεταφέρετε το υπερκείμενο υγρό στον εναπομείναντα μικροσωλήνα 0,5 ml. Προσέξτε να μην συλλέξετε λιπίδια από την επιφάνεια ή ηπατικό ιστό από την κάτω στρώση.

(5) Κλείστε το πώμα του μικροσωλήνα 0,5 ml και γράψτε τον όγκο του υπερκείμενου υγρού στην ετικέτα. Κατόπιν, παγώστε άμεσα τους μικροσωλήνες τοποθετώντας τους στη βάση πάγου.

(6) Αλλάζετε τη μύτη του μικροσιφωνίου με μία νέα για κάθε υπερκείμενο υγρό. Αν μια μεγάλη ποσότητα λιπιδίων κολλήσει στη μύτη, αλλάξτε την άμεσα για να αποτραπεί η επιμόλυνση του εκχυλίσματος ήπατος με λίπος.

(7) Μεταφέρετε όλο το φυγοκεντρημένο υπερκείμενο υγρό σε τέσσερις μικροσωλήνες 0,5 ml σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω.

▼M6

(8) Μετά τη μεταφορά του υπερκείμενου υγρού στους μικροσωλήνες 0,5 ml, τοποθετήστε τους όλους στη βάση σωλήνων με ετικέτα ταυτοποίησης, και μετά παγώστε τους άμεσα τοποθετώντας τους στην κατάψυξη. Αν οι συγκεντρώσεις VTG μετρηθούν αμέσως μετά την προκατεργασία, διατηρήστε έναν μικροσωλήνα 0,5 ml (που περιέχει 30 μl υπερκείμενου υγρού) σε ψύξη στη βάση σωλήνων και μεταφέρετέ τον στον σταθμό εργασίας όπου διεξάγεται η δοκιμή ELISA. Σε μια τέτοια περίπτωση, τοποθετήστε τους εναπομείναντες σωλήνες στη βάση σωλήνων και παγώστε τους στην κατάψυξη.

(9) Μετά τη συλλογή του υπερκείμενου υγρού, απορρίψτε το υπόλειμμα με ενδεδειγμένο τρόπο.

Αποθήκευση του δείγματος

Αποθηκεύστε τους μικροσωλήνες 0,5 ml που περιέχουν το υπερκείμενο υγρό του ομογενοποιημένου ήπατος στους ≤ – 70 °C έως ότου χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή ELISA.

Διαδικασία 3Α: Ρυζόψαρο, αιμοληψία από την ουραία φλέβα/αρτηρία

Αμέσως μετά την αναισθησία, ο ουραίος μίσχος αποκόπτεται εγκαρσίως, και αφαιρείται το αίμα από την ουραία αρτηρία/φλέβα με τριχοειδή ηπαρινισμένο σωλήνα αιματοκρίτη. Ο όγκος του αίματος κυμαίνεται μεταξύ 5 και 15 μl ανάλογα με το μέγεθος του ψαριού. Ίσος όγκος ρυθμιστικού διαλύματος απροτινίνης (6 μgml σε PBS) προστίθεται στον ημιτριχοειδή σωλήνα, και το πλάσμα διαχωρίζεται από το αίμα μέσω φυγοκέντρησης (5 λεπτά στα 600 g). Το πλάσμα συλλέγεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες και διατηρείται στους – 20 °C έως ότου διεξαχθεί ανάλυση για λεκιθογενίνη ή άλλες πρωτεΐνες που αποτελούν αντικείμενο ενδιαφέροντος.

Διαδικασία 3Β: Ζεβρόψαρο, αιμοληψία μέσω καρδιακής παρακέντησης

Για να αποφευχθεί η πήξη του αίματος και η αποδόμηση των πρωτεϊνών, τα δείγματα συλλέγονται μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με χλωριούχο νάτριο (phosphate-buffered saline, PBS) που περιέχει ηπαρίνη (1 000 μονάδες/ml) και τον αναστολέα πρωτεάσης απροτινίνη (2 TIU/ml). Ως συστατικά για το ρυθμιστικό διάλυμα συνιστώνται αμμωνιακό άλας της ηπαρίνης και λυοφιλιωμένη απροτινίνη. Για τη δειγματοληψία αίματος συνιστάται μια σύριγγα (1 ml) με προσαρμοσμένη λεπτή βελόνα (π.χ. Braun Omnikan-F). Η σύριγγα θα πρέπει να είναι προγεμισμένη με ρυθμιστικό διάλυμα (περίπου 100 μl) για να εκλουθούν πλήρως οι μικροί όγκοι αίματος από κάθε ψάρι. Τα δείγματα αίματος λαμβάνονται με παρακέντηση της καρδιάς. Αρχικά, τα ψάρια θα πρέπει να αναισθητοποιηθούν με MS-222 (100 mg/l). Το κατάλληλο επίπεδο αναισθησίας επιτρέπει στον χρήστη να διακρίνει τον καρδιακό παλμό του ζεβρόψαρου. Κατά την παρακέντηση της καρδιάς ασκήστε ελαφρά πίεση στο έμβολο της σύριγγας. Οι συλλέξιμοι όγκοι αίματος κυμαίνονται ανάμεσα σε 20 - 40 μικρόλιτρα. Μετά από την καρδιακή παρακέντηση, το μείγμα αίματος/ρυθμιστικού διαλύματος εισάγεται στον δοκιμαστικό σωλήνα. Το πλάσμα διαχωρίζεται από το αίμα μέσω φυγοκέντρησης (20 λεπτά· 5 000 g) και θα πρέπει να φυλάσσεται στους – 80 °C έως ότου χρειασθεί να χρησιμοποιηθεί για ανάλυση.

Διαδικασία 3Γ: Τυποποιημένες διαδικασίες λειτουργίας (ΤΔΛ): Ζεβρόψαρο, ομογενοποίηση κεφαλής & ουράς

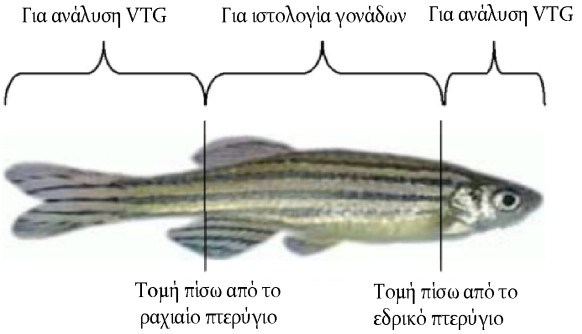
(1) Τα ψάρια υποβάλλονται σε αναισθησία και ευθανασία, σύμφωνα με την περιγραφή της δοκιμής.

(2) Το κεφάλι και η ουρά κόβονται από το ψάρι σύμφωνα με την εικόνα 1.

Σημαντική παρατήρηση: Όλα τα εργαλεία ανατομής και η πλάκα κοπής θα πρέπει να εκπλένονται και να καθαρίζονται κατάλληλα (π.χ. με 96 % αιθανόλη) ανάμεσα στους χειρισμούς του κάθε ψαριού για την αποφυγή «επιμόλυνσης λεκιθογενίνης» από τα θηλυκά άτομα ή τα αρσενικά άτομα στα οποία έχει πραγματοποιηθεί τεχνητή πρόκληση παραγωγής VTG προς τα αρσενικά άτομα στα οποία δεν έχει πραγματοποιηθεί τεχνητή πρόκληση παραγωγής VTG.

▼**M6**

Εικόνα 1



(3) Το βάρος του συνενωμένου κεφαλιού και της ουράς από το κάθε ψάρι μετράται με ακρίβεια χιλιοστόγραμμου.

(4) Αφού ζυγιστούν, τα τμήματα του ψαριού τοποθετούνται σε κατάλληλους σωλήνες (π.χ. σωλήνες Eppendorf των 1,5 ml) και καταψύχονται στους – 80 °C μέχρι να ομογενοποιηθούν ή ομογενοποιούνται απευθείας σε πάγο με δύο πλαστικούς υπέρους. (Μπορούν να χρησιμοποιούνται και άλλες μέθοδοι, εάν εκτελούνται σε πάγο και το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία μιας ομοιογενούς μάζας). Σημαντική παρατήρηση: Οι σωλήνες θα πρέπει να αριθμούνται κατάλληλα, ώστε το κεφάλι και η ουρά από το ψάρι να μπορούν να σχετιστούν με το αντίστοιχο τμήμα του σώματος που χρησιμοποιείται για την ιστολογική εξέταση των γονάδων.

(5) Όταν επιτευχθεί μια ομοιογενής μάζα, προστίθεται παγωμένο ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης (*) σε ποσότητα ίση με 4 φορές το βάρος του ιστού. Συνεχίστε τη διαδικασία με τους υπέρους μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές. Σημαντική σημείωση: Για κάθε ψάρι χρησιμοποιούνται καινούριοι ύπεροι.

(6) Τα δείγματα τοποθετούνται πάνω σε πάγο μέχρι τη φυγοκέντρησή τους σε 4 °C και 50 000 × g για 30 λεπτά.

(7) Με τη χρήση ενός σιφωνίου μεταφέρονται 20 μl υπερκείμενου υγρού σε τουλάχιστον δύο σωλήνες, με βύθιση της μύτης του σιφωνίου κάτω από το στρώμα λίπους στην επιφάνεια και με προσεκτική αναρρόφηση του υπερκείμενου υγρού χωρίς κλάσματα λίπους ή ιζήματος.

(8) Οι σωλήνες αποθηκεύονται στους – 80 °C μέχρι τη χρήση.

(*) **Ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης:**

— (50 mM Tris-HCl pH 7,4· μείγμα αναστολέων πρωτεάσης 1 % (Sigma)): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 μl μείγματος αναστολέων πρωτεάσης.

— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN) π.χ. από Bie & Berntsen, Δανία.

— Μείγμα αναστολέων πρωτεάσης: Από τη Sigma (για ιστό θηλαστικών) Κωδικός προϊόντος P 8340.

— *Σημείωση:* Το ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ημέρα παρασκευής του. Κατά τη διάρκεια της χρήσης να τοποθετείται πάνω σε πάγο.

▼**M6**

Προσάρτημα 7

Δείγματά εμπλουτισμού λεκιθογενινησ και πρότυπο αναφοράς μεταξύ διαφορετικών δοκίμων (inter-assay reference standard)

Για κάθε ημέρα που εκτελούνται δοκιμές λεκιθογενίνης, αναλύεται ένα δείγμα εμπλουτισμού που καταρτίζεται με χρήση ενός προτύπου αναφοράς μεταξύ διαφορετικών δοκιμών. Η λεκιθογενίνη που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία ενός προτύπου αναφοράς μεταξύ διαφορετικών δοκιμών θα προέρχεται από διαφορετική παρτίδα από εκείνη που χρησιμοποιείται για την προετοιμασία των προτύπων βαθμονόμησης για τη δοκιμή που εκτελείται.

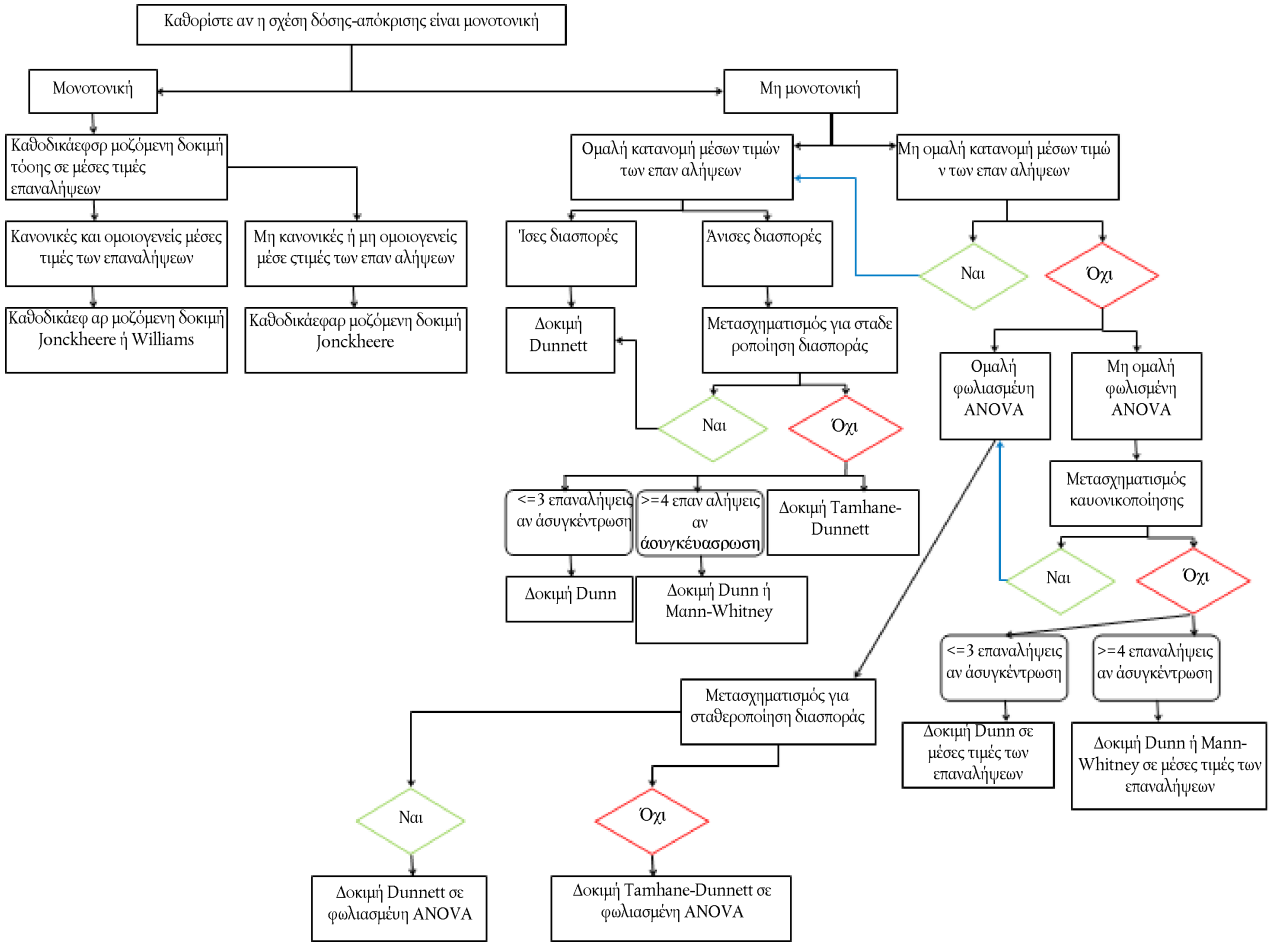
Το δείγμα εμπλουτισμού θα δημιουργηθεί με την προσθήκη γνωστής ποσότητας του προτύπου που χρησιμοποιείται στις δοκιμές σε δείγμα πλάσματος αρσενικού μάρτυρα. Το δείγμα θα εμπλουτιστεί ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση λεκιθογενίνης μεταξύ 10 και 100 φορές παραπάνω από την αναμενόμενη συγκέντρωση λεκιθογενίνης του αρσενικού μάρτυρα. Το δείγμα πλάσματος του αρσενικού μάρτυρα που εμπλουτίζεται μπορεί να προέρχεται από ένα μεμονωμένο ψάρι ή μπορεί να είναι σύνθετο, προερχόμενο από περισσότερα ψάρια.

Ένα μερικό δείγμα του μη εμπλουτισμένου πλάσματος αρσενικού μάρτυρα θα αναλυθεί σε δύο τουλάχιστον διπλές πλάκες βοθρίων. Το εμπλουτισμένο δείγμα θα αναλυθεί και αυτό σε δύο τουλάχιστον διπλές πλάκες βοθρίων. Η μέση ποσότητα λεκιθογενίνης στα δύο μη εμπλουτισμένα δείγματα πλάσματος αρσενικών μαρτύρων θα προστεθεί στην υπολογιζόμενη ποσότητα λεκιθογενίνης που προστίθεται στα εμπλουτισμένα δείγματα για τον καθορισμό της αναμενόμενης συγκέντρωσης. Ο λόγος της εν λόγω αναμενόμενης συγκέντρωσης προς τη μετρούμενη συγκέντρωση θα πρέπει να αναφέρεται μαζί με τα αποτελέσματα από κάθε σύνολο δοκιμών που διενεργούνται τη συγκεκριμένη ημέρα.

▼M6

Προσάρτημα 8

Διάγραμμα λήψης αποφάσεων για τη στατιστική ανάλυσή



▼M6

Γ.38. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΜΕΤΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΑΜΦΙΒΙΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 231 του ΟΟΣΑ (2009). Η ανάγκη ανάπτυξης και επικύρωσης μιας δοκιμασίας για την ανίχνευση χημικών ουσιών που είναι δραστικές στο θυρεοειδικό σύστημα των σπονδυλωτών προέκυψε από ανησυχίες ότι τα περιβαλλοντικά επίπεδα χημικών ουσιών μπορεί να προκαλέσουν δυσμενείς επιδράσεις τόσο στον άνθρωπο όσο και στη χλωροπανίδα. Το 1998, ο ΟΟΣΑ ανέλαβε μια δραστηριότητα υψηλής προτεραιότητας για την αναθεώρηση των υφιστάμενων κατευθυντήριων γραμμών και την εκπόνηση νέων σχετικά με τη διαλογή και τις δοκιμές δυνητικών ενδοκρινικών διαταρακτών. Ένα στοιχείο της δραστηριότητας ήταν η εκπόνηση μιας κατευθυντήριας γραμμής για τη διαλογή χημικών ουσιών που είναι δραστικές στο θυρεοειδικό σύστημα των σπονδυλωτών. Προτάθηκε μια βελτίωση της μελέτης τοξικότητας από του στόματος επαναλαμβανόμενης δόσης 28 ημερών σε τρωκτικά (Κεφάλαιο Β.7 του παρόντος προσαρτήματος) και η δοκιμασία μεταμόρφωσης αμφιβίων (AMA). Η βελτιωμένη μέθοδος δοκιμών Β.7 υποβλήθηκε σε επικύρωση και έχει εκδοθεί μια αναθεωρημένη μέθοδος δοκιμών. Η δοκιμασία μεταμόρφωσης αμφιβίων (AMA) υποβλήθηκε σε ένα εκτενές πρόγραμμα επικύρωσης που περιλάμβανε ενδοεργαστηριακές και διεργαστηριακές μελέτες, οι οποίες αποδεικνύουν τη συνάφεια και την αξιοπιστία της δοκιμασίας (1, 2). Στη συνέχεια, η επικύρωση της δοκιμασίας αξιολογήθηκε από μια ομάδα ανεξάρτητων εμπειρογνωμόνων (3). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι το αποτέλεσμα της εμπειρίας που αποκτήθηκε από τις μελέτες επικύρωσης για την ανίχνευση χημικών ουσιών που επιδρούν στον θυρεοειδή, καθώς και από εργασίες που διεξήχθησαν σε άλλα κέντρα χωρών-μελών του ΟΟΣΑ.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

2. Η δοκιμασία μεταμόρφωσης αμφιβίων (AMA) είναι μια δοκιμασία διαλογής που έχει στόχο να προσδιορίσει εμπειρικά χημικές ουσίες οι οποίες ενδέχεται να παρέμβουν στη φυσιολογική λειτουργία του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-θυρεοειδούς (ΥΥΘ). Η δοκιμασία AMA αντιπροσωπεύει ένα γενικευμένο μοντέλο σπονδυλωτών στον βαθμό που βασίζεται σε διατηρημένες δομές και λειτουργίες του άξονα ΥΥΘ. Πρόκειται για μια σημαντική δοκιμασία, επειδή η μεταμόρφωση των αμφιβίων προσφέρει μια καλά μελετημένη, εξαρτώμενη από τον θυρεοειδή διαδικασία που ανταποκρίνεται σε χημικές ουσίες οι οποίες είναι δραστικές εντός του άξονα ΥΥΘ. Επίσης, είναι η μοναδική υφιστάμενη δοκιμασία που ανιχνεύει τη λειτουργία του θυρεοειδούς σε ένα ζώο το οποίο βρίσκεται σε φάση μορφολογικής ανάπτυξης.

3. Ο γενικός πειραματικός σχεδιασμός περιλαμβάνει την έκθεση γυρίνων σταδίου 51 του είδους *Xenopus laevis* σε τουλάχιστον τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις μιας υπο δοκιμή χημικής ουσίας και ενός νερού αραίωσης-μάρτυρα για 21 ημέρες. Χρησιμοποιούνται τέσσερις επαναλήψεις για κάθε αγωγή της δοκιμής. Η πυκνότητα των προνυμφών κατά την έναρξη της δοκιμής είναι 20 γυρίνοι ανά δεξαμενή δοκιμής για όλες τις ομάδες αγωγής. Τα τελικά σημεία βάσει παρατήρησης είναι το μήκος των οπίσθιων άκρων, το μήκος ρύγχους-κλοάκης (SVL), το στάδιο ανάπτυξης, το υγρό βάρος, η ιστολογική εξέταση του θυρεοειδούς και οι καθημερινές παρατηρήσεις θνησιμότητας.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Είδος δοκιμής

4. Το είδος *Xenopus laevis* καλλιεργείται συστηματικά σε εργαστήρια παγκοσμίως και η απόκτησή του είναι εύκολη μέσω εμπορικών προμηθευτών. Σε αυτό το είδος, μπορεί εύκολα να πραγματοποιηθεί πρόκληση της αναπαραγωγής καθ' όλη τη διάρκεια του έτους με ενέσεις ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG) και οι προκύπτουσες προνύμφες μπορούν να εκτρέφονται συστηματικά, σε μεγάλους αριθμούς, μέχρι τα επιλεγμένα στάδια ανάπτυξης, ώστε να είναι εφικτή η χρήση πρωτοκόλλων δοκιμής

▼M6

ειδικά σχεδιασμένων για συγκεκριμένα στάδια. Οι προνύμφες που χρησιμοποιούνται σε αυτήν τη δοκιμασία προτιμάται να προέρχονται από ενήλικα άτομα εσωτερικής καλλιέργειας. Εναλλακτικά, μπορούν να αποστέλλονται αυγά ή έμβρυα στο εργαστήριο όπου πραγματοποιείται η δοκιμή και, στη συνέχεια, να εγκλιματίζονται, ωστόσο αυτή δεν είναι η προτιμώμενη διαδικασία. Η αποστολή στο στάδιο της προνύμφης για χρήση στη δοκιμή δεν είναι αποδεκτή.

Εξοπλισμός και προμήθειες

5. Ο εξοπλισμός και οι προμήθειες που απαιτούνται για τη διεξαγωγή αυτής της δοκιμασίας είναι τα ακόλουθα:

α) Σύστημα έκθεσης (βλ. περιγραφή κατωτέρω),

β) Ενυδρεία από γυαλί ή ανοξείδωτο χάλυβα (βλ. περιγραφή κατωτέρω),

γ) Δεξαμενές αναπαραγωγής,

δ) Συσκευή ελέγχου θερμοκρασίας [π.χ. θερμαντήρες ή ψύκτες (με δυνατότητα ρύθμισης στους 22° ± 1 °C)],

ε) Θερμόμετρο,

στ) Διοφθάλμιο στερεοσκοπικό μικροσκόπιο,

ζ) Ψηφιακή φωτογραφική μηχανή με ανάλυση τουλάχιστον 4 megapixel και λειτουργία micro,

η) Λογισμικό ψηφιοποίησης εικόνων,

θ) Τρυβλίο Petri (π.χ. 100 × 15 mm) ή διαφανής πλαστικός θάλαμος συγκρίσιμου μεγέθους,

ι) Αναλυτικός ζυγός, ακριβείας 3 δεκαδικών ψηφίων (mg),

ια) Μετρητής διαλυμένου οξυγόνου,

ιβ) Πεχάμετρο,

ιγ) Μετρητής έντασης φωτός, ικανός να πραγματοποιεί μετρήσεις σε μονάδες lux,

ιδ) Διάφορα γυάλινα είδη και εργαλεία εργαστηρίου,

ιε) Ρυθμιζόμενα σιφώνια (10 έως 5 000 μl) ή ποικιλία σιφωνίων ισοδύναμων μεγεθών,

ιστ) Υπό δοκιμή χημική ουσία σε επαρκείς ποσότητες για τη διεξαγωγή της μελέτης, κατά προτίμηση της ίδιας παρτίδας,

ιζ) Αναλυτικά όργανα κατάλληλα για τη χημική ουσία που ελέγχεται ή σύμβαση παροχής υπηρεσιών ανάλυσης.

Δυνατότητα δοκιμής χημικών ουσιών

6. Η δοκιμασία ΑΜΑ βασίζεται σε ένα πρωτόκολλο υδατικής έκθεσης όπου η υπό δοκιμή χημική ουσία εισάγεται στους θαλάμους δοκιμής μέσω ενός συστήματος συνεχούς ροής νερού. Οι μέθοδοι συνεχούς ροής νερού, ωστόσο, θέτουν περιορισμούς όσον αφορά τον τύπο των χημικών ουσιών που μπορούν να ελεγχθούν, οι οποίοι καθορίζονται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της χημικής ουσίας. Επομένως, πριν από τη χρήση αυτού του πρωτοκόλλου, πρέπει να λαμβάνονται βασικές πληροφορίες για τη χημική ουσία που είναι σχετικές με τον καθορισμό της δυνατότητας δοκιμής. Επίσης, θα πρέπει να συμβουλεύεστε το έγγραφο OECD Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures

▼M6

(Έγγραφο κατευθυντήριας γραμμής ΟΟΣΑ σχετικά με τις δοκιμές υδατικής τοξικότητας δύσκολων ουσιών και μιγμάτων) (4). Χαρακτηριστικά τα οποία υποδεικνύουν ότι ενδεχομένως να είναι δύσκολη η δοκιμή της χημικής ουσίας σε υδατικά συστήματα είναι, μεταξύ άλλων, τα εξής: υψηλοί συντελεστές κατανομής οκτανόλης/νερού (log K_{ow}), υψηλή πτητικότητα, ευαισθησία στην υδρόλυση και ευαισθησία στη φωτόλυση κάτω από εργαστηριακές συνθήκες φωτισμού περιβάλλοντος. Ενδεχομένως να υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που σχετίζονται με τον καθορισμό της δυνατότητας δοκιμής, οι οποίοι θα πρέπει να προσδιορίζονται κατά περίπτωση. Εάν δεν είναι δυνατή η επιτυχής δοκιμή για μια χημική ουσία με τη χρήση συστήματος δοκιμής συνεχούς ροής νερού, μπορεί να χρησιμοποιείται σύστημα στατικής ανανέωσης. Εάν κανένα από τα δύο συστήματα δεν έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί για την υπό δοκιμή χημική ουσία, η ουσία αυτή, εξ ορισμού, δεν πρέπει να υποβάλλεται σε δοκιμή με χρήση αυτού του πρωτοκόλλου.

Σύστημα έκθεσης

7. Προτιμάται σύστημα αραιωτή συνεχούς ροής νερού, όπου αυτό είναι δυνατόν, αντί ενός συστήματος στατικής ανανέωσης. Εάν οι φυσικές ή/και χημικές ιδιότητες οποιωνδήποτε υπό δοκιμή χημικών ουσιών δεν ενδείκνυνται για το σύστημα αραιωτή συνεχούς ροής νερού, μπορεί να χρησιμοποιείται εναλλακτικό σύστημα έκθεσης (π.χ., στατικής ανανέωσης). Τα εξαρτήματα του συστήματος θα πρέπει να περιλαμβάνουν εξαρτήματα που έρχονται σε επαφή με νερό κατασκευασμένα από γυαλί, ανοξείδωτο χάλυβα ή/και πολυτετραφθοροαιθυλένιο. Ωστόσο, μπορούν να χρησιμοποιούνται κατάλληλα πλαστικά εάν δεν θέτουν σε κίνδυνο τη διεξαγωγή της μελέτης. Οι δεξαμενές έκθεσης θα πρέπει να είναι ενυδρεία από γυαλί ή ανοξείδωτο χάλυβα, εξοπλισμένα με κατακόρυφους αγωγούς που παρέχουν, κατά προσέγγιση, όγκο δεξαμενής από 4,0 έως 10,0 l και ελάχιστο βάθος νερού από 10 έως 15 cm. Το σύστημα θα πρέπει να είναι σε θέση να υποστηρίζει όλες τις συγκεντρώσεις έκθεσης και έναν μάρτυρα, με τέσσερις επαναλήψεις ανά αγωγή. Η ταχύτητα ροής σε κάθε δεξαμενή θα πρέπει να είναι σταθερή ώστε να διατηρούνται οι βιολογικές συνθήκες και η χημική έκθεση (π.χ. 25 ml/λεπτό). Οι δεξαμενές αγωγής θα πρέπει να ορίζονται τυχαία σε μια θέση στο σύστημα έκθεσης, με σκοπό τη μείωση των πιθανών επιδράσεων που οφείλονται στη θέση, συμπεριλαμβανομένων των ελαφρών διακυμάνσεων στη θερμοκρασία, στην ένταση του φωτός κ.λπ. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται λαμπτήρες φθορισμού για την παροχή μιας φωτοπεριόδου 12 ωρών φωτός: 12 ώρες σκοταδιού, με ένταση που κυμαίνεται από 600 έως 2 000 lux (lumen/m^2) στην επιφάνεια του νερού. Η θερμοκρασία του νερού θα πρέπει να διατηρείται στους 22° ± 1 °C, το pH να διατηρείται σε τιμή από 6,5 έως 8,5 και η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου (DO) > 3,5 mg/l (> 40 % της τιμής κορεσμού με αέρα) σε κάθε δεξαμενή δοκιμής. Η θερμοκρασία του νερού, το pH και το διαλυμένο οξυγόνο θα πρέπει να μετρώνται τουλάχιστον σε εβδομαδιαία βάση. Η θερμοκρασία θα πρέπει, κατά προτίμηση, να μετράται συνεχώς σε τουλάχιστον ένα δοχείο δοκιμής. Στο προσάρτημα 1 περιγράφονται οι πειραματικές συνθήκες κάτω από τις οποίες θα πρέπει να εκτελείται το πρωτόκολλο. Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη ρύθμιση συστημάτων έκθεσης συνεχούς ροής νερού ή/και συστημάτων στατικής ανανέωσης, ανατρέξτε στο έγγραφο ASTM Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians (Πρότυπος οδηγός ASTM για τη διεξαγωγή δοκιμών οξείας τοξικότητας σε υλικά δοκιμών με ψάρια, μακροασπόνδυλα και αμφίβια) (5) και σε γενικές δοκιμές υδατικής τοξικότητας.

Ποιότητα του νερού

8. Μπορεί να χρησιμοποιείται κάθε νερό που διατίθεται τοπικά (π.χ. νερό πηγής ή νερό βρύσης φιλτραρισμένο με ενεργό άνθρακα) και επιτρέπει τη φυσιολογική αύξηση και ανάπτυξη των γυρίνων του είδους *X. laevis*. Επειδή η ποιότητα του τοπικού νερού μπορεί να διαφέρει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων περιοχών, θα πρέπει να διεξάγεται ανάλυση της ποιότητας του νερού, ιδιαίτερα εάν δεν υπάρχουν διαθέσιμα ιστορικά δεδομένα σχετικά με τη χρησιμότητα του νερού για την εκτροφή του *Xenopus*. Θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή ώστε το νερό να είναι απαλλαγμένο από χαλκό, χλώριο και χλωραμίνες, τα οποία είναι όλα τοξικά για τους βατράχους και τους γυρίνους. Συνιστάται επίσης η ανάλυση του νερού ως προς τα βασικά επίπεδα φθορίου, υπερχλωρικών ενώσεων και χλωρικών ενώσεων (υποπροϊόντα της απολύμανσης του πόσιμου

▼M6

νερού), καθώς όλα αυτά τα ανιόντα αποτελούν υποστρώματα του μεταφορέα ιωδίου του θυρεοειδούς αδένα και αυξημένα επίπεδα καθενός από αυτά τα ανιόντα ενδέχεται να ανατρέψουν την έκβαση της μελέτης. Η ανάλυση θα πρέπει να διεξάγεται πριν από την έναρξη της δοκιμής και το νερό δοκιμής θα πρέπει κανονικά να είναι απαλλαγμένο από αυτά τα ανιόντα.

Συγκέντρωση ιωδιδίου στο νερό δοκιμής

9. Για να μπορεί ο θυρεοειδής αδένας να συνθέτει TH, πρέπει να υπάρχει διαθέσιμη επαρκής ποσότητα ιωδιδίου για τις προνύμφες μέσω υδατικών και διατροφικών πόρων, σε συνδυασμό. Επί του παρόντος, δεν υπάρχουν κατευθυντήριες γραμμές που έχουν προκύψει εμπειρικά σχετικά με τις ελάχιστες συγκεντρώσεις ιωδιδίου. Ωστόσο, η διαθεσιμότητα του ιωδιδίου ενδέχεται να επηρεάσει την ανταπόκριση του θυρεοειδικού συστήματος σε παράγοντες που επιδρούν στον θυρεοειδή και είναι γνωστό ότι διαμορφώνει τη βασική λειτουργία του θυρεοειδούς αδένα, μια πτυχή στην οποία πρέπει να δίνεται προσοχή κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της ιστοπαθολογικής εξέτασης του θυρεοειδούς. Επομένως, θα πρέπει να αναφέρονται οι μετρηθείσες συγκεντρώσεις του υδατικού ιωδιδίου από το νερό δοκιμής. Με βάση τα διαθέσιμα δεδομένα από τις μελέτες επικύρωσης, έχει αποδειχθεί ότι το πρωτόκολλο αποδίδει ικανοποιητικά όταν οι συγκεντρώσεις ιωδιδίου (I^-) στο νερό δοκιμής κυμαίνονται μεταξύ 0,5 και 10 μg/l. Ιδανικά, η ελάχιστη συγκέντρωση ιωδιδίου στο νερό δοκιμής θα πρέπει να είναι 0,5 μg/l. Σε περίπτωση ανασύστασης του νερού δοκιμής από απιονισμένο νερό, θα πρέπει να προστίθεται ιώδιο σε ελάχιστη συγκέντρωση 0,5 μg/l. Κάθε πρόσθετη συμπλήρωση του νερού δοκιμής με ιώδιο ή άλλα άλατα θα πρέπει να επισημαίνεται στην έκθεση.

Διατήρηση των ζώων

Φροντίδα και αναπαραγωγή ενήλικων ατόμων

10. Η φροντίδα και η αναπαραγωγή των ενήλικων ατόμων πραγματοποιείται σύμφωνα με τυποποιημένες κατευθυντήριες γραμμές και, για περισσότερες λεπτομέρειες, συστήνεται στον αναγνώστη να ανατρέξει στον πρότυπο οδηγό για τη διεξαγωγή της δοκιμασίας τερατογένεσης σε έμβρυο βατράχου (FETAX) (6). Οι σχετικές τυποποιημένες κατευθυντήριες γραμμές παρέχουν ένα παράδειγμα κατάλληλων μεθόδων φροντίδας και αναπαραγωγής, αλλά δεν απαιτείται αυστηρή τήρησή τους. Για την πρόκληση αναπαραγωγής, χορηγείται ένεση ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG) σε ζεύγη (3-5) θηλυκών και αρσενικών ενήλικων ατόμων. Χορηγούνται με ένεση περίπου 800 IU-1 000 IU και 600 IU-800 IU hCG διαλυμένης σε αλατώδες διάλυμα 0,6-0,9 %, στα θηλυκά και αρσενικά άτομα, αντίστοιχα. Τα ζεύγη αναπαραγωγής διατηρούνται σε μεγάλες δεξαμενές ανενόχλητα και κάτω από στατικές συνθήκες, για την προώθηση του ζευγαρώματος. Στον πυθμένα κάθε δεξαμενής αναπαραγωγής θα πρέπει να υπάρχει ένας ψευδο-πυθμένας από πλέγμα ανοξείδωτου χάλυβα ή πλαστικού που να επιτρέπει στις μάζες των αυγών να αποτίθενται στον πυθμένα της δεξαμενής. Τα βατράχια στα οποία η ένεση χορηγείται αργά το απόγευμα, συνήθως εναποθέτουν τα περισσότερα αυγά τους μέχρι τη μέση του πρωινού της επόμενης ημέρας. Μετά την απελευθέρωση και γονιμοποίηση επαρκούς ποσότητας αυγών, τα ενήλικα άτομα θα πρέπει να απομακρύνονται από τις δεξαμενές αναπαραγωγής.

Φροντίδα και επιλογή προνυμφών

11. Μετά την απομάκρυνση των ενήλικων ατόμων από τις δεξαμενές αναπαραγωγής, τα αυγά συλλέγονται και αξιολογούνται ως προς τη βιωσιμότητα με χρήση μιας αντιπροσωπευτικής επιμέρους ομάδας εμβρύων από όλες τις δεξαμενές αναπαραγωγής. Θα πρέπει να διατηρούνται οι καλύτερες ωοτοκίες (για την αξιολόγηση της ποιότητας των ωοτοκιών συνιστώνται 2-3) με βάση τη βιωσιμότητα των εμβρύων και την παρουσία επαρκούς αριθμού (τουλάχιστον 1 500) εμβρύων. Όλοι οι οργανισμοί που χρησιμοποιούνται σε μια μελέτη θα πρέπει να προέρχονται από μία διαδικασία ωοτοκίας (δηλ. δεν θα πρέπει να αναμιγνύονται μεταξύ τους οι ωοτοκίες). Τα έμβρυα μεταφέρονται σε ένα μεγάλο επίπεδο πιάτο ή δίσκο και όλα τα εμφανώς νεκρά ή μη φυσιολογικά αυγά (βλ. ορισμό στο (5)) απομακρύνονται με χρήση σιφωνίου ή σταγονόμετρου. Τα υγιή έμβρυα από κάθε

▼M6

μία από τις τρεις ωοτοκίες μεταφέρονται σε τρεις ξεχωριστές δεξαμενές εκκόλαψης. Τέσσερις ημέρες μετά την τοποθέτηση στις δεξαμενές εκκόλαψης, επιλέγεται η καλύτερη ωοτοκία, με βάση τη βιωσιμότητα και την επιτυχή εκκόλαψη, και οι προνύμφες μεταφέρονται σε κατάλληλο αριθμό δεξαμενών εκτροφής στους 22° ±1 °C. Επίσης, μερικές επιπλέον προνύμφες μεταφέρονται σε πρόσθετες δεξαμενές για να χρησιμοποιηθούν ως αντικατάσταση σε περίπτωση που σημειωθεί θνησιμότητα στις δεξαμενές εκτροφής κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας. Με τη διαδικασία αυτή διατηρείται σταθερή η πυκνότητα των οργανισμών και επομένως μειώνεται η αναπτυξιακή απόκλιση εντός της κοόρτης μίας διαδικασίας ωοτοκίας. Όλες οι δεξαμενές εκτροφής θα πρέπει να καθαρίζονται καθημερινά με σιφωνισμό. Ως προφύλαξη, προτιμώνται τα γάντια βινυλίου ή νιτριλίου από τα γάντια λάτεξ. Τυχόν θανόντα έμβρυα θα πρέπει να απομακρύνονται καθημερινά και να προστίθενται προνύμφες αντικατάστασης για τη διατήρηση της πυκνότητας των οργανισμών κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας. Η σίτιση θα πρέπει να διεξάγεται τουλάχιστον δύο φορές την ημέρα.

12. Κατά τη διάρκεια της φάσης πριν από την έκθεση, οι γυρίνοι εγκλιματίζονται στις συνθήκες που επικρατούν στη φάση της πραγματικής έκθεσης, συμπεριλαμβανομένων του είδους τροφής, της θερμοκρασίας, του κύκλου φωτός/σκοταδιού και του μέσου καλλιέργειας. Επομένως, συνιστάται να χρησιμοποιείται το ίδιο νερό καλλιέργειας/αραίωσης κατά τη φάση πριν από την έκθεση και τη φάση έκθεσης. Εάν χρησιμοποιείται στατικό σύστημα καλλιέργειας για τη διατήρηση των γυρίνων κατά τη φάση πριν από την έκθεση, το μέσο καλλιέργειας θα πρέπει να αντικαθίσταται πλήρως τουλάχιστον δύο φορές την εβδομάδα. Θα πρέπει να αποφεύγεται ο συνωστισμός, ο οποίος προκύπτει από υψηλές πυκνότητες προνυμφών κατά την περίοδο πριν από την έκθεση, καθώς μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την ανάπτυξη των γυρίνων κατά την επακόλουθη φάση της δοκιμής. Επομένως, η πυκνότητα εκτροφής δεν θα πρέπει να υπερβαίνει κατά προσέγγιση τους τέσσερις γυρίνους/λίτρο μέσου καλλιέργειας (σύστημα στατικής έκθεσης) ή τους 10 γυρίνους/λίτρο μέσου καλλιέργειας (με ταχύτητα ροής π.χ. 50 ml/λεπτό στο σύστημα πριν από την έκθεση ή στο σύστημα καλλιέργειας). Υπό τις συνθήκες αυτές, οι γυρίνοι θα πρέπει να αναπτύσσονται από τα στάδια 45/46 έως το στάδιο 51 εντός δώδεκα ημερών. Θα πρέπει να ελέγχεται καθημερινά το στάδιο ανάπτυξης αντιπροσωπευτικών γυρίνων από αυτόν τον αρχικό πληθυσμό, προκειμένου να εκτιμάται το κατάλληλο χρονικό σημείο για την έναρξη της έκθεσης. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να ελαχιστοποιείται η πρόκληση πίεσης και τραυματισμών στους γυρίνους, ιδιαίτερα κατά τη μετακίνηση, τον καθαρισμό των ενυδρείων και τον χειρισμό των προνυμφών. Θα πρέπει να αποφεύγονται οι συνθήκες/δραστηριότητες που προκαλούν πίεση, όπως ο δυνατός ή/και αδιάκοπος θόρυβος, τα ελαφριά χτυπήματα στα ενυδρεία, οι κραδασμοί μέσα στα ενυδρεία, η υπερβολική δραστηριότητα στον χώρο του εργαστηρίου και οι ταχείες αλλαγές των περιβαλλοντικών μέσων (διαθεσιμότητα φωτός, θερμοκρασία, pH, διαλυμένο οξυγόνο, ταχύτητες ροής νερού κ.λπ.). Εάν οι γυρίνοι δεν αναπτυχθούν έως το στάδιο 51 εντός 17 ημερών από τη γονιμοποίηση, πιθανό αίτιο θα πρέπει να θεωρηθεί η πρόκληση υπερβολικής πίεσης.

Καλλιέργεια και σίτιση προνυμφών

13. Οι γυρίνοι σιτίζονται, για παράδειγμα, με την εμπορικά διαθέσιμη τροφή για γυρίνους που χρησιμοποιείται στις μελέτες επικύρωσης (βλ. επίσης προσάρτημα 1) καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου πριν από την έκθεση (μετά το στάδιο 45/46 των Nieuwkoop και Faber (NF) (8)) και καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου δοκιμής των 21 ημερών, ή με άλλη διατροφή με την οποία η απόδοση της δοκιμασίας μεταμόρφωσης αμφιβίων έχει αποδειχθεί ισοδύναμη. Το καθεστώς σίτισης κατά τη διάρκεια της περιόδου πριν από την έκθεση θα πρέπει να ρυθμίζεται προσεκτικά ώστε να ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις των υπό ανάπτυξη γυρίνων. Αυτό σημαίνει ότι θα πρέπει να παρέχονται μικρές ποσότητες τροφής στους νεοεκκολαφθέντες γυρίνους αρκετές φορές την ημέρα (τουλάχιστον δύο φόρες). Η υπερβολική παροχή τροφής θα πρέπει να αποφεύγεται, ώστε *i)* να διατηρείται η ποιότητα του νερού και *ii)* να αποτρέπεται η απόφραξη των βραγχιακών ακανθών που λειτουργούν ως φίλτρα με σωματίδια και κατάλοιπα τροφής. Σχετικά με την τροφή των γυρίνων που χρησιμοποιείται στις μελέτες επικύρωσης, τα σιτηρέσια θα πρέπει να αυξάνονται παράλληλα με την ανάπτυξη των γυρίνων σε περίπου 30 mg/ζώο/ημέρα λίγο πριν από την

▼M6

έναρξη της δοκιμής. Στις μελέτες επικύρωσης έχει αποδειχθεί ότι αυτή η εμπορικά διαθέσιμη τροφή υποστηρίζει τη σωστή αύξηση και ανάπτυξη των γυρίνων του *X. laevis*, βρίσκεται σε μορφή λεπτών σωματιδίων που παραμένουν σε κατάσταση εναιωρήματος στη στήλη ύδατος για μεγάλο χρονικό διάστημα και υπόκειται σε έκπλυση με τη ροή του νερού. Επομένως, η συνολική ημερήσια ποσότητα τροφής θα πρέπει να διαιρείται σε μικρότερες μερίδες και να παρέχεται ως σίτιση τουλάχιστον δύο φορές την ημέρα. Το καθεστώς σίτισης για αυτήν την τροφή περιγράφεται στον πίνακα 1. Οι ρυθμοί σίτισης θα πρέπει να καταγράφονται. Η τροφή μπορεί να παρέχεται ως ξηρά τροφή ή ως διάλυμα παρακαταθήκης που προετοιμάζεται σε νερό αραίωσης. Το εν λόγω διάλυμα παρακαταθήκης θα πρέπει να προετοιμάζεται κάθε δεύτερη ημέρα και να αποθηκεύεται στους 4 °C όταν δεν χρησιμοποιείται.

Πίνακας 1.

Καθεστώς σίτισης με εμπορικά διαθέσιμη τροφή γυρίνων που χρησιμοποιείται στις μελέτες επικύρωσης για τους γυρίνους του *X. laevis* κατά τη διάρκεια του έμβιου μέρους της δοκιμασίας ΑΜΑ σε συνθήκες συνεχούς ροής νερού

Ημέρα μελέτης	Σιτηρέσιο (mg τροφής/ζώο/ημέρα)
0-4	30
5-7	40
8-10	50
11-14	70
15-21	80

Αναλυτική χημεία

14. Πριν από τη διεξαγωγή μιας μελέτης, θα πρέπει να αξιολογείται η σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας με τη χρήση υφιστάμενων πληροφοριών σχετικά με τη διαλυτότητα, την αποικοδομησιμότητα και την πτητικότητά της. Θα πρέπει να λαμβάνονται δείγματα διαλυμάτων δοκιμής από κάθε δεξαμενή επανάληψης σε κάθε συγκέντρωση για χημική ανάλυση κατά την έναρξη της δοκιμής (ημέρα 0) και κάθε εβδομάδα κατά τη διάρκεια της δοκιμής, για τουλάχιστον τέσσερα δείγματα. Συνιστάται επίσης να αναλύεται κάθε συγκέντρωση δοκιμής κατά την προετοιμασία του συστήματος, πριν από την έναρξη της δοκιμής, για να επαληθεύεται η απόδοση του συστήματος. Επιπλέον, συνιστάται να αναλύονται τα διαλύματα παρακαταθήκης όταν αλλάζονται, ειδικά εάν ο όγκος του διαλύματος παρακαταθήκης δεν παρέχει επαρκείς ποσότητες της χημικής ουσίας ώστε να καλύπτεται ολόκληρη η διάρκεια των περιόδων τακτικής δειγματοληψίας. Στην περίπτωση χημικών ουσιών που δεν είναι δυνατό να ανιχνευτούν σε μερικές ή όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται σε μια δοκιμή, θα πρέπει να πραγματοποιείται μέτρηση των διαλυμάτων παρακαταθήκης και καταγραφή των ταχυτήτων ροής του συστήματος, προκειμένου να υπολογίζονται οι ονομαστικές συγκεντρώσεις.

Παροχή της χημικής ουσίας

15. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την εισαγωγή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο σύστημα μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητές της. Οι υδατοδιαλυτές χημικές ουσίες μπορούν να διαλύονται σε κλάσματα νερού δοκιμής σε συγκέντρωση που επιτρέπει την παροχή της χημικής ουσίας στην επιδιωκόμενη συγκέντρωση δοκιμής σε σύστημα συνεχούς ροής νερού. Οι χημικές ουσίες που βρίσκονται υπό μορφή υγρού σε θερμοκρασία δωματίου και οι οποίες είναι μέτρια διαλυτές στο νερό μπορούν να εισάγονται με τη χρήση μεθόδων κορεσμού υγρού:υγρό. Οι χημικές ουσίες που βρίσκονται υπό μορφή στερεού σε θερμοκρασία δωματίου και οι οποίες είναι μέτρια διαλυτές στο νερό μπορούν να εισάγονται με τη χρήση κορεστών στήλης υαλοβάμβακα (7). Δίνεται προτίμηση στη χρήση ενός συστήματος δοκιμής χωρίς φορέα,

▼M6

ωστόσο οι διάφορες υπό δοκιμή χημικές ουσίες έχουν διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, οι οποίες πιθανώς να απαιτούν διαφορετικές προσεγγίσεις, όσον αφορά την προετοιμασία του νερού χημικής έκθεσης. Είναι προτιμότερο να καταβάλλεται προσπάθεια αποφυγής διαλυτών ή φορέων επειδή: *i)* ορισμένοι διαλύτες μπορεί οι ίδιοι να προκαλέσουν τοξικότητα ή/και δυσμενείς ή αναπάντεχες ενδοκρινολογικές αποκρίσεις, *ii)* οι δοκιμές των χημικών ουσιών σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από την υδατοδιαλυτότητά τους (όπως μπορεί συχνά να συμβεί με τη χρήση διαλυτών) μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα ανακριβείς προσδιορισμούς των αποτελεσματικών συγκεντρώσεων και *iii)* η χρήση διαλυτών σε πιο μακροπρόθεσμες δοκιμές μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικού βαθμού σχηματισμό «βιομεμβρανών» που σχετίζονται με τη μικροβιακή δραστηριότητα. Για χημικές ουσίες που δυσχεραίνουν τη διεξαγωγή της δοκιμής, μπορεί να χρησιμοποιείται διαλύτης ως έσχατη λύση και θα πρέπει να συμβουλεύεστε το έγγραφο OECD Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures (Έγγραφο κατευθυντήριας γραμμής ΟΟΣΑ σχετικά με τις δοκιμές υδατικής τοξικότητας δύσκολων ουσιών και μιγμάτων) (4) για τον προσδιορισμό της βέλτιστης μεθόδου. Η επιλογή του διαλύτη θα καθορίζεται από τις χημικές ιδιότητες της χημικής ουσίας. Οι διαλύτες που έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικοί για δοκιμές υδατικής τοξικότητας περιλαμβάνουν την ακετόνη, την αιθανόλη, τη μεθανόλη, το διμεθυλοφορμαμίδιο και την τριαιθυλενογλυκόλη. Σε περίπτωση που χρησιμοποιείται διαλύτης ως φορέας, οι συγκεντρώσεις του διαλύτη θα πρέπει να είναι χαμηλότερες από τη χρόνια συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρείται καμία επίδραση (No Observed Effect Concentration -NOEC). Σύμφωνα με το έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ, η μέγιστη συνιστώμενη συγκέντρωση είναι 100 μl/l, ενώ μια πρόσφατη ανασκόπηση συνιστά τη χρήση χαμηλών συγκεντρώσεων διαλύτη έως και 20 μl/l νερού αραίωσης (12). Εάν χρησιμοποιούνται διαλύτες ως φορείς, θα πρέπει να αξιολογούνται κατάλληλοι μάρτυρες με διαλύτη εκτός από τους μάρτυρες χωρίς διαλύτη (καθαρό νερό). Εάν δεν είναι δυνατή η χορήγηση μιας χημικής ουσίας μέσω του νερού, είτε λόγω των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών (χαμηλή διαλυτότητα) είτε λόγω της περιορισμένης χημικής διαθεσιμότητας, μπορεί να εξεταστεί το ενδεχόμενο εισαγωγής της μέσω της διατροφής. Έχουν διεξαχθεί προκαταρκτικές εργασίες σχετικά με τις εκθέσεις μέσω της διατροφής, ωστόσο αυτή η οδός έκθεσης δεν χρησιμοποιείται συχνά. Η επιλογή της μεθόδου θα πρέπει να τεκμηριώνεται και να επαληθεύεται μέσω ανάλυσης.

Επιλογή συγκεντρώσεων δοκιμής

Καθορισμός της υψηλής συγκέντρωσης δοκιμής

16. Για τους σκοπούς της παρούσας δοκιμής, η υψηλή συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να ορίζεται σύμφωνα με το όριο διαλυτότητας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, τη μέγιστη ανεκτή συγκέντρωση (ΜΑΣ) για χημικές ουσίες οξείας τοξικότητας ή ως 100 mg/l, όποια τιμή είναι χαμηλότερη.

17. Η ΜΑΣ ορίζεται ως η υψηλότερη συγκέντρωση της χημικής ουσίας στη δοκιμή που έχει ως αποτέλεσμα οξεία θνησιμότητα μικρότερη από 10 %. Η χρήση αυτής της προσέγγισης προϋποθέτει την ύπαρξη εμπειρικών δεδομένων οξείας θνησιμότητας από τα οποία μπορεί να γίνει εκτίμηση της ΜΑΣ. Η εκτίμηση της ΜΑΣ μπορεί να μην είναι ακριβής και συνήθως απαιτεί τη γνώμη ενός ειδικού. Παρότι η χρήση μοντέλων παλινδρόμησης ενδέχεται να αποτελεί την πιο ορθή τεχνικά προσέγγιση για την εκτίμηση της ΜΑΣ, είναι δυνατό να προκύψει μια χρήσιμη κατά προσέγγιση τιμή της ΜΑΣ από υφιστάμενα δεδομένα οξείας τοξικότητας με τη χρήση του 1/3 της τιμής LC_{50} για την οξεία τοξικότητα. Ωστόσο, ενδέχεται να υπάρχει έλλειψη δεδομένων οξείας τοξικότητας για το είδος υπό δοκιμή. Εάν δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα οξείας τοξικότητας για το συγκεκριμένο είδος, μπορεί να ολοκληρωθεί μια εξέταση LC_{50} 96 ωρών με γυρίνους που είναι αντιπροσωπευτικοί (δηλ., του ίδιου σταδίου) εκείνων που βρίσκονται υπό δοκιμή στη δοκιμασία ΑΜΑ. Προαιρετικά, εάν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα από άλλα υδρόβια είδη (π.χ. μελέτες LC_{50} σε ψάρια ή άλλα είδη αμφιβίων), μπορεί κατόπιν επαγγελματικής κρίσης να γίνει εκτίμηση μιας πιθανής ΜΑΣ βάσει παρέκτασης μεταξύ ειδών.

18. Εναλλακτικά, εάν η χημική ουσία δεν είναι οξείας τοξικότητας και είναι διαλυτή σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 100 mg/l, η τιμή των 100 mg/l θα πρέπει να θεωρείται η ανώτατη συγκέντρωση δοκιμής (ΑΣΔ), καθώς η συγκέντρωση αυτή γενικά θεωρείται «πρακτικά μη τοξική».

▼M6

19. Οι μέθοδοι στατικής ανανέωσης δεν αποτελούν την προτεινόμενη διαδικασία, ωστόσο μπορούν να χρησιμοποιούνται όταν οι μέθοδοι συνεχούς ροής νερού είναι ανεπαρκείς για την επίτευξη της ΜΑΣ. Εάν χρησιμοποιούνται μέθοδοι στατικής ανανέωσης, η σταθερότητα της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να τεκμηριώνεται και να παραμένει εντός των οριακών τιμών των κριτηρίων απόδοσης. Συνιστώνται περίοδοι ανανέωσης είκοσι τεσσάρων ωρών. Περίοδοι ανανέωσης που υπερβαίνουν τις 72 ώρες δεν είναι αποδεκτές. Επιπλέον, θα πρέπει να μετρώνται οι παράμετροι ποιότητας του νερού (π.χ. διαλυμένο οξυγόνο, θερμοκρασία, pH κ.λπ.) στο τέλος κάθε περιόδου ανανέωσης, αμέσως πριν από την ανανέωση.

Εύρος συγκεντρώσεων δοκιμής

20. Απαιτούνται *κατ' ελάχιστον* τρεις συγκεντρώσεις δοκιμής και ένας μάρτυρας καθαρού νερού (και μάρτυρας φορέα, εάν απαιτείται). Η ελάχιστη διαφορά της συγκέντρωσης δοκιμής μεταξύ της υψηλότερης και της χαμηλότερης τιμής θα πρέπει να είναι περίπου μία τάξη μεγέθους. Ο μέγιστος διαχωρισμός δόσεων είναι 0,1 και ο ελάχιστος είναι 0,33.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Έναρξη και διεξαγωγή δοκιμής

Ημέρα 0

21. Η έκθεση θα πρέπει να ξεκινάει όταν ένας επαρκής αριθμός γυρίνων από τον αρχικό πληθυσμό πριν από την έκθεση έχει φτάσει στο στάδιο ανάπτυξης 51, σύμφωνα με τους Nieuwkoop και Faber (8), οι οποίοι έχουν ηλικία μικρότερη ή ίση των 17 ημερών μετά τη γονιμοποίηση. Για την επιλογή των ζώων δοκιμής, οι υγιείς γυρίνοι φυσιολογικής εμφάνισης του αρχικού πληθυσμού θα πρέπει να συνενώνονται σε ένα μοναδικό δοχείο που περιέχει κατάλληλο όγκο νερού αραίωσης. Για τον καθορισμό του σταδίου ανάπτυξης, ο κάθε γυρίνος θα πρέπει να απομακρύνεται από τη δεξαμενή συνένωσης με μια μικρή απόχη ή σουρωτήρι και να μεταφέρεται σε έναν διαφανή θάλαμο μέτρησης (π.χ. τρυβλίο Petri των 100 mm) που περιέχει νερό αραίωσης. Για τον καθορισμό του σταδίου, προτιμάται να μην χρησιμοποιείται αναισθησία. Ωστόσο, μπορεί να πραγματοποιηθεί μεμονωμένη αναισθησία των γυρίνων με τη χρήση 100 mg/l μεθανοσουλφονικής τρικαΐνης (π.χ. MS-222), στην οποία έχει προστεθεί κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος διττανθρακικού νατρίου (pH 7,0) πριν από τον χειρισμό. Εάν χρησιμοποιηθεί αναισθησία, η μεθοδολογία σχετικά με τον κατάλληλο τρόπο χρήσης π.χ. της MS-222 για σκοπούς αναισθησίας θα πρέπει να λαμβάνεται από πεπειραμένα εργαστήρια και να αναφέρεται μαζί με τα αποτελέσματα της δοκιμής. Ο χειρισμός των ζώων κατά τη διάρκεια αυτής της μεταφοράς θα πρέπει να πραγματοποιείται με προσοχή, ώστε να ελαχιστοποιείται η πρόκληση πίεσης λόγω του χειρισμού και να αποφεύγονται τυχόν τραυματισμοί.

22. Το στάδιο ανάπτυξης των ζώων καθορίζεται με τη χρήση διοφθάλμιου στερεοσκοπικού μικροσκοπίου. Για τον περιορισμό της τελικής μεταβλητότητας του σταδίου ανάπτυξης, είναι σημαντικό ο καθορισμός του σταδίου να διεξάγεται με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ακρίβεια. Σύμφωνα με τους Nieuwkoop και Faber (8), το κύριο αναπτυξιακό σημείο αναφοράς για την επιλογή των οργανισμών του σταδίου 51 είναι η μορφολογία των οπίσθιων άκρων. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των οπίσθιων άκρων θα πρέπει να εξετάζονται στο μικροσκόπιο. Ενώ θα πρέπει κανείς να συμβουλεύεται τον πλήρη οδηγό των Nieuwkoop και Faber (8) για εκτενείς πληροφορίες σχετικά με τον καθορισμό σταδίου των γυρίνων, το στάδιο ανάπτυξης μπορεί να καθορίζεται με αξιοπιστία με χρήση των βασικών μορφολογικών σημείων αναφοράς. Ο ακόλουθος πίνακας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απλοποίηση και την τυποποίηση της διαδικασίας καθορισμού των σταδίων καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης με την αναγνώριση των βασικών μορφολογικών σημείων αναφοράς που σχετίζονται με τα διάφορα στάδια, με την προϋπόθεση ότι η ανάπτυξη είναι φυσιολογική.

▼M6

Πίνακας 2.

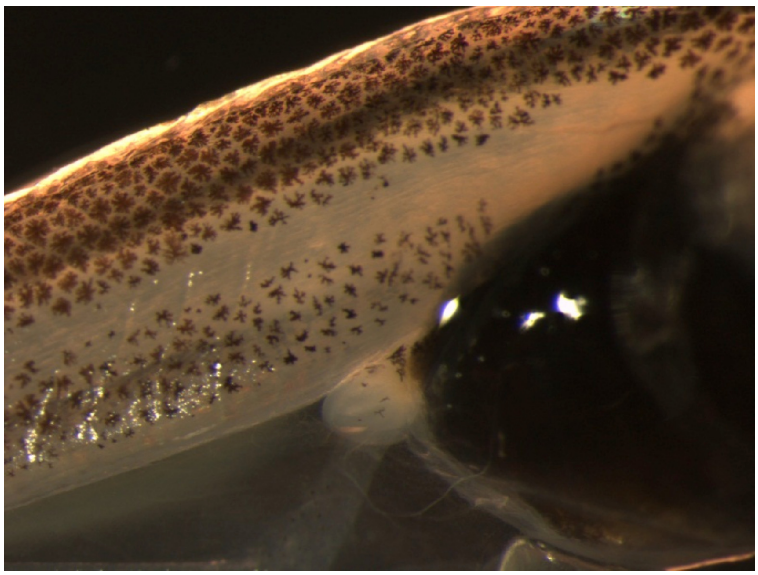
Βασικά μορφολογικά σημεία αναφοράς για τον καθορισμό των σταδίων με βάση τον οδηγό καθοδήγησης των Nieuwkoop και Faber.

Βασικά μορφολογικά σημεία αναφοράς	Στάδιο ανάπτυξης															
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
Οπίσθιο άκρο	X	X	X	X	X	X	X									
Εμπρόσθιο άκρο						X	X	X	X	X						
Κρανιοπροσωπική δομή										X	X	X	X			
Μορφολογία οσφρητικού νεύρου											X	X	X			
Μήκος ουράς													X	X	X	X

23. Για την έναρξη της δοκιμής, όλοι οι γυρίνοι θα πρέπει να βρίσκονται στο στάδιο 51. Το βασικότερο μορφολογικό σημείο αναφοράς για τον καθορισμό αυτού του σταδίου είναι η μορφολογία των οπίσθιων άκρων, η οποία απεικονίζεται στο σχήμα 1.

Σχήμα 1.

Μορφολογία οπίσθιων άκρων ενός γυρίνου σταδίου 51 του X. laevis.



24. Εκτός από την επιλογή του σταδίου ανάπτυξης, μπορεί προαιρετικά να γίνει και επιλογή μεγέθους των πειραματόζωων. Για τον σκοπό αυτό, θα πρέπει να καταμετράται την ημέρα 0 το μήκος ολόκληρου του σώματος (και όχι το μήκος SVL) ενός επιμέρους δείγματος αποτελούμενου από περίπου 20 γυρίνους σταδίου 51 κατά NF. Μετά τον υπολογισμό του μέσου μήκους ολόκληρου του σώματος για αυτήν την ομάδα ζώων, μπορούν να οριστούν τα ελάχιστα και μέγιστα όρια για το μήκος ολόκληρου του σώματος των πειραματόζωων, παρέχοντας ένα εύρος ± 3 mm από τη μέση τιμή (οι μέσες τιμές του μήκους ολόκληρου του σώματος κυμαίνονται μεταξύ 24,0 και 28,1 mm για γυρίνους σταδίου 51). Ωστόσο, ο προσδιορισμός του σταδίου ανάπτυξης είναι η βασική παράμετρος προκειμένου να καθοριστεί εάν κάθε ζώο δοκιμής είναι έτοιμο. Οι γυρίνοι που παρουσιάζουν εμφανώς ορατές δυσμορφίες ή τραυματισμούς θα πρέπει να αποκλείονται από τη δοκιμασία.

▼M6

25. Οι γυρίνοι που πληρούν τα κριτήρια του σταδίου που περιγράφονται ανωτέρω διατηρούνται σε μια δεξαμενή με καθαρό νερό καλλιέργειας μέχρι την ολοκλήρωση της διαδικασίας καθορισμού σταδίου. Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία καθορισμού σταδίου, οι προνύμφες κατανέμονται τυχαία σε δεξαμενές αγωγής έκθεσης μέχρι η κάθε δεξαμενή να περιέχει 20 προνύμφες. Κατόπιν, κάθε δεξαμενή αγωγής ελέγχεται με σκοπό τον εντοπισμό ζώων με μη φυσιολογική εμφάνιση (π.χ. τραυματισμοί, ασυνήθιστη συμπεριφορά κολύμβησης κ.λπ.). Οι γυρίνοι με έκδηλα μη υγιή εμφάνιση θα πρέπει να απομακρύνονται από τις δεξαμενές αγωγής και να αντικαθίστανται από νεοεπιλεγμένες προνύμφες από τη δεξαμενή συνένωσης.

Παρατηρήσεις

26. Για αναλυτικότερες πληροφορίες σχετικά με τις διαδικασίες τερματισμού της δοκιμής και με την επεξεργασία των γυρίνων, ανατρέξτε στο έγγραφο OECD Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology (Έγγραφο κατευθυντήριων γραμμών του ΟΟΣΑ για την ιστολογία του θυρεοειδούς των αμφιβίων) (9).

Μετρήσεις 7ης ημέρας

27. Την 7η ημέρα, πέντε γυρίνοι τυχαίας επιλογής ανά επανάληψη απομακρύνονται από κάθε δεξαμενή δοκιμής. Η τυχαία διαδικασία που χρησιμοποιείται θα πρέπει να παρέχει την ίδια πιθανότητα επιλογής σε κάθε οργανισμό της δοκιμής. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση οποιασδήποτε μεθόδου τυχαιοποίησης, αλλά προϋποθέτει την παγίδευση κάθε γυρίνου με δίχτυ. Οι γυρίνοι που δεν επιλέγονται επιστρέφονται στη δεξαμενή προέλευσης, ενώ οι επιλεγμένοι γυρίνοι υποβάλλονται σε ανώδυνη ευθανασία σε 150 έως 200 mg/l π.χ. MS-222, όπου έχει προστεθεί κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος διττανθρακικού νατρίου για την επίτευξη pH 7,0. Οι υποβληθέντες σε ευθανασία γυρίνοι εκπλένονται σε νερό και στεγνώνονται με απορροφητικό χαρτί. Στη συνέχεια, προσδιορίζεται το σωματικό τους βάρος με ακρίβεια χιλιοστόγραμμου. Για κάθε γυρίνο προσδιορίζεται το μήκος οπίσθιων άκρων, το μήκος ρύγχους-κλοάκης και το στάδιο ανάπτυξης (με τη χρήση διοφθάλμιου στερεοσκοπικού μικροσκοπίου).

Μετρήσεις 21ης ημέρας (Τερματισμός δοκιμής)

28. Κατά τον τερματισμό της δοκιμής (21η ημέρα), οι υπόλοιποι γυρίνοι απομακρύνονται από τις δεξαμενές δοκιμής και υποβάλλονται σε ανώδυνη ευθανασία σε 150 έως 200 mg/l π.χ. MS-222, όπου έχει προστεθεί κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος διττανθρακικού νατρίου, όπως περιγράφεται ανωτέρω. Οι γυρίνοι εκπλένονται σε νερό και στεγνώνονται με απορροφητικό χαρτί. Στη συνέχεια, προσδιορίζεται το σωματικό τους βάρος με ακρίβεια χιλιοστόγραμμου. Για κάθε γυρίνο προσδιορίζεται το στάδιο ανάπτυξης, το μήκος ρύγχους-κλοάκης και το μήκος οπίσθιων άκρων.

29. Όλες οι προνύμφες τοποθετούνται σε μονιμοποιητικό υγρό του Davidson για 48 έως 72 ώρες είτε ως δείγματα ολόκληρου σώματος είτε ως δείγματα τεμαχισμένου ιστού κεφαλής που περιλαμβάνει την κάτω γνάθο για ιστολογικές εκτιμήσεις. Για την ιστοπαθολογική εξέταση, θα πρέπει να γίνεται δειγματοληψία συνολικά πέντε γυρίνων από κάθε δεξαμενή επανάληψης. Επειδή το μήκος των θυλακικών κυττάρων εξαρτάται από το στάδιο (10), η καταλληλότερη προσέγγιση δειγματοληψίας για τις ιστολογικές αναλύσεις είναι η χρήση ατόμων με αντιστοίχιση σταδίου, όπου αυτό είναι δυνατό. Για να γίνει επιλογή ατόμων με αντιστοίχιση σταδίου, θα πρέπει αρχικά να προσδιοριστεί το στάδιο όλων των προνυμφών και, στη συνέχεια, να ακολουθήσει η επιλογή και η επακόλουθη επεξεργασία για τη συλλογή και διατήρηση δεδομένων. Αυτό είναι απαραίτητο, επειδή η φυσιολογική απόκλιση στην ανάπτυξη θα οδηγήσει σε διαφορετικές κατανομές των σταδίων σε κάθε δεξαμενή επανάληψης.

30. Τα ζώα που επιλέγονται για αναλύσεις ιστοπαθολογίας (n = 5 από κάθε επανάληψη) θα πρέπει να αντιστοιχίζονται στο διάμεσο στάδιο των μαρτύρων (συνενωμένες επαναλήψεις), όπου είναι δυνατό. Εάν υπάρχουν δεξαμενές επανάληψης με περισσότερες από πέντε προνύμφες στο επιθυμητό στάδιο, επιλέγονται τυχαία πέντε προνύμφες.

▼M6

31. Εάν υπάρχουν δεξαμενές επανάληψης με λιγότερες από πέντε προνύμφες στο επιθυμητό στάδιο, θα πρέπει να πραγματοποιείται τυχαία δειγματοληψία ατόμων από το αμέσως κατώτερο ή ανώτερο στάδιο ανάπτυξης ώστε να επιτυγχάνεται το συνολικό μέγεθος δείγματος των πέντε προνυμφών ανά επανάληψη. Κατά προτίμηση, η απόφαση σχετικά με το αν η δειγματοληψία επιπλέον προνυμφών θα πρέπει να πραγματοποιηθεί από το αμέσως κατώτερο ή το αμέσως ανώτερο στάδιο ανάπτυξης θα πρέπει να λαμβάνεται βάσει μιας συνολικής αξιολόγησης της κατανομής σταδίων στον μάρτυρα και στις αγωγές με χημικές ουσίες. Δηλαδή εάν η αγωγή με τη χημική ουσία σχετίζεται με καθυστέρηση της ανάπτυξης, τότε η δειγματοληψία των επιπλέον προνυμφών θα πρέπει να πραγματοποιείται από το αμέσως κατώτερο στάδιο. Αντίστοιχα, εάν η αγωγή με τη χημική ουσία σχετίζεται με επιτάχυνση της ανάπτυξης, τότε η δειγματοληψία των επιπλέον προνυμφών θα πρέπει να πραγματοποιείται από το αμέσως ανώτερο στάδιο.

32. Σε περιπτώσεις σοβαρών αλλαγών στην ανάπτυξη των γυρίνων εξαιτίας της αγωγής με την υπό δοκιμή χημική ουσία, μπορεί να μην υπάρχει αλληλεπικάλυψη μεταξύ της κατανομής σταδίων των ομάδων αγωγής με τη χημική ουσία και του εκτιμώμενου διάμεσου σταδίου ανάπτυξης του μάρτυρα. Μόνο σε αυτές τις περιπτώσεις, η διαδικασία επιλογής θα πρέπει να τροποποιείται με τη χρήση ενός σταδίου που διαφέρει από το διάμεσο στάδιο του μάρτυρα, ώστε να επιτυγχάνεται δειγματοληψία με αντιστοίχιση σταδίου των προνυμφών για την ιστοπαθολογική εξέταση του θυρεοειδούς. Επιπλέον, εάν τα στάδια είναι απροσδιόριστα (δηλ. ασυγχρονισμός), θα πρέπει να επιλέγονται τυχαία 5 γυρίνοι από κάθε επανάληψη για ιστολογική ανάλυση. Ο λόγος για τον οποίο πραγματοποιείται δειγματοληψία οποιωνδήποτε προνυμφών που δεν βρίσκονται στο αντίστοιχο στάδιο ανάπτυξης με αυτό του διάμεσου σταδίου ανάπτυξης του μάρτυρα θα πρέπει να αναφέρεται.

Καθορισμός βιολογικών τελικών σημείων

33. Κατά τη διάρκεια της φάσης έκθεσης 21 ημερών, η μέτρηση των πρωτευόντων τελικών σημείων πραγματοποιείται την 7η ημέρα και την 21η ημέρα, ωστόσο απαιτείται καθημερινή παρακολούθηση των ζώων δοκιμής. Στον πίνακα 3 παρέχεται μια επισκόπηση των τελικών σημείων μέτρησης και των αντίστοιχων χρονικών σημείων παρατήρησης. Αναλυτικότερες πληροφορίες σχετικά με τις τεχνικές διαδικασίες για τη μέτρηση των κορυφαίων τελικών σημείων και τις ιστολογικές εκτιμήσεις διατίθενται στα έγγραφα καθοδήγησης του ΟΟΣΑ (9).

Πίνακας 3.

Χρονικά σημεία παρατήρησης για πρωτεύοντα τελικά σημεία στη δοκιμασία ΑΜΑ.

Κορυφαία τελικά σημεία	Καθημερινά	7η ημέρα	21η ημέρα
— Θνησιμότητα	•		
— Στάδιο ανάπτυξης		•	•
— Μήκος οπίσθιων άκρων		•	•
— Μήκος ρύγχους-κλοάκης		•	•
— Υγρό σωματικό βάρος		•	•
— Ιστολογία θυρεοειδούς αδένα			•

▼M6

Κορυφαία τελικά σημεία

34. Το στάδιο ανάπτυξης, το μήκος οπίσθιων άκρων, το μήκος ρύγχους-κλοάκης και το υγρό βάρος αποτελούν τα κορυφαία τελικά σημεία της δοκιμασίας AMA, και το καθένα περιγράφεται εν συντομία παρακάτω. Περισσότερες τεχνικές πληροφορίες για τη συλλογή αυτών των δεδομένων διατίθενται στα αναφερόμενα έγγραφα καθοδήγησης, συμπεριλαμβανομένων των διαδικασιών για ανάλυση μέσω υπολογιστή, οι οποίες συνιστώνται προς χρήση.

Στάδιο ανάπτυξης

35. Το στάδιο ανάπτυξης των γυρίνων του *X. laevis* προσδιορίζεται με χρήση των κριτηρίων καθορισμού σταδίου των Nieuwkoop και Faber (8). Τα δεδομένα σταδίων ανάπτυξης χρησιμοποιούνται για να προσδιορίζεται εάν η ανάπτυξη είναι ταχύτερη, ασύγχρονη, καθυστερημένη ή ανεπηρέαστη. Η επιτάχυνση ή η καθυστέρηση της ανάπτυξης προσδιορίζεται με σύγκριση μεταξύ των διάμεσων σταδίων που επιτυγχάνονται από την ομάδα μαρτύρων και τις ομάδες που λαμβάνουν αγωγή. Η ανάπτυξη αναφέρεται ως ασύγχρονη όταν οι εξεταζόμενοι ιστοί δεν παρουσιάζουν δυσμορφία ή μη φυσιολογική εμφάνιση, αλλά ο σχετικός χρονισμός της μορφογένεσης ή της ανάπτυξης των διαφορετικών ιστών διαταράσσεται σε έναν γυρίνο.

Μήκος οπίσθιων άκρων

36. Η διαφοροποίηση και η ανάπτυξη των οπίσθιων άκρων ελέγχονται από τις θυρεοειδικές ορμόνες, ενώ αποτελούν σημαντικά σημεία αναφοράς της ανάπτυξης τα οποία χρησιμοποιούνται ήδη για τον προσδιορισμό του σταδίου ανάπτυξης. Η ανάπτυξη των οπίσθιων άκρων χρησιμοποιείται ως ποιοτικός δείκτης στον προσδιορισμό του σταδίου ανάπτυξης, αλλά εδώ λαμβάνεται υπόψη ως ποσοτικό τελικό σημείο. Επομένως, η μέτρηση του μήκους των οπίσθιων άκρων χρησιμοποιείται ως τελικό σημείο για τον εντοπισμό των επιδράσεων στον άξονα του θυρεοειδούς (Σχήμα 2). Για λόγους συνέπειας, η μέτρηση του μήκος των οπίσθιων άκρων πραγματοποιείται στο αριστερό οπίσθιο άκρο. Το μήκος των οπίσθιων άκρων αξιολογείται την 7η και την 21η ημέρα της δοκιμής. Την 7η ημέρα, η μέτρηση του μήκους των οπίσθιων άκρων είναι μια απλή διαδικασία, όπως απεικονίζεται στο σχήμα 2. Ωστόσο, η μέτρηση του μήκους των οπίσθιων άκρων την 21η ημέρα είναι πιο πολύπλοκη εξαιτίας των κάμψεων του άκρου. Επομένως, οι μετρήσεις του μήκους των οπίσθιων άκρων την 21η ημέρα θα πρέπει να ξεκινούν από το τοίχωμα του σώματος και να ακολουθούν τη μεσαία γραμμή του άκρου όταν συναντάται γωνιακή απόκλιση. Αλλαγές στο μήκος των οπίσθιων άκρων την 7η ημέρα, ακόμα και εάν δεν είναι εμφανείς την 21η ημέρα, εξακολουθούν να θεωρούνται σημαντικές σε ό,τι αφορά τη δυνητική θυρεοειδική δραστηριότητα. Οι μετρήσεις του μήκους λαμβάνονται από ψηφιακές φωτογραφίες με τη χρήση λογισμικού ανάλυσης εικόνας, όπως περιγράφεται στο έγγραφο OECD Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology (Εγγραφο κατευθυντήριων γραμμών του ΟΟΣΑ για την ιστολογία του θυρεοειδούς των αμφιβίων) (9).

Μήκος σώματος και υγρό βάρος

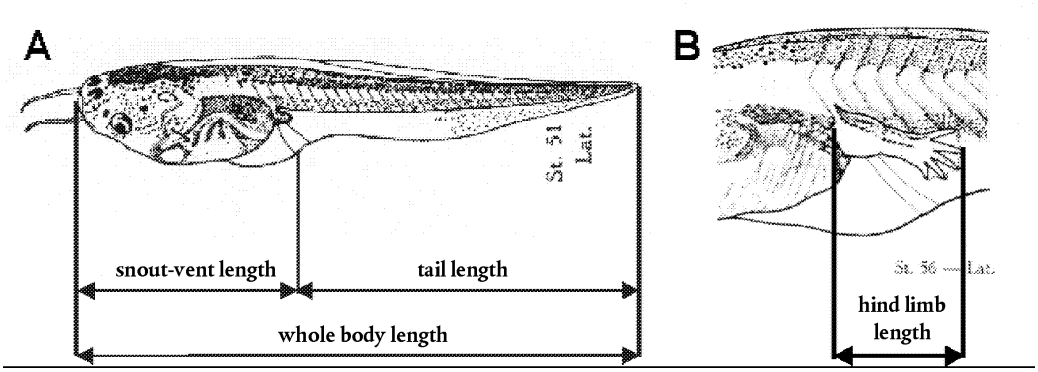
37. Στο πρωτόκολλο της δοκιμής περιλαμβάνονται προσδιορισμοί του μήκους ρύγχους-κλοάκης (SVL) (Σχήμα 2) και του υγρού βάρους, για να αξιολογούνται οι πιθανές επιδράσεις των υπό δοκιμή χημικών ουσιών στον ρυθμό ανάπτυξης των γυρίνων σε σύγκριση με την ομάδα-μάρτυρα, οι οποίοι είναι επίσης χρήσιμοι για τον εντοπισμό γενικευμένης τοξικότητας στην υπό δοκιμή χημική ουσία. Επειδή η απομάκρυνση του νερού από το σώμα των γυρίνων για τους προσδιορισμούς του βάρους μπορεί να δημιουργήσει συνθήκες πρόκλησης πίεσης για τους γυρίνους και ενδέχεται να προκαλέσει δερματική βλάβη, οι μετρήσεις αυτές πραγματοποιούνται την 7η ημέρα στους γυρίνους του επιμέρους δείγματος και κατά τον τερματισμό της δοκιμής (21η ημέρα) στους υπόλοιπους γυρίνους. Για λόγους συνέπειας, χρησιμοποιείτε την κρανιακή όψη της κλοάκης ως το ουραίο όριο της μέτρησης.

38. Το μήκος ρύγχους-κλοάκης (SVL) χρησιμοποιείται για να εκτιμηθεί η ανάπτυξη των γυρίνων, όπως απεικονίζεται στο σχήμα 2.

▼M6

Σχήμα 2.

(A) Τύποι μετρήσεων του μήκους σώματος και (B) μετρήσεις του μήκους οπίσθιων άκρων στους γυρίνους του X. laevis (1).



Ιστολογία θυρεοειδούς αδένα

39. Παρότι το στάδιο ανάπτυξης και το μήκος οπίσθιων άκρων αποτελούν σημαντικά τελικά σημεία για την αξιολόγηση αλλαγών που σχετίζονται με την έκθεση κατά τη διαδικασία μεταμόρφωσης, η καθυστερημένη ανάπτυξη δεν μπορεί από μόνη της να θεωρείται διαγνωστικός δείκτης αντιθυρεοειδικής δράσης. Μερικές αλλαγές μπορούν να εντοπιστούν μόνο με ιστοπαθολογική ανάλυση ρουτίνας. Τα διαγνωστικά κριτήρια περιλαμβάνουν την υπερτροφία/ατροφία του θυρεοειδούς αδένα, την υπερτροφία των θυλακικών κυττάρων, την υπερπλασία των θυλακικών κυττάρων και, ως πρόσθετα ποιοτικά κριτήρια, τα εξής: περιοχή του θυλακικού αυλού, ποιότητα κολλοειδούς και ύψος/σχήμα θυλακικών κυττάρων. Θα πρέπει να αναφέρεται και ο βαθμός σοβαρότητας (4 βαθμοί). Πληροφορίες σχετικά με τη λήψη και την επεξεργασία δειγμάτων για ιστολογική ανάλυση, καθώς και για τη διεξαγωγή ιστολογικών αναλύσεων σε δείγματα ιστού διατίθενται στο έγγραφο «Amphibian Metamorphosis Assay: Part 1 — Technical guidance for morphologic sampling and histological preparation» (Δοκιμασία μεταμόρφωσης αμφιβίων: Μέρος 1 — Τεχνικές κατευθύνσεις για τη μορφολογική δειγματοληψία και την ιστολογική προετοιμασία) και στο έγγραφο «Amphibian Metamorphosis Assay: Part 2 — Approach to reading studies, diagnostic criteria, severity grading and atlas» (Δοκιμασία μεταμόρφωσης αμφιβίων: Μέρος 2 — Προσέγγιση στην ερμηνεία μελετών, διαγνωστικών κριτηρίων, βαθμολόγησης σοβαρότητας και του άτλαντα) (9). Όταν ένα εργαστήριο πραγματοποιεί τη δοκιμασία για πρώτη φορά ή από τις πρώτες φορές, θα πρέπει να συμβουλεύεται πεπειραμένους παθολογοανατόμους για σκοπούς εκπαίδευσης προτού αναλάβει την ιστολογική ανάλυση και αξιολόγηση του θυρεοειδούς αδένα. Έκδηλες και σημαντικές αλλαγές σε κορυφαία τελικά σημεία που υποδεικνύουν επιτάχυνση ή ασυγχρονισμό της ανάπτυξης ενδέχεται να καθιστούν μη αναγκαία την εκτέλεση ιστοπαθολογικής ανάλυσης του θυρεοειδούς αδένα. Ωστόσο, η απουσία έκδηλων μορφολογικών αλλαγών ή οι ενδείξεις καθυστέρησης στην ανάπτυξη επιβάλλουν τη διεξαγωγή ιστολογικών αναλύσεων.

Θνησιμότητα

40. Όλες οι δεξαμενές δοκιμής θα πρέπει να ελέγχονται καθημερινά για νεκρούς γυρίνους και θα πρέπει να καταγράφονται οι αριθμοί για κάθε δεξαμενή. Για κάθε θνησιμότητα που παρατηρείται, θα πρέπει να καταγράφονται η ημερομηνία, η συγκέντρωση και ο αριθμός της δεξαμενής. Τα νεκρά ζώα θα πρέπει να απομακρύνονται από τη δεξαμενή δοκιμής αμέσως μόλις γίνονται αντιληπτά. Ποσοστά θνησιμότητας που υπερβαίνουν το 10 % ενδέχεται να υποδεικνύουν ακατάλληλες συνθήκες δοκιμής ή τοξικές επιδράσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Συμπληρωματικές παρατηρήσεις

41. Περιπτώσεις μη φυσιολογικής συμπεριφοράς και μακροσκοπικών δυσμορφιών και βλαβών θα πρέπει να καταγράφονται. Για κάθε μη φυσιολογική συμπεριφορά και μακροσκοπική δυσμορφία ή βλάβη που παρατηρείται, θα πρέπει να καταγράφονται η ημερομηνία, η συγκέντρωση και ο αριθμός της

▼M6

δεξαμενής. Η φυσιολογική συμπεριφορά χαρακτηρίζεται από την εναιώρηση των γυρίνων στη στήλη ύδατος με την ουρά ανεβασμένη πάνω από το κεφάλι, το τακτικό και ρυθμικό χτύπημα του ουραίου πτερυγίου, την περιοδική ανάδυση στην επιφάνεια του νερού, το ανοιγοκλείσιμο των επικαλυμμάτων των βραγχίων και την ανταπόκριση σε ερεθίσματα. Η μη φυσιολογική συμπεριφορά μπορεί να περιλαμβάνει, για παράδειγμα, επίπλευση στην επιφάνεια, παραμονή στον πυθμένα της δεξαμενής, ανεστραμμένη ή ακανόνιστη κολύμβηση, έλλειψη δραστηριότητας ανάδυσης και μη ανταπόκριση σε ερεθίσματα. Επιπλέον, μεγάλες διαφορές στην κατανάλωση τροφής μεταξύ των αγωγών θα πρέπει να καταγράφονται. Μακροσκοπικές δυσμορφίες και βλάβες μπορεί να περιλαμβάνουν, για παράδειγμα, μορφολογικές ανωμαλίες (π.χ. παραμορφώσεις άκρων), αιμορραγικές βλάβες ή λοιμώξεις από βακτήρια ή μύκητες. Οι προσδιορισμοί αυτοί είναι ποιοτικοί και θα πρέπει θεωρούνται παρόμοιοι με κλινικές ενδείξεις ασθένειας/πίεσης, καθώς και να γίνονται σε σύγκριση με τα ζώα-μάρτυρες. Εάν η εμφάνιση ή ο ρυθμός εμφάνισής τους είναι μεγαλύτερος στις δεξαμενές έκθεσης σε σχέση με τους μάρτυρες, θα πρέπει να θεωρούνται ενδείξεις έκδηλης τοξικότητας.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Συλλογή δεδομένων

42. Όλα τα δεδομένα θα πρέπει να συλλέγονται με χρήση ηλεκτρονικών ή μη αυτόματων συστημάτων που συμμορφώνονται με τους κανόνες των ορθών εργαστηριακών πρακτικών (ΟΕΠ). Στα δεδομένα της μελέτης θα πρέπει να περιλαμβάνονται τα εξής:

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

— Χαρακτηρισμός της υπό δοκιμή χημικής ουσίας: φυσικοχημικές ιδιότητες, πληροφορίες σχετικά με τη σταθερότητα και τη βιοαποικοδομησιμότητα,

— Χημικές πληροφορίες και δεδομένα: μέθοδος και συχνότητα προετοιμασίας των αραιώσεων. Οι πληροφορίες σχετικά με την υπό δοκιμή χημική ουσία περιλαμβάνουν τις πραγματικές και ονομαστικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και, σε μερικές περιπτώσεις, της μη μητρικής χημικής ουσίας, εάν απαιτείται. Μετρήσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μπορεί να απαιτούνται τόσο για τα διαλύματα παρακαταθήκης, όσο και για τα διαλύματα δοκιμής,

— Διαλύτης (εάν είναι διαφορετικός από το νερό): αιτιολόγηση για την επιλογή του διαλύτη και χαρακτηρισμός του διαλύτη (φύση, χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση),

Συνθήκες δοκιμής:

— Αρχεία λειτουργιών: αυτά περιλαμβάνουν παρατηρήσεις που αφορούν τη λειτουργία του συστήματος δοκιμής, καθώς και το περιβάλλον υποστήριξης και την υποδομή. Στα τυπικά αρχεία περιλαμβάνονται τα εξής: θερμοκρασία περιβάλλοντος, θερμοκρασία δοκιμής, φωτοπερίοδος, κατάσταση κρίσιμων εξαρτημάτων του συστήματος έκθεσης (π.χ. αντλίες, μετρητές κύκλου, πιέσεις), ταχύτητες ροής, επίπεδα νερού, αλλαγές φιάλης διαλύματος παρακαταθήκης και αρχεία σίτισης. Στις γενικές παραμέτρους ποιότητας νερού περιλαμβάνονται τα εξής: pH, διαλυμένο οξυγόνο, αγωγιμότητα, συνολικό ιώδιο, αλκαλικότητα και σκληρότητα,

— Αποκλίσεις από τη μέθοδο δοκιμών: οι πληροφορίες αυτές θα πρέπει να περιλαμβάνουν οποιοδήποτε στοιχείο ή λεπτομερείς περιγραφές των αποκλίσεων από τη μέθοδο δοκιμών,

Αποτελέσματα:

— Βιολογικές παρατηρήσεις και δεδομένα: αυτά περιλαμβάνουν καθημερινές παρατηρήσεις της θνησιμότητας, της κατανάλωσης τροφής, της μη φυσιολογικής συμπεριφοράς κολύμβησης, του λήθαργου, της απώλειας ισορροπίας, των δυσμορφιών, των βλαβών κ.λπ. Οι παρατηρήσεις και τα δεδομένα που συλλέγονται σε προκαθορισμένα διαστήματα είναι, μεταξύ άλλων: στάδιο ανάπτυξης, μήκος οπίσθιων άκρων, μήκος ρύγχους-κλοάκης και υγρό βάρος,

▼M6

— Στατιστικές τεχνικές ανάλυσης και αιτιολόγηση των χρησιμοποιούμενων τεχνικών, αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης, κατά προτίμηση σε μορφή πίνακα,

— Ιστολογικά δεδομένα: αυτά περιλαμβάνουν λεπτομερείς περιγραφές, καθώς και βαθμολογίες για τη σοβαρότητα και τη συχνότητα συγκεκριμένων παρατηρήσεων, όπως περιγράφεται στο έγγραφο καθοδήγησης ιστοπαθολογίας,

— Παρατηρήσεις ad hoc: οι παρατηρήσεις αυτές θα πρέπει να περιλαμβάνουν λεπτομερείς περιγραφές της μελέτης που δεν εντάσσονται στις κατηγορίες που περιγράφηκαν προηγουμένως.

Αναφορά δεδομένων

43. Το προσάρτημα 2 περιέχει φύλλα εργασίας για την καθημερινή συλλογή δεδομένων που μπορούν να χρησιμοποιούνται ως οδηγός για την καταχώριση ανεπεξέργαστων δεδομένων και για υπολογισμούς συνοπτικών στατιστικών στοιχείων. Επιπλέον, παρέχονται πίνακες αναφοράς που είναι χρήσιμοι για την ανακοίνωση συνόψεων με τα δεδομένα των τελικών σημείων. Πίνακες αναφοράς για τις ιστολογικές εκτιμήσεις περιλαμβάνονται στο προσάρτημα 2.

Κριτήρια απόδοσης και αποδοχή/εγκυρότητα δοκιμής

44. Γενικώς, οι μεγάλες αποκλίσεις από τη μέθοδο δοκιμών θα έχουν ως αποτέλεσμα τα δεδομένα να μην είναι αποδεκτά για ερμηνεία ή αναφορά. Για τον σκοπό αυτό, αναπτύχθηκαν τα ακόλουθα κριτήρια που παρατίθενται στον πίνακα 4 ως οδηγός για τον προσδιορισμό της ποιότητας της εκτελεσθείσας δοκιμής και της γενικής απόδοσης των οργανισμών-μαρτύρων.

Πίνακας 4.

Κριτήρια απόδοσης για τη δοκιμασία AMA.

Κριτήριο	Αποδεκτά όρια
Συγκεντρώσεις δοκιμής	Διατήρηση σε ≤ 20 % CV (μεταβλητότητα της μετρηθείσας συγκέντρωσης δοκιμής) καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής 21 ημερών
Θνησιμότητα στους μάρτυρες	≤ 10 % — η θνησιμότητα των μαρτύρων σε οποιαδήποτε μία επανάληψη δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τους 2 γυρίνους
Ελάχιστο διάμεσο στάδιο ανάπτυξης των μαρτύρων στο τέλος της δοκιμής	57
Κατανομή του σταδίου ανάπτυξης στην ομάδα-μάρτυρα	Η κατανομή του σταδίου ανάπτυξης μεταξύ του $10^{ου}$ και του $90^{ού}$ εκατοστημορίου δεν θα πρέπει να διαφέρει κατά περισσότερο από 4 στάδια
Διαλυμένο οξυγόνο	≥ 40 % κορεσμός με αέρα (*)
pH	Το pH θα πρέπει να διατηρείται σε τιμή από 6,5 έως 8,5. Οι διαφορές μεταξύ των επαναλήψεων/μεταξύ των αγωγών δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν την τιμή 0,5.
Θερμοκρασία νερού	22° ± 1 °C — οι διαφορές μεταξύ των επαναλήψεων/μεταξύ των αγωγών δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν τους 0,5 °C
Συγκεντρώσεις δοκιμής χωρίς έκδηλη τοξικότητα	≥ 2
Απόδοση επανάληψης	Επιτρέπεται να υπάρχουν ≤ 2 υποβαθμισμένες επαναλήψεις σε ολόκληρη τη δοκιμή

▼**M6**

Κριτήριο	Αποδεκτά όρια
Ειδικές συνθήκες για τη χρήση διαλύτη	Εάν χρησιμοποιείται διαλύτης ως φορέας, θα πρέπει να χρησιμοποιείται μάρτυρας με διαλύτη και μάρτυρας καθαρού νερού και να αναφέρονται τα αποτελέσματα
	Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες-μάρτυρες με διαλύτη και ομάδες-μάρτυρες νερού υφίστανται ειδική μεταχείριση. Για περισσότερες πληροφορίες, βλ. παρακάτω
Ειδικές συνθήκες για τη χρήση συστήματος στατικής ανανέωσης	Θα πρέπει να αναφέρονται αντιπροσωπευτικές χημικές αναλύσεις πριν από την ανανέωση και μετά από αυτήν
	Τα επίπεδα αμμωνίας θα πρέπει να μετρώνται αμέσως πριν από την ανανέωση
	Όλες οι παράμετροι της ποιότητας νερού που παρατίθενται στον πίνακα 1 του προσαρτήματος 1 θα πρέπει να μετρώνται αμέσως πριν από την ανανέωση
	Η περίοδος ανανέωσης δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τις 72 ώρες
	Κατάλληλο πρόγραμμα σίτισης (το 50 % του ημερήσιου σιτηρεσίου να αποτελείται από εμπορικά διαθέσιμη τροφή για γυρίνους)

(*) Ο αερισμός του νερού μπορεί να διατηρείται μέσω συσκευής δημιουργίας φυσαλίδων. Συνιστάται η ρύθμιση των συσκευών δημιουργίας φυσαλίδων σε επίπεδα που δεν δημιουργούν αδικαιολόγητη πίεση στους γυρίνους.

Εγκυρότητα δοκιμής

45. Για να κριθεί μια δοκιμή αποδεκτή/έγκυρη, θα πρέπει να πληρούνται οι ακόλουθες προϋποθέσεις:

Έγκυρο πείραμα σε μια δοκιμή με αρνητική επίδραση στη λειτουργία του θυρεοειδούς:

(1) Για οποιαδήποτε αγωγή (συμπεριλαμβανομένων των μαρτύρων), η θνησιμότητα δεν επιτρέπεται να υπερβαίνει το 10 %. Για οποιαδήποτε επανάληψη, η θνησιμότητα δεν επιτρέπεται να υπερβαίνει τους τρεις γυρίνους, διαφορετικά η επανάληψη θεωρείται υποβαθμισμένη

(2) Θα πρέπει να είναι διαθέσιμα για ανάλυση τουλάχιστον δύο επίπεδα αγωγής και με τις τέσσερις μη υποβαθμισμένες επαναλήψεις.

(3) Θα πρέπει να είναι διαθέσιμα για ανάλυση τουλάχιστον δύο επίπεδα αγωγής χωρίς έκδηλη τοξικότητα

Έγκυρο πείραμα σε μια δοκιμή με θετική επίδραση στη λειτουργία του θυρεοειδούς:

(1) Μπορεί να προκύψει θνησιμότητα σε έως δύο γυρίνους/επανάληψη στην ομάδα-μάρτυρα

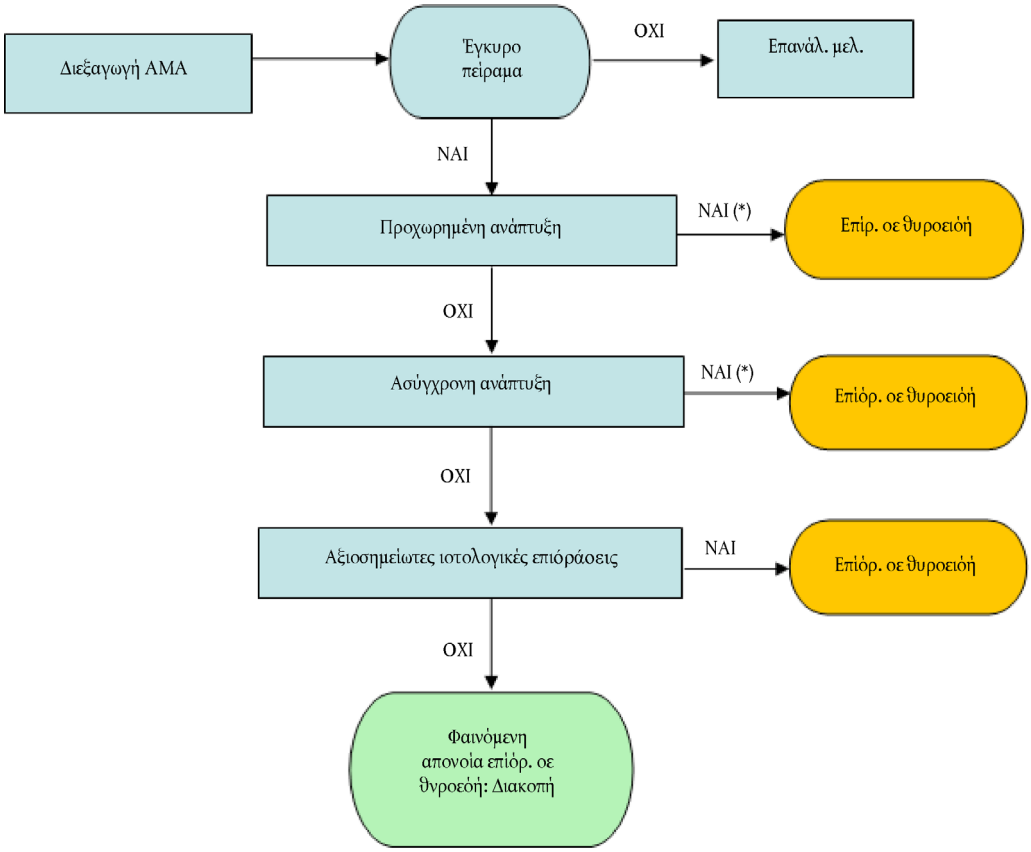
Λογική απόφασης για τη διεξαγωγή της δοκιμασίας ΑΜΑ

46. Η λογική της απόφασης για τη δοκιμασία ΑΜΑ αναπτύχθηκε ώστε να προσφέρει μια λογική βοήθεια όσον αφορά τη διεξαγωγή και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της βιοδοκιμασίας (βλ. διάγραμμα ροής στο σχήμα 3). Η λογική της απόφασης, ουσιαστικά, σταθμίζει τα τελικά σημεία με τρόπο ώστε να δίνεται μεγαλύτερη βαρύτητα στην προχωρημένη ανάπτυξη, την ασύγχρονη ανάπτυξη και την ιστοπαθολογία του θυρεοειδούς και μικρότερη βαρύτητα στην καθυστερημένη ανάπτυξη, στο μήκος ρύγχους-κλοάκης και στο βάρος υγρού σώματος -παράμετροι που μπορεί ενδεχομένως να επηρεαστούν από τη γενική τοξικότητα.

▼**M6**

Σχήμα 3.

Λογική απόφασης για τη διεξαγωγή της δοκιμασίας ΑΜΑ.



(*) Μπορεί να απαιτείται ιστολογική εξέταση από ορισμένες ρυθμιστικές αρχές παρά τις σημαντικές διαφορές στην προχωρημένη και την ασύγχρονη ανάπτυξη. Συνιστάται ο φορέας που εκτελεί αυτήν τη δοκιμή να συμβουλεύεται τις αρμόδιες αρχές πριν από την εκτέλεση της δοκιμής προκειμένου να προσδιορίσει ποια τελικά σημεία απαιτούνται.

Προχωρημένη ανάπτυξη (που προσδιορίζεται με τη χρήση του σταδίου ανάπτυξης, του μήκους ρύγχους-κλοάκης (SVL) και του μήκους των οπίσθιων άκρων (HLL))

47. Οι μοναδικές γνωστές αιτίες που προκαλούν προχωρημένη ανάπτυξη είναι επιδράσεις που σχετίζονται με τον θυρεοειδή. Αυτές μπορεί να είναι επιδράσεις στον περιφερικό ιστό, όπως άμεση αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα των θυρεοειδικών ορμονών (όπως της Τ4) ή επιδράσεις που μεταβάλλουν τα επίπεδα των κυκλοφορουσών θυρεοειδικών ορμονών. Σε κάθε περίπτωση, αυτές οι ενδείξεις αποδεικνύουν επαρκώς ότι η χημική ουσία έχει επίδραση στη λειτουργία του θυρεοειδούς. Η προχωρημένη ανάπτυξη αξιολογείται με έναν από τους δύο ακόλουθους τρόπους. Πρώτον, το στάδιο γενικής ανάπτυξης μπορεί να αξιολογηθεί με τη χρήση της τυποποιημένης προσέγγισης που περιγράφεται από τους Nieuwkoop και Faber (8). Δεύτερον, μπορεί να γίνει ποσοτικός προσδιορισμός συγκεκριμένων μορφολογικών χαρακτηριστικών, όπως το μήκος των οπίσθιων άκρων, την 7η και την 21η ημέρα, το οποίο σχετίζεται θετικά με αγωνιστικές επιδράσεις στον υποδοχέα των θυρεοειδικών ορμονών. Εάν προκύπτουν στατιστικά σημαντικές εξελίξεις στην ανάπτυξη ή στο μήκος των οπίσθιων άκρων, η δοκιμή υποδεικνύει ότι η χημική ουσία επιδρά στον θυρεοειδή.

▼**M6**

48. Η αξιολόγηση των ζώων δοκιμής όσον αφορά την παρουσία ταχύτερης ανάπτυξης σε σχέση με τον πληθυσμό του μάρτυρα θα βασίζεται στα αποτελέσματα στατιστικών αναλύσεων για τα ακόλουθα τέσσερα τελικά σημεία:

— μήκος οπίσθιων άκρων (κανονικοποιημένο ως προς το μήκος ρύγχους-κλοάκης) την 7η ημέρα της μελέτης

— μήκος οπίσθιων άκρων (κανονικοποιημένο ως προς το μήκος ρύγχους-κλοάκης) την 21η ημέρα της μελέτης

— στάδιο ανάπτυξης την 7η ημέρα της μελέτης

— στάδιο ανάπτυξης την 21η ημέρα της μελέτης.

49. Η διεξαγωγή των στατιστικών αναλύσεων για το μήκος οπίσθιων άκρων θα πρέπει να βασίζεται σε μετρήσεις του μήκους του αριστερού οπίσθιου άκρου. Για την κανονικοποίηση του μήκους οπίσθιων άκρων λαμβάνεται ο λόγος του μήκους των οπίσθιων άκρων προς το μήκος ρύγχους-κλοάκης ενός ατόμου. Στη συνέχεια, γίνεται σύγκριση του μέσου όρου των κανονικοποιημένων τιμών για κάθε επίπεδο αγωγής. Η επιτάχυνση της ανάπτυξης υποδεικνύεται από μια σημαντική αύξηση του μέσου μήκους οπίσθιων άκρων (κανονικοποιημένο) σε μια ομάδα αγωγής με τη χημική ουσία σε σύγκριση με την ομάδα-μάρτυρα την 7η ημέρα της μελέτης ή/και την 21η ημέρα της μελέτης (βλ. προσάρτημα 3).

50. Οι στατιστικές αναλύσεις του σταδίου ανάπτυξης θα πρέπει να διεξάγονται με βάση τον προσδιορισμό των σταδίων ανάπτυξης σύμφωνα με τα μορφολογικά κριτήρια όπως έχουν περιγραφεί από τους Nieuwkoop και Faber (8). Επιτάχυνση της ανάπτυξης υποδεικνύεται όταν η πολλαπλή ποσοτικοποιημένη ανάλυση εντοπίζει σημαντική αύξηση στις τιμές του σταδίου ανάπτυξης σε μια ομάδα αγωγής με χημική ουσία σε σύγκριση με την ομάδα-μάρτυρα την 7η ημέρα της μελέτης ή/και την 21η ημέρα της μελέτης.

51. Στη μέθοδο δοκιμών AMA, μια σημαντική επίδραση σε οποιοδήποτε από τα τέσσερα τελικά σημεία που αναφέρονται ανωτέρω θεωρείται επαρκής για θετικό αποτέλεσμα όσον αφορά την ανίχνευση ταχύτερης ανάπτυξης. Με άλλα λόγια, σημαντικές επιδράσεις στο μήκος των οπίσθιων άκρων σε ένα συγκεκριμένο χρονικό σημείο δεν απαιτούν επιβεβαίωση από σημαντικές επιδράσεις στο μήκος των οπίσθιων άκρων σε ένα άλλο χρονικό σημείο, ούτε από σημαντικές επιδράσεις στο στάδιο ανάπτυξης στο εν λόγω συγκεκριμένο χρονικό σημείο. Με τη σειρά τους, σημαντικές επιδράσεις στο στάδιο ανάπτυξης σε ένα συγκεκριμένο χρονικό σημείο δεν απαιτούν επιβεβαίωση από σημαντικές επιδράσεις στο στάδιο ανάπτυξης σε ένα άλλο χρονικό σημείο, ούτε από σημαντικές επιδράσεις στο μήκος των οπίσθιων άκρων στο εν λόγω συγκεκριμένο χρονικό σημείο. Ωστόσο, η βαρύτητα των ενδείξεων ταχύτερης ανάπτυξης θα ενισχύεται εάν ανιχνευτούν σημαντικές επιδράσεις για περισσότερα από ένα τελικά στοιχεία.

Ασύγχρονη ανάπτυξη (που προσδιορίζεται με τη χρήση των κριτηρίων του σταδίου ανάπτυξης)

52. Η ασύγχρονη ανάπτυξη χαρακτηρίζεται από διατάραξη του σχετικού χρονισμού της μορφογένεσης ή ανάπτυξη διαφορετικών ιστών σε έναν γυρίνο. Η αδυναμία να καθοριστεί με σαφήνεια το στάδιο ανάπτυξης ενός οργανισμού μέσω της ομάδας μορφολογικών τελικών σημείων που θεωρούνται τυπικά ενός οποιουδήποτε δεδομένου σταδίου υποδεικνύει ότι οι ιστοί αναπτύσσονται ασύγχρονα κατά τη διάρκεια της μεταμόρφωσης. Η ασύγχρονη ανάπτυξη αποτελεί έναν δείκτη θυρεοειδικής λειτουργίας. Οι μόνοι γνωστοί τρόποι δράσης που προκαλούν ασύγχρονη ανάπτυξη είναι μέσω της επίδρασης χημικών ουσιών στην περιφερική δράση των θυρεοειδικών ορμονών ή/και στον μεταβολισμό των θυρεοειδικών ορμονών σε αναπτυσσόμενους ιστούς, όπως παρατηρείται με τους αναστολείς της αποϊωδινάσης.

▼**M6**

53. Η αξιολόγηση των ζώων δοκιμής όσον αφορά την παρουσία ασύγχρονης ανάπτυξης σε σχέση με τον πληθυσμό μαρτύρων θα βασίζεται στη μακροσκοπική μορφολογική εκτίμηση των ζώων δοκιμής την 7η και την 21η ημέρα της μελέτης.

54. Η περιγραφή της φυσιολογικής ανάπτυξης του *Xenopus laevis* από τους Nieuwkoop και Faber (8) παρέχει το πλαίσιο για την αναγνώριση της διαδοχικής σειράς των σταδίων φυσιολογικής ανακατασκευής των ιστών. Ο όρος «ασύγχρονη ανάπτυξη» αναφέρεται ειδικά στις αποκλίσεις που εμφανίζονται στη μακροσκοπική μορφολογική ανάπτυξη των γυρίνων, οι οποίες αποτρέπουν τον σαφή προσδιορισμό ενός σταδίου ανάπτυξης σύμφωνα με τα κριτήρια των Nieuwkoop και Faber (8) επειδή τα βασικά μορφολογικά σημεία αναφοράς εμφανίζουν χαρακτηριστικά διαφορετικών σταδίων.

55. Όπως γίνεται αντιληπτό από τον όρο «ασύγχρονη ανάπτυξη», θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη μόνο οι περιπτώσεις όπου εμφανίζονται αποκλίσεις κατά την εξέλιξη της ανακατασκευής συγκεκριμένων ιστών σε σχέση με την εξέλιξη της ανακατασκευής άλλων ιστών. Ορισμένοι κλασικοί φαινότυποι περιλαμβάνουν την καθυστέρηση ή την απουσία εμφάνισης των εμπρόσθιων άκρων παρά τη φυσιολογική ή προχωρημένη ανάπτυξη των οπίσθιων άκρων και των ουραίων ιστών, ή την πρώιμη αναρρόφηση των βραγχίων σε σχέση με το στάδιο μορφογένεσης των οπίσθιων άκρων και αναρρόφησης της ουράς. Ένα ζώο θα καταγράφεται ως ζώο που παρουσιάζει ασύγχρονη ανάπτυξη, εάν δεν μπορεί να ταξινομηθεί σε κανένα στάδιο επειδή δεν πληροί την πλειοψηφία των αναπτυξιακών κριτηρίων αναφοράς για ένα συγκεκριμένο στάδιο κατά Nieuwkoop και Faber (8), ή εάν εμφανίζει ακραία καθυστέρηση ή επιτάχυνση σε ένα ή περισσότερα βασικά χαρακτηριστικά (π.χ. πλήρης αναρρόφηση της ουράς αλλά μη εμφάνιση εμπρόσθιων άκρων). Η εκτίμηση αυτή είναι ποιοτική και θα πρέπει να εξετάζει την πλήρη ομάδα των χαρακτηριστικών αναφοράς που παρατίθενται από τους Nieuwkoop και Faber (8). Ωστόσο, δεν είναι απαραίτητο να καταγράφεται το στάδιο ανάπτυξης των διαφόρων χαρακτηριστικών αναφοράς για τα υπό παρατήρηση ζώα. Τα ζώα που καταγράφονται ως ζώα που εμφανίζουν ασύγχρονη ανάπτυξη δεν ταξινομούνται σε ένα στάδιο ανάπτυξης κατά Nieuwkoop και Faber (8).

56. Συνεπώς, ένα κεντρικό κριτήριο για τον χαρακτηρισμό περιπτώσεων μη φυσιολογικής μορφολογικής ανάπτυξης ως «ασύγχρονης ανάπτυξης» είναι η διατάραξη του σχετικού χρονισμού της ανακατασκευής των ιστών και της μορφογένεσης των ιστών, ενώ η μορφολογία των επηρεασμένων ιστών δεν είναι έκδηλα μη φυσιολογική. Ένα παράδειγμα για να γίνει κατανοητή αυτή η ερμηνεία των μακροσκοπικών μορφολογικών ανωμαλιών είναι ότι η καθυστερημένη μορφογένεση των οπίσθιων άκρων σε σχέση την ανάπτυξη άλλων ιστών θα πληροί το κριτήριο της «ασύγχρονης ανάπτυξης», ενώ περιπτώσεις στις οποίες παρουσιάζεται απουσία των οπίσθιων άκρων, μη φυσιολογικός αριθμός δακτύλων (π.χ. εκτοδακτυλία, πολυδακτυλία) ή άλλες έκδηλες δυσμορφίες άκρων δεν θα πρέπει να θεωρούνται περιπτώσεις «ασύγχρονης ανάπτυξης».

57. Στο πλαίσιο αυτό, τα κύρια μορφολογικά σημεία αναφοράς που θα πρέπει να αξιολογούνται ως προς τη συντονισμένη εξέλιξή τους κατά τη μεταμόρφωση θα πρέπει να συμπεριλαμβάνουν τη μορφογένεση των οπίσθιων άκρων, τη μορφογένεση των εμπρόσθιων άκρων, την εμφάνιση των εμπρόσθιων άκρων, το στάδιο αναρρόφησης της ουράς (ιδιαίτερα την αναρρόφηση του ουραίου πτερυγίου) και τη μορφολογία κεφαλής (π.χ. μέγεθος βραγχίων και στάδιο αναρρόφησης βραγχίων, μορφολογία κάτω γνάθου, προεκβολή του χόνδρου του Meckel).

58. Ανάλογα με τον τρόπο της χημικής δράσης, μπορεί να προκύψουν διαφορετικοί μακροσκοπικοί μορφολογικοί φαινότυποι. Ορισμένοι κλασικοί φαινότυποι περιλαμβάνουν την καθυστέρηση ή την απουσία εμφάνισης των εμπρόσθιων άκρων παρά τη φυσιολογική ή προχωρημένη ανάπτυξη των οπίσθιων άκρων και των ουραίων ιστών, την πρώιμη αναρρόφηση των βραγχίων σε σχέση με τα οπίσθια άκρα και την ανακατασκευή της ουράς.

▼**M6**

Ιστοπαθολογία

59. Εάν η χημική ουσία δεν προκαλεί έκδηλη τοξικότητα και δεν επιταχύνει την ανάπτυξη, ούτε προκαλεί ασύγχρονη ανάπτυξη, η ιστοπαθολογία των θυρεοειδικών αδένων αξιολογείται με τη χρήση του κατάλληλου εγγράφου καθοδήγησης (9). Η αναπτυξιακή καθυστέρηση, απουσία τοξικότητας, αποτελεί ισχυρό δείκτη αντιθυρεοειδικής δράσης, ωστόσο η ανάλυση του σταδίου ανάπτυξης είναι λιγότερο ευαίσθητη και μικρότερης διαγνωστικής αξίας σε σχέση με την ιστοπαθολογική ανάλυση του θυρεοειδούς αδένα. Επομένως, σε αυτήν την περίπτωση η διεξαγωγή ιστοπαθολογικών αναλύσεων των θυρεοειδών αδένων είναι απαραίτητη. Επιδράσεις στην ιστολογία του θυρεοειδούς αδένα έχουν καταδειχθεί απουσία επιδράσεων στην ανάπτυξη. Εάν προκύψουν αλλαγές στην ιστοπαθολογία του θυρεοειδούς, η χημική ουσία θεωρείται ότι έχει επίδραση στον θυρεοειδή. Εάν δεν παρατηρηθούν καθυστερήσεις στην ανάπτυξη ή ιστολογικές βλάβες στους θυρεοειδείς αδένες, η χημική ουσία θεωρείται ότι δεν έχει επίδραση στον θυρεοειδή. Το σκεπτικό για αυτήν την απόφαση είναι ότι ο θυρεοειδής αδένας βρίσκεται υπό την επίδραση της TSH και κάθε χημική ουσία η οποία μεταβάλλει την κυκλοφορούσα θυρεοειδική ορμόνη αρκετά ώστε να μεταβάλλει την έκκριση της TSH θα έχει ως αποτέλεσμα ιστοπαθολογικές αλλαγές στους θυρεοειδείς αδένες. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι και μηχανισμοί δράσης που μπορούν να μεταβάλλουν την κυκλοφορούσα θυρεοειδική ορμόνη. Επομένως, ενώ το επίπεδο της θυρεοειδικής ορμόνης είναι ενδεικτικό μιας επίδρασης που σχετίζεται με τον θυρεοειδή, δεν επαρκεί για να προσδιοριστεί ποιος τρόπος ή μηχανισμός δράσης σχετίζεται με την απόκριση.

60. Επειδή αυτό το τελικό σημείο δεν είναι δυνατό να αναλυθεί με τις βασικές στατιστικές προσεγγίσεις, ο προσδιορισμός μιας επίδρασης που σχετίζεται με την έκθεση σε μια χημική ουσία θα πρέπει να γίνεται βάσει της εμπειρογνωμοσύνης ενός παθολογοανατόμου.

Καθυστερημένη ανάπτυξη (που προσδιορίζεται με τη χρήση του σταδίου ανάπτυξης, του μήκος οπίσθιων άκρων (HLL), του σωματικού βάρους (BW) και του μήκους ρύγχους-κλοάκης (SVL))

61. Καθυστερημένη ανάπτυξη μπορεί να προκύψει μέσω αντιθυρεοειδικών μηχανισμών και έμμεσης τοξικότητας. Μικρές καθυστερήσεις στην ανάπτυξη σε συνδυασμό με έκδηλες ενδείξεις τοξικότητας είναι πιθανόν να υποδεικνύουν μη συγκεκριμένη τοξική επίδραση. Η αξιολόγηση της μη θυρεοειδικής τοξικότητας αποτελεί σημαντικό παράγοντα της δοκιμής για τη μείωση της πιθανότητας ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Η υπερβολική θνησιμότητα αποτελεί προφανή ένδειξη της παρουσίας και άλλων τοξικών μηχανισμών. Παρομοίως, μικρές μειώσεις στην ανάπτυξη, όπως προσδιορίζονται από το υγρό βάρος ή/και το μήκος ρύγχους-κλοάκης, επίσης υποδηλώνουν μη θυρεοειδική τοξικότητα. Εμφανείς αυξήσεις στην ανάπτυξη παρατηρούνται συχνά με χημικές ουσίες που επηρεάζουν αρνητικά τη φυσιολογική ανάπτυξη. Κατά συνέπεια, η παρουσία μεγαλύτερων ζώων δεν αποτελεί απαραιτήτως ένδειξη μη θυρεοειδικής τοξικότητας. Η ανάπτυξη, ωστόσο, δεν θα πρέπει ποτέ να είναι το αποκλειστικό κριτήριο για τον προσδιορισμό της θυρεοειδικής τοξικότητας. Αντίθετα, για τον προσδιορισμό της λειτουργίας του θυρεοειδούς θα πρέπει να χρησιμοποιείται η ανάπτυξη, σε συνδυασμό με το στάδιο ανάπτυξης και την ιστοπαθολογία του θυρεοειδούς. Θα πρέπει επίσης να χρησιμοποιούνται και άλλα τελικά σημεία για τον προσδιορισμό έκδηλης τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένων του οιδήματος, των αιμορραγικών βλαβών, του λήθαργου, της μειωμένης κατανάλωσης τροφής, της ασταθούς/τροποποιημένης συμπεριφοράς κολύμβησης κ.λπ. Εάν σε όλες τις συγκεντρώσεις της δοκιμής παρουσιάζονται ενδείξεις έκδηλης τοξικότητας, θα πρέπει να γίνεται επαναξιολόγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις δοκιμής προτού προσδιοριστεί εάν η χημική ουσία ασκεί δυνητικά επίδραση στον θυρεοειδή ή όχι.

62. Στατιστικά σημαντικές καθυστερήσεις στην ανάπτυξη, απουσία άλλων ενδείξεων έκδηλης τοξικότητας, υποδεικνύουν ότι η χημική ουσία επιδρά στον θυρεοειδή (ανταγωνιστικά). Απουσία ισχυρών στατιστικών στοιχείων, το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να ενισχυθεί με τα αποτελέσματα της ιστοπαθολογικής εξέτασης του θυρεοειδούς.

▼M6

Στατιστικές αναλύσεις

63. Για τις στατιστικές αναλύσεις των δεδομένων θα πρέπει, κατά προτίμηση, να ακολουθούνται οι διαδικασίες που περιγράφονται στο έγγραφο Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application (Τρέχουσες προσεγγίσεις στη στατιστική ανάλυση των δεδομένων οικοτοξικότητας: Οδηγός εφαρμογής) (11). Για όλα τα συνεχή ποσοτικά τελικά σημεία (μήκος οπίσθιων άκρων, μήκος ρύγχους-κλοάκης, υγρό βάρος) που είναι συμβατά με μια μονοτονική σχέση δόσης-απόκρισης, θα πρέπει να εφαρμόζεται καθοδικά η δοκιμασία Jonckheere-Terpstra προκειμένου να καθοριστεί μια σημαντική επίδραση της αγωγής.

64. Για συνεχή τελικά σημεία που δεν είναι συμβατά με μια μονοτονική σχέση δόσης-απόκρισης, τα δεδομένα θα πρέπει να αξιολογούνται ως προς την κανονικότητα (κατά προτίμηση με τη χρήση της δοκιμασίας Shapiro-Wilk ή Anderson-Darling) και την ομοιογένεια της διασποράς (κατά προτίμηση με τη χρήση της δοκιμασίας Levene). Και οι δύο δοκιμασίες εφαρμόζονται στα κατάλοιπα της ανάλυσης ANOVA. Η γνώμη ενός ειδικού μπορεί να αντικαταστήσει αυτές τις επίσημες δοκιμασίες όσον αφορά την κανονικότητα και την ομοιογένεια της διασποράς, ωστόσο προτιμάται η διεξαγωγή επίσημων δοκιμασιών. Στις περιπτώσεις όπου εντοπίζεται μη κανονικότητα ή ανομοιογένεια της διασποράς, θα πρέπει να χρησιμοποιείται ένας μετασχηματισμός κανονικοποίησης για τη σταθεροποίηση της διασποράς. Εάν τα δεδομένα (πιθανώς μετά τον μετασχηματισμό) κατανέμονται κανονικά με ομοιογενή διασπορά, ο καθορισμός σημαντικής επίδρασης της αγωγής πραγματοποιείται με τη δοκιμασία Dunnett. Εάν τα δεδομένα (πιθανώς μετά τον μετασχηματισμό) κατανέμονται κανονικά με ετερογενή διασπορά, ο καθορισμός σημαντικής επίδρασης της αγωγής πραγματοποιείται με τη δοκιμασία Tamhane-Dunnett ή T3 ή με τη δοκιμασία Mann-Whitney-Wilcoxon U. Στις περιπτώσεις όπου δεν εντοπίζεται μετασχηματισμός κανονικοποίησης, ο καθορισμός σημαντικής επίδρασης της αγωγής γίνεται με τη δοκιμασία Mann-Whitney-Wilcoxon U με διόρθωση των τιμών p κατά Bonferroni-Holm. Η δοκιμασία Dunnett εφαρμόζεται ανεξάρτητα από κάθε δοκιμασία F ANOVA, ενώ η δοκιμασία Mann-Whitney εφαρμόζεται ανεξάρτητα από κάθε συνολική δοκιμασία Kruskal-Wallis.

65. Σημαντική θνησιμότητα δεν αναμένεται, ωστόσο θα πρέπει να αξιολογείται με τη δοκιμασία Cochran-Armitage εφαρμοζόμενη καθοδικά όταν τα δεδομένα συμφωνούν με μονοτονικότητα της σχέσης δόσης-απόκρισης, ή σε άλλη περίπτωση με τη δοκιμασία Fisher's Exact με διόρθωση τιμών κατά Bonferroni-Holm.

66. Μια σημαντική επίδραση της αγωγής για το στάδιο ανάπτυξης καθορίζεται από την εφαρμογή καθοδικά της δοκιμασίας Jonckheere-Terpstra στις διάμεσες τιμές επαναλήψεων. Εναλλακτικά και κατά προτίμηση, θα πρέπει να χρησιμοποιείται η πολλαπλή ποσοτική δοκιμασία Jonckheere μεταξύ του $20^{ού}$ και του $80^{ού}$ εκατοστημορίου για τον καθορισμό της επίδρασης, επειδή λαμβάνονται υπόψη αλλαγές στο προφίλ κατανομής.

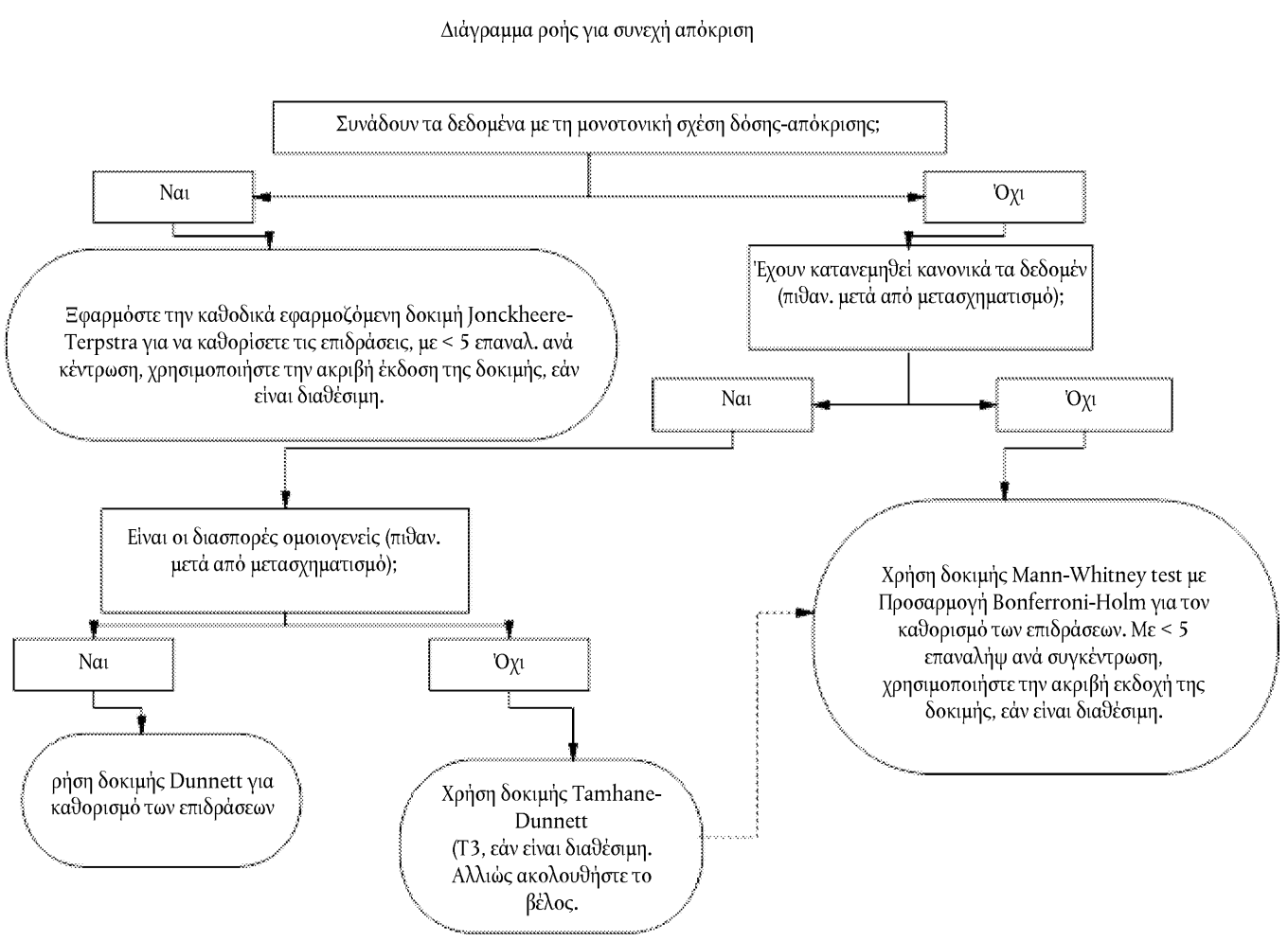
67. Η κατάλληλη μονάδα ανάλυσης είναι η επανάληψη, οπότε τα δεδομένα αποτελούνται από τις διάμεσες τιμές των επαναλήψεων εάν χρησιμοποιείται η δοκιμασία Jonckheere-Terpstra ή Mann-Whitney U, ή από τις μέσες τιμές των επαναλήψεων εάν χρησιμοποιείται η δοκιμασία Dunnett. Η μονοτονικότητα της σχέσης δόσης-απόκρισης μπορεί να αξιολογείται οπτικά από τις μέσες ή διάμεσες τιμές της επανάληψης και της αγωγής ή από επίσημες δοκιμασίες, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (11). Με λιγότερες από πέντε επαναλήψεις ανά αγωγή ή μάρτυρα, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οι ακριβείς παραλλαγές μετάθεσης των δοκιμασιών Jonckheere-Terpstra και Mann-Whitney, εάν διατίθενται. Η στατιστική σημαντικότητα όλων των δοκιμασιών που υποδεικνύονται εξετάζεται σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05.

68. Στο σχήμα 4 παρατίθεται ένα διάγραμμα ροής για τη διεξαγωγή στατιστικών δοκιμασιών σε συνεχή δεδομένα.

▼M6

Σχήμα 4.

Διάγραμμα ροής στατιστικών προσεγγίσεων για συνεχή δεδομένα απόκρισης.



02008R0440 — EL — 16.10.2019 — 008.001 — 2222

▼M6

Ειδικά θέματα για την ανάλυση δεδομένων

Χρήση υποβαθμισμένων επιπέδων αγωγής

69. Ορισμένοι παράγοντες λαμβάνονται υπόψη προκειμένου να καθοριστεί εάν μια επανάληψη ή μια ολόκληρη αγωγή παρουσιάζει έκδηλη τοξικότητα και θα πρέπει να εξαιρεθεί από την ανάλυση. Η έκδηλη τοξικότητα ορίζεται ως > 2 θνησιμότητες σε οποιαδήποτε επανάληψη που μπορούν να επεξηγηθούν μόνο από την παρουσία τοξικότητας και όχι λόγω τεχνικού σφάλματος. Άλλες ενδείξεις έκδηλης τοξικότητας περιλαμβάνουν την αιμορραγία, μη φυσιολογικές συμπεριφορές, μη φυσιολογικούς τρόπους κολύμβησης, ανορεξία και άλλες κλινικές ενδείξεις ασθένειας. Για υποθανατηφόρες ενδείξεις τοξικότητας, ενδέχεται να είναι απαραίτητες ποιοτικές αξιολογήσεις, οι οποίες θα πρέπει πάντα να πραγματοποιούνται σε συνάρτηση με την ομάδα-μάρτυρα καθαρού νερού.

Μάρτυρες με διαλύτη

70. Το ενδεχόμενο χρήσης διαλύτη θα πρέπει να εξετάζεται μόνο ως έσχατη λύση, αφού έχει εξεταστεί το ενδεχόμενο χρήσης όλων των άλλων επιλογών χορήγησης χημικών ουσιών. Εάν χρησιμοποιείται διαλύτης, θα πρέπει να χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με έναν μάρτυρα καθαρού νερού. Στο τέλος της δοκιμής, θα πρέπει να αξιολογούνται οι πιθανές επιδράσεις του διαλύτη. Αυτό πραγματοποιείται μέσω στατιστικής σύγκρισης της ομάδας-μάρτυρα με διαλύτη και της ομάδας-μάρτυρα καθαρού νερού. Τα πιο σχετικά τελικά σημεία που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη σε αυτήν την ανάλυση είναι το στάδιο ανάπτυξης, το μήκος ρύγχους-κλοάκης και το υγρό βάρος, επειδή αυτά μπορούν να επηρεαστούν μέσω μη θυρεοειδικών τοξικοτήτων. Εάν εντοπιστούν στατιστικά σημαντικές διαφορές για αυτά τα τελικά σημεία μεταξύ της ομάδας-μάρτυρα καθαρού νερού και της ομάδας-μάρτυρα με διαλύτη, θα πρέπει να καθοριστούν τα τελικά σημεία της μελέτης για τις μετρήσεις της απόκρισης με τη χρήση του μάρτυρα καθαρού νερού. Εάν δεν εντοπιστεί στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας-μάρτυρα καθαρού νερού και της ομάδας-μάρτυρα με διαλύτη για όλες τις μετρηθείσες μεταβλητές απόκρισης, θα πρέπει να καθοριστούν τα τελικά σημεία της μελέτης για τις μετρήσεις της απόκρισης με τη χρήση συνενωμένων μαρτύρων νερού αραίωσης και μαρτύρων με διαλύτη.

Ομάδες αγωγής στις οποίες επιτυγχάνεται στάδιο ανάπτυξης 60 και άνω

71. Μετά το στάδιο 60, οι γυρίνοι εμφανίζουν μείωση μεγέθους και βάρους εξαιτίας αναρρόφησης ιστού και μείωσης της απόλυτης περιεκτικότητας σε νερό. Συνεπώς, οι μετρήσεις του υγρού βάρους και του μήκους ρύγχους-κλοάκης δεν είναι κατάλληλες για εφαρμογή σε στατιστικές αναλύσεις για διαφορές στους ρυθμούς ανάπτυξης. Επομένως, το υγρό βάρος και τα δεδομένα μήκους από οργανισμούς > σταδίου 60 κατά NF θα πρέπει να αποκλείονται και δεν μπορούν να χρησιμοποιούνται σε αναλύσεις των μέσων τιμών επαναλήψεων ή των διάμεσων τιμών επαναλήψεων. Για την ανάλυση αυτών των παραμέτρων που σχετίζονται με την ανάπτυξη, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις.

72. Η μία προσέγγιση είναι να λαμβάνονται υπόψη μόνο οι γυρίνοι σταδίων ανάπτυξης κατώτερων ή ίσων με το στάδιο 60 για τις στατιστικές αναλύσεις του υγρού βάρους ή/και του μήκους ρύγχους-κλοάκης. Η προσέγγιση αυτή θεωρείται ότι παρέχει επαρκώς έγκυρες πληροφορίες σχετικά με τη σοβαρότητα των δυνητικών επιδράσεων στην ανάπτυξη, με την προϋπόθεση ότι μόνο ένα μικρό ποσοστό των ζώων δοκιμής απομακρύνεται από τις αναλύσεις (≤ 20 %). Εάν ένας αυξημένος αριθμός γυρίνων παρουσιάζει ανάπτυξη πέρα από το στάδιο 60 (≥ 20 %) σε μία ή περισσότερες ονομαστικές συγκεντρώσεις, θα πρέπει να εφαρμόζεται ανάλυση ANOVA δύο παραγόντων με φωλιασμένη (εγκλωβισμένη) δομή διασποράς σε όλους τους γυρίνους ώστε να εκτιμώνται οι επιδράσεις στην ανάπτυξη εξαιτίας της αγωγής με χημικές ουσίες, λαμβάνοντας ταυτόχρονα υπόψη και την επίδραση της ανάπτυξης προχωρημένων σταδίων. Στο προσάρτημα 3 παρέχεται καθοδήγηση για την ανάλυση ANOVA δύο παραγόντων, βάρους και μήκους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2004) Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay for the detection of thyroid active substances: Phase 1 — Optimisation of the Test Protocol. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. Αρ. 77, Παρίσι.

▼**M6**

(2) OECD (2007) Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay: Phase 2 — Multi-chemical Interlaboratory Study. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. Αρ. 76. Παρίσι

(3) OECD (2008) Report of the Validation Peer Review for the Amphibian Metamorphosis Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. Αρ. 92. Παρίσι

(4) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. Αρ. 23. Παρίσι

(5) ASTM (2002) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. American Society for Testing and Materials, ASTM E729-96(2002), Φιλαδέλφεια, PA

(6) ASTM (2004) Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay — Xenopus (FETAX). E 1439-98

(7) Kahl, M.D., Russom, C.L., DeFoe, D.L. και Hammermeister, D.E. (1999) Saturation units for use in aquatic bioassays. Chemosphere 39, σελ. 539-551

(8) Nieuwkoop, P.D. και Faber, J. (1994) Normal Table of Xenopus laevis. Garland Publishing, Νέα Υόρκη

(9) OECD (2007) Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. Αρ. 82. Παρίσι

(10) Dodd, M.H.I. και Dodd, J.M. (1976) Physiology of Amphibia. Lofts, B. (εκδ.), Academic Press, Νέα Υόρκη, σελ. 467-599

(11) OECD (2006) Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, Αρ. 54. Παρίσι

(12) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76, σελ.69–92.

▼**M6**

Προσάρτημα 1

Πίνακας 1

Πειραματικές συνθήκες για τη δοκιμασία μεταμόρφωσης αμφιβίων 21 ημερών

Ζώο δοκιμής		Προνύμφες του *Xenopus laevis*	
Αρχικό προνυμφικό στάδιο		Στάδιο 51 κατά Nieuwkoop και Faber	
Περίοδος έκθεσης		21 ημέρες	
Κριτήρια επιλογής προνυμφών		Στάδιο ανάπτυξης και συνολικό μήκος (προαιρετικά)	
Συγκεντρώσεις δοκιμής		Τουλάχιστον 3 συγκεντρώσεις που καλύπτουν περίπου μία τάξη μεγέθους	
Πρόγραμμα έκθεσης		Συνεχής ροή νερού (προτιμάται) ή/και στατική ανανέωση	
Ταχύτητα ροής συστήματος δοκιμής		25 ml/λεπτό (πλήρης αντικατάσταση του όγκου περίπου κάθε 2,7 ώρες)	
Πρωτεύοντα τελικά σημεία / Ημέρες προσδιορισμού		Θνησιμότητα	Καθημερινά
		Στάδιο ανάπτυξης	Ημ. 7 και 21
		Μήκος οπίσθιων άκρων	Ημ. 7 και 21
		Μήκος ρύγχους-κλοάκης	Ημ. 7 και 21
		Υγρό σωματικό βάρος	Ημ. 7 και 21
		Ιστολογία θυρεοειδούς	Ημ. 21
Νερό αραίωσης / Εργαστηριακός μάρτυρας		Αποχλωριωμένο νερό βρύσης (φιλτραρισμένο με άνθρακα) ή η ισοδύναμη εργαστηριακή πηγή	
Πυκνότητα προνυμφών		20 προνύμφες / δοχείο δοκιμής (5 / λίτρο)	
Διάλυμα δοκιμής / Δοχείο δοκιμής		4-10 l (10-15 cm νερό τουλάχιστον) / Δοχείο δοκιμής από γυαλί ή ανοξείδωτο χάλυβα (π.χ. 22,5 cm × 14 cm × 16,5 cm)	
Επανάληψη		4 δοχεία δοκιμής επανάληψης / συγκέντρωση δοκιμής και μάρτυρα	
Αποδεκτό ποσοστό θνησιμότητας στους μάρτυρες		≤ 10 % ανά δοχείο δοκιμής επανάληψης	
Μονιμοποίηση θυρεοειδούς	Αριθμός μονιμοποιημένων	Όλοι οι γυρίνοι (αρχικά αξιολογούνται 5/επανάληψη)	
	Περιοχή	Κεφαλή ή ολόκληρο το σώμα	
	Υγρό μονιμοποίησης	Μονιμοποιητικό υγρό του Davidson	
Σίτιση	Τροφή	Sera MicronÒ ή ισοδύναμη	
	Ποσότητα / Συχνότητα	Για το καθεστώς σίτισης με τη χρήση τροφής Sera Micron®, βλ. πίνακα 1	
Φωτισμός	Φωτοπερίοδος	12 ώρες φως: 12 ώρες σκοτάδι	

▼**M6**

	Ένταση	600 έως 2 000 lux (μέτρηση στην επιφάνεια του νερού)
Θερμοκρασία νερού		22° ± 1 °C
pH		6,5-8,5
Συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου (DO)		> 3,5 mg/l (> 40 % κορεσμός με αέρα)
Χρονοδιάγραμμα δειγματοληψίας για χημική ανάλυση		Μία φορά / εβδομάδα (4 δείγματα / δοκιμή)

▼**M6**

Προσάρτημα 2

Πίνακές αναφοράς για ανεπεξέργαστα δεδομένα και συνοπτικά δεδομένα

Πίνακας 1

Γενικές πληροφορίες για την υπό δοκιμή χημική ουσία

Πληροφορίες για τη χημική ουσία			
	Εισαγάγετε την υπό δοκιμή χημική ουσία, τις μονάδες συγκέντρωσης και τις αγωγές		
	Υπό δοκιμή χημική ουσία:		
	Μονάδες συγκέντρωσης:		
	Αγωγή 1		
	Αγωγή 2		
	Αγωγή 3		
	Αγωγή 4		
	Ημερομηνία (ημέρα 0):		Εισαγάγετε ημερομηνία (μμ/ηη/εε)
	Ημερομηνία (ημέρα 7):		Εισαγάγετε ημερομηνία (μμ/ηη/εε)
	Ημερομηνία (ημέρα 21):		Εισαγάγετε ημερομηνία (μμ/ηη/εε)

Πίνακας 2

Φύλλα συλλογής ανεπεξέργαστων δεδομένων για την 7η και 21η ημέρα

ΗΜΕΡΑ Χ
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ 00/00/00

	Συγκέ-ντρωση	Αριθμός αγωγής	Αριθμός επανάληψης	Αριθμός ατόμου	Αναγνωρι-στικό ατό-μου	Στάδιο ανά-πτυξης	Μήκος SVL (mm)	Μήκος οπί-σθιων άκρων (mm)	Υγρό βάρος ολόκληρου του οργανι-σμού (mg)
ΣΕΙΡΑ	ΑΓΩΓ	ΑΡ. ΑΓΩΓ	ΕΠΑΝΛ	ΑΤΟΜ	ΑΝΑΓΝ. ΑΤΟΜ	ΣΤΑΔΙΟ	ΜΗΚ. ΣΩΜ.	HLL	ΒΑΡΟΣ
1	0,00	1							
2	0,00	1							
3	0,00	1							
4	0,00	1							
5	0,00	1							
6	0,00	1							
7	0,00	1							
8	0,00	1							

▼**M6**

	Συγκέ-ντρωση	Αριθμός αγωγής	Αριθμός επανάληψης	Αριθμός ατόμου	Αναγνωρι-στικό ατό-μου	Στάδιο ανά-πτυξης	Μήκος SVL (mm)	Μήκος οπί-σθιων άκρων (mm)	Υγρό βάρος ολόκληρου του οργανι-σμού (mg)
ΣΕΙΡΑ	ΑΓΩΓ	ΑΡ. ΑΓΩΓ	ΕΠΑΝΛ	ΑΤΟΜ	ΑΝΑΓΝ. ΑΤΟΜ	ΣΤΑΔΙΟ	ΜΗΚ. ΣΩΜ.	HLL	ΒΑΡΟΣ
9	0,00	1							
10	0,00	1							
11	0,00	1							
12	0,00	1							
13	0,00	1							
14	0,00	1							
15	0,00	1							
16	0,00	1							
17	0,00	1							
18	0,00	1							
19	0,00	1							
20	0,00	1							
21	0,00	2							
22	0,00	2							
23	0,00	2							
24	0,00	2							
25	0,00	2							
26	0,00	2							
27	0,00	2							
28	0,00	2							
29	0,00	2							
30	0,00	2							
31	0,00	2							
32	0,00	2							
33	0,00	2							

▼**M6**

	Συγκέ-ντρωση	Αριθμός αγωγής	Αριθμός επανάληψης	Αριθμός ατόμου	Αναγνωρι-στικό ατό-μου	Στάδιο ανά-πτυξης	Μήκος SVL (mm)	Μήκος οπί-σθιων άκρων (mm)	Υγρό βάρος ολόκληρου του οργανι-σμού (mg)
ΣΕΙΡΑ	ΑΓΩΓ	ΑΡ. ΑΓΩΓ	ΕΠΑΝΛ	ΑΤΟΜ	ΑΝΑΓΝ. ΑΤΟΜ	ΣΤΑΔΙΟ	ΜΗΚ. ΣΩΜ.	HLL	ΒΑΡΟΣ
34	0,00	2							
35	0,00	2							
36	0,00	2							
37	0,00	2							
38	0,00	2							
39	0,00	2							
40	0,00	2							
41	0,00	3							
42	0,00	3							
43	0,00	3							
44	0,00	3							
45	0,00	3							
46	0,00	3							
47	0,00	3							
48	0,00	3							
49	0,00	3							
50	0,00	3							
51	0,00	3							
52	0,00	3							
53	0,00	3							
54	0,00	3							
55	0,00	3							
56	0,00	3							
57	0,00	3							
58	0,00	3							

▼**M6**

	Συγκέ-ντρωση	Αριθμός αγωγής	Αριθμός επανάληψης	Αριθμός ατόμου	Αναγνωρι-στικό ατό-μου	Στάδιο ανά-πτυξης	Μήκος SVL (mm)	Μήκος οπί-σθιων άκρων (mm)	Υγρό βάρος ολόκληρου του οργανι-σμού (mg)
ΣΕΙΡΑ	ΑΓΩΓ	ΑΡ. ΑΓΩΓ	ΕΠΑΝΛ	ΑΤΟΜ	ΑΝΑΓΝ. ΑΤΟΜ	ΣΤΑΔΙΟ	ΜΗΚ. ΣΩΜ.	HLL	ΒΑΡΟΣ
59	0,00	3							
60	0,00	3							
61	0,00	4							
62	0,00	4							
63	0,00	4							
64	0,00	4							
65	0,00	4							
66	0,00	4							
67	0,00	4							
68	0,00	4							
69	0,00	4							
70	0,00	4							
71	0,00	4							
72	0,00	4							
73	0,00	4							
74	0,00	4							
75	0,00	4							
76	0,00	4							
77	0,00	4							
78	0,00	4							
79	0,00	4							
80	0,00	4							

▼**M6**

Πίνακας 3

Υπολογισμένα συνοπτικά στοιχεία για δεδομένα τελικών σημείων από την 7η και την 21η ημέρα

		Στάδιο ανάπτυξης			SVL (mm)		Μήκος οπίσθιων άκρων (mm)		Βάρος (mg)	
ΑΓΩΓ	ΕΠΑΝΛ	ΕΛΑΧ	ΔΙΑΜΕΣΟ	ΜΕΓ	ΜΕΣΟ	ΤΥΠ ΑΠΟΚΛ	ΜΕΣΟ	ΤΥΠ ΑΠΟΚΛ	ΜΕΣΟ	ΤΥΠ ΑΠΟΚΛ
1	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

Σημείωση: Οι υπολογισμοί κελιών σχετίζονται με τις καταχωρίσεις των δεδομένων στον πίνακα 2.

Πίνακας 4

Δεδομένα καθημερινής θνησιμότητας

Ημέρα δοκιμής	Ημερομηνία	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																
1	#Value!																
2	#Value!																
3	#Value!																
4	#Value!																
5	#Value!																

▼**M6**

Ημέρα δοκιμής	Ημερομηνία	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
6	#Value!																
7	#Value!																
8	#Value!																
9	#Value!																
10	#Value!																
11	#Value!																
12	#Value!																
13	#Value!																
14	#Value!																
15	#Value!																
16	#Value!																
17	#Value!																
18	#Value!																
19	#Value!																
20	#Value!																
21	#Value!																
Αριθμός επαναλήψεων		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Αριθμός αγωγών		0				0				0				0			

Σημείωση: Οι υπολογισμοί κελιών σχετίζονται με τις καταχωρίσεις των δεδομένων στον πίνακα 1.

Πίνακας 5

Κριτήρια ποιότητας νερού

Σύστημα έκθεσης (συνεχούς ροής νερού/στατικής ανανέωσης):
Θερμοκρασία:
Ένταση φωτός:
Κύκλος φωτός-σκοταδιού:
Τροφή:
Ρυθμός σίτισης:
pH νερού:
Συγκέντρωση ιωδίου στο νερό δοκιμής:

▼**M6**

Πίνακας 6

Συνοπτικά χημικά δεδομένα

Χημική ονομασία:																					
Αρ. Cas:																					
Ημέρα δοκιμής	Ημερομηνία	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																				
1	#Value!																				
2	#Value!																				
3	#Value!																				
4	#Value!																				
5	#Value!																				
6	#Value!																				
7	#Value!																				
8	#Value!																				
9	#Value!																				
10	#Value!																				
11	#Value!																				
12	#Value!																				
13	#Value!																				
14	#Value!																				
15	#Value!																				
16	#Value!																				
17	#Value!																				
18	#Value!																				
19	#Value!																				
20	#Value!																				
21	#Value!																				

Σημείωση: Οι υπολογισμοί κελιών σχετίζονται με τις καταχωρίσεις των δεδομένων στον πίνακα 1.

▼**M6**

Πίνακας 7

Πίνακες αναφοράς ιστοπαθολογίας για βασικά κριτήρια

Ημερομηνία: Χημική ουσία: Παθολογοανατόμος:

Αναγνωριστικό ζώου μάρτυρα – επανάληψη 1	Αναγνωριστικό ζώου μάρτυρα – επανάληψη 2	Υπερτροφία θυρεοειδούς αδένα	Ατροφία θυρεοειδούς αδένα	Υπερτροφία θυλακικών κυττάρων	Υπερπλασία θυλακικών κυττάρων
Σύνολο:					

Αναγνωριστικό δόσης ζώου – επανάληψη 1	Αναγνωριστικό δόσης ζώου – επανάληψη 2	Υπερτροφία θυρεοειδούς αδένα	Ατροφία θυρεοειδούς αδένα	Υπερτροφία θυλακικών κυττάρων	Υπερπλασία θυλακικών κυττάρων
Σύνολο:					

Αναγνωριστικό δόσης ζώου – επανάληψη 1	Αναγνωριστικό δόσης ζώου – επανάληψη 2	Υπερτροφία θυρεοειδούς αδένα	Ατροφία θυρεοειδούς αδένα	Υπερτροφία θυλακικών κυττάρων	Υπερπλασία θυλακικών κυττάρων
Σύνολο:					

Αναγνωριστικό δόσης ζώου – επανάληψη 1	Αναγνωριστικό δόσης ζώου – επανάληψη 2	Υπερτροφία θυρεοειδούς αδένα	Ατροφία θυρεοειδούς αδένα	Υπερτροφία θυλακικών κυττάρων	Υπερπλασία θυλακικών κυττάρων
Σύνολο:					

▼**M6**

Πίνακας 8

Πρόσθετα κριτήρια ιστοπαθολογίας

Ημερομηνία: Χημική ουσία: Παθολογοανατόμος:

Αναγνωριστικό ζώου μάρτυρα — επανάληψη 1		Αύξηση περιοχής θυλακικού αυλού	Μείωση περιοχής θυλακικού αυλού
Αναγνωριστικό ζώου μάρτυρα — επανάληψη 2			
Σύνολο:			

Αναγνωριστικό ζώου — επανάληψη 1		Αύξηση περιοχής θυλακικού αυλού	Μείωση περιοχής θυλακικού αυλού
Αναγνωριστικό ζώου — επανάληψη 2			
Σύνολο:			

Αναγνωριστικό δόσης ζώου — επανάληψη 1		Αύξηση περιοχής θυλακικού αυλού	Μείωση περιοχής θυλακικού αυλού
Αναγνωριστικό δόσης ζώου — επανάληψη 2			
Σύνολο:			

Αναγνωριστικό δόσης ζώου — επανάληψη 1		Αύξηση περιοχής θυλακικού αυλού	Μείωση περιοχής θυλακικού αυλού
Αναγνωριστικό δόσης ζώου — επανάληψη 2			
Σύνολο:			

▼**M6**

Πίνακας 9

Λεπτομερείς περιγραφές ιστοπαθολογικών ευρημάτων

Ημερομηνία:

Χημική ουσία:

Παθολογοανατόμος:

		Λεπτομερής περιγραφή
Αναγνωριστικό ζώου μάρτυρα – επανάληψη 1		
Αναγνωριστικό ζώου μάρτυρα – επανάληψη 2		
Αναγνωριστικό δόσης ζώου – επανάληψη 1		
Αναγνωριστικό δόσης ζώου – επανάληψη 2		

▼**M6**

Αναγνωριστικό δόσης ζώου – επανάληψη 1		
Αναγνωριστικό δόσης ζώου – επανάληψη 2		

Αναγνωριστικό δόσης ζώου – επανάληψη 1		
Αναγνωριστικό δόσης ζώου – επανάληψη 2		

▼M6

Πίνακας 10

Πρότυπο συνοπτικού πίνακα αναφοράς για την ημέρα × (7η ή 21η) της δοκιμασίας AMA

		Μάρτυρας				Δόση 1					Δόση 2					Δόση 3				
Τελικό σημείο	Επανάληψη	Μέση τιμή	SD	CV	N	Μέση τιμή	SD	CV	N	Τιμή p	Μέση τιμή	SD	CV	N	Τιμή p	Μέση τιμή	SD	CV	N	Τιμή p
Μήκος οπίσθιων άκρων (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Μέση τιμή:																			
Μήκος ρύγχους-κλοάκης (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Μέση τιμή:																			
Υγρό βάρος (mg)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Μέση τιμή:																			

02008R0440 — EL — 16.10.2019 — 008.001 — 2238

▼M6

Πίνακας 11

Πρότυπο συνοπτικού πίνακα αναφοράς για τα δεδομένα σταδίου ανάπτυξης της ημέρας × (7η ή 21η) της δοκιμασίας AMA

		Μάρτυρας				Δόση 1					Δόση 2					Δόση 3				
	Επανάληψη	Διάμεση τιμή	Ελάχ	Μέγ	N	Διάμεση τιμή	Ελάχ	Μέγ	N	Τιμή p	Διάμεση τιμή	Ελάχ	Μέγ	N	Τιμή p	Διάμεση τιμή	Ελάχ	Μέγ	Διάμεση τιμή	Τιμή p
Στάδιο ανάπτυξης	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Μέση τιμή:																			

▼M6

Προσάρτημα 3

Εναλλακτική ανάλυσή βάρους και μήκους στην περίπτωσή ανάπτυξής προχωρημένου Σταδίου σε ποσοστό άνω του 20 % των γύψινων σε μια η περισσότερες συγκεντρώσεις

Εάν ένας αυξημένος αριθμός γυρίνων παρουσιάζει ανάπτυξη πέρα από το στάδιο 60 (≥ 20 %) σε μία ή περισσότερες ονομαστικές συγκεντρώσεις, θα πρέπει να εφαρμόζεται ανάλυση ANOVA δύο παραγόντων με φωλιασμένη (εγκλωβισμένη) δομή διασποράς σε όλους τους γυρίνους ώστε να εκτιμώνται οι επιδράσεις στην ανάπτυξη εξαιτίας της αγωγής με χημικές ουσίες, λαμβάνοντας ταυτόχρονα υπόψη και την επίδραση της ανάπτυξης προχωρημένων σταδίων.

Η πρόταση συνιστά να χρησιμοποιούνται όλα τα δεδομένα αλλά να λαμβάνεται υπόψη η επίδραση της ανάπτυξης προχωρημένων σταδίων. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί με μια ανάλυση ANOVA δύο παραγόντων με φωλιασμένη (εγκλωβισμένη) δομή. Καθορίστε LateStage = «Yes» (Προχωρημένο στάδιο=Ναι) για ένα ζώο, εάν βρίσκεται στο στάδιο ανάπτυξης 61 ή άνω. Διαφορετικά, καθορίστε LateStage = «No» (Προχωρημένο στάδιο=Όχι). Στη συνέχεια, μπορεί να εφαρμοστεί ανάλυση ANOVA δύο παραγόντων με τη συγκέντρωση και το προχωρημένο στάδιο, και να γίνει η αλληλεπίδρασή τους, όπου το Rep(Conc) (Επαν. (Συγκ.)) θα είναι ένας τυχαίος παράγοντας και το Tadpole(Rep) (Γυρίνος (Επαν.)) θα είναι μια άλλη τυχαία επίδραση. Με αυτόν τον τρόπο, το rep (επανάληψη) εξακολουθεί να λαμβάνεται υπόψη ως μονάδα ανάλυσης και τα αποτελέσματα που προκύπτουν είναι ουσιαστικά ίδια με τη σταθμισμένη ανάλυση της μέσης τιμής rep*latestage (επανάληψη*προχωρημένο στάδιο), σταθμισμένης ως προς τον αριθμό των ζώων ανά μέση τιμή. Εάν τα δεδομένα παραβιάζουν τις απαιτήσεις κανονικότητας ή ομοιογένειας της διασποράς της ανάλυσης ANOVA, μπορεί να πραγματοποιηθεί κανονικοποιημένος μετασχηματισμός κατάταξης για την απομάκρυνση αυτού του περιορισμού.

Επιπλέον των τυπικών δοκιμασιών F της ANOVA για τον έλεγχο των επιδράσεων των Conc (Συγκέντρωση), LateStage (Προχωρημένο στάδιο) και των αλληλεπιδράσεων αυτών, η δοκιμασία F αλληλεπίδρασης μπορεί να «διαχωριστεί» σε δύο επιπρόσθετες δοκιμασίες F της ANOVA, μία για τις μέσες αποκρίσεις σε όλες τις συγκεντρώσεις για LateStage = «No» (Προχωρημένο στάδιο=Όχι) και μία άλλη για τις μέσες αποκρίσεις σε όλες τις συγκεντρώσεις για LateStage = «Yes» (Προχωρημένο στάδιο=Ναι). Περαιτέρω συγκρίσεις για τις μέσες τιμές των αγωγών έναντι του μάρτυρα διεξάγονται εντός κάθε επιπέδου του LateStage (Προχωρημένο στάδιο). Μπορεί να εφαρμοστεί μια ανάλυση τύπου τάσεων με τη χρήση κατάλληλων αντιθέσεων ή μπορούν να πραγματοποιηθούν απλές συγκρίσεις με ζεύγη εάν υπάρχουν ενδείξεις μη μονοτονικής σχέσης δόσης-απόκρισης εντός ενός επιπέδου της μεταβλητής LateStage (Προχωρημένο στάδιο). Διόρθωση κατά Bonferroni-Holm στις τιμές p πραγματοποιείται μόνο εάν η αντίστοιχη τομή F δεν είναι σημαντική. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί με το SAS και, πιθανόν, με άλλα στατιστικά πακέτα λογισμικού. Μπορεί να προκύψουν επιπλοκές όταν δεν υπάρχουν ζώα προχωρημένης ανάπτυξης σε μερικές συγκεντρώσεις, ωστόσο οι περιπτώσεις αυτές μπορούν να αντιμετωπιστούν με απλό τρόπο.

▼**M6**

Προσάρτημα 4

Ορισμοί

Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών

▼M6

Γ.39. ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΟΛΛΕΜΒΟΛΩΝ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 232 του ΟΟΣΑ (2009). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι σχεδιασμένη για την εκτίμηση των επιδράσεων χημικών ουσιών στην αναπαραγωγική απόδοση των κολλεμβόλων στο έδαφος. Βασίζεται σε υφιστάμενες διαδικασίες (1) (2). Το *Folsomia candida* που αναπαράγεται με παρθενογένεση και το *Folsomia fimetaria* που αναπαράγεται σεξουαλικά είναι δύο από τα πιο προσιτά είδη κολλεμβόλων και είναι καλλιεργήσιμα και διαθέσιμα στην αγορά. Όταν χρειάζεται να γίνει εκτίμηση ειδικών οικοτόπων στους οποίους δεν διαβιώνουν αυτά τα δύο είδη, η διαδικασία μπορεί να εφαρμοστεί και σε άλλα είδη κολλεμβόλων, εάν πληρούν τα κριτήρια εγκυρότητας της δοκιμής.

2. Τα κολλέμβολα που διαβιούν στο έδαφος είναι κατάλληλα είδη από οικολογικής άποψης για οικοτοξικολογικές δοκιμές. Τα κολλέμβολα είναι εξάποδα με λεπτό εξωσκελετό που παρουσιάζει υψηλή διαπερατότητα από τον αέρα και το νερό, τα οποία αντιπροσωπεύουν είδη αρθροπόδων με διαφορετική οδό και διαφορετικό ρυθμό έκθεσης σε σύγκριση με τους γαιοσκώληκες και τους λευκοσκώληκες.

3. Σε πολλά χερσαία οικοσυστήματα, οι πυκνότητες πληθυσμών των κολλεμβόλων συχνά φθάνουν την τιμή 10^5 m^{-2} στο έδαφος και στην απορριμματική στιβάδα (3) (4). Το μέγεθος των ενήλικων ατόμων, κατά κανόνα, κυμαίνεται μεταξύ 0,5 και 5 mm, ενώ η συνεισφορά τους στην ολική ζωική βιομάζα του εδάφους και στον ρυθμό αναπνοής βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα που εκτιμώνται μεταξύ 1 % και 5 % (5). Επομένως, ο σημαντικότερος ρόλος τους ενδεχομένως είναι η δυνητική ρύθμιση διαδικασιών μέσω της θηρευτικής τους δράσης σε μικροοργανισμούς και στη μικροχλωρίδα. Τα κολλέμβολα αποτελούν θηράματα για ένα ευρύ φάσμα ενδόγειων και επίγειων ασπόνδυλων, όπως ακάρεα, χιλιόποδα, αράχνες, εδαφικά κολεόπτερα της οικογένειας Carabidae και κανθάρους της οικογένειας Staphylinidae. Τα κολλέμβολα συνεισφέρουν στις διαδικασίες αποσύνθεσης σε όξινα εδάφη, όπου ενδέχεται να είναι τα σημαντικότερα ασπόνδυλα εδάφους εκτός από τους λευκοσκώληκες, καθώς, κατά κανόνα, στα εδάφη αυτά δεν υπάρχουν γαιοσκώληκες και διπλόποδα.

4. Το είδος *F. fimetaria* απαντάται σε ολόκληρο τον κόσμο και αποτελεί κοινό είδος σε αρκετούς τύπους εδαφών, από αμμώδη έως αργιλώδη εδάφη και από εδάφη τύπου mull (ενδοχούμος) έως εδάφη τύπου mor (εκτοχούμος). Πρόκειται για ένα κολλέμβολο χωρίς μάτια και χωρίς χρωματισμό. Έχει καταγραφεί σε καλλιεργούμενα εδάφη σε όλη την Ευρώπη (6). Είναι παμφάγο και στην τροφή του συμπεριλαμβάνονται υφές των νηματοειδών μυκήτων, βακτήρια, πρωτόζωα και νεκρή ύλη. Μέσω της βοσκής, αλληλεπιδρά με λοιμώξεις προκαλούμενες από φυτοπαθογόνους μύκητες (7) και μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη μυκόρριζας, όπως είναι γνωστό ότι ισχύει για το *F. candida*. Όπως συμβαίνει στα περισσότερα είδη κολλεμβόλων, αναπαράγεται σεξουαλικά, ενώ απαιτείται η μόνιμη παρουσία των αρσενικών για τη γονιμοποίηση των αυγών.

5. Το είδος *F. candida* επίσης απαντάται σε ολόκληρο τον κόσμο. Παρότι δεν είναι κοινό είδος στα περισσότερα φυσικά εδάφη, υπάρχει συχνά σε πολύ μεγάλους αριθμούς σε τοποθεσίες πλούσιες σε χούμο. Πρόκειται για ένα κολλέμβολο χωρίς μάτια και χωρίς χρωματισμό. Διαθέτει καλά αναπτυγμένο όργανο αναπήδησης (furca) και δραστήρια κίνηση τρεξίματος και εάν δεχθεί ενόχληση αναπηδά με ευκολία. Ο οικολογικός ρόλος του είδους *F. candida* είναι παρόμοιος με αυτόν του είδους *F. fimetaria*, αλλά οι οικότοποί του είναι εδάφη πιο πλούσια σε οργανικές ενώσεις. Αναπαράγεται με παρθενογένεση. Ο αριθμός των αρσενικών ειδών μπορεί να είναι μικρότερος από 1 στα χίλια.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

6. Ενήλικα (*F. fimetaria*) ή νεαρά (*F. candida*) άτομα κολλεμβόλων συγχρονισμένης ανάπτυξης εκτίθενται σε ένα εύρος συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που έχει αναμιχθεί σε τροποποιημένο τεχνητό έδαφος (8) με περιεκτικότητα σε οργανική ύλη της τάξης του 5 % (ή σε εναλλακτικό έδαφος). Το σενάριο της δοκιμής μπορεί να χωριστεί σε δύο βήματα:

   — Δοκιμή καθορισμού εύρους, σε περίπτωση που δεν υπάρχουν επαρκείς πληροφορίες σχετικά με την τοξικότητα, κατά την οποία η θνησιμότητα

▼M6

και η αναπαραγωγή αποτελούν τα κύρια τελικά σημεία που εκτιμώνται μετά από 2 εβδομάδες για το *F. fimetaria* και 3 εβδομάδες για το *F. candida*.

— Οριστική δοκιμή αναπαραγωγής, κατά την οποία εκτιμάται ο συνολικός αριθμός των νεαρών ατόμων που προήλθαν από μητρικά ζώα, καθώς και η επιβίωση των μητρικών ζώων. Η διάρκεια αυτής της οριστικής δοκιμής είναι 3 εβδομάδες για το *F. fimetaria* ή 4 εβδομάδες για το *F. candida*.

Η τοξική επίδραση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στη θνησιμότητα και την αναπαραγωγική απόδοση των ενήλικων ατόμων εκφράζεται ως LC_x και EC_x με προσαρμογή των δεδομένων σε ένα κατάλληλο μοντέλο μέσω μη γραμμικής παλινδρόμησης προκειμένου να υπολογιστεί η συγκέντρωση που θα προκαλούσε x % θνησιμότητα ή μείωση στην αναπαραγωγική απόδοση, αντίστοιχα, ή εναλλακτικά ως τιμή NOEC (συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρούνται επιδράσεις)/LOEC (κατώτατη συγκέντρωση παρατηρούμενων επιδράσεων) (9).

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

7. Οι φυσικές ιδιότητες, η υδατοδιαλυτότητα, η τιμή log K_{ow}, ο συντελεστής κατανομής νερού στο έδαφος και η τάση ατμών της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει, κατά προτίμηση, να είναι γνωστά. Πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με την πορεία της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο έδαφος, όπως ο ρυθμός φωτόλυσης και υδρόλυσης και η βιοτική αποδόμηση, είναι επιθυμητές. Η χημική ταυτοποίηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σύμφωνα με την ονοματολογία IUPAC, ο αριθμός CAS, ο αριθμός φορτίου, ο αριθμός παρτίδας, ο συντακτικός τύπος και η καθαρότητα θα πρέπει να τεκμηριώνονται όταν είναι διαθέσιμα.

8. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών μπορεί να χρησιμοποιείται για χημικές ουσίες διαλυτές ή αδιάλυτες στο νερό. Ωστόσο, ο τρόπος εφαρμογής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα διαφέρει ανάλογα. Η μέθοδος δοκιμών δεν εφαρμόζεται σε πτητικές χημικές ουσίες, δηλ. χημικές ουσίες για τις οποίες η σταθερά του Henry ή ο συντελεστής κατανομής αέρα/νερού έχει τιμή μεγαλύτερη από ένα, ή χημικές ουσίες για τις οποίες η τάση ατμών υπερβαίνει την τιμή 0,0133 Pa στους 25 °C.

ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

9. Για να θεωρείται έγκυρο ένα αποτέλεσμα της δοκιμής, θα πρέπει να πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια στους μη κατεργασμένους μάρτυρες:

— Η μέση θνησιμότητα των ενήλικων ατόμων δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 20 % στο τέλος της δοκιμής,

— Ο μέσος αριθμός των νεαρών ατόμων ανά δοχείο θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 100 στο τέλος της δοκιμής,

— Ο υπολογισμένος συντελεστής μεταβλητότητας για τον αριθμό των νεαρών ατόμων θα πρέπει να είναι μικρότερος από 30 % στο τέλος της οριστικής δοκιμής.

ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

10. Μια χημική ουσία αναφοράς θα πρέπει να ελέγχεται στη συγκέντρωση EC_{50} για τον επιλεγμένο τύπο εδάφους της δοκιμής είτε σε τακτικά διαστήματα είτε πιθανώς στο πλαίσιο κάθε εκτέλεσης της δοκιμής, προκειμένου να επιβεβαιώνεται ότι η απόκριση των οργανισμών της δοκιμής στο σύστημα δοκιμής βρίσκεται εντός του φυσιολογικού επιπέδου. Μια κατάλληλη χημική ουσία αναφοράς είναι το βορικό οξύ, το οποίο αναμένεται να μειώνει την αναπαραγωγή κατά 50 % (10) (11) σε περίπου 100 mg/kg ξηρού βάρους εδάφους και για τα δύο είδη.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Δοχεία και εξοπλισμός δοκιμής

11. Περιέκτες με χωρητικότητα 30 g υγρού εδάφους αποτελούν κατάλληλα δοχεία δοκιμής. Το υλικό θα πρέπει να είναι γυαλί ή αδρανές πλαστικό (μη τοξικό). Ωστόσο, θα πρέπει να αποφεύγεται η χρήση πλαστικών περιεκτών εάν η έκθεση της χημικής ουσίας είναι μειωμένη εξαιτίας της ρόφησης. Τα δοχεία δοκιμής θα πρέπει να διαθέτουν μια επιφάνεια εγκάρσιας

▼M6

διατομής που επιτρέπει πραγματικό βάθος εδάφους εντός του δοχείου δοκιμής 2-4 cm. Τα δοχεία θα πρέπει να διαθέτουν καπάκια (π.χ. γυάλινα ή πολυαιθυλενίου) σχεδιασμένα να μειώνουν την εξάτμιση νερού και ταυτόχρονα να επιτρέπουν την ανταλλαγή αερίων μεταξύ του εδάφους και της ατμόσφαιρας. Ο περιέκτης θα πρέπει να είναι τουλάχιστον μερικώς διαφανής για να επιτρέπεται η διαπερατότητα από το φως.

12. Απαιτείται συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός και ειδικότερα τα εξής:

— θάλαμος ξηράνσεως,

— στερεοσκοπικό μικροσκόπιο,

— πεχάμετρο και λουξόμετρο,

— κατάλληλοι ζυγοί ακριβείας,

— κατάλληλος εξοπλισμός για τον έλεγχο της θερμοκρασίας,

— κατάλληλος εξοπλισμός για τον έλεγχο της υγρασίας του αέρα (δεν απαιτείται εάν τα δοχεία έκθεσης είναι καλυμμένα με καπάκια),

— επωαστήρας ή μικρό δωμάτιο ελεγχόμενης θερμοκρασίας,

— λαβίδα ή συσκευή ροής αέρα χαμηλής αναρρόφησης.

Προετοιμασία του εδάφους δοκιμής

13. Χρησιμοποιείται τροποποιημένο τεχνητό έδαφος (8) με περιεκτικότητα σε οργανική ύλη της τάξης του 5 %. Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιείται φυσικό έδαφος, επειδή το τεχνητό έδαφος δεν προσομοιάζει στα φυσικά εδάφη. Η συνιστώμενη σύνθεση του τεχνητού εδάφους είναι η εξής (βάσει ξηρών βαρών, όπου το υλικό έχει αποξηρανθεί στους 105 °C για την επίτευξη σταθερού βάρους):

— 5 % τύρφης σφάγνων, αερόξηρης και λεπτοαλεσμένης (μέγεθος σωματιδίων 2 ± 1 mm είναι αποδεκτό),

— 20 % καολινιτικής αργίλου (περιεκτικότητα σε καολινίτη, κατά προτίμηση, άνω του 30 %),

— περίπου 74 % αερόξηρης βιομηχανικής άμμου (ανάλογα με την ποσότητα $CaCO_3$ που απαιτείται), όπου επικρατεί η λεπτή άμμος με ποσοστό σωματιδίων μεγέθους μεταξύ 50 και 200 μικρά πάνω από 50 %. Η ακριβής ποσότητα της άμμου εξαρτάται από την ποσότητα του $CaCO_3$ (βλ. παρακάτω), μαζί θα πρέπει να ισούνται με 75 %,

— 1,0 % ανθρακικού ασβεστίου ($CaCO_3$, κονιοποιημένο, αναλυτικής καθαρότητας) για την επίτευξη pH 6,0 ± 0,5. Η ποσότητα του ανθρακικού ασβεστίου που πρέπει να προστεθεί ενδέχεται να εξαρτάται κυρίως από την ποιότητα/φύση της τύρφης (βλ. σημείωση 1).

Σημείωση 1: Η ποσότητα του απαιτούμενου $CaCO_3$ θα εξαρτάται από τα συστατικά του υπεδάφους και θα πρέπει να προσδιορίζεται με μέτρηση του pH επιμέρους δειγμάτων υγρού εδάφους που έχουν υποστεί προεπώαση αμέσως πριν από τη δοκιμή.

Σημείωση 2: Συνιστάται η μέτρηση του pH και προαιρετικά της αναλογίας C/N, της ικανότητας ανταλλαγής κατιόντων (CEC) και της περιεκτικότητας του εδάφους σε οργανική ύλη, για να είναι δυνατή η κανονικοποίηση σε μεταγενέστερο στάδιο και για την καλύτερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Σημείωση 3: Εάν απαιτείται, π.χ. για συγκεκριμένους σκοπούς δοκιμής, φυσικά εδάφη που προέρχονται από μη ρυπασμένες τοποθεσίες μπορούν να χρησιμεύσουν επίσης ως υπόστρωμα δοκιμής ή/και καλλιέργειας. Ωστόσο, εάν χρησιμοποιείται φυσικό έδαφος, θα πρέπει να χαρακτηρίζεται τουλάχιστον βάσει της προέλευσης (τόπος συλλογής), του pH, της υφής (κατανομή μεγέθους σωματιδίων), της CEC και της περιεκτικότητας σε οργανική ύλη, και θα πρέπει είναι απαλλαγμένο από τυχόν μόλυνση. Για φυσικό έδαφος, συνιστάται να αποδεικνύεται ότι είναι κατάλληλο για τη δοκιμή και ότι πληροί τα κριτήρια εγκυρότητας της δοκιμής πριν από τη χρήση του σε μια οριστική δοκιμή.

▼M6

14. Τα ξηρά συστατικά του εδάφους αναμιγνύονται επιμελώς (π.χ. σε εργαστηριακό αναμείκτη μεγάλης κλίμακας). Η μέγιστη υδατοχωρητικότητα (WHC) του τεχνητού εδάφους προσδιορίζεται σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφονται στο προσάρτημα 5. Η περιεκτικότητα σε υγρασία του εδάφους δοκιμής θα πρέπει να βελτιστοποιείται για την επίτευξη μιας χαλαρής πορώδους δομής εδάφους που επιτρέπει την είσοδο των κολλεμβόλων εντός των πόρων. Αυτή συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 40 και 60 % της μέγιστης WHC.

15. Το ξηρό τεχνητό έδαφος υγραίνεται εκ των προτέρων με την προσθήκη επαρκούς ποσότητας απιονισμένου νερού ώστε να επιτυγχάνεται περίπου το ήμισυ της τελικής περιεκτικότητας σε νερό 2-7 ημέρες πριν από την έναρξη της δοκιμής, για την εξισορρόπηση/σταθεροποίηση της οξύτητας. Για τον προσδιορισμό του pH, χρησιμοποιείται μείγμα εδάφους και διαλύματος χλωριούχου καλίου (KCl) 1 M ή χλωριούχου ασβεστίου ($CaCl_2$) 0,01 M, σε αναλογία 1:5 (σύμφωνα με το προσάρτημα 6). Εάν το έδαφος είναι περισσότερο όξινο από το απαιτούμενο εύρος, μπορεί να ρυθμιστεί με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας $CaCO_3$. Εάν το έδαφος είναι πολύ αλκαλικό, μπορεί να ρυθμιστεί με την προσθήκη ενός ανόργανου οξέος που δεν είναι επιβλαβές για τα κολλέμβολα.

16. Το έδαφος, που έχει προηγουμένως υγρανθεί, χωρίζεται σε μέρη αντίστοιχα με τον αριθμό των συγκεντρώσεων της δοκιμής (και των χημικών ουσιών αναφοράς, κατά περίπτωση) και των μαρτύρων που χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες προστίθενται και η περιεκτικότητα σε νερό ρυθμίζεται σύμφωνα με την παράγραφο 24.

Επιλογή και προετοιμασία των ζώων δοκιμής

17. Το *F. candida* που αναπαράγεται με παρθενογένεση αποτελεί το συνιστώμενο είδος, επειδή στις κυκλικές δοκιμές επικύρωσης της μεθόδου δοκιμών (11) το είδος αυτό ικανοποιούσε τα κριτήρια εγκυρότητας για επιβίωση πιο συχνά από το *F. fimetaria*. Εάν χρησιμοποιηθεί εναλλακτικό είδος, θα πρέπει να πληροί τα κριτήρια εγκυρότητας που περιγράφονται στην παράγραφο 9. Κατά την έναρξη της δοκιμής, τα ζώα θα πρέπει να τρέφονται καλά και να είναι ηλικίας μεταξύ 23 και 26 ημερών για το *F. fimetaria* και μεταξύ 9 και 12 ημερών για το *F. candida*. Για κάθε επανάληψη, ο αριθμός των ατόμων του *F. fimetaria* θα πρέπει να είναι 10 αρσενικά και 10 θηλυκά, και για το *F. candida* θα πρέπει να χρησιμοποιούνται 10 θηλυκά (βλ. προσάρτημα 2 και προσάρτημα 3). Ζώα συγχρονισμένης ανάπτυξης επιλέγονται τυχαία από τα τρυβλία και γίνεται έλεγχος της υγείας και της σωματικής τους κατάστασης για κάθε παρτίδα που προστίθεται στην επανάληψη. Κάθε ομάδα των 10/20 ατόμων προστίθεται σε τυχαία επιλεγμένο περιέκτη δοκιμής και επιλέγονται τα θηλυκά μεγάλου μεγέθους του *F. fimetaria* για να διασφαλιστεί η ορθή διάκρισή τους από τα αρσενικά του *F. fimetaria*.

Παρασκευή των συγκεντρώσεων δοκιμής

18. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν τέσσερις μέθοδοι εφαρμογής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας: 1) ανάμιξη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μέσα στο έδαφος με το νερό ως φορέα, 2) ανάμιξη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μέσα στο έδαφος με έναν οργανικό διαλύτη ως φορέα, 3) ανάμιξη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μέσα στο έδαφος με άμμο ως φορέα ή 4) εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην επιφάνεια του εδάφους. Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά της χημικής ουσίας και τον σκοπό της δοκιμής. Σε γενικές γραμμές, συνιστάται η μέθοδος ανάμιξης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μέσα στο έδαφος. Ωστόσο, ενδέχεται να απαιτούνται διαδικασίες εφαρμογής που συνάδουν με την πρακτική χρήση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (π.χ. ψεκασμός υγρής σύνθεσης ή χρήση ειδικών συνθέσεων φυτοφαρμάκων, όπως κοκκία ή σποροαπολυμαντικά). Το έδαφος υφίσταται κατεργασία πριν από την προσθήκη των κολλεμβόλων, εκτός από την περίπτωση όπου η υπό δοκιμή χημική ουσία προστίθεται στην επιφάνεια του εδάφους, κατά την οποία τα κολλέμβολα θα πρέπει να εισέλθουν στο έδαφος πριν από την κατεργασία του εδάφους.

Υδατοδιαλυτή υπό δοκιμή χημική ουσία

19. Παρασκευάζεται ένα διάλυμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε απιονισμένο νερό, σε ποσότητα που επαρκεί για όλες τις επαναλήψεις μίας συγκέντρωσης δοκιμής. Κάθε διάλυμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας αναμιγνύεται επιμελώς με μία παρτίδα εδάφους που έχει υγρανθεί προηγουμένως, προτού εισαχθεί μέσα στο δοχείο δοκιμής.

Μη υδατοδιαλυτή υπό δοκιμή χημική ουσία

20. Για χημικές ουσίες που είναι αδιάλυτες στο νερό, αλλά διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες, η υπό δοκιμή χημική ουσία μπορεί να διαλυθεί στον

▼M6

μικρότερο δυνατό όγκο ενός κατάλληλου διαλύτη (π.χ. ακετόνη), διασφαλίζοντας πάντα τη σωστή ανάμιξη της χημικής ουσίας στο έδαφος και αναμιγνύοντάς την με το απαιτούμενο μέρος χαλαζιακής άμμου. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο πτητικοί διαλύτες. Όταν χρησιμοποιείται οργανικός διαλύτης, όλες οι συγκεντρώσεις δοκιμής και ένας πρόσθετος αρνητικός μάρτυρας του διαλύτη θα πρέπει να περιέχουν την ίδια ελάχιστη ποσότητα του διαλύτη. Οι περιέκτες της εφαρμογής θα πρέπει να μένουν χωρίς καπάκι για ορισμένο χρονικό διάστημα, ώστε να εξατμίζεται ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, διασφαλίζοντας, ωστόσο, την αποφυγή διάχυσης της τοξικής χημικής ουσίας κατά το διάστημα αυτό.

Υπό δοκιμή χημική ουσία ασθενώς διαλυτή στο νερό και σε οργανικούς διαλύτες

21. Για χημικές ουσίες που είναι ασθενώς διαλυτές στο νερό και σε οργανικούς διαλύτες, γίνεται ανάμειξη χαλαζιακής άμμου, η οποία θα πρέπει να αποτελεί μέρος της ολικής άμμου που προστίθεται στο έδαφος, με την ποσότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας για την επίτευξη της επιθυμητής συγκέντρωσης δοκιμής. Αυτό το μείγμα χαλαζιακής άμμου και υπό δοκιμή χημικής ουσίας προστίθεται στο έδαφος που έχει προηγουμένως υγρανθεί και αναμειγνύεται πλήρως μετά την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας απιονισμένου νερού για να εξασφαλιστεί η απαιτούμενη περιεκτικότητα σε υγρασία. Το τελικό μείγμα κατανέμεται μεταξύ των δοχείων δοκιμής. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για κάθε συγκέντρωση δοκιμής και προετοιμάζεται επίσης ένας κατάλληλος μάρτυρας.

Εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην επιφάνεια του εδάφους

22. Όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι ένα φυτοφάρμακο, ενδεχομένως να είναι σκόπιμη η εφαρμογή της επάνω στην επιφάνεια του εδάφους με ψεκασμό. Το έδαφος υφίσταται κατεργασία μετά την προσθήκη των κολλεμβόλων. Οι περιέκτες δοκιμής αρχικά πληρώνονται με το υγρό υπέδαφος, στη συνέχεια προστίθενται τα ζώα και μετά ζυγίζονται οι περιέκτες δοκιμής. Προκειμένου να αποφεύγεται τυχόν άμεση έκθεση των ζώων στην υπό δοκιμή χημική ουσία μέσω άμεσης επαφής, η εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας γίνεται τουλάχιστον μισή ώρα μετά την εισαγωγή των κολλεμβόλων. Η υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να εφαρμόζεται στην επιφάνεια του εδάφους όσο το δυνατόν πιο ομοιογενώς, με τη χρήση κατάλληλης συσκευής ψεκασμού εργαστηριακής κλίμακας για την προσομοίωση του ψεκασμού στο χωράφι. Η εφαρμογή θα πρέπει να πραγματοποιείται σε θερμοκρασία με διακυμάνσεις της τάξης του ± 2 °C, ενώ εάν πρόκειται για υδατικά διαλύματα, γαλακτώματα ή παρασκευάσματα διασποράς, ο ρυθμός εφαρμογής νερού θα πρέπει να συμφωνεί με τις συστάσεις εκτίμησης κινδύνου. Ο ρυθμός θα πρέπει να επαληθεύεται με τη χρήση κατάλληλης τεχνικής βαθμονόμησης. Ειδικές συνθέσεις, όπως κοκκία ή σποροαπολυμαντικά, μπορούν να εφαρμόζονται με τρόπο ο οποίος συνάδει με τη γεωργική χρήση. Η προσθήκη της τροφής πραγματοποιείται μετά τον ψεκασμό.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Συνθήκες δοκιμής

23. Η μέση θερμοκρασία δοκιμής θα πρέπει να είναι 20 ± 1 °C με εύρος θερμοκρασίας 20 ± 2 °C. Η δοκιμή διεξάγεται υπό ελεγχόμενους κύκλους φωτός-σκοταδιού (κατά προτίμηση, 12 ώρες φως και 12 ώρες σκοτάδι) με φωτεινή ισχύ 400 έως 800 lux στην περιοχή των δοχείων δοκιμής.

24. Προκειμένου να ελέγχεται η υγρασία του εδάφους, τα δοχεία ζυγίζονται στην αρχή, στη μέση και στο τέλος της δοκιμής. Μια μείωση βάρους > 2 % αναπληρώνεται με την προσθήκη απιονισμένου νερού. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι η απώλεια νερού μπορεί να περιοριστεί εάν διατηρείται υψηλή υγρασία αέρα (> 80 %) στον επωαστήρα της δοκιμής.

25. Το pH θα πρέπει να μετράται στην αρχή και στο τέλος τόσο της δοκιμής καθορισμού εύρους όσο και της οριστικής δοκιμής. Μετρήσεις θα πρέπει να πραγματοποιούνται και σε ένα πρόσθετο δείγμα μάρτυρα, καθώς και σε ένα πρόσθετο δείγμα από τα δείγματα εδάφους που έχουν υποστεί κατεργασία (όλες οι συγκεντρώσεις), τα οποία θα έχουν παρασκευαστεί και διατηρηθεί με τον ίδιο τρόπο όπως οι καλλιέργειες δοκιμής, αλλά χωρίς την προσθήκη κολλεμβόλων.

Διαδικασία δοκιμής και μετρήσεις

26. Για κάθε συγκέντρωση δοκιμής, μια ποσότητα του εδάφους δοκιμής που αντιστοιχεί σε 30 g υγρού βάρους τοποθετείται μέσα στο δοχείο δοκιμής.

▼M6

Παρασκευάζονται επίσης μάρτυρες νερού, χωρίς την υπό δοκιμή χημική ουσία. Εάν χρησιμοποιείται φορέας για την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, θα πρέπει να εκτελεστεί μία σειρά μάρτυρα που περιέχει μόνο τον φορέα, επιπλέον της σειράς δοκιμής. Η συγκέντρωση του διαλύτη ή του προσθέτου διασποράς θα πρέπει να είναι ίδια με την αντίστοιχη στα δοχεία δοκιμής που περιέχουν την υπό δοκιμή χημική ουσία.

27. Κάθε κολλέμβολο μεταφέρεται προσεκτικά σε δοχείο δοκιμής (τυχαία κατανομή στα δοχεία δοκιμής) και τοποθετείται στην επιφάνεια του εδάφους. Για την αποτελεσματική μεταφορά των ζώων, μπορεί να χρησιμοποιείται συσκευή ροής αέρα χαμηλής αναρρόφησης. Ο αριθμός των επαναλήψεων για τις συγκεντρώσεις δοκιμής και τους μάρτυρες εξαρτάται από τον σχεδιασμό της δοκιμής που χρησιμοποιείται. Τα δοχεία δοκιμής τοποθετούνται τυχαία στον επωαστήρα της δοκιμής και οι θέσεις αυτές αλλάζουν τυχαία εβδομαδιαίως.

28. Για τη δοκιμή του *F. fimetaria*, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται είκοσι ενήλικα άτομα, 10 αρσενικά και 10 θηλυκά, ηλικίας 23 έως 26 ημερών σε κάθε δοχείο δοκιμής. Την 21η ημέρα, τα κολλέμβολα εκχυλίζονται από το έδαφος και καταμετρώνται. Για το *F. fimetaria,* γίνεται διάκριση του φύλου από το μέγεθος στη συγχρονισμένη παρτίδα ζώων που χρησιμοποιείται για τη δοκιμή. Τα θηλυκά άτομα είναι σαφώς μεγαλύτερα σε μέγεθος από τα αρσενικά (βλ. προσάρτημα 3)

29. Για τη δοκιμή του *F. candida*, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται δέκα νεαρά άτομα ηλικίας 9 έως 12 ημερών σε κάθε δοχείο δοκιμής. Την 28η ημέρα, τα κολλέμβολα εκχυλίζονται από το έδαφος και καταμετρώνται.

30. Ως κατάλληλη πηγή τροφής, προστίθεται σε κάθε περιέκτη στην αρχή της δοκιμής και μετά από περίπου 2 εβδομάδες επαρκής ποσότητα, π.χ. 2-10 mg, κοκκοποιημένης ξηρής ζύμης αρτοποιίας, που διατίθεται στην αγορά για οικιακή χρήση.

31. Στο τέλος της δοκιμής, γίνεται εκτίμηση της θνησιμότητας και της αναπαραγωγής. Μετά από 3 εβδομάδες (*F. fimetaria*) ή 4 εβδομάδες (*F. candida*), τα κολλέμβολα εκχυλίζονται από το έδαφος δοκιμής (βλ. προσάρτημα 4) και καταμετρώνται (12). Ένα κολλέμβολο καταγράφεται ως νεκρό, εάν δεν υπάρχει στο εκχύλισμα. Η μέθοδος εκχύλισης και καταμέτρησης θα πρέπει να επικυρώνεται. Η εγκυρότητα προϋποθέτει αποδοτικότητα εκχύλισης των νεαρών ατόμων μεγαλύτερη από 95 %, π.χ. με την προσθήκη γνωστού αριθμού στο έδαφος.

32. Μια πρακτική σύνοψη και ένα χρονοδιάγραμμα της διαδικασίας δοκιμής περιγράφονται στο προσάρτημα 2.

Σχεδιασμός της δοκιμής

Δοκιμή καθορισμού εύρους

33. Όταν είναι αναγκαίο, εκτελείται μια δοκιμή καθορισμού εύρους, για παράδειγμα πέντε συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας της τάξεως του 0,1, 1,0, 10, 100 και 1 000 mg/kg ξηρού βάρους εδάφους και δύο επαναλήψεις για κάθε αγωγή και μάρτυρα. Πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με τη θνησιμότητα ή την αναπαραγωγή των κολλεμβόλων, από δοκιμές με παρόμοιες χημικές ουσίες ή από τη βιβλιογραφία, μπορεί επίσης να είναι χρήσιμες για να αποφασιστεί το εύρος των συγκεντρώσεων που θα χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή καθορισμού εύρους.

34. Η διάρκεια της δοκιμής καθορισμού εύρους είναι δύο εβδομάδες για το *F. fimetaria* και 3 εβδομάδες για το *F. candida* ώστε να διασφαλίζεται ότι έχει παραχθεί μία σειρά νεαρών ατόμων. Στο τέλος της δοκιμής, γίνεται εκτίμηση της θνησιμότητας και της αναπαραγωγής των κολλεμβόλων. Θα πρέπει να καταγράφονται ο αριθμός των ενήλικων ατόμων και η εμφάνιση νεαρών ατόμων.

Οριστική δοκιμή

35. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης EC_x (π.χ. EC_{10}, EC_{50}), θα πρέπει να ελέγχονται δώδεκα συγκεντρώσεις. Συνιστάται η χρήση τουλάχιστον δύο επαναλήψεων για κάθε αγωγή με τη συγκέντρωση δοκιμής και έξι επαναλήψεις μαρτύρων. Ο παράγοντας κλιμάκωσης ενδέχεται να διαφέρει ανάλογα με τη σχέση δόσης-απόκρισης.

▼M6

36. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης στην οποία δεν παρατηρείται επίδραση (NOEC)/της κατώτατης συγκέντρωσης παρατηρούμενης επίδρασης (LOEC), θα πρέπει να ελέγχονται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις σε γεωμετρική σειρά. Συνιστάται η χρήση τεσσάρων επαναλήψεων για κάθε αγωγή με τη συγκέντρωση δοκιμής και οκτώ μαρτύρων. Ο παράγοντας κλιμάκωσης των συγκεντρώσεων δεν θα πρέπει να υπερβαίνει την τιμή 1,8.

37. Με μια συνδυασμένη προσέγγιση είναι δυνατός ο προσδιορισμός τόσο της συγκέντρωσης στην οποία δεν παρατηρείται επίδραση (NOEC)/της κατώτατης συγκέντρωσης παρατηρούμενης επίδρασης (LOEC) όσο και της συγκέντρωσης ECx. Για την εν λόγω συνδυασμένη προσέγγιση, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οκτώ συγκεντρώσεις αγωγής σε γεωμετρική σειρά. Συνιστάται η χρήση τεσσάρων επαναλήψεων για κάθε αγωγή και οκτώ μαρτύρων. Ο παράγοντας κλιμάκωσης των συγκεντρώσεων δεν θα πρέπει να υπερβαίνει την τιμή 1,8.

38. Εάν δεν παρατηρηθεί καμία επίδραση στην υψηλότερη συγκέντρωση με τη δοκιμή καθορισμού εύρους (δηλ. 1 000 mg/kg), μπορεί να διεξαχθεί η δοκιμή αναπαραγωγής ως οριακή δοκιμή, με τη χρήση μιας συγκέντρωσης δοκιμής των 1 000 mg/kg και του μάρτυρα. Μια οριακή δοκιμή θα προσφέρει την ευκαιρία να αποδειχθεί ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές επιδράσεις στην οριακή συγκέντρωση. Για το έδαφος που έχει υποστεί κατεργασία και για τον μάρτυρα, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οκτώ επαναλήψεις.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

39. Η αναπαραγωγική απόδοση είναι το κύριο τελικό σημείο (π.χ. ο αριθμός των νεαρών ατόμων που παράγονται ανά δοχείο δοκιμής). Η στατιστική ανάλυση, π.χ. διαδικασίες ANOVA, συγκρίνει τις αγωγές μέσω της δοκιμασίας t του Student, της δοκιμασίας Dunnett ή της δοκιμασίας William. Υπολογίζονται τα διαστήματα εμπιστοσύνης 95 % για τις μέσες τιμές των μεμονωμένων αγωγών.

40. Ο αριθμός των επιβιωσάντων ενήλικων ατόμων στην ομάδα των μαρτύρων που δεν υποβλήθηκε σε κατεργασία αποτελεί σημαντικό κριτήριο εγκυρότητας και θα πρέπει να τεκμηριώνεται. Όπως και στη δοκιμή καθορισμού εύρους, όλες οι άλλες επιβλαβείς ενδείξεις θα πρέπει να αναφέρονται και στην τελική έκθεση.

LC_x και EC_x

41. Οι τιμές ECx, συμπεριλαμβανομένων των αντίστοιχων κατώτατων και ανώτατων ορίων εμπιστοσύνης 95 % για την παράμετρο, υπολογίζονται με χρήση κατάλληλων στατιστικών μεθόδων (π.χ. λογιστική κατανομή ή συνάρτηση Weibull, σταθμισμένη μέθοδος Spearman-Karber ή απλή παρεμβολή). Λαμβάνεται μια τιμή EC_x με εισαγωγή μιας τιμής που αντιστοιχεί στο x % της μέσης τιμής του μάρτυρα στην εξίσωση που προκύπτει. Για να υπολογιστεί η τιμή EC_{50} ή οποιαδήποτε άλλη τιμή EC_x, το πλήρες σύνολο δεδομένων θα πρέπει να υποβάλλεται σε ανάλυση παλινδρόμησης. Η τιμή LC_{50} συνήθως υπολογίζεται με ανάλυση πιθανοτήτων ή παρόμοια ανάλυση που λαμβάνει υπόψη τα δεδομένα θνησιμότητας που ακολουθούν διωνυμική κατανομή.

NOEC/LOEC

42. Εάν μια στατιστική ανάλυση αποσκοπεί στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης στην οποία δεν παρατηρείται επίδραση (NOEC)/της κατώτατης συγκέντρωσης παρατηρούμενης επίδρασης (LOEC), απαιτούνται στατιστικά στοιχεία ανά δοχείο (το κάθε δοχείο θεωρείται επανάληψη). Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες στατιστικές μέθοδοι σύμφωνα με το έγγραφο 54 του ΟΟΣΑ, Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application (Τρέχουσες προσεγγίσεις στη στατιστική ανάλυση των δεδομένων οικοτοξικότητας: Οδηγός εφαρμογής) (9). Σε γενικές γραμμές, οι δυσμενείς επιδράσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε σύγκριση με τον μάρτυρα διερευνώνται με χρήση της μονόπλευρης δοκιμασίας υποθέσεων με $p \leq 0,05$.

43. Η κανονική κατανομή και η ομοιογένεια της διασποράς μπορούν να ελέγχονται με τη χρήση κατάλληλης στατιστικής δοκιμασίας, π.χ. δοκιμασία Shapiro-Wilk και δοκιμασία Levene, αντίστοιχα ($p \leq 0,05$). Μπορεί να

▼M6

διεξαχθεί μονόδρομη ανάλυση της διασποράς (ANOVA) και επακόλουθες δοκιμασίες πολλαπλών συγκρίσεων. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλαπλές συγκρίσεις (π.χ. δοκιμασία Dunnett) ή καθοδικά εφαρμοζόμενες δοκιμασίες τάσεων (π.χ. δοκιμασία Williams) για να υπολογιστεί εάν υπάρχουν σημαντικές διαφορές ($p \leq 0,05$) μεταξύ των μαρτύρων και των διαφόρων συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (επιλογή της συνιστώμενης δοκιμής σύμφωνα με το Έγγραφο 54 του ΟΟΣΑ (9)). Διαφορετικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν μη παραμετρικές μέθοδοι (π.χ. δοκιμασία Bonferroni-U σύμφωνα με τον Holm ή δοκιμασία τάσεων Jonckheere-Terpstra) για να προσδιοριστούν οι τιμές NOEC και LOEC.

Οριακή δοκιμή

44. Εάν έχει διεξαχθεί οριακή δοκιμή (σύγκριση του μάρτυρα και μίας αγωγής μόνο) και πληρούνται οι προϋποθέσεις των διαδικασιών παραμετρικής δοκιμής (κανονικότητα, ομοιογένεια), οι μετρικές αποκρίσεις μπορούν να αξιολογούνται με τη δοκιμασία Student (δοκιμασία t). Εάν δεν πληρούνται οι απαιτήσεις αυτές, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η δοκιμασία t άνισης διασποράς (δοκιμασία t του Welch) ή μια μη παραμετρική δοκιμασία, όπως η Mann-Whitney-U.

45. Για τον προσδιορισμό σημαντικών διαφορών μεταξύ των μαρτύρων (μάρτυρας και μάρτυρας με διαλύτη), οι επαναλήψεις κάθε μάρτυρα μπορούν να ελέγχονται με τον τρόπο που περιγράφεται για την οριακή δοκιμή. Εάν με τις δοκιμασίες αυτές δεν εντοπίζονται σημαντικές διαφορές, μπορεί να γίνει συνένωση όλων των επαναλήψεων του μάρτυρα και του μάρτυρα με διαλύτη. Διαφορετικά, όλες οι αγωγές θα πρέπει να συγκρίνονται με τον μάρτυρα με διαλύτη.

Έκθεση δοκιμής

46. Η έκθεση της δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία

— ταυτότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, αριθμός φορτίου, αριθμός παρτίδας, αριθμός CAS, καθαρότητα,

— φυσικοχημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (π.χ. log Kow, υδατοδιαλυτότητα, τάση ατμών, σταθερά του Henry (H) και, κατά προτίμηση, πληροφορίες για την πορεία της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο έδαφος), εάν διατίθενται,

— θα πρέπει να προσδιορίζεται η σύνθεση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και τα πρόσθετα, εάν δεν ελέγχεται η καθαρή μορφή της χημικής ουσίας,

Οργανισμοί δοκιμής

— ταυτότητα των ειδών και του προμηθευτή των οργανισμών δοκιμής, περιγραφή των συνθηκών αναπαραγωγής και ηλικιακό εύρος των οργανισμών δοκιμής,

Συνθήκες δοκιμής

— περιγραφή του πειραματικού σχεδιασμού και της διαδικασίας,

— λεπτομέρειες σχετικά με την προετοιμασία του εδάφους δοκιμής, λεπτομερείς προδιαγραφές στην περίπτωση που χρησιμοποιείται φυσικό έδαφος (προέλευση, ιστορικό, κατανομή μεγέθους σωματιδίων, pH, περιεκτικότητα σε οργανική ύλη),

— υδατοχωρητικότητα του εδάφους,

— περιγραφή της τεχνικής που χρησιμοποιείται για την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο έδαφος,

— συνθήκες δοκιμής: ένταση φωτός, διάρκεια κύκλων φωτός-σκοταδιού, θερμοκρασία,

— περιγραφή του καθεστώτος σίτισης, τύπος και ποσότητα τροφής που χρησιμοποιείται στη δοκιμή, ημερομηνίες σίτισης,

— pH και περιεκτικότητα του εδάφους σε νερό στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής (μάρτυρας και κάθε αγωγή),

— λεπτομερής περιγραφή της μεθόδου εκχύλισης και της αποδοτικότητας εκχύλισης,

▼**M6**

Αποτελέσματα δοκιμής

— αριθμός των νεαρών ατόμων που προσδιορίστηκε σε κάθε δοχείο δοκιμής στο τέλος της δοκιμής,

— αριθμός των ενήλικων ατόμων και ποσοστό θνησιμότητάς τους (%) σε κάθε δοχείο δοκιμής στο τέλος της δοκιμής,

— περιγραφή των εμφανώς φυσιολογικών ή παθολογικών συμπτωμάτων ή των διακριτών αλλαγών συμπεριφοράς,

— αποτελέσματα που ελήφθησαν με την υπό δοκιμή χημική ουσία αναφοράς,

— τιμές NOEC/LOEC, τιμή LC_x για τη θνησιμότητα και τιμή EC_x για την αναπαραγωγή (κυρίως τιμές LC_{50}, LC_{10}, EC_{50} και EC_{10}) με διαστήματα εμπιστοσύνης 95 %. Μια γραφική παράσταση του προσαρμοσμένου μοντέλου που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό, καθώς και η εξίσωση της συνάρτησης και οι παράμετροί του (βλ. (9)),

— κάθε πληροφορία και παρατήρηση που είναι χρήσιμη για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων,

— ισχύς της πραγματικής δοκιμής, εάν διεξάγεται δοκιμασία υπόθεσης (9),

— αποκλίσεις από τις διαδικασίες που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών και τυχόν ασυνήθιστα συμβάντα κατά τη διάρκεια της δοκιμής,

— εγκυρότητα της δοκιμής,

— ελάχιστη ανιχνεύσιμη διαφορά, όταν γίνεται εκτίμηση της τιμής NOEC.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(13) Wiles JA και Krogh PH (1998) Testing with the collembolans *I. viridis*, *F. candida* and *F. fimetaria*. In Handbook of soil invertebrate toxicity tests (έκδ. H Løkke και CAM Van Gestel), σελ. 131-156. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester

(14) ISO (1999) Soil Quality — Effects of soil pollutants on Collembola (*Folsomia candida*): Method for determination of effects on reproduction. Αρ. 11267. Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης, Γενεύη

(15) Burges A και Raw F (εκδ.) (1967) Soil Biology. Academic Press. Λονδίνο

(16) Petersen H και Luxton M (1982) A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287-388

(17) Petersen H (1994) A review of collembolan ecology in ecosystem context. Acta Zoologica Fennica 195: 111-118

(18) Hopkin SP (1997). *Biology of the Springtails (Insecta: Collembola)*. Oxford University Press. σελ. 330 (ISBN 0-19-854084-1)

(19) Ulber B (1983) Einfluss von *Onychirurus fimatus* Gisin (Collembola, Onychiuridae) und *Folsomia fimetaria* L. (Collembola, Isotomidae) auf *Pythium ultimum* Trow. einen Erreger des Wurzelbrandes der Zuckerrübe. In New trends in soil Biology (Lebrun Ph, André HM, De Medts A, Grégoire-Wibo, Wauthy G (εκδ.), Proceedings of the VI. international colloquium on soil zoology, Louvain-la-neuve (Βέλγιο), 30 Αυγούστου-2 Σεπτεμβρίου 1982, I Dieu-Brichart, Ottignies-Louvain-la-Neuve, σελ. 261-268

(20) Κεφάλαιο Γ.36 του παρόντος προσαρτήματος, *Predatory mite (Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer) reproduction test in soil*.

(21) OECD (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. OECD series on testing and assessment Αριθμός 54, ENV/JM/MONO(2006)18, ΟΟΣΑ Παρίσι

(22) Scott-Fordsmand JJ και Krogh PH (2005) Background report on prevalidation of an OECD springtail test guideline. Environmental Project Αρ. 986. Miljøstyrelsen σελ. 61 Danish Ministry for the Environment.

▼**M6**

(23) Krogh, P.H., 2009. Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. Danish Environmental Protection Agency, Environmental Project Αρ. 1256, σελ. 66.

(24) Krogh PH, Johansen K και Holmstrup M (1998) Automatic counting of collembolans for laboratory experiments. Appl. Soil Ecol. 7, 201-205.

(25) Fjellberg A (1980) Identification keys to Norwegian collembolans. Norsk Entomologisk Forening.

(26) Edwards C.A. (1955) Simple techniques for rearing Collembola, Symphyla and other small soil inhabiting arthropods. In Soil Zoology (Kevan D.K. McE., εκδ.). Butterworths, Λονδίνο, σελ. 412-416

(27) Goto HE (1960) Simple techniques for the rearing of Collembola and a not on the use of a fungistatic substance in the cultures. Entomologists' Monthly Magazine 96:138-140.

▼M6

Προσάρτημα 1

Ορισμοί

Για την παρούσα μέθοδο δοκιμών ισχύουν οι παρακάτω ορισμοί (σε αυτήν τη δοκιμή όλες οι συγκεντρώσεις στις οποίες παρουσιάζεται επίδραση εκφράζονται ως μάζα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ανά ξηρή μάζα του εδάφους δοκιμής):

Χημική ουσία είναι μια ουσία ή ένα μείγμα.

NOEC (no observed effect concentration) είναι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην οποία δεν παρατηρείται επίδραση. Σε αυτήν τη δοκιμή, η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στη NOEC δεν έχει στατιστικά σημαντική επίδραση ($p < 0,05$) εντός μιας δεδομένης περιόδου έκθεσης κατά τη σύγκριση με τον μάρτυρα.

LOEC (lowest observed effect concentration) είναι η κατώτατη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που έχει στατιστικά σημαντική επίδραση ($p < 0,05$) εντός μιας δεδομένης περιόδου έκθεσης κατά τη σύγκριση με τον μάρτυρα.

ECx (Effect concentration for x % effect) είναι η συγκέντρωση που προκαλεί το x % μιας επίδρασης σε οργανισμούς δοκιμής εντός μιας δεδομένης περιόδου έκθεσης κατά τη σύγκριση με τον μάρτυρα. Για παράδειγμα, μια τιμή EC_{50} είναι μια συγκέντρωση που εκτιμάται ότι προκαλεί επίδραση σε ένα τελικό σημείο μιας δοκιμής στο 50 % ενός εκτιθέμενου πληθυσμού κατά τη διάρκεια μιας καθορισμένης περιόδου έκθεσης.

Υπό δοκιμή χημική ουσία είναι κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

▼**M6**

Προσάρτημα 2

ΚΥΡΙΕΣ ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΚΑΙ ΧΡΟΝΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗΣ ΜΙΑΣ ΔΟΚΙΜΗΣ ΚΟΛΛΕΜΒΟΛΩΝ

Τα βήματα της δοκιμής μπορούν να συνοψιστούν ως εξής:

Χρόνος (ημέρα)	Ενέργεια
– 23 έως – 26	Προετοιμασία συγχρονισμένης καλλιέργειας *F. fimetaria*
– 14	Προετοιμασία τεχνητού εδάφους (ανάμειξη των ξηρών συστατικών) Έλεγχος pH του τεχνητού εδάφους και ανάλογη προσαρμογή Μέτρηση μέγιστης υδατοχωρητικότητας του εδάφους
– 9 έως – 12	Προετοιμασία συγχρονισμένης καλλιέργειας *F. candida*
– 2 έως – 7	Ύγρανση του εδάφους
– 1	Κατανομή νεαρών ατόμων σε παρτίδες Παρασκευή διαλυμάτων παρακαταθήκης και εφαρμογή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, εάν απαιτείται διαλύτης
0	Παρασκευή διαλυμάτων παρακαταθήκης και εφαρμογή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, εάν απαιτείται χημική ουσία σε στερεά μορφή, υδατοδιαλυτή χημική ουσία ή εφαρμογή της χημικής ουσίας στην επιφάνεια του εδάφους. Μέτρηση pH εδάφους και ζύγισμα των περιεκτών. Προσθήκη τροφής. Εισαγωγή κολλεμβόλων.
14	Δοκιμή καθορισμού εύρους για το *F. fimetaria*: Τερματισμός δοκιμής, εκχύλιση ζώων, μέτρηση pH και απώλειας νερού (βάρους) του εδάφους Οριστικές δοκιμές: Μέτρηση περιεκτικότητας σε υγρασία, αναπλήρωση νερού και προσθήκη 2-10 mg ζύμης
21	Οριστική δοκιμή για το *F. fimetaria*: Τερματισμός δοκιμής, εκχύλιση ζώων, μέτρηση pH και απώλειας νερού (βάρους) του εδάφους Δοκιμή καθορισμού εύρους για το *F. candida*: Τερματισμός δοκιμής, εκχύλιση ζώων, μέτρηση pH και απώλειας νερού (βάρους) του εδάφους
28	Οριστική δοκιμή για το *F. candida*: Τερματισμός δοκιμής, εκχύλιση ζώων, μέτρηση pH και απώλειας νερού (βάρους) του εδάφους

▼M6

Προσάρτημα 3

Καθοδήγησή για τον τρόπο εκτροφής και τον συγχρονισμό των *f. Fimetaria* και *f. Candida*

Ο χρόνος και οι διάρκειες που παρέχονται σε αυτήν την καθοδήγηση θα πρέπει να ελέγχονται για κάθε συγκεκριμένο στέλεχος κολλεμβόλων ώστε να διασφαλίζεται ότι ο χρονισμός θα παρέχει τη δυνατότητα για επαρκώς συγχρονισμένα νεαρά άτομα. Στην ουσία, η συχνότητα της ωοτοκίας μετά τη μεταφορά των ενήλικων ατόμων σε ανανεωμένο υπόστρωμα, και η εκκόλαψη των αυγών καθορίζουν την κατάλληλη ημέρα για τη συλλογή των αυγών, καθώς και για τη συλλογή των συγχρονισμένων νεαρών ατόμων.

Συνιστάται να διατηρείται μια μόνιμη αρχική καλλιέργεια που θα αποτελείται από π.χ. 50 περιέκτες/τρυβλία Petri. Η αρχική καλλιέργεια θα πρέπει να διατηρείται σε καλή κατάσταση σίτισης μέσω εβδομαδιαίας σίτισης, παροχής νερού και απομάκρυνσης της παλιάς τροφής και των ψόφιων ατόμων. Ο μικρός αριθμός κολλεμβόλων στο υπόστρωμα μπορεί να οδηγήσει σε αναστολή λόγω αυξημένης ανάπτυξης μυκήτων. Εάν η αρχική καλλιέργεια χρησιμοποιείται πολύ συχνά για την παραγωγή αυγών, η καλλιέργεια ενδέχεται να υποστεί κόπωση. Ενδείξεις κόπωσης είναι νεκρά ενήλικα άτομα και εμφάνιση μούχλας στο υπόστρωμα. Τα εναπομένοντα αυγά από την παραγωγή των συγχρονισμένων ζώων μπορούν να χρησιμοποιούνται για την ανανέωση της καλλιέργειας.

Σε μια συγχρονισμένη καλλιέργεια του *F. fimetaria*, τα αρσενικά διακρίνονται από τα θηλυκά κυρίως από το μέγεθος. Τα αρσενικά είναι σαφώς μικρότερα σε μέγεθος από τα θηλυκά, ενώ η ταχύτητα βάδισης των αρσενικών είναι μεγαλύτερη από αυτή των θηλυκών. Η ορθή επιλογή του φύλου απαιτεί λίγη εξάσκηση και μπορεί να επιβεβαιωθεί με εξέταση της γεννητικής περιοχής στο μικροσκόπιο (13).

1. **Τρόπος εκτροφής**

1.α. *Προετοιμασία του υποστρώματος καλλιέργειας*

Το υπόστρωμα καλλιέργειας αποτελείται από γύψο (θειικό ασβέστιο) με ενεργό άνθρακα. Αυτό προσφέρει ένα υγρό υπόστρωμα, ενώ ο σκοπός του άνθρακα είναι να απορροφά τα απόβλητα αέρια και τα απεκκρίματα (14) (15). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικές μορφές άνθρακα για να είναι πιο εύκολη η παρατήρηση των κολλεμβόλων. Για παράδειγμα, για τα *F. candida* και *F. fimetaria* χρησιμοποιείται άνθρακας σε σκόνη (παράγεται ένας μαύρος/γκρι γύψος):

Συστατικά υποστρώματος:

— 20 ml ενεργού άνθρακα

— 200 ml απεσταγμένου νερού

— 200 ml γύψου

ή

— 50 g κονιοποιημένου ενεργού άνθρακα

— 260-300 ml απεσταγμένου νερού

— 400 g γύψου.

Το μείγμα του υποστρώματος πρέπει να παραμείνει σε ηρεμία ώστε να πήξει πριν από τη χρήση.

1.β. *Αναπαραγωγή*

Τα κολλέμβολα διατηρούνται σε περιέκτες, όπως τρυβλία Petri (90 mm × 13 mm), των οποίων ο πυθμένας είναι καλυμμένος με μια στρώση πάχους 0,5 cm από υπόστρωμα γύψου / άνθρακα. Καλλιεργούνται στους 20 ± 1 °C σε κύκλο φωτός-σκοταδιού των 12-12 ωρών (400-800 Lux). Οι περιέκτες διατηρούνται συνεχώς υγροί διασφαλίζοντας ότι η σχετική υγρασία του αέρα εντός των περιεκτών είναι 100 %. Αυτό μπορεί να διασφαλιστεί με την παρουσία ελεύθερου νερού εντός του πορώδους γύψου, αλλά πρέπει να αποφεύγεται η δημιουργία υμενώδους ύδατος στην επιφάνεια του γύψου.

▼M6

Η απώλεια νερού μπορεί να αποφευχθεί με την παροχή υγρού αέρα περιβάλλοντος. Τυχόν νεκρά ζώα θα πρέπει να απομακρύνονται από τους περιέκτες, όπως θα πρέπει να γίνεται και για τυχόν μουχλιασμένη τροφή. Για την ενίσχυση της παραγωγής αυγών, τα ενήλικα ζώα πρέπει να μεταφέρονται σε τρυβλία Petri με φρέσκο υπόστρωμα γύψου/άνθρακα.

1.γ. *Πηγή τροφής*

Ως αποκλειστική πηγή τροφής τόσο για το *F. candida* όσο και για το *F fimetaria* χρησιμοποιείται κοκκοποιημένη ξηρή ζύμη αρτοποιίας. Φρέσκια τροφή παρέχεται μία ή δύο φορές την εβδομάδα ώστε να μην μουχλιάζει. Τοποθετείται απευθείας επάνω στον γύψο σε μια μικρή στοίβα. Η μάζα της προστιθέμενης ζύμης αρτοποιίας θα πρέπει να προσαρμόζεται στο μέγεθος του πληθυσμού των κολλεμβόλων, αλλά ως γενικός κανόνας επαρκεί ποσότητα 2-15 mg.

2. **Συγχρονισμός**

Η δοκιμή θα πρέπει να διεξάγεται με συγχρονισμένα ζώα για τη λήψη ομοιογενών ζώων δοκιμής του ίδιου σταδίου και μεγέθους. Επιπλέον, ο συγχρονισμός επιτρέπει να γίνεται διάκριση μεταξύ των αρσενικών και θηλυκών ατόμων του *F. fimetaria* από την ηλικία των 3 εβδομάδων και άνω, με βάση τον σεξουαλικό διμορφισμό, δηλ. διαφορές στο μέγεθος. Η ακόλουθη διαδικασία αποτελεί μια πρόταση για τον τρόπο λήψης συγχρονισμένων ζώων (τα πρακτικά βήματα είναι προαιρετικά).

2.α. *Συγχρονισμός.*

— Προετοιμάστε περιέκτες με μια στρώση πάχους 0,5 cm από υπόστρωμα γύψου/άνθρακα.

— Για την ωοτοκία, μεταφέρετε στους περιέκτες 150-200 ενήλικα άτομα *F. fimetaria* και 50-100 ενήλικα άτομα *F. candida* από τους 15-20 καλύτερους περιέκτες της αρχικής καλλιέργειας με υπόστρωμα ηλικίας 4-8 εβδομάδων και χορηγήστε 15 mg ζύμης αρτοποιίας ως τροφή. Αποφεύγετε τη μεταφορά νεαρών ατόμων μαζί με τα ενήλικα άτομα, καθώς η παρουσία των νεαρών ατόμων ενδέχεται να αναστείλει την παραγωγή αυγών.

— Διατηρείτε την καλλιέργεια στους 20 ± 1 °C (η μέση θερμοκρασία θα πρέπει να είναι 20 °C) και σε κύκλο φωτός-σκοταδιού των 12-12 ωρών (400-800 Lux). Διασφαλίζετε τη διαθεσιμότητα φρέσκιας τροφής και τον κορεσμό του αέρα με νερό. Η έλλειψη τροφής μπορεί να οδηγήσει στην αφόδευση των ζώων επάνω στα αυγά, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη μυκήτων στα αυγά, ή το *F. candida* μπορεί να φάει τα ίδια του τα αυγά. Μετά από 10 ημέρες, τα αυγά συλλέγονται προσεκτικά με μια βελόνα και σπάτουλα και μεταφέρονται σε «χαρτί αυγών» (μικρά κομμάτια διηθητικού χαρτιού που έχουν εμβυθιστεί σε πολτό γύψου/άνθρακα), το οποίο τοποθετείται μέσα σε έναν περιέκτη με φρέσκο υπόστρωμα γύψου/άνθρακα. Στο υπόστρωμα προστίθενται μερικοί κόκκοι ζύμης για την προσέλκυση των νεαρών τόμων ώστε να απομακρυνθούν από το χαρτί αυγών. Είναι σημαντικό το χαρτί αυγών και το υπόστρωμα να είναι υγρά, διαφορετικά τα αυγά θα αφυδατωθούν. Εναλλακτικά, τα ενήλικα άτομα μπορούν να απομακρύνονται από τα κουτιά της καλλιέργειας συγχρονισμού αφού παράξουν αυγά για 2 ή 3 ημέρες.

— Μετά από τρεις ημέρες, τα περισσότερα από τα αυγά που βρίσκονται επάνω στο χαρτί αυγών θα έχουν εκκολαφθεί και ενδεχομένως να υπάρχουν μερικά νεαρά άτομα κάτω από το χαρτί αυγών.

— Για να είναι τα νεαρά άτομα ίδιας ηλικίας, το χαρτί αυγών με τα αυγά που δεν έχουν εκκολαφθεί απομακρύνεται από το τρυβλίο Petri με μια λαβίδα. Τα νεαρά άτομα, τα οποία είναι πλέον 0-3 ημερών, παραμένουν στο τρυβλίο και τρέφονται με ζύμη αρτοποιίας. Τα μη εκκολαφθέντα αυγά απορρίπτονται.

— Τα αυγά και τα εκκολαφθέντα νεαρά άτομα καλλιεργούνται όπως και τα ενήλικα άτομα. Συγκεκριμένα για το *F. fimetaria*, θα πρέπει να λαμβάνονται τα ακόλουθα μέτρα: διασφάλιση επαρκούς ποσότητας φρέσκιας τροφής, απομάκρυνση παλιάς μουχλιασμένης τροφής, μετά από 1 εβδομάδα τα νεαρά άτομα κατανέμονται σε καινούρια τρυβλία Petri με την προϋπόθεση ότι η πυκνότητα είναι πάνω από 200.

▼M6

2.β. *Χειρισμός των κολλεμβόλων κατά την έναρξη της δοκιμής*

— Συλλέγονται τα *F. candida* 9-12 ημερών ή τα *F. fimetaria* 23-26 ημερών, π.χ. με αναρρόφηση, τα οποία απελευθερώνονται σε έναν μικρό περιέκτη με υγρό υπόστρωμα γύψου/άνθρακα και ελέγχεται η φυσική τους κατάσταση κάτω από ένα διοφθάλμιο μικροσκόπιο (τα τραυματισμένα ζώα και τα ζώα που φέρουν βλάβες απορρίπτονται). Όλα τα βήματα θα πρέπει να εκτελούνται ενώ τα κολλέμβολα παραμένουν σε υγρή ατμόσφαιρα για την αποφυγή καταπόνησης από ξηρασία, π.χ. με τη χρήση υγραμένων επιφανειών κ.λπ.

— Γυρνάτε τον περιέκτη ανάποδα και χτυπάτε τον απαλά για να μεταφερθούν τα κολλέμβολα στο έδαφος. Θα πρέπει να εξουδετερώνεται ο στατικός ηλεκτρισμός, διαφορετικά τα ζώα μπορεί απλώς να πετάξουν στον αέρα ή να κολλήσουν στα πλευρικά τοιχώματα του περιέκτη δοκιμής και να αποξηρανθούν. Για την εξουδετέρωση, μπορεί να χρησιμοποιείται ένας ιονιστής ή ένα βρεγμένο πανί κάτω από τον περιέκτη.

— Η τροφή θα πρέπει να κατανέμεται σε ολόκληρη την επιφάνεια του εδάφους και όχι σε μία μόνο στοίβα.

— Κατά τη διάρκεια της μεταφοράς και της περιόδου δοκιμής θα πρέπει να αποφεύγετε να χτυπάτε ή να διαταράσσετε με άλλον φυσικό τρόπο τους περιέκτες δοκιμής, καθώς αυτό μπορεί να αυξήσει τη συμπίεση του εδάφους και να παρεμποδίσει την αλληλεπίδραση μεταξύ των κολλεμβόλων.

3. **Εναλλακτικά είδη κολλεμβόλων**

Μπορούν να επιλεγούν και άλλα είδη κολλεμβόλων για έλεγχο σύμφωνα με αυτήν τη μέθοδο δοκιμών, όπως τα είδη Proisotoma minuta, Isotoma viridis, Isotoma anglicana, Orchesella cincta, Sinella curviseta, Paronychiurus kimi, Orthonychiurus folsomi, Mesaphorura macrochaeta. Πριν από τη χρήση εναλλακτικών ειδών, θα πρέπει να πληρούνται κάποιες προϋποθέσεις εκ των προτέρων:

— Θα πρέπει να ταυτοποιούνται με αδιαμφισβήτητο τρόπο,

— Θα πρέπει να αιτιολογείται η επιλογή του είδους,

— Θα πρέπει να διασφαλίζεται ότι η αναπαραγωγική βιολογία περιλαμβάνεται στη φάση δοκιμής ώστε να αποτελεί δυνητικό στόχο κατά τη διάρκεια της έκθεσης,

— Θα πρέπει να είναι γνωστός ο κύκλος ζωής: ηλικία κατά την ωρίμανση, διάρκεια ανάπτυξης των αυγών και στάδια που υπόκεινται σε έκθεση,

— Θα πρέπει να παρέχονται οι βέλτιστες συνθήκες για ανάπτυξη και αναπαραγωγή μέσω του υποστρώματος δοκιμής και της παροχής τροφής,

— Η μεταβλητότητα θα πρέπει να είναι αρκετά χαμηλή για τον ακριβή και αξιόπιστο υπολογισμό της τοξικότητας.

▼M6

Προσάρτημα 4

Εκχύλιση και καταμέτρησή των ζωών

1. **Μπορούν να χρησιμοποιούνται δύο μέθοδοι εκχύλισης.**

1.α. Πρώτη μέθοδος: Μπορεί να χρησιμοποιείται ένας εκχυλιστής κλίσης με ελεγχόμενη θερμοκρασία που βασίζεται στις αρχές του MacFadyen (1). Η θερμότητα προέρχεται από ένα θερμαντικό στοιχείο στο επάνω μέρος του κουτιού εκχύλισης (ρυθμίζεται μέσω ενός θερμίστορ που είναι τοποθετημένο στην επιφάνεια του δείγματος εδάφους). Η θερμοκρασία στο υγρό ψύξης που περιβάλλει το δοχείο συλλογής ρυθμίζεται μέσω ενός θερμίστορ που βρίσκεται στην επιφάνεια του κουτιού συλλογής (κάτω από το βασικό έδαφος). Τα θερμίστορ είναι συνδεδεμένα σε μια μονάδα ελέγχου με δυνατότητα προγραμματισμού που ανεβάζει τη θερμοκρασία ανάλογα με το χρονοδιάγραμμα που έχει προγραμματιστεί εκ των προτέρων. Τα ζώα συλλέγονται στο ψυχόμενο κουτί συλλογής (2 °C) που περιέχει μια στρώση γύψου/άνθρακα στον πυθμένα. Η εκχύλιση ξεκινάει στους 25 °C και η θερμοκρασία αυξάνεται αυτόματα κάθε 12 ώρες κατά 5 °C και διαρκεί συνολικά 48 ώρες. Μετά από 12 ώρες στους 40 °C, η εκχύλιση ολοκληρώνεται.

1.β. Δεύτερη μέθοδος: Μετά την πειραματική περίοδο επώασης, ο αριθμός των νεαρών κολλεμβόλων που υπάρχουν εκτιμάται μέσω της επίπλευσης. Για τον σκοπό αυτό, η δοκιμή διεξάγεται στα δοχεία με όγκο περίπου 250 ml. Στο τέλος της δοκιμής, προστίθενται περίπου 200 ml απεσταγμένου νερού. Το έδαφος αναδεύεται απαλά με ένα λεπτό πινέλο για να επιπλεύσουν τα κολλέμβολα στην επιφάνεια του νερού. Μπορεί να προστεθεί στο νερό μια μικρή ποσότητα μαύρης χρωστικής Kentmere, περίπου 0,5 ml, για την αύξηση της αντίθεσης μεταξύ του νερού και των λευκών κολλεμβόλων ώστε να διευκολυνθεί η καταμέτρηση. Η χρωστική δεν είναι τοξική για τα κολλέμβολα.

2. **Καταμέτρηση:**

Οι καταμετρήσεις των αριθμών μπορούν να διεξάγονται με το μάτι ή με ένα κοινό μικροσκόπιο με τη χρήση ενός πλέγματος που τοποθετείται επάνω από το δοχείο επίπλευσης ή με φωτογράφηση της επιφάνειας κάθε δοχείου, ακολουθούμενη από την καταμέτρηση των κολλεμβόλων στις μεγεθυσμένες εικόνες ή σε διαφάνειες προβολής. Οι καταμετρήσεις μπορούν επίσης να διεξάγονται με τη χρήση τεχνικών επεξεργασίας ψηφιακών εικόνων (12). Όλες οι τεχνικές θα πρέπει να επικυρώνονται.

▼M6

Προσάρτημα 5

Προσδιορισμός τη μέγιστης υδατοχωρητικοτητασ του εδάφους

Η ακόλουθη μέθοδος για τον προσδιορισμό της μέγιστης υδατοχωρητικότητας (WHC) του εδάφους έχει αποδειχθεί κατάλληλη. Περιγράφεται στο προσάρτημα Γ του προτύπου ISO DIS 11268-2 (Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction) (Ποιότητα εδάφους — Επιδράσεις ρυπαντικών ουσιών στους γαιοσκώληκες (Eisenia fetida). Μέρος 2: Προσδιορισμός επιδράσεων στην αναπαραγωγή).

Συλλέγετε μια καθορισμένη ποσότητα (π.χ. 5 g) του υπεδάφους δοκιμής χρησιμοποιώντας μια κατάλληλη συσκευή δειγματοληψίας (κοχλιωτός σωλήνας κ.λπ). Καλύπτετε το κάτω μέρος του σωλήνα με ένα βρεγμένο κομμάτι διηθητικού χαρτιού και, στη συνέχεια, τοποθετείτε τον σε μια βάση στο υδατόλουτρο. Ο σωλήνας θα πρέπει να βυθίζεται σταδιακά μέχρι η στάθμη του νερού να ανέβει επάνω ως την επιφάνεια του εδάφους. Στη συνέχεια, θα πρέπει να παραμένει μέσα στο νερό για περίπου τρεις ώρες. Επειδή δεν μπορεί να συγκρατηθεί όλο το νερό που έχει απορροφηθεί από το τριχοειδές του εδάφους, το δείγμα εδάφους θα πρέπει να αποστραγγίζεται για περίοδο δύο ωρών με τοποθέτηση του σωλήνα σε ένα στρώμα από πολύ υγρή, λεπτοαλεσμένη χαλαζιακή άμμο που βρίσκεται μέσα σε ένα καλυμμένο δοχείο (για την αποφυγή της ξήρανσης). Κατόπιν, το δείγμα θα πρέπει να ζυγίζεται, ξηραμένο στους 105 °C μέχρι σταθερού βάρους. Η υδατοχωρητικότητα (WHC) θα πρέπει να υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{WHC (σε \% ξηρής μάζας)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Όπου:

S = υπόστρωμα κορεσμένο με νερό + μάζα σωλήνα + μάζα διηθητικού χαρτιού

T = απόβαρο (μάζα σωλήνα + μάζα διηθητικού χαρτιού)

D = ξηρή μάζα υποστρώματος

▼**M6**

Προσάρτημα 6

Προσδιορισμός του ph του εδάφους

Η ακόλουθη μέθοδος για τον προσδιορισμό του pH ενός εδάφους βασίζεται στην περιγραφή που παρέχεται από το πρότυπο ISO DIS 10390: Soil Quality — Determination of pH (Ποιότητα εδάφους — Προσδιορισμός του pH).

Μια καθορισμένη ποσότητα εδάφους ξηραίνεται σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 12 ώρες. Κατόπιν, παρασκευάζεται ένα εναιώρημα του εδάφους (που περιέχει τουλάχιστον 5 gr εδάφους) έτσι ώστε ο όγκος του να αυξηθεί κατά πέντε φορές χρησιμοποιώντας είτε διάλυμα χλωριούχου καλίου (KCl) 1 M αναλυτικής καθαρότητας είτε διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου ($CaCl_2$) 0,01 M αναλυτικής καθαρότητας. Στη συνέχεια, το εναιώρημα ανακινείται επιμελώς για πέντε λεπτά και μετά αφήνεται να καθιζάνει για τουλάχιστον 2 ώρες, αλλά όχι για περισσότερο από 24 ώρες. Το pH της υγρής φάσης μετριέται, στη συνέχεια, με χρήση ενός πεχάμετρου που έχει βαθμονομηθεί πριν από κάθε μέτρηση με τη χρήση κατάλληλης σειράς ρυθμιστικών διαλυμάτων (π.χ. pH 4,0 και 7,0).

▼M6

Γ.40. ΔΟΚΙΜΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟΝ ΚΥΚΛΟ ΖΩΗΣ ΧΕΙΡΟΝΟΜΙΔΩΝ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑ ΙΖΗΜΑΤΟΣ-ΝΕΡΟΥ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΟΥ ΝΕΡΟΥ Ή ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΈΝΟΥ ΙΖΗΜΑΤΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 233 του ΟΟΣΑ (2010). Σκοπός της είναι η εκτίμηση των επιδράσεων της ισόβιας έκθεσης σε χημικές ουσίες των δίπτερων γλυκών υδάτων του είδους *Chironomus* sp., με πλήρη κάλυψη της $1^{ης}$ γενιάς (πατρική γενιά -γενιά P) και του πρώτου μέρους της $2^{ης}$ γενιάς (πρώτη θυγατρική γενιά -γενιά F1). Αποτελεί μια επέκταση των υφιστάμενων μεθόδων δοκιμών Γ.28 (1) ή Γ.27 (15), με χρήση σεναρίου έκθεσης με εμβολιασμένο νερό ή με εμβολιασμένο ίζημα, αντίστοιχα. Στη μέθοδο λαμβάνονται υπόψη τα υπάρχοντα πρωτόκολλα δοκιμών τοξικότητας για τα είδη *Chironomus riparius* και *Chironomus dilutus* (πρώην *C. tentans* (2)) που έχουν καταρτιστεί στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) και έχουν στη συνέχεια υποβληθεί σε κυκλική δοκιμή (1) (7) (10) (11) (12). Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη χειρονομίδων για τα οποία υπάρχει επαρκής τεκμηρίωση, π.χ. *Chironomus yoshimatsui* (13) (14). Η πλήρης διάρκεια της έκθεσης είναι περίπου 44 ημέρες για τα *C. riparius* και *C. yoshimatsui*, και περίπου 100 ημέρες για το *C. dilutus*.

2. Σε αυτήν τη μέθοδο δοκιμών περιγράφονται και τα δύο σενάρια έκθεσης σε νερό και σε ίζημα. Η επιλογή ενός κατάλληλου σεναρίου έκθεσης εξαρτάται από την επιδιωκόμενη εφαρμογή της δοκιμής. Το σενάριο της έκθεσης στο νερό, με εμβολιασμό της στήλης ύδατος, σκοπό έχει να προσομοιώσει ένα περιστατικό μετακίνησης ψεκαστικού νέφους φυτοφαρμάκων και καλύπτει το αρχικό μέγιστο της συγκέντρωσης στα επιφανειακά ύδατα. Ο εμβολιασμός του νερού εξυπηρετεί, επίσης, και άλλους τύπους έκθεσης (συμπεριλαμβανομένων των χημικών διαρροών), αλλά όχι τις διαδικασίες συσσώρευσης εντός του ιζήματος, των οποίων η διάρκεια υπερβαίνει τη διάρκεια της δοκιμής. Σε αυτήν την περίπτωση, καθώς και όταν η απορροή είναι η κύρια οδός εισόδου των φυτοφαρμάκων στις υδάτινες μάζες, ενδεχομένως να είναι καταλληλότερος ένας σχεδιασμός με εμβολιασμένο ίζημα. Εάν υπάρχουν άλλα ενδιαφέροντα σενάρια έκθεσης, ο σχεδιασμός της δοκιμής μπορεί να προσαρμοστεί εύκολα. Για παράδειγμα, εάν η κατανομή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μεταξύ της υδάτινης φάσης και του στρώματος ιζήματος δεν αποτελεί αντικείμενο ενδιαφέροντος και η προσρόφηση στο ίζημα πρέπει να ελαχιστοποιηθεί, μπορεί να εξεταστεί η περίπτωση χρήσης ενός βοηθητικού τεχνητού ιζήματος (π.χ. χαλαζιακή άμμος).

3. Οι χημικές ουσίες για τις οποίες απαιτείται έλεγχος σε οργανισμούς που διαβιούν σε ιζήματα ενδέχεται να παραμένουν στο ίζημα για μεγάλες χρονικές περιόδους. Οι οργανισμοί που διαβιούν σε ιζήματα ενδέχεται να εκτίθενται μέσω διάφορων οδών. Η σχετική σημασία της κάθε οδού έκθεσης, καθώς και ο χρόνος που απαιτείται για να συμβάλει στη συνολική τοξική επίδραση, εξαρτώνται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της χημικής ουσίας. Για χημικές ουσίες ισχυρής προσρόφησης ή για χημικές ουσίες που συνδέονται με ιζήματα με ομοιοπολικούς δεσμούς, η πρόσληψη μολυσμένων τροφών μπορεί να είναι μια σημαντική οδός έκθεσης. Προκειμένου να μην υποτιμάται η τοξικότητα των εξαιρετικά λιπόφιλων χημικών ουσιών, μπορεί να εξετάζεται η προσθήκη της τροφής στο ίζημα πριν από την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (βλ. παράγραφο 31). Επομένως, είναι δυνατόν να συμπεριλαμβάνονται όλες οι οδοί έκθεσης και όλα τα στάδια ζωής.

4. Τα μετρούμενα τελικά σημεία είναι ο συνολικός αριθμός εμφανιζόμενων ενήλικων ατόμων (για την πατρική και την πρώτη θυγατρική γενιά), ο ρυθμός ανάπτυξης (για την πατρική και την πρώτη θυγατρική γενιά), η αναλογία φύλου των πλήρως αναπτυχθέντων και ζωντανών ενήλικων ατόμων (για την πατρική και την πρώτη θυγατρική γενιά), ο αριθμός των αλυσίδων αυγών ανά θηλυκό (μόνο για την πατρική γενιά) και η γονιμότητα των αλυσίδων αυγών (μόνο για την πατρική γενιά).

5. Συνιστάται ιδιαίτερα η χρήση μορφοποιημένου ιζήματος, το οποίο παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα φυσικά ιζήματα:

▼M6

— η πειραματική μεταβλητότητα μειώνεται, επειδή σχηματίζει μια αναπαραγόμενη «τυποποιημένη μήτρα» και εκλείπει η ανάγκη εξεύρεσης αμόλυντου και καθαρού ιζήματος,

— οι δοκιμές μπορούν να αρχίζουν ανά πάσα στιγμή, χωρίς να αντιμετωπίζουν εποχιακή μεταβλητότητα του ιζήματος δοκιμής και δεν απαιτείται προκατεργασία του ιζήματος για την απομάκρυνση της αυτόχθονης πανίδας,

— το κόστος είναι μειωμένο σε σύγκριση με τη συλλογή επαρκών ποσοτήτων ιζημάτων από το ύπαιθρο που απαιτούνται για δοκιμές ρουτίνας,

— το μορφοποιημένο ίζημα καθιστά δυνατές τις συγκρίσεις τοξικότητας μεταξύ μελετών και την ανάλογη κατάταξη των χημικών ουσιών (3).

6. Οι χρησιμοποιούμενοι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

7. Προνύμφες χειρονομίδων πρώτου σταδίου εκτίθενται σε ένα εύρος συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε σύστημα ιζήματος-νερού. Η δοκιμή αρχίζει με την τοποθέτηση προνυμφών πρώτου σταδίου (πατρική γενιά) σε ποτήρια ζέσεως που περιέχουν εμβολιασμένο ίζημα ή εναλλακτικά η υπό δοκιμή χημική ουσία εμβολιάζεται μέσα στο νερό μετά την προσθήκη των προνυμφών. Αξιολογείται η εμφάνιση των χειρονομίδων, ο χρόνος μέχρι την εμφάνιση και η αναλογία φύλου των πλήρως αναπτυχθέντων και ζωντανών χειρονόμων. Τα εμφανιζόμενα ενήλικα άτομα μεταφέρονται σε κλωβούς αναπαραγωγής προς διευκόλυνση της δημιουργία σμήνους, του ζευγαρώματος και της ωοτοκίας. Αξιολογείται ο αριθμός των αλυσίδων αυγών και η γονιμότητά τους. Από αυτές τις αλυσίδες αυγών, λαμβάνονται προνύμφες πρώτου σταδίου της πρώτης θυγατρικής γενιάς. Αυτές οι προνύμφες τοποθετούνται σε προσφάτως παρασκευασμένα ποτήρια ζέσεως (διαδικασία εμβολιασμού όπως και για την πατρική γενιά) για να προσδιοριστεί η βιωσιμότητα της πρώτης θυγατρικής γενιάς μέσω μιας εκτίμησης της εμφάνισής τους, του χρόνου μέχρι την εμφάνιση και της αναλογίας φύλου των πλήρως αναπτυχθέντων και ζωντανών χειρονόμων (μια σχηματική παρουσίαση της δοκιμής κύκλου ζωής παρέχεται στο προσάρτημα 5). Όλα τα δεδομένα αναλύονται με τη χρήση είτε ενός μοντέλου παλινδρόμησης, ώστε να εκτιμηθεί η συγκέντρωση η οποία θα μπορούσε να προκαλέσει X % μείωση του σχετικού τελικού σημείου, είτε δοκιμασιών υπόθεσης για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης στην οποία δεν παρατηρείται επίδραση (NOEC). Στη δεύτερη περίπτωση, απαιτείται σύγκριση μεταξύ των αποκρίσεων αγωγής και των κατάλληλων αποκρίσεων μαρτύρων, με τη χρήση στατιστικών δοκιμασιών. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι στο σενάριο με εμβολιασμένο νερό, στην περίπτωση χημικών ουσιών ταχείας αποικοδόμησης, τα μεταγενέστερα στάδια ζωής της κάθε γενιάς (π.χ. φάση χρυσαλίδος) ενδεχομένως να εκτίθενται σε σημαντικά χαμηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης στο υπερκείμενο νερό από ότι οι προνύμφες πρώτου σταδίου. Εάν αυτό αποτελεί ανησυχία και απαιτείται συγκρίσιμο επίπεδο έκθεσης για κάθε στάδιο ζωής, μπορούν να εξεταστούν οι ακόλουθες τροποποιήσεις της μεθόδου δοκιμών:

— παράλληλες εκτελέσεις με εμβολιασμό σε διαφορετικά στάδια ζωής ή

— επαναλαμβανόμενος εμβολιασμός (ή ανανέωση υπερκείμενου νερού) του συστήματος δοκιμής και στις δύο φάσεις της δοκιμής (πατρική και πρώτη θυγατρική γενιά), όπου τα διαστήματα μεταξύ εμβολιασμών (ανανεώσεων) θα πρέπει να προσαρμόζονται στα χαρακτηριστικά της πορείας που ακολουθεί η υπό δοκιμή χημική ουσία.

Οι εν λόγω τροποποιήσεις είναι εφικτές μόνο στο σενάριο με εμβολιασμένο νερό και όχι στο σενάριο με εμβολιασμένο ίζημα.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

8. Θα πρέπει να είναι γνωστά η υδατοδιαλυτότητα, η τάση ατμών και το log K_{ow} της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, η μετρούμενη ή υπολογιζόμενη κατανομή της στο ίζημα και η σταθερότητά της στο νερό και το ίζημα. Θα πρέπει να διατίθεται μια αξιόπιστη μέθοδος ανάλυσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο υπερκείμενο νερό, στο ενδοπορικό νερό και στο ίζημα, με γνωστή και δημοσιευμένη

▼M6

ακρίβεια (accuracy) και όριο ανίχνευσης. Στις χρήσιμες πληροφορίες συγκαταλέγονται ο συντακτικός τύπος και η καθαρότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Χρήσιμο στοιχείο είναι επίσης η χημική πορεία της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (π.χ. διασπορά, βιοτική και αβιοτική αποικοδόμηση κ.λπ.). Περαιτέρω καθοδήγηση για τις δοκιμές χημικών ουσιών με φυσικοχημικές ιδιότητες που δυσχεραίνουν τη διεξαγωγή της δοκιμής παρέχεται στο σημείο (16).

ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

9. Για να διασφαλίζεται ότι η ευαισθησία του εργαστηριακού πληθυσμού δεν έχει αλλάξει, μπορούν να ελέγχονται περιοδικά χημικές ουσίες αναφοράς. Όπως και με τις δαφνίδες, θα επαρκούσε η εκτέλεση μιας δοκιμής οξείας τοξικότητας 48 ωρών (ακολουθώντας το σημείο 17). Ωστόσο, μέχρι να υπάρχει διαθέσιμη μια επικυρωμένη κατευθυντήρια γραμμή για την οξεία τοξικότητα, μπορεί να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης μιας δοκιμασίας χρόνιας τοξικότητας σύμφωνα με το κεφάλαιο Γ.28 του παρόντος προσαρτήματος. Μερικές από τις τοξικές ουσίες αναφοράς που χρησιμοποιούνται με επιτυχία σε κυκλικές δοκιμές και μελέτες επικύρωσης είναι το λινδάνιο, η τριφλουραλίνη, η πενταχλωροφαινόλη, το χλωριούχο κάδμιο και το χλωριούχο κάλιο (1) (3) (6) (7) (18).

ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

10. Για να θεωρηθεί έγκυρη η δοκιμή, πρέπει να πληρούνται οι ακόλουθες προϋποθέσεις:

— το μέσο ποσοστό εμφάνισης στην αγωγή-μάρτυρα θα πρέπει να ανέρχεται σε τουλάχιστον 70 % στο τέλος της περιόδου έκθεσης και για τις δύο γενιές (1) (7),

— για τα *C. riparius* και *C. yoshimatsui*, το 85 % του συνόλου των εμφανιζόμενων ενήλικων χειρονόμων από την αγωγή-μάρτυρα και στις δύο γενιές θα πρέπει να προκύπτει μεταξύ της 12ης και 23ης ημέρας μετά την εισαγωγή των προνυμφών πρώτου σταδίου στα δοχεία. Για το *C. dilutus*, είναι αποδεκτή μια περίοδος 20 έως 65 ημερών,

— η μέση αναλογία φύλου των πλήρως αναπτυχθέντων και ζωντανών ενήλικων ατόμων (ως κλάσμα θηλυκών ή αρσενικών) στην αγωγή-μάρτυρα και στις δύο γενιές θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 0,4, αλλά να μην υπερβαίνει την τιμή 0,6,

— για κάθε κλωβό αναπαραγωγής, ο αριθμός των αλυσίδων αυγών στους μάρτυρες της πατρικής γενιάς θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 0,6 ανά θηλυκό που προστίθεται στον κλωβό αναπαραγωγής,

— το κλάσμα των γόνιμων αλυσίδων αυγών σε κάθε κλωβό αναπαραγωγής των μαρτύρων της πατρικής γενιάς θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 0.6,

— στο τέλος της περιόδου έκθεσης και για τις δύο γενιές, θα πρέπει να μετρώνται το pH και η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου σε κάθε δοχείο. Η συγκέντρωση οξυγόνου θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 60 % της τιμής κορεσμού με αέρα (ASV ([1])) και το pH του υπερκείμενου νερού να είναι της τάξης του 6-9 σε όλα τα δοχεία δοκιμής,

— η θερμοκρασία του νερού δεν θα πρέπει να διαφέρει κατά περισσότερο από ± 1,0 °C.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Δοχεία δοκιμής και κλωβοί αναπαραγωγής

11. Οι προνύμφες εκτίθενται σε ποτήρια ζέσεως των 600 ml με διάμετρο περίπου 8,5 cm (βλ. προσάρτημα 5). Κατάλληλα είναι και άλλα δοχεία, αλλά θα πρέπει να εξασφαλίζουν κατάλληλο βάθος υπερκείμενου νερού και ιζήματος. Η επιφάνεια του ιζήματος θα πρέπει να είναι επαρκής για την παροχή 2 έως 3 cm^2 ανά προνύμφη. Η αναλογία του βάθους του

([1]) Στους 20 °C υπό κανονική ατμοσφαιρική πίεση, η τιμή ASV στα γλυκά νερά ισούται με 9,1 mg/l (το 60 % ισούται με 5,46 mg/l)

▼M6

στρώματος ιζήματος προς το βάθος του υπερκείμενου νερού θα πρέπει να είναι περίπου 1:4. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κλωβοί αναπαραγωγής (τουλάχιστον 30 cm και στις τρεις διαστάσεις) με γάζα (μέγεθος πλέγματος περίπου 1 mm) στο επάνω μέρος και σε μία τουλάχιστον πλευρά του κλωβού (βλ. προσάρτημα 5). Σε κάθε κλωβό, τοποθετείται δοχείο κρυστάλλωσης 2 l για την ωοτοκία, το οποίο περιέχει νερό δοκιμής και ίζημα. Και για το δοχείο κρυστάλλωσης, η αναλογία του βάθους του στρώματος ιζήματος προς το βάθος του υπερκείμενου νερού θα πρέπει να είναι περίπου 1:4. Αφού συλλεχθούν οι αλυσίδες αυγών από το δοχείο κρυστάλλωσης, τοποθετούνται σε πλάκες μικροτιτλοδότησης 12 βοθρίων (μία αλυσίδα ανά βοθρίο το οποίο περιέχει τουλάχιστον 2,5 ml νερό από το εμβολιασμένο δοχείο κρυστάλλωσης) και, στη συνέχεια, οι πλάκες καλύπτονται με ένα καπάκι για την αποφυγή σημαντικής εξάτμισης. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν επίσης άλλα δοχεία που είναι κατάλληλα για τη φύλαξη των αλυσίδων αυγών. Με εξαίρεση τις πλάκες μικροτιτλοδότησης, όλα τα δοχεία δοκιμής και ο λοιπός εξοπλισμός που θα έρχονται σε επαφή με το σύστημα δοκιμής θα πρέπει να είναι κατασκευασμένα εξ ολοκλήρου από γυαλί ή άλλο χημικώς αδρανές υλικό (π.χ. πολυτετραφθοροαιθυλένιο).

Επιλογή ειδών

12. Το είδος που χρησιμοποιείται στη δοκιμή είναι κατά προτίμηση το *Chironomus riparius*. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί το *C. yoshimatsui*. Κατάλληλο είναι επίσης το *C. dilutus*, αλλά είναι πιο δύσκολο στη μεταχείριση και απαιτεί μεγαλύτερο χρονικό διάστημα δοκιμής. Οι λεπτομέρειες των μεθόδων καλλιέργειας του *C. riparius* παρατίθενται στο προσάρτημα 2. Πληροφορίες για τις συνθήκες καλλιέργειας είναι επίσης διαθέσιμες για τα είδη *C. dilutus* (5) και *C. yoshimatsui* (14). Η ταυτοποίηση των ειδών θα πρέπει να επιβεβαιώνεται πριν από τη δοκιμή, ενώ δεν απαιτείται πριν από κάθε δοκιμή, εάν οι οργανισμοί προέρχονται από εσωτερική καλλιέργεια.

Ίζημα

13. Κατά προτίμηση, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μορφοποιημένα ιζήματα (που ονομάζονται επίσης ανασυσταθέντα, τεχνητά ή συνθετικά ιζήματα). Ωστόσο, εάν χρησιμοποιείται φυσικό ίζημα, θα πρέπει να έχει χαρακτηριστεί (τουλάχιστον το pH, η περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, ενώ συνιστάται επίσης ο προσδιορισμός άλλων παραμέτρων, όπως η αναλογία C/N και η κοκκομετρία) και να είναι απαλλαγμένο από τυχόν μόλυνση και άλλους οργανισμούς που ενδέχεται να ανταγωνιστούν ή να καταναλώσουν τις προνύμφες χειρονομίδων. Επίσης συνιστάται, πριν από τη δοκιμή, ο εγκλιματισμός των ιζημάτων για επτά ημέρες υπό τις συνθήκες της δοκιμής. Όπως περιγράφεται στο σημείο (1), συνιστάται η χρήση του ακόλουθου μορφοποιημένου ιζήματος (1) (20) (21):

α. 4-5 % (ξηρό βάρος) τύρφης: με pH όσο το δυνατόν πλησιέστερα στο 5,5 έως 6,0. Είναι σημαντικό να χρησιμοποιείται τύρφη σε μορφή σκόνης, λεπτοαλεσμένη (μέγεθος σωματιδίων ≤ 1 mm) και μόνο αερόξηρη,

β. 20 % (ξηρό βάρος) καολινιτικής αργίλου (περιεκτικότητα σε καολινίτη κατά προτίμηση άνω του 30 %),

γ. 75-76 % (ξηρό βάρος) χαλαζιακής άμμου (θα πρέπει να επικρατεί η λεπτή άμμος με ποσοστό σωματιδίων μεγέθους μεταξύ 50 και 200 μm πάνω από 50 %),

δ. Προστίθεται απιονισμένο νερό για να επιτευχθεί υγρασία του τελικού μείγματος της τάξης του 30–50 %,

ε. Προστίθεται ανθρακικό ασβέστιο χημικώς καθαρό ($CaCO_3$) για τη ρύθμιση του pH του τελικού μείγματος του ιζήματος σε 7,0 ± 0,5,

στ. Η περιεκτικότητα του τελικού μίγματος σε οργανικό άνθρακα θα πρέπει να είναι 2 % (± 0,5 %) και να ρυθμίζεται με τη χρήση κατάλληλων ποσοτήτων τύρφης και άμμου, σύμφωνα με τα στοιχεία α) και γ).

14. Η πηγή της τύρφης, της καολινιτικής αργίλου και της άμμου θα πρέπει να είναι γνωστή. Τα συστατικά των ιζημάτων θα πρέπει να ελέγχονται για

▼M6

απουσία χημικής μόλυνσης (π.χ. βαρέα μέταλλα, οργανοχλωριωμένες ενώσεις, οργανοφωσφορικές ενώσεις). Στο προσάρτημα 3, παρατίθεται παράδειγμα παρασκευής μορφοποιημένου ιζήματος. Επίσης, επιτρέπεται η ανάμειξη των ξηρών συστατικών, εάν καταδεικνύεται ότι, μετά την προσθήκη υπερκείμενου νερού, δεν διαχωρίζονται τα συστατικά του ιζήματος (π.χ. επίπλευση σωματιδίων τύρφης) και ότι η τύρφη ή το ίζημα είναι επαρκώς εγκλιματισμένα.

Νερό

15. Κάθε νερό που είναι σύμφωνο με τα χημικά χαρακτηριστικά του αποδεκτού νερού αραίωσης, τα οποία απαριθμούνται στα προσαρτήματα 2 και 4, είναι κατάλληλο ως νερό δοκιμής. Οποιοδήποτε κατάλληλο νερό, φυσικό (επιφανειακά ή υπόγεια ύδατα), ανασυσταθέν (βλ. προσάρτημα 2) ή αποχλωριωμένο νερό βρύσης είναι αποδεκτό ως νερό καλλιέργειας και δοκιμής, εάν οι χειρονομίδες επιβιώνουν σε αυτό καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας και των δοκιμών χωρίς να επιδεικνύουν σημεία πίεσης. Κατά την έναρξη της δοκιμής, το pH του νερού δοκιμής θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 6 και 9 και η συνολική σκληρότητα να μην είναι μεγαλύτερη από 400 mg/l ως $CaCO_3$. Ωστόσο, εάν υπάρχουν υπόνοιες για αλληλεπίδραση μεταξύ ιόντων σκληρότητας και της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, θα πρέπει να χρησιμοποιείται νερό χαμηλότερης σκληρότητας (και, ως εκ τούτου, δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό Elendt M4 στην περίπτωση αυτή). Το ίδιο είδος νερού θα πρέπει να χρησιμοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης. Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του νερού, που απαριθμούνται στο προσάρτημα 4, θα πρέπει να μετρώνται τουλάχιστον δύο φορές ετησίως ή όταν υπάρχουν υπόνοιες για σημαντική μεταβολή τους.

Διαλύματα παρακαταθήκης — Εμβολιασμένο νερό

16. α. Οι συγκεντρώσεις δοκιμής υπολογίζονται βάσει των συγκεντρώσεων στη στήλη ύδατος, δηλαδή στο νερό που υπέρκειται του ιζήματος. Τα διαλύματα δοκιμής των επιλεγμένων συγκεντρώσεων παρασκευάζονται συνήθως με αραίωση ενός διαλύματος παρακαταθήκης. Τα διαλύματα παρακαταθήκης θα πρέπει κατά προτίμηση να παρασκευάζονται με διάλυση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο νερό δοκιμής. Η χρήση διαλυτών ή μέσων διασποράς μπορεί να είναι απαραίτητη σε ορισμένες περιπτώσεις, προκειμένου να παρασκευασθεί ένα κατάλληλα συμπυκνωμένο διάλυμα παρακαταθήκης. Στους διαλύτες που μπορούν να χρησιμοποιούνται περιλαμβάνονται η ακετόνη, ο μονοαιθυλαιθέρας της αιθυλενογλυκόλης, ο διμεθυλαιθέρας της αιθυλενογλυκόλης, το διμεθυλοφορμαμίδιο και η τριαιθυλενογλυκόλη. Μέσα διασποράς που μπορούν να χρησιμοποιούνται είναι το Cremophor RH40, το Tween 80, η μεθυλοκυτταρίνη 0,01 % και το HCO-40. Η συγκέντρωση του μέσου διαλυτοποίησης στο τελικό μέσο δοκιμής θα πρέπει να είναι ελάχιστη (δηλαδή ≤ 0,1 ml/l) και η ίδια σε κάθε αγωγή. Όταν χρησιμοποιείται μέσο διαλυτοποίησης, αυτό δεν θα πρέπει να έχει σημαντικές επιδράσεις στην επιβίωση, όπως γίνεται αντιληπτό με έναν μάρτυρα του διαλύτη σε σύγκριση με έναν αρνητικό μάρτυρα (νερού). Εντούτοις, θα πρέπει να καταβάλλεται κάθε δυνατή προσπάθεια για την αποφυγή της χρήσης τέτοιων υλικών.

Διαλύματα παρακαταθήκης — Εμβολιασμένο ίζημα

16. β. Τα εμβολιασμένα ιζήματα με την επιλεγμένη συγκέντρωση παρασκευάζονται συνήθως με την απευθείας προσθήκη διαλύματος της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο ίζημα. Διάλυμα παρακαταθήκης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που έχει διαλυθεί σε απιονισμένο νερό αναμειγνύεται με το μορφοποιημένο ίζημα με τη βοήθεια πρέσας, αναμείκτη τροφών ή χειρωνακτικά. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι δυσδιάλυτη στο νερό, μπορεί να διαλυθεί σε όσο το δυνατόν μικρότερο όγκο κατάλληλου οργανικού διαλύτη (π.χ. εξάνιο, ακετόνη ή χλωροφόρμιο). Στη συνέχεια, το διάλυμα αυτό αναμειγνύεται με 10 g λεπτής χαλαζιακής άμμου για κάθε δοχείο δοκιμής. Ο διαλύτης αφήνεται να εξατμιστεί και θα πρέπει να απομακρύνεται εντελώς από την άμμο. Στη συνέχεια, η άμμος αναμιγνύεται με την κατάλληλη ποσότητα ιζήματος. Για τη διαλυτοποίηση, τη διασπορά ή τη γαλακτωματοποίηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, μπορούν να χρησιμοποιούνται μόνο μέσα που εξατμίζονται εύκολα. Υπενθυμίζεται ότι, κατά την παρασκευή του ιζήματος, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η άμμος που παρέχεται από το μείγμα υπό δοκιμή χημικής ουσίας και άμμου (δηλαδή το ίζημα θα πρέπει επομένως να παρασκευάζεται με λιγότερη άμμο). Θα πρέπει να

▼M6

λαμβάνεται μέριμνα ώστε να εξασφαλίζεται ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία που προστίθεται στο ίζημα είναι πλήρως και ομοιογενώς κατανεμημένη μέσα στο ίζημα. Εάν είναι απαραίτητο, μπορούν να αναλύονται επιμέρους δείγματα για τον προσδιορισμό του βαθμού ομοιογένειας.

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

17. Ο σχεδιασμός της δοκιμής αφορά την επιλογή του αριθμού και της κλιμάκωσης των συγκεντρώσεων δοκιμής, του αριθμού των δοχείων για κάθε συγκέντρωση, του αριθμού των προνυμφών ανά δοχείο, του αριθμού των δοχείων κρυστάλλωσης και των κλωβών αναπαραγωγής. Παρακάτω περιγράφονται σχεδιασμοί για την EC_x, την NOEC και την οριακή δοκιμή.

Σχεδιασμός για ανάλυση παλινδρόμησης

18. Η συγκέντρωση επίδρασης (EC_x) και το εύρος συγκεντρώσεων που ενδιαφέρουν σε σχέση με την επίδραση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να καλύπτονται από τη δοκιμή, έτσι ώστε να μην γίνεται παρέκταση του τελικού σημείου εκτός των ορίων των παραγόμενων δεδομένων. Θα πρέπει να αποφεύγεται η παρέκταση πολύ χαμηλότερα από την κατώτατη συγκέντρωση ή πάνω από την ανώτατη συγκέντρωση. Η διεξαγωγή προκαταρκτικής δοκιμής καθορισμού εύρους σύμφωνα με τις μεθόδους δοκιμών Γ.27 ή Γ.28 ενδέχεται να είναι χρήσιμη για την επιλογή του κατάλληλου εύρους συγκεντρώσεων που θα χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή.

19. Για μια προσέγγιση EC_x, απαιτούνται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις, με οκτώ επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση. Για κάθε συγκέντρωση, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται δύο κλωβοί αναπαραγωγής (Α και Β). Οι οκτώ επαναλήψεις χωρίζονται σε δύο ομάδες των τεσσάρων επαναλήψεων που χρησιμοποιούνται για κάθε κλωβό αναπαραγωγής. Αυτή η συγχώνευση των επαναλήψεων είναι αναγκαία λόγω του αριθμού των χειρονόμων που απαιτείται να υπάρχουν στον κλωβό για ορθές εκτιμήσεις της αναπαραγωγής. Ωστόσο, η πρώτη θυγατρική γενιά έχει και πάλι οκτώ επαναλήψεις, που ξεκινούν από τους εκτιθέμενους πληθυσμούς στους κλωβούς αναπαραγωγής. Ο συντελεστής μεταξύ των συγκεντρώσεων δεν θα πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 2 (εξαίρεση θα μπορούσε να γίνει σε περιπτώσεις όπου η καμπύλη δόσης-απόκρισης έχει μικρή κλίση). Ο αριθμός των επαναλήψεων σε κάθε αγωγή μπορεί να μειώνεται στις έξι (τρεις σε κάθε κλωβό αναπαραγωγής), εάν αυξάνεται ο αριθμός των συγκεντρώσεων δοκιμής με διαφορετικές αποκρίσεις. Η αύξηση του αριθμού των επαναλήψεων ή η μείωση του μεγέθους των διαστημάτων μεταξύ των συγκεντρώσεων δοκιμής τείνουν να οδηγούν σε στενότερα διαστήματα εμπιστοσύνης γύρω από την EC_X.

Σχεδιασμός για την εκτίμηση της τιμής NOEC

20. Για μια προσέγγιση NOEC, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πέντε συγκεντρώσεις δοκιμής με τουλάχιστον οκτώ επαναλήψεις (4 για κάθε κλωβό αναπαραγωγής, Α και Β) και ο συντελεστής μεταξύ των συγκεντρώσεων δεν θα πρέπει να είναι μεγαλύτερος από δύο. Ο αριθμός των επαναλήψεων θα πρέπει να είναι επαρκής για να εξασφαλίζεται κατάλληλη στατιστική ισχύς για τον εντοπισμό διαφοράς 20 % από τον μάρτυρα με επίπεδο σημαντικότητας 5 % (α = 0,05). Για τον ρυθμό ανάπτυξης, την αναπαραγωγική απόδοση και τη γονιμότητα, κατάλληλη είναι συνήθως μια ανάλυση διασποράς (ANOVA), ακολουθούμενη από τη δοκιμασία Dunnett ή τη δοκιμασία Williams (22-25). Για τον λόγο εμφάνισης και την αναλογία φύλου, κατάλληλες μπορεί να είναι οι δοκιμασίες Cochran-Armitage, Fisher's exact (με διόρθωση κατά Bonferroni) ή Mantel-Haentzal.

Οριακή δοκιμή

21. Εάν δεν έχει παρατηρηθεί καμία επίδραση στην προαιρετική προκαταρκτική δοκιμή καθορισμού εύρους έως μια μέγιστη συγκέντρωση, είναι δυνατόν να διεξαχθεί οριακή δοκιμή (μία συγκέντρωση δοκιμής και μάρτυρας(-ες)). Σκοπός της οριακής δοκιμής είναι να δείξει ότι κάθε τοξική επίδραση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας εντοπίζεται σε επίπεδα μεγαλύτερα από την οριακή συγκέντρωση που ελέγχεται. Συνιστώνται 100 mg/l για το νερό και 1 000 mg/kg (ξηρό βάρος) για το ίζημα. Συνήθως, χρειάζονται τουλάχιστον οκτώ επαναλήψεις, τόσο για την αγωγή όσο και

▼M6

για τον μάρτυρα. Θα πρέπει να καταδεικνύεται επαρκής στατιστική ισχύς για τον εντοπισμό διαφοράς 20 % από τον μάρτυρα με επίπεδο σημαντικότητας 5 % (α = 0,05). Με μετρικές αποκρίσεις (π.χ. ρυθμός ανάπτυξης), η δοκιμασία t είναι κατάλληλη στατιστική μέθοδος, εάν τα δεδομένα πληρούν τις απαιτήσεις αυτής της δοκιμής (κανονικότητα, ομοιογενείς διασπορές). Εάν δεν πληρούνται οι απαιτήσεις αυτές, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η δοκιμασία t άνισης διασποράς ή μια μη παραμετρική δοκιμασία, όπως η Wilcoxon-Mann-Whitney. Για τον λόγο εμφάνισης, κατάλληλη είναι η δοκιμή Fisher's exact.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Συνθήκες έκθεσης

Προετοιμασία του συστήματος νερού-ιζήματος (εμβολιασμός νερού)

22. α. Μορφοποιημένο ίζημα (βλ. παραγράφους 13-14 και προσάρτημα 3) προστίθεται σε κάθε δοχείο δοκιμής και δοχείο κρυστάλλωσης για να σχηματιστεί ένα στρώμα τουλάχιστον 1,5 cm (για το δοχείο κρυστάλλωσης μπορεί να είναι λίγο μικρότερο) αλλά 3 cm το μέγιστο. Νερό (βλ. παράγραφο 15) προστίθεται ώστε η αναλογία του βάθους του στρώματος ιζήματος προς το βάθος του νερού να μην υπερβαίνει το 1:4. Μετά την προετοιμασία των δοχείων δοκιμής, το σύστημα ιζήματος-νερού θα πρέπει να παραμένει υπό ήπιο αερισμό για περίπου επτά ημέρες πριν από την προσθήκη των προνυμφών πρώτου σταδίου της πατρικής ή πρώτης θυγατρικής γενιάς (βλ. παράγραφο 14 και προσάρτημα 3). Το σύστημα ιζήματος-νερού των δοχείων κρυστάλλωσης δεν αερίζεται κατά τη διάρκεια της δοκιμής, επειδή δεν χρειάζεται να υποστηρίζεται η επιβίωση των προνυμφών (οι αλυσίδες αυγών έχουν ήδη συλλεχθεί πριν από την εκκόλαψη). Για να αποφεύγεται ο διαχωρισμός των συστατικών του ιζήματος και η επαναιώρηση του λεπτόκοκκου υλικού κατά τη διάρκεια της προσθήκης νερού δοκιμής στη στήλη ύδατος, μπορεί να καλύπτεται το ίζημα με πλαστικό δίσκο, ενώ το νερό χύνεται επάνω σε αυτό. Αμέσως μετά ο δίσκος αφαιρείται. Κατάλληλες μπορεί να είναι και άλλες συσκευές.

Προετοιμασία του συστήματος νερού-ιζήματος (εμβολιασμένο ίζημα)

22. β. Τα εμβολιασμένα ιζήματα που έχουν προετοιμαστεί σύμφωνα με την παράγραφο 16β τοποθετούνται στα δοχεία και στο δοχείο κρυστάλλωσης και προστίθεται υπερκείμενο νερό για να επιτευχθεί αναλογία όγκων ιζήματος-νερού 1:4. Το βάθος του στρώματος ιζήματος θα πρέπει να κυμαίνεται από 1,5 έως 3 cm (για το δοχείο κρυστάλλωσης μπορεί να είναι λίγο μικρότερο). Για να αποφεύγεται ο διαχωρισμός των συστατικών του ιζήματος και η επαναιώρηση του λεπτόκοκκου υλικού κατά τη διάρκεια της προσθήκης νερού δοκιμής στη στήλη ύδατος, μπορεί να καλύπτεται το ίζημα με πλαστικό δίσκο, ενώ το νερό χύνεται επάνω σε αυτό, και αμέσως μετά να αφαιρείται ο δίσκος. Κατάλληλες μπορεί να είναι και άλλες συσκευές. Μετά την ετοιμασία του εμβολιασμένου ιζήματος με το υπερκείμενο νερό, είναι σκόπιμο να παρέχεται ένα χρονικό περιθώριο για την κατανομή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μεταξύ του ιζήματος και της υδατικής φάσης (4) (5) (7) (18). Αυτό θα πρέπει να γίνεται κατά προτίμηση υπό τις συνθήκες θερμοκρασίας και αερισμού που εφαρμόζονται στη δοκιμή. Ο κατάλληλος χρόνος εξισορρόπησης είναι ειδικός για τα ιζήματα και τις χημικές ουσίες και μπορεί να κυμαίνεται από ώρες έως ημέρες και, σε σπάνιες περιπτώσεις, έως πέντε εβδομάδες. Δεδομένου ότι οι χρόνοι αυτοί επιτρέπουν την αποικοδόμηση πολλών χημικών ουσιών, δεν αναμένεται η επίτευξη ισορροπίας, αλλά συνιστάται 48ωρη περίοδος εξισορρόπησης. Ωστόσο, όταν είναι γνωστό ότι ο χρόνος ημιζωής της αποικοδόμησης της χημικής ουσίας στο ίζημα είναι πολύ μεγάλος (βλ. παράγραφο 8), ο χρόνος εξισορρόπησης μπορεί να παραταθεί. Στο τέλος αυτής της νέας περιόδου εξισορρόπησης, θα πρέπει να μετράται η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο υπερκείμενο νερό, στο ενδοπορικό νερό και στο ίζημα, τουλάχιστον στα δοχεία με την υψηλότερη και τη χαμηλότερη συγκέντρωση (βλ. παράγραφο 38). Οι εν λόγω αναλυτικοί προσδιορισμοί της υπό δοκιμή χημικής ουσίας επιτρέπουν τον υπολογισμό του ισοζυγίου μάζας και την έκφραση των αποτελεσμάτων με βάση τις μετρούμενες συγκεντρώσεις.

23. Τα δοχεία δοκιμής θα πρέπει να καλύπτονται (π.χ. με γυάλινες πλάκες). Εάν είναι απαραίτητο, κατά τη διάρκεια της μελέτης το νερό μπορεί να συμπληρώνεται μέχρι τον αρχικό όγκο, ώστε να αναπληρώνεται η εξάτμιση. Αυτό θα πρέπει να γίνεται με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό για να αποτρέπεται τυχόν συσσώρευση αλάτων. Τα δοχεία

▼M6

κρυστάλλωσης στους κλωβούς αναπαραγωγής δεν καλύπτονται και μπορούν να ρυθμίζονται για να αναπληρώνεται η απώλεια νερού κατά τη διάρκεια της περιόδου δοκιμής. Ωστόσο, αυτό δεν χρειάζεται, επειδή οι αλυσίδες αυγών βρίσκονται σε επαφή με το νερό μόνο για περίπου μία ημέρα και τα δοχεία κρυστάλλωσης χρησιμοποιούνται μόνο κατά τη διάρκεια μιας σύντομης φάσης της δοκιμής.

Προσθήκη των οργανισμών δοκιμής

24. Τέσσερις έως πέντε ημέρες πριν από την προσθήκη των προνυμφών πρώτου σταδίου για την πατρική γενιά, θα πρέπει να λαμβάνονται μάζες αυγών από την καλλιέργεια και να τοποθετούνται σε μικρά δοχεία με το μέσο καλλιέργειας. Μπορεί να χρησιμοποιείται παλαιό μέσο από την αρχική καλλιέργεια ή προσφάτως παρασκευασμένο. Σε κάθε περίπτωση, θα πρέπει να προστίθεται στο μέσο καλλιέργειας μικρή ποσότητα τροφής, π.χ. λίγες σταγόνες διηθήματος από εναιώρημα λεπτοαλεσμένων νιφάδων τροφής για ψάρια (βλ. προσάρτημα 2). Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο μάζες φρέσκων αυγών. Κανονικά, οι προνύμφες αρχίζουν να εκκολάπτονται λίγες ημέρες μετά την τοποθέτηση των αυγών (2 έως 3 ημέρες για το *C. riparius* στους 20 °C και 1 έως 4 ημέρες για το *C. dilutus* στους 23 °C και το *C. yoshimatsui* στους 25 °C) και αναπτύσσονται σε τέσσερα στάδια, διάρκειας 4-8 ημερών το καθένα. Για τη δοκιμή θα πρέπει να χρησιμοποιούνται προνύμφες πρώτου σταδίου (48 ώρες, το μέγιστο, μετά την εκκόλαψη). Το στάδιο των προνυμφών μπορεί δυνητικά να εξακριβωθεί από το πλάτος της κεφαλικής κάψας (7).

25. Είκοσι προνύμφες πρώτου σταδίου για την πατρική γενιά κατανέμονται τυχαία, με αμβλύ σιφώνιο, σε κάθε δοχείο δοκιμής που περιέχει το σύστημα ιζήματος-νερού. Κατά τη διάρκεια της προσθήκης των προνυμφών στα δοχεία δοκιμής, ο αερισμός του νερού διακόπτεται και δεν θα πρέπει να αποκαθίσταται πριν από την παρέλευση 24ώρου από την προσθήκη των προνυμφών (βλ. παράγραφο 32). Ανάλογα με τον σχεδιασμό της δοκιμής (βλ. παραγράφους 19 και 20), ο αριθμός των χρησιμοποιούμενων προνυμφών ανά συγκέντρωση είναι τουλάχιστον 120 (6 επαναλήψεις ανά συγκέντρωση) για την προσέγγιση της EC_X και 160 για την προσέγγιση της NOEC (8 επαναλήψεις ανά συγκέντρωση). Στον σχεδιασμό εμβολιασμένου ιζήματος, η έκθεση ξεκινάει με την προσθήκη των προνυμφών.

Εμβολιασμός του υπερκείμενου νερού

26. Είκοσι τέσσερις ώρες μετά την προσθήκη των προνυμφών πρώτου σταδίου για την πατρική γενιά, η υπό δοκιμή χημική ουσία εμβολιάζεται στη στήλη υπερκείμενου ύδατος και παρέχεται και πάλι ήπιος αερισμός (για πιθανές τροποποιήσεις του σχεδιασμού δοκιμής, βλ. παράγραφο 7). Μικροί όγκοι των διαλυμάτων παρακαταθήκης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας εφαρμόζονται κάτω από την επιφάνεια του νερού με τη βοήθεια σιφωνίου. Το υπερκείμενο νερό θα πρέπει στη συνέχεια να αναμειγνύεται με επιμέλεια, ώστε να μην διαταράσσεται το ίζημα. Στον σχεδιασμό εμβολιασμένου νερού, η έκθεση ξεκινάει με τον εμβολιασμό του νερού (δηλ. μία ημέρα μετά την προσθήκη των προνυμφών).

Συλλογή εμφανιζόμενων ενηλίκων

27. Οι εμφανιζόμενοι χειρονόμοι της πατρικής γενιάς συλλέγονται από τα δοχεία δοκιμής τουλάχιστον μία φορά την ημέρα, αλλά κατά προτίμηση δύο, (βλ. σημείο 36) με τη χρήση αναρροφητήρα, φυσητήρα εμφυσήσεως αέρα ή παρόμοιας συσκευής (βλ. προσάρτημα 5). Θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μην υφίστανται ζημιά τα ενήλικα άτομα. Οι χειρονόμοι που συλλέγονται από τέσσερα δοχεία δοκιμής εντός μίας αγωγής απελευθερώνονται σε έναν κλωβό αναπαραγωγής στον οποίο έχουν εκχωρηθεί προηγουμένως. Την ημέρα της πρώτης εμφάνισης (αρσενικού), τα δοχεία κρυστάλλωσης εμβολιάζονται με έναν μικρό όγκο του διαλύματος παρακαταθήκης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας κάτω από την επιφάνεια του νερού (σχεδιασμός εμβολιασμένου νερού) με τη βοήθεια σιφωνίου. Το υπερκείμενο νερό θα πρέπει στη συνέχεια να αναμειγνύεται με επιμέλεια, ώστε να μην διαταράσσεται το ίζημα. Η ονομαστική συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο δοχείο κρυστάλλωσης είναι ίδια όπως και στα δοχεία αγωγής που έχουν εκχωρηθεί στον συγκεκριμένο κλωβό αναπαραγωγής. Για τον σχεδιασμό εμβολιασμένου ιζήματος, τα δοχεία κρυστάλλωσης προετοιμάζονται περίπου την 11η ημέρα μετά

▼M6

την έναρξη της έκθεσης (δηλ. την προσθήκη προνυμφών πατρικής γενιάς) ώστε να γίνει εξισορρόπησή τους για περίπου 48 ώρες προτού παραχθούν οι πρώτες αλυσίδες αυγών.

28. Οι αλυσίδες αυγών συλλέγονται από το δοχείο κρυστάλλωσης στον κλωβό αναπαραγωγής με λαβίδα ή αμβλύ σιφώνιο. Κάθε αλυσίδα αυγών τοποθετείται μέσα σε ένα δοχείο που περιέχει μέσο καλλιέργειας από το δοχείο κρυστάλλωσης από το οποίο συλλέχθηκε (π.χ. ένα βοθρίο μιας μικροπλάκας 12 βοθρίων με τουλάχιστον 2,5 ml μέσου). Τα δοχεία με τις αλυσίδες αυγών καλύπτονται με ένα καπάκι για την αποφυγή σημαντικής εξάτμισης. Οι αλυσίδες αυγών παραμένουν για παρατήρηση τουλάχιστον έξι μέρες αφού παραχθούν, ώστε να ταξινομηθούν ως γόνιμα ή μη γόνιμα.

Για την έναρξη της πρώτης θυγατρικής γενιάς, επιλέγονται τουλάχιστον τρεις, αλλά κατά προτίμηση έξι, γόνιμες αλυσίδες αυγών από κάθε κλωβό αναπαραγωγής, οι οποίες παραμένουν μαζί με λίγη τροφή ώστε να εκκολαφθούν. Αυτές οι αλυσίδες αυγών θα πρέπει να έχουν παραχθεί κατά την κορύφωση της ωοτοκίας, η οποία συνήθως συμβαίνει περίπου την 19η ημέρα της δοκιμής στους μάρτυρες. Στην ιδανική περίπτωση, η έναρξη της πρώτης θυγατρικής γενιάς σε όλες τις αγωγές γίνεται την ίδια ημέρα, αλλά αυτό ενδέχεται να μην είναι πάντα δυνατό εξαιτίας επιδράσεων στην ανάπτυξη των προνυμφών που σχετίζονται με τη χημική ουσία. Σε αυτήν την περίπτωση, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορούν να εκκινηθούν αργότερα από τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις της αγωγής και τον μάρτυρα (διαλύτη).

29. α. Στον σχεδιασμό εμβολιασμένου νερού, η προετοιμασία του συστήματος ιζήματος-νερού για την πρώτη θυγατρική γενιά πραγματοποιείται με εμβολιασμό της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μέσα στη στήλη υπερκείμενου νερού περίπου 1 ώρα πριν από την προσθήκη των προνυμφών πρώτου σταδίου στα δοχεία δοκιμής. Μικροί όγκοι των διαλυμάτων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας εφαρμόζονται κάτω από την επιφάνεια του νερού με τη βοήθεια σιφωνίου. Το υπερκείμενο νερό θα πρέπει στη συνέχεια να αναμειγνύεται με επιμέλεια, ώστε να μην διαταράσσεται το ίζημα. Μετά τον εμβολιασμό, παρέχεται ήπιος αερισμός.

29. β. Στον σχεδιασμό εμβολιασμένου ιζήματος, τα δοχεία έκθεσης που περιέχουν το σύστημα ιζήματος-νερού για την πρώτη θυγατρική γενιά προετοιμάζονται με τον ίδιο τρόπο όπως και για την πατρική γενιά.

30. Είκοσι προνύμφες πρώτου σταδίου (48 ώρες μετά την εκκόλαψη, το μέγιστο) για την πρώτη θυγατρική γενιά κατανέμονται τυχαία, με αμβλύ σιφώνιο, σε κάθε δοχείο δοκιμής που περιέχει το σύστημα ιζήματος-νερού. Κατά τη διάρκεια της προσθήκης των προνυμφών πρώτου σταδίου στα δοχεία δοκιμής, ο αερισμός του νερού θα πρέπει να διακόπτεται και να μην αποκαθίσταται πριν από την παρέλευση 24ώρου από την προσθήκη των προνυμφών. Ανάλογα με τον σχεδιασμό της δοκιμής (βλ. παραγράφους 19 και 20), ο αριθμός των χρησιμοποιούμενων προνυμφών ανά συγκέντρωση είναι τουλάχιστον 120 (6 επαναλήψεις ανά συγκέντρωση) για την προσέγγιση της EC_X και 160 για την προσέγγιση της NOEC (8 επαναλήψεις ανά συγκέντρωση).

Τροφή

31. Η παροχή τροφής στις προνύμφες μέσα στα δοχεία δοκιμής είναι απαραίτητη, κατά προτίμηση καθημερινά ή τουλάχιστον τρεις φορές την εβδομάδα. Η τροφή για ψάρια (εναιώρημα σε νερό ή λεπτοαλεσμένη τροφή, π.χ. Tetra-Min ή Tetra-Phyll, βλ. λεπτομέρειες στο προσάρτημα 2), σε ποσότητα 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg για το είδος C. yoshimatsui) ανά προνύμφη ανά ημέρα, είναι επαρκής ποσότητα τροφής για τις νεαρές προνύμφες κατά τις πρώτες 10 ημέρες της ανάπτυξής τους. Οι μεγαλύτερης ηλικίας προνύμφες μπορεί να χρειάζονται ελαφρώς μεγαλύτερες ποσότητες τροφής: 0,5-1,0 mg ανά προνύμφη ανά ημέρα θα πρέπει να είναι επαρκής ποσότητα για το υπόλοιπο της δοκιμής. Το σιτηρέσιο θα πρέπει να μειώνεται σε κάθε αγωγή και στους μάρτυρες, σε περίπτωση που αναπτύσσονται μύκητες ή εάν παρατηρείται θνησιμότητα στους μάρτυρες. Εάν η ανάπτυξη μυκήτων δεν μπορεί να ανακοπεί, η δοκιμή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται.

Η τοξικολογική συνάφεια της έκθεσης μέσω της πρόσληψης τροφής είναι γενικά υψηλότερη για χημικές ουσίες με υψηλή συγγένεια προς οργανικό

▼M6

άνθρακα ή χημικές ουσίες που συνδέονται με το ίζημα με ομοιοπολικούς δεσμούς. Ως εκ τούτου, κατά τη δοκιμή χημικών ουσιών με τις εν λόγω ιδιότητες, η ποσότητα τροφής που απαιτείται για να διασφαλίζεται η επιβίωση και η φυσική ανάπτυξη των προνυμφών μπορεί να προστίθεται στο μορφοποιημένο ίζημα πριν από την περίοδο σταθεροποίησης, ανάλογα με τη ρυθμιστική απαίτηση. Για την αποφυγή της υποβάθμισης της ποιότητας του νερού, θα πρέπει να χρησιμοποιείται φυτικό υλικό αντί της τροφής για ψάρια, π.χ. προσθήκη 0,5 % (ξηρό βάρος) λεπτοαλεσμένων φύλλων τσουκνίδας (*Urtica dioica*), μουριάς (*Morus alba*), λευκού τριφυλλιού (*Trifolium repens*), σπανακιού (*Spinacia oleracea*) ή άλλων φυτικών υλών (*Cerophyl* ή *α*-κυτταρίνη). Η προσθήκη του πλήρους σιτηρεσίου από μια οργανική πηγή τροφής στο ίζημα πριν από τον εμβολιασμό δεν είναι ασήμαντο ζήτημα όσον αφορά την ποιότητα του νερού και τη βιολογική απόδοση (21), ούτε τυποποιημένη μέθοδος. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες παρέχουν ενδείξεις ότι η μέθοδος αυτή είναι αποτελεσματική (19) (26). Οι ενήλικοι χειρονόμοι στον κλωβό αναπαραγωγής δεν χρειάζονται σίτιση κανονικά, αλλά η αναπαραγωγική απόδοση και η γονιμότητα ενισχύονται όταν ένα τεμάχιο βαμβακιού εμποτισμένο σε κορεσμένο διάλυμα σακχαρόζης παρέχεται ως πηγή τροφής για τα εμφανιζόμενα ενήλικα άτομα (34).

Συνθήκες επώασης

32. Παρέχεται ήπιος αερισμός του υπερκείμενου νερού στα δοχεία δοκιμής 24 ώρες μετά την προσθήκη των προνυμφών πρώτου σταδίου και των δύο γενεών και συνεχίζεται καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής (θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου να μην μειώνεται σε επίπεδα κάτω από το 60 % της ASV). Ο αερισμός παρέχεται μέσω γυάλινου σιφωνίου Pasteur, του οποίου το στόμιο στερεώνεται σε ύψος 2-3 cm πάνω από το στρώμα ιζήματος, παρέχοντας μερικές φυσαλίδες/δευτερόλεπτο. Κατά τη δοκιμή πτητικών χημικών ουσιών, θα πρέπει να δίνεται προσοχή ώστε να μην αερίζεται το σύστημα ιζήματος-νερού, ενώ ταυτόχρονα θα πρέπει να ικανοποιείται το κριτήριο εγκυρότητας του ελάχιστου ποσοστού του 60 % της ASV (παράγραφος 10). Περαιτέρω καθοδήγηση παρέχεται στο σημείο (16).

33. Η δοκιμή με το είδος *C. riparius* διεξάγεται σε σταθερή θερμοκρασία 20 °C (± 2 °C). Για τα είδη *C. dilutus* και *C. yoshimatsui*, οι συνιστώμενες θερμοκρασίες είναι 23 °C και 25 °C (± 2 °C), αντιστοίχως. Εφαρμόζεται φωτοπερίοδος 16 ωρών και η φωτεινή ισχύς θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 500 και 1 000 Lux. Για τους κλωβούς αναπαραγωγής, μπορεί να συμπεριλαμβάνεται μια επιπλέον φάση μίας ώρας με ημίφως (χάραμα και σούρουπο).

Διάρκεια έκθεσης

34. Σχεδιασμός εμβολιασμένου νερού: Η περίοδος έκθεσης της πατρικής γενιάς ξεκινάει όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία εμβολιαστεί μέσα στο υπερκείμενο νερό των δοχείων δοκιμής (το οποίο γίνεται μία ημέρα μετά την εισαγωγή των προνυμφών — για πιθανές τροποποιήσεις του σχεδιασμού έκθεσης, βλ. παράγραφο 7). Η έκθεση της πρώτης θυγατρικής γενιάς των προνυμφών ξεκινάει αμέσως, επειδή αυτές οι προνύμφες εισάγονται σε σύστημα ιζήματος-νερού που έχει ήδη εμβολιαστεί. Η μέγιστη διάρκεια έκθεσης για την πατρική γενιά είναι 27 ημέρες και για την πρώτη θυγατρική γενιά 28 ημέρες (οι προνύμφες της πατρικής γενιάς παραμένουν μία ημέρα μέσα στα δοχεία χωρίς έκθεση) για τα είδη *C. riparius* και *C. yoshimatsui*. Λαμβανομένης υπόψη της επικάλυψης, η πλήρης διάρκεια της δοκιμής είναι περίπου 44 ημέρες. Για το είδος *C. dilutus*, οι μέγιστες διάρκειες έκθεσης είναι 64 και 65 ημέρες για την πατρική και πρώτη θυγατρική γενιά, αντίστοιχα. Η συνολική διάρκεια είναι περίπου 100 ημέρες.

Σχεδιασμός εμβολιασμένου ιζήματος: η έκθεση ξεκινάει με την προσθήκη των προνυμφών και διαρκεί 28 ημέρες το μέγιστο και για τις δύο γενιές για τα είδη *C. riparius* και *C. yoshimatsui*, και 65 ημέρες το μέγιστο και για τις δύο γενιές για το είδος *C. dilutus*.

Παρατηρήσεις

Εμφάνιση

35. Προσδιορίζονται ο χρόνος ανάπτυξης και ο συνολικός αριθμός των πλήρως αναπτυχθέντων και ζωντανών αρσενικών και θηλυκών χειρονόμων και για τις δύο γενιές. Τα αρσενικά άτομα αναγνωρίζονται εύκολα από τις πτεροειδείς κεραίες τους και το λεπτό τους σώμα.

▼M6

36. Τα δοχεία δοκιμής και των δύο γενεών θα πρέπει να παρατηρούνται τουλάχιστον τρεις φορές την εβδομάδα με σκοπό την οπτική εκτίμηση κάθε μη φυσιολογικής συμπεριφοράς των προνυμφών (π.χ. εγκατάλειψη του ιζήματος, ασυνήθιστη κολύμβηση), σε σύγκριση με το δοχείο-μάρτυρα. Κατά τη διάρκεια της περιόδου εμφάνισης, η οποία ξεκινάει περίπου 12 ημέρες μετά την εισαγωγή των προνυμφών για τα είδη *C. riparius* και *C. yoshimatsui* (μετά από 20 ημέρες για το είδος *C. dilutus*), πραγματοποιείται καταμέτρηση των εμφανιζόμενων χειρονόμων και προσδιορισμός του φύλου τους τουλάχιστον μία φορά την ημέρα, αλλά κατά προτίμηση δύο (νωρίς το πρωί και αργά το απόγευμα). Μετά την αναγνώριση, οι χειρονόμοι της πατρικής γενιάς απομακρύνονται με προσοχή από τα δοχεία και μεταφέρονται σε κλωβό αναπαραγωγής. Οι χειρονόμοι της πρώτης θυγατρικής γενιάς απομακρύνονται και θανατώνονται μετά την αναγνώριση. Κάθε αλυσίδα αυγών που εναποτίθεται στα δοχεία δοκιμής της πατρικής γενιάς θα πρέπει να συλλέγεται ξεχωριστά και να μεταφέρεται με τουλάχιστον 2,5 ml εγγενούς νερού σε μικροπλάκες 12 βοθρίων (ή άλλα κατάλληλα δοχεία), οι οποίες καλύπτονται με καπάκι για την αποφυγή σημαντικής εξάτμισης. Επίσης, θα πρέπει να καταγράφεται ο αριθμός των νεκρών προνυμφών και των ορατών χρυσαλλίδων που δεν τελειοποιήθηκαν. Παραδείγματα κλωβού αναπαραγωγής, δοχείου δοκιμής και φυσητήρα εμφυσήσεως αέρα παρέχονται στο προσάρτημα 5.

Αναπαραγωγή

37. Οι επιδράσεις στην αναπαραγωγή εκτιμώνται μέσω του αριθμού των αλυσίδων αυγών που παράγονται από την πατρική γενιά των χειρονόμων και της γονιμότητας αυτών των αλυσίδων αυγών. Οι αλυσίδες αυγών συλλέγονται μία φορά την ημέρα από το δοχείο κρυστάλλωσης που είναι τοποθετημένο μέσα σε κάθε περιέκτη αναπαραγωγής. Οι αλυσίδες αυγών θα πρέπει να συλλέγονται και να μεταφέρονται με τουλάχιστον 2,5 ml εγγενούς νερού σε μια μικροπλάκα 12 βοθρίων (μία αλυσίδα αυγών σε κάθε βοθρίο) ή άλλα κατάλληλα δοχεία, τα οποία καλύπτονται με καπάκι για την αποφυγή σημαντικής εξάτμισης. Για κάθε αλυσίδα αυγών καταγράφονται τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: ημέρα παραγωγής, μέγεθος (κανονικό, δηλ. 1,0 ± 0,3 cm ή μικρό, κατά κανόνα ≤ 0,5 cm), δομή (φυσιολογική = μορφή μπανάνας με σπειροειδή κλωστή αυγών ή μη φυσιολογική, π.χ. μη σπειροειδής κλωστή αυγών) και γονιμότητα (γόνιμη ή μη γόνιμη). Η γονιμότητα μιας αλυσίδας αυγών εκτιμάται κατά τη διάρκεια των έξι ημερών μετά την παραγωγή της. Μια αλυσίδα αυγών θεωρείται γόνιμη όταν εκκολάπτεται τουλάχιστον το ένα τρίτο των αυγών. Ο συνολικός αριθμός των θηλυκών ατόμων που προστίθενται στον κλωβό αναπαραγωγής χρησιμοποιείται για να υπολογιστεί ο αριθμός των αλυσίδων αυγών ανά θηλυκό άτομο και ο αριθμός των γόνιμων αλυσίδων αυγών ανά θηλυκό άτομο. Εάν απαιτείται, ο αριθμός των αυγών σε μια αλυσίδα αυγών μπορεί να υπολογιστεί χωρίς να υποστούν ζημιά με την κυκλική μέθοδο μέτρησης (περιγράφεται στα σημεία 32 και 33).

Αναλυτικές μετρήσεις

Συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας

38. Θα πρέπει να αναλύονται, τουλάχιστον, δείγματα του υπερκείμενου νερού, του ενδοπορικού νερού και του ιζήματος στην αρχή της έκθεσης (στην περίπτωση εμβολιασμού νερού, κατά προτίμηση μία ώρα μετά την εφαρμογή) και στο τέλος της δοκιμής, στην υψηλότερη και στη χαμηλότερη συγκέντρωση. Αυτό ισχύει για τα δοχεία και από τις δύο γενιές. Από τα δοχεία κρυστάλλωσης στον κλωβό αναπαραγωγής μόνο το υπερκείμενο νερό αναλύεται, επειδή με αυτό έρχονται σε επαφή οι αλυσίδες αυγών (για τον σχεδιασμό εμβολιασμένου ιζήματος, μπορεί να εξεταστεί το ενδεχόμενο αναλυτικής επιβεβαίωσης της συγκέντρωσης του ιζήματος). Ενδεχομένως να διεξαχθούν περαιτέρω μετρήσεις του ιζήματος, του ενδοπορικού νερού ή του υπερκείμενου νερού κατά τη διάρκεια της δοκιμής, εάν κριθεί απαραίτητο. Οι συγκεκριμένοι προσδιορισμοί της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τη συμπεριφορά/κατανομή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο σύστημα νερού-ιζήματος. Η δειγματοληψία του ιζήματος και του ενδοπορικού νερού στην αρχή και κατά τη διάρκεια της δοκιμής (βλ. παράγραφο 39) απαιτεί πρόσθετα δοχεία δοκιμής για τη διεξαγωγή των αναλυτικών προσδιορισμών. Στον σχεδιασμό εμβολιασμένου νερού, οι

▼M6

μετρήσεις στο ίζημα μπορεί να μην είναι απαραίτητες εάν η κατανομή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μεταξύ νερού και ιζήματος έχει προσδιοριστεί σαφώς σε μια μελέτη νερού/ιζήματος υπό συγκρίσιμες συνθήκες (π.χ. αναλογία ιζήματος προς νερό, τύπος εφαρμογής, περιεκτικότητα του ιζήματος σε οργανικό άνθρακα) ή εάν οι μετρούμενες συγκεντρώσεις στο υπερκείμενο νερό φαίνεται ότι παραμένουν μεταξύ 80 έως 120 % της ονομαστικής ή μετρούμενης αρχικής συγκέντρωσης.

39. Όταν εκτελούνται ενδιάμεσες μετρήσεις (π.χ. την 7η ή/και 14η ημέρα) και εάν για την ανάλυση απαιτούνται μεγάλα δείγματα τα οποία δεν μπορούν να ληφθούν από τα δοχεία δοκιμής χωρίς να επηρεάσουν το σύστημα δοκιμής, θα πρέπει να εκτελούνται αναλυτικοί προσδιορισμοί σε δείγματα από πρόσθετα δοχεία δοκιμής που υποβάλλονται στην ίδια αγωγή (συμπεριλαμβανομένης της παρουσίας των οργανισμών δοκιμής), αλλά δεν χρησιμοποιούνται για βιολογικές παρατηρήσεις.

40. Η φυγοκέντριση, π.χ. σε 10 000 g στους 4 °C για 30 λεπτά, αποτελεί τη συνιστώμενη διαδικασία για την απομόνωση του διάμεσου (= ενδοπορικού) νερού. Ωστόσο, εάν καταδεικνύεται ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν προσροφάται στους ηθμούς, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της διήθησης. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να μην είναι δυνατόν να προσδιοριστούν με ανάλυση οι συγκεντρώσεις σε ενδοπορικό νερό, καθώς ο όγκος του δείγματος μπορεί να είναι υπερβολικά μικρός.

Φυσικοχημικές παράμετροι

41. Θα πρέπει να μετρώνται με κατάλληλο τρόπο το pH, το διαλυμένο οξυγόνο στο νερό δοκιμής και η θερμοκρασία του νερού στα δοχεία δοκιμής και στα δοχεία κρυστάλλωσης (βλ. παράγραφο 10). Η σκληρότητα και η αμμωνία θα πρέπει να μετρώνται στους μάρτυρες και σε ένα δοχείο δοκιμής και δοχείο κρυστάλλωσης στην υψηλότερη συγκέντρωση στην αρχή και το τέλος της δοκιμής.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

42. Σκοπός της παρούσας δοκιμής κύκλου ζωής είναι η διαπίστωση της επίδρασης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην αναπαραγωγή και, για δύο γενιές, στον ρυθμό ανάπτυξης και τον συνολικό αριθμό των πλήρως αναπτυχθέντων και ζωντανών αρσενικών και θηλυκών χειρονόμων. Για τον λόγο εμφάνισης, θα πρέπει να συνενώνονται δεδομένα των αρσενικών και θηλυκών ατόμων. Εάν δεν υπάρχει καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ευαισθησίες του ρυθμού ανάπτυξης των δύο φύλων, τα αποτελέσματα των αρσενικών και θηλυκών ατόμων μπορούν να συνενώνονται για στατιστική ανάλυση.

43. Οι συγκεντρώσεις στις οποίες παρατηρείται επίδραση, εκφραζόμενες ως συγκεντρώσεις στο υπερκείμενο νερό (για εμβολιασμένο νερό) ή στο ίζημα (για εμβολιασμένο ίζημα), συνήθως υπολογίζονται με βάση τις συγκεντρώσεις που μετρώνται κατά την έναρξη της έκθεσης (βλ. παράγραφο 38). Επομένως, για το εμβολιασμένο νερό, οι συγκεντρώσεις που συνήθως μετρώνται κατά την έναρξη της έκθεσης στο υπερκείμενο νερό των δοχείων και για τις δύο γενιές και οι συγκεντρώσεις στα δοχεία κρυστάλλωσης παράγουν έναν μέσο όρο για κάθε αγωγή. Για το εμβολιασμένο ίζημα, οι συγκεντρώσεις που συνήθως μετρώνται κατά την έναρξη της έκθεσης στα δοχεία και για τις δύο γενιές (και προαιρετικά αυτές των δοχείων κρυστάλλωσης) παράγουν έναν μέσο όρο για κάθε αγωγή.

44. Για την εκτίμηση των σημείων των τιμών, δηλ. της EC_x, μπορούν να χρησιμοποιούνται τα στατιστικά στοιχεία ανά δοχείο και ανά κλωβό αναπαραγωγής ως πραγματικές επαναλήψεις. Κατά τον υπολογισμό διαστήματος εμπιστοσύνης για κάθε EC_x, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η μεταβλητότητα μεταξύ των δοχείων ή να αποδεικνύεται ότι η μεταβλητότητα αυτή είναι τόσο μικρή, ώστε μπορεί να αγνοηθεί. Όταν η προσαρμογή του μοντέλου γίνεται με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, θα πρέπει να εφαρμόζεται μετασχηματισμός στα στατιστικά στοιχεία ανά δοχείο, ώστε να βελτιώνεται η ομοιογένεια της διασποράς. Ωστόσο, οι τιμές EC_x θα πρέπει να υπολογίζονται αφού μετασχηματιστεί εκ νέου η απόκριση στην αρχική τιμή (31).

▼M6

45. Όταν η στατιστική ανάλυση στοχεύει στον προσδιορισμό της NOEC μέσω δοκιμασίας υποθέσεων, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η μεταβλητότητα μεταξύ των δοχείων, γεγονός που εξασφαλίζεται με τη χρήση των μεθόδων ANOVA (π.χ. δοκιμασίες Williams και Dunnett). Η δοκιμασία Williams είναι κατάλληλη όταν αναμένεται θεωρητικά μονοτονική σχέση δόσης-απόκρισης, ενώ η δοκιμασία Dunnett είναι κατάλληλη σε περιπτώσεις όπου δεν ισχύει η υπόθεση της μονοτονικότητας. Εναλλακτικά, μπορεί να είναι κατάλληλες πιο ανθεκτικές δοκιμασίες (27), σε περιπτώσεις όπου παραβιάζονται οι συνήθεις παραδοχές της ANOVA (31).

Λόγος εμφάνισης

46. Οι λόγοι εμφάνισης είναι ποσοστιαία δεδομένα που μπορούν να αναλυθούν με τη δοκιμασία Cochran-Armitage, εφαρμοζόμενη καθοδικά, όπου αναμένεται μονοτονική σχέση δόσης-απόκρισης και τα δεδομένα αυτά συνάδουν με τη συγκεκριμένη προσδοκία. Σε αντίθετη περίπτωση, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια δοκιμασία Fisher's exact ή Mantel-Haentzal, με διόρθωση των τιμών p κατά Bonferroni-Holm. Εάν υπάρχουν ενδείξεις για μεταβλητότητα μεταξύ των επαναλήψεων στο πλαίσιο της ίδιας συγκέντρωσης, η οποία είναι μεγαλύτερη από εκείνη που θα έδειχνε μια διωνυμική κατανομή (συχνά αναφέρεται ως «εξωδιωνυμική» διασπορά), θα πρέπει να χρησιμοποιείται μια ανθεκτική δοκιμασία Cochran-Armitage ή Fisher's exact, όπως προτείνεται στην παράγραφο (27).

Προσδιορίζεται το άθροισμα των ζωντανών χειρονόμων (αρσενικών και θηλυκών) που εμφανίζονται ανά δοχείο, n_e, και διαιρείται δια του αριθμού των εισαγόμενων προνυμφών, n_a:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

όπου:

ER = λόγος εμφάνισης

n_e = αριθμός ζωντανών χειρονόμων που εμφανίστηκαν ανά δοχείο

n_a = αριθμός προνυμφών που εισήχθησαν ανά δοχείο (κανονικά 20)

Όταν το n_e είναι μεγαλύτερο από το n_a (δηλ. όταν έχει εισαχθεί ακουσίως μεγαλύτερος αριθμός προνυμφών από τον προβλεπόμενο), το n_a θα πρέπει να γίνεται ίσο με το n_e.

47. Μια εναλλακτική προσέγγιση που είναι η πλέον κατάλληλη για δείγματα μεγάλου μεγέθους, όταν υπάρχει εξωδιωνυμική διασπορά, είναι να θεωρείται ο λόγος εμφάνισης συνεχής απόκριση και να χρησιμοποιούνται διαδικασίες που συνάδουν με αυτά τα δεδομένα για τον *ER*. Εν προκειμένω, το δείγμα μεγάλου μεγέθους ορίζεται ως αριθμός τόσο των εμφανιζόμενων όσο και των μη εμφανιζόμενων ατόμων μεγαλύτερος του 5 ανά επανάληψη (δοχείο).

48. Για την εφαρμογή των μεθόδων ANOVA, οι τιμές του *ER* θα πρέπει πρώτα να μετασχηματίζονται με μετασχηματισμό της τετραγωνικής ρίζας του τόξου ημιτόνου ή με τον μετασχηματισμό Tukey-Freeman για την επίτευξη μιας κατά προσέγγιση κανονικής κατανομής και την εξίσωση των διασπορών. Οι δοκιμασίες Cochran-Armitage, Fisher's exact (Bonferroni) και Mantel-Haentzal μπορούν να εφαρμοστούν όταν χρησιμοποιούνται απόλυτες συχνότητες. Ο μετασχηματισμός της τετραγωνικής ρίζας του τόξου ημιτόνου εφαρμόζεται λαμβάνοντας το αντίστροφο του ημιτόνου ($\sin^{-1}$) της τετραγωνικής ρίζας του *ER*.

49. Για τους λόγους εμφάνισης, οι τιμές EC_x υπολογίζονται με ανάλυση παλινδρόμησης (π.χ., με μοντέλο probit, logit ή Weibull (28)). Εάν η ανάλυση παλινδρόμησης αποτύχει (π.χ. όταν υπάρχουν λιγότερες από δύο μερικές αποκρίσεις), μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλες, μη παραμετρικές μέθοδοι, όπως ο κινητός μέσος όρος ή η απλή παρεμβολή.

Ρυθμός ανάπτυξης

50. Ο μέσος χρόνος ανάπτυξης αντιπροσωπεύει το μέσο χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την εισαγωγή των προνυμφών (ημέρα 0 της δοκιμής)

▼**M6**

έως την εμφάνιση της πειραματικής κοόρτης χειρονόμων (για τον υπολογισμό του πραγματικού χρόνου ανάπτυξης, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η ηλικία των προνυμφών κατά τον χρόνο της εισαγωγής). Ο ρυθμός ανάπτυξης (μονάδα: 1/ημέρα) ισούται με το αντίστροφο του χρόνου ανάπτυξης και αντιπροσωπεύει το ημερήσιο τμήμα της ανάπτυξης των προνυμφών. Ο ρυθμός ανάπτυξης προτιμάται για την αξιολόγηση των παρουσών μελετών τοξικότητας σε ίζημα, καθώς παρουσιάζει μικρότερη διασπορά, είναι πιο ομοιογενής και προσεγγίζει περισσότερο την κανονική κατανομή σε σύγκριση με τον χρόνο ανάπτυξης. Ως εκ τούτου, περισσότερες διαδικασίες ανθεκτικής παραμετρικής δοκιμής μπορούν να εφαρμόζονται στον ρυθμό ανάπτυξης σε αντίθεση με τον χρόνο ανάπτυξης. Για τον ρυθμό ανάπτυξης ως συνεχή απόκριση, οι τιμές EC_x μπορούν να υπολογίζονται με ανάλυση παλινδρόμησης [π.χ. (29) (30)]. Η NOEC για τον μέσο ρυθμό ανάπτυξης μπορεί να προσδιοριστεί με μεθόδους ANOVA, π.χ. δοκιμασία Williams ή Dunnett. Επειδή τα αρσενικά εμφανίζονται νωρίτερα από τα θηλυκά, δηλ. έχουν υψηλότερο ρυθμό ανάπτυξης, είναι σκόπιμο να υπολογίζεται ο ρυθμός ανάπτυξης για κάθε φύλο ξεχωριστά εκτός από τον υπολογισμό του ρυθμού ανάπτυξης για το σύνολο των χειρονόμων.

51. Για τις στατιστικές δοκιμασίες, ο αριθμός των χειρονόμων που παρατηρείται κατά την ημέρα επιθεώρησης x υποτίθεται ότι εμφανίστηκε κατά το μέσο χρονικό διάστημα μεταξύ της ημέρας x και της ημέρας x – 1 (1 = διάρκεια του διαστήματος επιθεώρησης, συνήθως 1 ημέρα). Ο μέσος ρυθμός ανάπτυξης ανά δοχείο ($\bar{x}$) υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i X_i}{n_e}$$

όπου:

$\bar{x}$: μέσος ρυθμός ανάπτυξης ανά δοχείο

i: δείκτης του διαστήματος επιθεώρησης

m: μέγιστος αριθμός διαστημάτων επιθεώρησης

f_i: αριθμός χειρονόμων που εμφανίστηκαν κατά το διάστημα

n_e: επιθεώρησης i συνολικός αριθμός χειρονόμων που εμφανίστηκαν στο τέλος του πειράματος (Σf_i)

x_i: ρυθμός ανάπτυξης των χειρονόμων που εμφανίστηκαν κατά το διάστημα i

$$x_i = 1/\mathrm{day}_i - \frac{l_i}{2}$$

όπου:

day_i: ημέρα επιθεώρησης (ημέρες από την εισαγωγή των προνυμφών)

l_i: διάρκεια του διαστήματος επιθεώρησης i (ημέρες, συνήθως 1 ημέρα)

Αναλογία φύλου

52. Οι αναλογίες φύλου είναι ποσοστιαία δεδομένα και επομένως θα πρέπει να αξιολογούνται με μια δοκιμασία Fisher's exact ή άλλες κατάλληλες μεθόδους. Η κανονική αναλογία φύλου του είδους *C. riparius* είναι ίση με ένα, δηλ. τα αρσενικά και τα θηλυκά είναι εξίσου άφθονα. Τα δεδομένα αναλογίας φύλου χρήζουν ίδιας μεταχείρισης και για τις δύο γενιές. Δεδομένου ότι ο μέγιστος αριθμός χειρονόμων ανά δοχείο (δηλ. 20) είναι πολύ χαμηλός για μια ουσιώδη στατιστική ανάλυση, ο συνολικός αριθμός των πλήρως αναπτυχθέντων και ζωντανών χειρονόμων για κάθε φύλο

▼M6

αθροίζεται από όλα τα δοχεία μίας αγωγής. Τα εν λόγω μη μετασχηματισμένα δεδομένα ελέγχονται έναντι των δεδομένων του μάρτυρα (διαλύτη) ή των συνενωμένων δεδομένων μάρτυρα σε έναν πίνακα συνάφειας 2 × 2.

Αναπαραγωγή

53. Η αναπαραγωγή, όπως και η αναπαραγωγική απόδοση, υπολογίζεται ως ο αριθμός των αλυσίδων αυγών ανά θηλυκό. Ειδικότερα, ο συνολικός αριθμός των αλυσίδων αυγών που παράγονται σε έναν κλωβό αναπαραγωγής διαιρείται με τον συνολικό αριθμό των ζωντανών και αβλαβών θηλυκών ατόμων που έχουν προστεθεί στον εν λόγω κλωβό. Η NOEC για την αναπαραγωγική απόδοση μπορεί να προσδιοριστεί με μεθόδους ANOVA, π.χ. δοκιμασία Williams ή Dunnett.

54. Η αναπαραγωγική απόδοση των αλυσίδων αυγών χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί ποσοτικά ο αριθμός των γόνιμων αλυσίδων αυγών ανά θηλυκό. Ο συνολικός αριθμός των γόνιμων αλυσίδων αυγών που παράγονται σε έναν κλωβό αναπαραγωγής διαιρείται με τον συνολικό αριθμό των ζωντανών και αβλαβών θηλυκών ατόμων που έχουν προστεθεί στον εν λόγω κλωβό. Η NOEC για τη γονιμότητα μπορεί να προσδιοριστεί με μεθόδους ANOVA, π.χ. δοκιμασία Williams ή Dunnett.

Έκθεση δοκιμής

55. Η έκθεση της δοκιμής θα πρέπει να παρέχει τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

— φυσική κατάσταση και φυσικοχημικές ιδιότητες (υδατοδιαλυτότητα, τάση ατμών, log K_{ow}, συντελεστής κατανομής στο έδαφος (ή στο ίζημα, εάν είναι διαθέσιμος), σταθερότητα στο νερό και στο ίζημα κ.λπ.),

— στοιχεία ταυτοποίησης χημικής ουσίας (κοινή ονομασία, χημική ονομασία, συντακτικός τύπος, αριθμός CAS κ.λπ.), συμπεριλαμβανομένων της καθαρότητας και της αναλυτικής μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Υπό δοκιμή είδη:

— χρησιμοποιούμενοι οργανισμοί δοκιμής: είδος, επιστημονική ονομασία, πηγή των οργανισμών και συνθήκες αναπαραγωγής,

— πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο μεταχείρισης των μαζών αυγών και των προνυμφών,

— πληροφορίες σχετικά με τη μεταχείριση των εμφανιζόμενων ενήλικων ατόμων της πατρικής γενιάς με τη χρήση φυσητήρα εμφυσήσεως αέρα κ.λπ (βλ. προσάρτημα 5),

— ηλικία των οργανισμών δοκιμής κατά τον χρόνο εισαγωγής στα δοχεία δοκιμής της πατρικής και πρώτης θυγατρικής γενιάς.

Συνθήκες δοκιμής:

— ίζημα που χρησιμοποιήθηκε, δηλαδή φυσικό ή μορφοποιημένο (τεχνητό),

— φυσικό ίζημα: τοποθεσία και περιγραφή του σημείου δειγματοληψίας του ιζήματος, συμπεριλαμβανομένου, εάν είναι δυνατόν, του ιστορικού μόλυνσης· χαρακτηριστικά ιζήματος: pH, περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, αναλογία C/N και κοκκομετρία (κατά περίπτωση),

— μορφοποιημένο ίζημα: παρασκευή, συστατικά και χαρακτηριστικά (περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, pH, υγρασία, κ.λπ. μετρούμενα κατά την έναρξη της δοκιμής),

— παρασκευή του νερού δοκιμής (εάν χρησιμοποιείται ανασυσταθέν νερό) και χαρακτηριστικά του (συγκέντρωση οξυγόνου, pH, σκληρότητα κ.λπ. μετρούμενα κατά την έναρξη της δοκιμής),

▼M6

— βάθος του ιζήματος και του υπερκείμενου νερού για τα δοχεία δοκιμής και τα δοχεία κρυστάλλωσης,

— όγκος του υπερκείμενου και του ενδοπορικού νερού, βάρος του υγρού ιζήματος με και χωρίς ενδοπορικό νερό για τα δοχεία δοκιμής και τα δοχεία κρυστάλλωσης,

— δοχεία δοκιμής (υλικό και μέγεθος),

— δοχεία κρυστάλλωσης (υλικό και μέγεθος),

— κλωβοί αναπαραγωγής (υλικό και μέγεθος),

— μέθοδος παρασκευής των διαλυμάτων παρακαταθήκης και συγκεντρώσεις δοκιμής για τα δοχεία δοκιμής και τα δοχεία κρυστάλλωσης,

— εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στα δοχεία δοκιμής και τα δοχεία κρυστάλλωσης: συγκεντρώσεις δοκιμής, αριθμός επαναλήψεων και διαλύτες, εφόσον απαιτούνται,

— συνθήκες επώασης για τα δοχεία δοκιμής: θερμοκρασία, φωτοπερίοδος και φωτεινή ισχύς, αερισμός (φυσαλίδες ανά δευτερόλεπτο),

— συνθήκες επώασης για τους κλωβούς αναπαραγωγής και τα δοχεία κρυστάλλωσης: θερμοκρασία, φωτοπερίοδος και φωτεινή ισχύς,

— συνθήκες επώασης για τις αλυσίδες αυγών στις μικροπλάκες (ή άλλα δοχεία): θερμοκρασία, φωτοπερίοδος και φωτεινή ισχύς,

— λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη σίτιση, συμπεριλαμβανομένων του είδους τροφής, της παρασκευής, της ποσότητας και του καθεστώτος σίτισης.

Αποτελέσματα:

— ονομαστικές συγκεντρώσεις δοκιμής, μετρούμενες συγκεντρώσεις δοκιμής και τα αποτελέσματα όλων των αναλύσεων για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στα δοχεία δοκιμής και τα δοχεία κρυστάλλωσης,

— ποιότητα του νερού στο εσωτερικό των δοχείων δοκιμής και των δοχείων κρυστάλλωσης, δηλ. pH, θερμοκρασία, διαλυμένο οξυγόνο, σκληρότητα και αμμωνία,

— αναπλήρωση του εξατμισθέντος νερού δοκιμής για τα δοχεία δοκιμής, εάν σημειώνεται,

— αριθμός των αρσενικών και των θηλυκών χειρονόμων που εμφανίστηκαν ανά δοχείο και ανά ημέρα για την πατρική και πρώτη θυγατρική γενιά,

— αναλογία φύλου των πλήρως αναπτυχθέντων και ζωντανών χειρονόμων ανά αγωγή για την πατρική και πρώτη θυγατρική γενιά,

— αριθμός των προνυμφών που δεν εμφανίστηκαν ως τέλειοι χειρονόμοι ανά δοχείο για την πατρική και πρώτη θυγατρική γενιά,

— ποσοστό/κλάσμα εμφάνισης ανά επανάληψη και συγκέντρωση δοκιμής (συνενωμένα αποτελέσματα για αρσενικούς και θηλυκούς χειρονόμους) για την πατρική και πρώτη θυγατρική γενιά,

— μέσος ρυθμός ανάπτυξης των πλήρως αναπτυχθέντων και ζωντανών χειρονόμων ανά επανάληψη και αγωγή (ξεχωριστά και συνενωμένα αποτελέσματα για αρσενικούς και θηλυκούς χειρονόμους) για την πατρική και πρώτη θυγατρική γενιά,

— αριθμός των αλυσίδων αυγών που εναποτέθηκαν στα δοχεία κρυστάλλωσης ανά κλωβό αναπαραγωγής και ημέρα,

▼**M6**

— χαρακτηριστικά κάθε αλυσίδας αυγών (μέγεθος, σχήμα και γονιμότητα),

— αναπαραγωγική απόδοση — συνολικός αριθμός αλυσίδων αυγών ανά συνολικό αριθμό θηλυκών ατόμων που προστέθηκαν στον κλωβό αναπαραγωγής,

— γονιμότητα — συνολικός αριθμός γόνιμων αλυσίδων αυγών ανά συνολικό αριθμό θηλυκών ατόμων που προστέθηκαν στον κλωβό αναπαραγωγής,

— εκτιμήσεις των τοξικών τελικών σημείων, π.χ. EC_x (και τα σχετικά διαστήματα εμπιστοσύνης), NOEC και στατιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων, συμπεριλαμβανομένης της επίδρασης τυχόν αποκλίσεων από την παρούσα μέθοδο δοκιμών στην έκβαση της δοκιμής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Κεφάλαιο Γ.28 του παρόντος προσαρτήματος, Δοκιμή τοξικότητας σε χειρονομίδες σε σύστημα ιζήματος-νερού με τη χρήση εμβολιασμένου νερού.

(2) Shobanov, N.A., Kiknadze, I.I. και M.G. Butler (1999), Palearctic and Nearctic *Chironomus* (*Camptochironomus*) *tentans* Fabricius are different species (Diptera: Chironomidae). Entomologica Scandinavica, 30: 311-322.

(3) Fleming, R. *κ.ά.* (1994), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances, Final Report to the European Commission, Αρ. έκθεσης: EC 3738. Αύγουστος 1994. WRc, HB.

(4) SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments, Από το εργαστήριο WOSTA που πραγματοποιήθηκε στις Κάτω Χώρες.

(5) ASTM International (2009), E1706-05E01: Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, Στο: Annual Book of ASTM Standards, Τόμος 11.06, Biological Effects and Environmental Fate, Biotechnology. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(6) Environment Canada (1997), Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*), Biological Test Method, Έκθεση SPE 1/RM/32, Δεκέμβριος 1997.

(7) US-EPA (2000), Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, Δεύτερη έκδοση, EPA 600/R-99/064, Μάρτιος 2000, Αναθεώρηση της πρώτης έκδοσης με ημερομηνία Ιούνιος 1994.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1735 (1996), Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(9) US-EPA/OPPTS 850.1790 (1996), Chironomid Sediment toxicity Test.

(10) Milani, D., Day, K.E., McLeay, D.J. και R.S. Kirby (1996), Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*), Technical Report, Environment Canada, National Water Research Institute, Burlington, Οντάριο, Καναδάς.

(11) Norberg-King, T.J., Sibley, P.K., Burton, G.A., Ingersoll, C.G., Kemble, N.E., Ireland, S., Mount, D.R. και C.D. Rowland (2006), Interlaboratory evaluation of *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* short-term and long-term sediment toxicity tests, Environ. Toxicol. Chem., 25: 2662-2674.

▼**M6**

(12) Taenzler, V., Bruns, E., Dorgerloh, M., Pfeifle, V. και L. Weltje (2007), Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine-disrupting properties of pesticides, Ecotoxicology, 16: 221-230.

(13) Sugaya, Y. (1997), Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*, Jp. J. Sanit. Zool., 48: 345-350.

(14) Kawai, K. (1986), Fundamental studies on chironomid allergy, I. Culture methods of some Japanese chironomids (Chironomidae, Diptera), Jp. J. Sanit. Zool., 37: 47-57.

(15) Κεφάλαιο Γ.27 του παρόντος προσαρτήματος, Δοκιμή τοξικότητας σε χειρονομίδες σε σύστημα ιζήματος-νερού με τη χρήση εμβολιασμένου ιζήματος.

(16) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Αρ. 23, ENV/JM/MONO(2000)6, ΟΟΣΑ, Παρίσι.

(17) Weltje, L., Rufli, H., Heimbach, F., Wheeler, J., Vervliet-Scheebaum, M. και M. Hamer (2010), The chironomid acute toxicity test: development of a new test system, Integr. Environ. Assess. Management.

(18) Environment Canada. (1995), Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant, Έκθεση EPS 1/RM/30, Σεπτέμβριος 1995.

(19) Oetken, M, Nentwig, G., Löffler, D, Ternes, T. και J. Oehlmann (2005), Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates, Part I, The antiepileptic drug carbamazepine, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 49: 353-361.

(20) Suedel, B.C. και J.H. Rodgers (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, Environ. Toxicol. Chem., 13: 1163-1175.

(21) Naylor, C. και C. Rodrigues (1995), Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment, Chemosphere, 31: 3291-3303.

(22) Dunnett, C.W. (1964), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096-1121.

(23) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, 20: 482-491.

(24) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.

(25) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510-531.

(26) Jungmann, D., Bandow, C., Gildemeister, T., Nagel, R., Preuss, T.G., Ratte, H.T., Shinn, C., Weltje, L. και H.M. Maes (2009), Chronic toxicity of fenoxycarb to the midge *Chironomus riparius* after exposure in sediments of different composition. J Soils Sediments, 9: 94-102.

(27) Rao, J.N.K. και A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics, 48: 577-585.

(28) Christensen, E.R. (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, Water Res., 18: 213-221.

▼**M6**

(29) Bruce, R.D. και D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environ. Toxicol. Chem., 11: 1485-1494.

(30) Slob, W. (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci., 66: 298-312.

(31) OECD (2006), *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*, OECD Series on Testing and Assessment Αρ. 54, σελ. 146, ENV/JM/MONO(2006)18, ΟΟΣΑ, Παρίσι.

(32) Benoit, D.A., Sibley, P.K., Juenemann, J.L. και G.T. Ankley (1997), *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments, Environ. Toxicol. Chem., 16: 1165-1176.

(33) Vogt, C., Belz, D., Galluba, S., Nowak, C., Oetken, M. και J. Oehlmann (2007), Effects of cadmium and tributyltin on development and reproduction of the non-biting midge *Chironomus riparius* (Diptera) — baseline experiments for future multi-generation studies, J. Environ. Sci. Health Μέρος A, 42: 1-9.

(34) OECD (2010), Validation *report of the Chironomid full life-cycle toxicity test*, Forthcoming publication in the Series on Testing and Assessment, ΟΟΣΑ, Παρίσι.

▼**M6**

Προσάρτημα 1

Ορισμοί

Για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου δοκιμών χρησιμοποιούνται οι ακόλουθοι ορισμοί:

Χημική ουσία είναι μια ουσία ή ένα μείγμα.

Μορφοποιημένο ίζημα ή ανασυσταθέν, τεχνητό ή συνθετικό ίζημα είναι ένα μείγμα υλικών που χρησιμοποιείται για να απομιμείται τα φυσικά συστατικά ενός φυσικού ιζήματος.

Υπερκείμενο νερό είναι το νερό που τοποθετείται πάνω από το ίζημα στο δοχείο δοκιμής.

Διάμεσο νερό ή ενδοπορικό νερό είναι το νερό που καταλαμβάνει τον χώρο μεταξύ των σωματιδίων του ιζήματος και του εδάφους.

Εμβολιασμένο νερό είναι το νερό δοκιμής στο οποίο έχει προστεθεί υπό δοκιμή χημική ουσία.

Υπό δοκιμή χημική ουσία είναι κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

▼M6

Προσάρτημα 2

Συστάσεις για την καλλιέργειά του chironomus riparius

1. Οι προνύμφες του γένους *Chironomus* μπορούν να εκτρέφονται σε δοχεία κρυστάλλωσης ή μεγαλύτερους περιέκτες. Λεπτή χαλαζιακή άμμος απλώνεται σε ένα λεπτό στρώμα βάθους περίπου 5 έως 10 mm πάνω από τον πυθμένα του περιέκτη. Το Kieselgur (π.χ. Merck, Art 8117) έχει επίσης αποδειχθεί κατάλληλο υπόστρωμα (επαρκεί ένα λεπτότερο στρώμα πάχους πολύ λίγων mm). Στη συνέχεια, προστίθεται κατάλληλο νερό σε βάθος αρκετών εκατοστών. Το νερό θα πρέπει να συμπληρώνεται, όσο χρειάζεται ώστε να αναπληρώνονται οι απώλειες λόγω εξάτμισης, καθώς και για την πρόληψη της αποξήρανσης. Το νερό μπορεί να αντικαθίσταται, εάν είναι απαραίτητο. Θα πρέπει να παρέχεται ήπιος αερισμός. Τα δοχεία εκτροφής των προνυμφών θα πρέπει να είναι τοποθετημένα σε κατάλληλο κλωβό που αποτρέπει τη διαφυγή των εμφανιζόμενων ενήλικων ατόμων. Ο κλωβός θα πρέπει να είναι αρκετά μεγάλος για να επιτρέπει στα εμφανιζόμενα ενήλικα άτομα να σχηματίσουν σμήνος, γιατί διαφορετικά δεν είναι δυνατή η αναπαραγωγή (οι ελάχιστες διαστάσεις είναι περίπου 30 × 30 × 30 cm).

2. Οι κλωβοί θα πρέπει να διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου ή σε αίθουσα σταθερού περιβάλλοντος, στους 20 ± 2 °C, με φωτοπερίοδο 16 ωρών φωτός (ισχύς περίπου 1 000 lux), 8 ωρών σκοταδιού. Έχει αναφερθεί ότι υγρασία του αέρα μικρότερη από 60 % RH μπορεί να εμποδίσει την αναπαραγωγή.

Νερό αραίωσης

3. Μπορεί να χρησιμοποιείται οποιοδήποτε κατάλληλο φυσικό ή συνθετικό νερό. Συνήθως χρησιμοποιούνται νερό γεώτρησης, αποχλωριωμένο νερό βρύσης και τεχνητά μέσα (π.χ. θρεπτικό υλικό Elendt «M4» ή «M7», βλ. κατωτέρω). Το νερό θα πρέπει να αερίζεται πριν από τη χρήση. Εάν είναι απαραίτητο, το νερό καλλιέργειας μπορεί να ανανεώνεται με έκχυση ή σιφωνισμό του χρησιμοποιημένου νερού από τα δοχεία καλλιέργειας, με προσοχή, χωρίς να καταστρέφονται οι σωλήνες των προνυμφών.

Σίτιση προνυμφών

4. Οι προνύμφες του γένους *Chironomus* θα πρέπει να τρέφονται με νιφάδες τροφής για ψάρια (Tetra Min®, Tetra Phyll® ή άλλη παρόμοια τροφή για ψάρια με κατοχυρωμένο εμπορικό σήμα), σε ποσότητα περίπου 250 mg ανά δοχείο ανά ημέρα. Η τροφή αυτή μπορεί να χορηγείται ως ξηρή αλεσμένη σκόνη ή ως εναιώρημα σε νερό: 1,0 g νιφάδων τροφής προστίθεται σε 20 ml νερού αραίωσης και αναμειγνύεται για να προκύψει ένα ομοιογενές μείγμα. Το παρασκεύασμα αυτό μπορεί να χορηγείται με ρυθμό περίπου 5 ml ανά δοχείο ανά ημέρα (ανακινείτε πριν από τη χρήση). Οι μεγαλύτερης ηλικίας προνύμφες μπορούν να λαμβάνουν μεγαλύτερες ποσότητες.

5. Η σίτιση ρυθμίζεται ανάλογα με την ποιότητα του νερού. Εάν το μέσο καλλιέργειας «θολώσει», η σίτιση θα πρέπει να μειωθεί. Οι προσθήκες τροφής θα πρέπει να παρακολουθούνται επισταμένως. Η υπερβολικά μικρή ποσότητα τροφής θα προκαλέσει μετανάστευση των προνυμφών προς τη στήλη ύδατος, ενώ η υπερβολικά μεγάλη ποσότητα θα προκαλέσει αυξημένη μικροβιακή δραστηριότητα και μειωμένες συγκεντρώσεις οξυγόνου. Οι συνθήκες αυτές μπορούν να οδηγήσουν και οι δύο σε μειωμένους ρυθμούς ανάπτυξης.

6. Μπορούν επίσης να προστίθενται κύτταρα ορισμένων πράσινων φυκών (π.χ. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*), όταν ετοιμάζονται νέα δοχεία καλλιέργειας.

Σίτιση εμφανιζόμενων ενηλίκων

7. Ορισμένοι πειραματιστές έχουν προτείνει τον εμποτισμό ενός τεμαχίου βαμβακιού με κορεσμένο διάλυμα σακχαρόζης για να χρησιμεύσει ως τροφή για τα εμφανιζόμενα ενήλικα άτομα.

▼M6

Εμφάνιση

8. Στους 20 ± 2 °C θα αρχίσουν να εμφανίζονται ενήλικα άτομα από τα δοχεία εκτροφής προνυμφών μετά από περίπου 13-15 ημέρες. Τα αρσενικά άτομα διακρίνονται εύκολα από τις πτεροειδείς κεραίες τους και το λεπτό σώμα.

Μάζες αυγών

9. Μόλις εμφανιστούν ενήλικα άτομα μέσα στον κλωβό αναπαραγωγής, όλα τα δοχεία εκτροφής προνυμφών θα πρέπει να ελέγχονται τρεις φορές την εβδομάδα για απόθεση των ζελατινωδών μαζών αυγών. Εάν υπάρχουν μάζες αυγών, θα πρέπει να αφαιρούνται με προσοχή και να μεταφέρονται σε έναν μικρό δίσκο που περιέχει δείγμα του νερού αναπαραγωγής. Οι μάζες των αυγών χρησιμοποιούνται για την έναρξη καλλιέργειας σε νέο δοχείο (π.χ. 2-4 μάζες αυγών/δοχείο) ή για δοκιμές τοξικότητας.

10. Οι προνύμφες πρώτου σταδίου θα πρέπει να εκκολάπτονται μετά από 2-3 ημέρες.

Ετοιμασία νέων δοχείων καλλιέργειας

11. Από τη στιγμή που οι καλλιέργειες έχουν εγκατασταθεί, υπάρχει δυνατότητα ετοιμασίας νέων δοχείων καλλιέργειας προνυμφών ανά εβδομάδα ή λιγότερο συχνά, ανάλογα με τις απαιτήσεις της δοκιμής, με αφαίρεση των παλαιότερων δοχείων μετά την εμφάνιση των ενήλικων χειρονόμων. Με τη χρήση του συστήματος αυτού, θα παράγεται κανονική ποσότητα ενήλικων ατόμων με την ελάχιστη δυνατή διαχείριση.

Παρασκευή των διαλυμάτων δοκιμής «M4» και «M7»

12. Το θρεπτικό υλικό «M4» έχει περιγραφεί από τον Elendt (1990). Το υλικό «M7» παρασκευάζεται όπως και το «M4», εκτός από τις ουσίες που αναφέρονται στον πίνακα 1, των οποίων οι συγκεντρώσεις στο «M7» είναι υποτετραπλάσιες εκείνων του «M4». Το διάλυμα δοκιμής δεν θα πρέπει να παρασκευάζεται σύμφωνα με τους Elendt και Bias (1990) για τις συγκεντρώσεις $NaSiO_3$ × Τα $5H_2O$, $NaNO_3$, KH_2PO_4 και K_2HPO_4 που υποδεικνύονται για την παρασκευή των διαλυμάτων παρακαταθήκης δεν είναι επαρκή.

Παρασκευή του θρεπτικού υλικού «M7»

13. Κάθε διάλυμα παρακαταθήκης (I) παρασκευάζεται χωριστά και από τα εν λόγω διαλύματα (I) παρασκευάζεται συνδυασμένο διάλυμα παρακαταθήκης (II) (βλ. πίνακα 1). Πενήντα ml συνδυασμένου διαλύματος παρακαταθήκης (II) αναμειγνύονται με τις ποσότητες κάθε διαλύματος παρακαταθήκης μακροθρεπτικών συστατικών που εμφανίζονται στον πίνακα 2 και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι 1 λίτρο με απιονισμένο νερό για την παρασκευή του θρεπτικού υλικού «M7». Παρασκευάζεται διάλυμα παρακαταθήκης βιταμινών με την προσθήκη τριών βιταμινών σε απιονισμένο νερό, όπως υποδεικνύεται στον πίνακα 3, και 0,1 ml από το διάλυμα παρακαταθήκης συνδυασμού βιταμινών προστίθενται στο τελικό θρεπτικό υλικό «M7» λίγο πριν από τη χρήση. Το διάλυμα παρακαταθήκης βιταμινών φυλάσσεται στην κατάψυξη, χωρισμένο σε μικρές ποσότητες. Το θρεπτικό υλικό αερίζεται και σταθεροποιείται.

Πίνακας 1

Διαλύματα παρακαταθήκης ιχνοστοιχείων για τα θρεπτικά υλικά M4 και M7

Διαλύματα παρακαταθήκης (I)	Ποσότητα (mg) που αραιώνεται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό	Για την παρασκευή του συνδυασμένου διαλύματος παρακαταθήκης (II): αναμειγνύονται οι ακόλουθες ποσότητες (ml) διαλυμάτων παρακαταθήκης (I) και συμπληρώνεται ο όγκος έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό		Τελικές συγκεντρώσεις στα διαλύματα δοκιμής (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 [1]	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \times 4H_2O$ [1]	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl [1]	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M6**

Διαλύματα παρακαταθήκης (I)	Ποσότητα (mg) που αραιώνεται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό	Για την παρασκευή του συνδυασμένου διαλύματος παρακαταθήκης (II): αναμειγνύονται οι ακόλουθες ποσότητες (ml) διαλυμάτων παρακαταθήκης (I) και συμπληρώνεται ο όγκος έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό		Τελικές συγκεντρώσεις στα διαλύματα δοκιμής (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \times 6H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \times 2H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \times 6H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \times 2H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \times 7H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Οι ουσίες αυτές διαφέρουν μεταξύ του M4 και του M7, όπως αναφέρεται ανωτέρω.
(2) Τα διαλύματα αυτά παρασκευάζονται χωριστά, ενώνονται και αποστειρώνονται αμέσως σε αυτόκαυστο.

Πίνακας 2

Διαλύματα παρακαταθήκης μακροθρεπτικών συστατικών για τα θρεπτικά υλικά M4 και M7

	Ποσότητα που αραιώνεται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό (mg)	Ποσότητα διαλυμάτων παρακαταθήκης μακροθρεπτικών συστατικών που προστίθεται για την παρασκευή των θρεπτικών υλικών M4 και M7 (ml/l)	Τελικές συγκεντρώσεις στα διαλύματα δοκιμής M4 και M7 (mg/l)
$CaCl_2 \times 6H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \times 7H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \times 9H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M6**

Πίνακας 3

Διάλυμα παρακαταθήκης βιταμινών για τα θρεπτικά υλικά M4 και M7

Συνδυάζονται και τα τρία διαλύματα βιταμινών για την παρασκευή ενιαίου διαλύματος παρακαταθήκης βιταμινών.

	Ποσότητα που αραιώνεται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό (mg)	Ποσότητα διαλύματος παρακαταθήκης βιταμινών που προστίθεται για την παρασκευή των θρεπτικών υλικών M4 και M7 (ml/l)	Τελικές συγκεντρώσεις στα διαλύματα δοκιμής M4 και M7 (mg/l)
Υδροχλωρική θειαμίνη	750	0,1	0,075
Κυανοκοβαλαμίνη (B12)	10	0,1	0,0010
Βιοτίνη	7,5	0,1	0,00075

ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, δημοσιεύθηκε από τους M. Streloke και H. Köpp. Βερολίνο.

Elendt, B.P. (1990), Selenium deficiency in Crustacea, Protoplasma, 154: 25-33.

Elendt, B.P. και W.-R. Bias (1990), Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing, Effects on the optimisation of culture conditions on life history parameters of *D. magna*, Water Research, 24: 1157-1167.

▼**M6**

Προσάρτημα 3

Παρασκευή μορφοποιημένο ιζήματος

ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΙΖΗΜΑΤΟΣ

Η σύνθεση του μορφοποιημένου ιζήματος θα πρέπει να έχει ως εξής:

Συστατικό	Χαρακτηριστικά	% ξηρού βάρους ιζήματος
Τύρφη	Τύρφη σφάγνων, με pH όσο το δυνατόν πλησιέστερα στο 5,5-6,0, χωρίς ορατά υπολείμματα φυτών, λεπτοαλεσμένη (μέγεθος σωματιδίων ≤ 1 mm) και αερόξηρη	4-5
Χαλαζιακή άμμος	Μέγεθος κόκκων: > 50 % των σωματιδίων θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 50-200 μm	75-76
Καολινιτική άργιλος	Περιεκτικότητα σε καολινίτη ≥ 30 %	20
Οργανικός άνθρακας	Ρυθμίζεται με προσθήκη τύρφης και άμμου	2 (± 0,5)
Ανθρακικό ασβέστιο	$CaCO_3$, κονιοποιημένο, χημικά καθαρό	0,05-0,1
Νερό	Αγωγιμότητα ≤ 10 μS/cm	30-50

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

Η τύρφη ξηραίνεται στον αέρα και αλέθεται σε λεπτή σκόνη. Παρασκευάζεται εναιώρημα της απαιτούμενης ποσότητας σκόνης τύρφης σε απιονισμένο νερό με τη βοήθεια ομοιογενοποιητή υψηλής απόδοσης. Το pH του εν λόγω εναιωρήματος ρυθμίζεται στο 5,5 ± 0,5 με $CaCO_3$. Το εναιώρημα εγκλιματίζεται για τουλάχιστον δύο ημέρες με ήπια ανάδευση στους 20 ± 2 °C, για τη σταθεροποίηση του pH και τη δημιουργία σταθερού μικροβιακού συστατικού. Το pH μετράται εκ νέου και θα πρέπει να είναι 6,0 ± 0,5. Στη συνέχεια, το εναιώρημα τύρφης αναμειγνύεται με τα άλλα συστατικά (άμμος και καολινιτική άργιλος) και με απιονισμένο νερό για να ληφθεί ένα ομοιογενές ίζημα με περιεκτικότητα σε νερό 30–50 % επί του ξηρού βάρους του ιζήματος. Το pH του τελικού μείγματος μετράται και πάλι και ρυθμίζεται σε 6,5 έως 7,5 με $CaCO_3$, εάν είναι απαραίτητο. Λαμβάνονται δείγματα του ιζήματος για τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους και της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα. Στη συνέχεια, πριν από τη χρήση του ιζήματος στη δοκιμή τοξικότητας σε χειρονομίδες, συνιστάται ο εγκλιματισμός του μορφοποιημένου ιζήματος για επτά ημέρες υπό τις ίδιες συνθήκες με εκείνες που θα επικρατούν στην επακόλουθη δοκιμή.

ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ

Τα ξηρά συστατικά για την παρασκευή του τεχνητού ιζήματος μπορούν να φυλάσσονται σε ξηρό και δροσερό χώρο, σε θερμοκρασία δωματίου. Το μορφοποιημένο (υγρό) ίζημα δεν θα πρέπει να αποθηκεύεται πριν από τη χρήση του στη δοκιμή. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται αμέσως μετά την πάροδο των 7 ημερών εγκλιματισμού με τον οποίο ολοκληρώνεται η παρασκευή του.

ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

OECD (1984), *Earthworm, Acute Toxicity Test*, Test Guideline Αρ. 207, Guidelines for the Testing of Chemicals, ΟΟΣΑ, Παρίσι.

Meller, M., Egeler, P., Roembke, J., Schallnass, H., Nagel, R. και B. Streit (1998), Short-term toxicity of lindane, hexachlorobenzene and copper sulfate on tubificid sludgeworms (Oligochaeta) in artificial media, Ecotox. Environ. Safety, 39: 10-20.

▼**M6**

Προσάρτημα 4

Χημικά χαρακτηριστικά ενόσω αποδεκτού νερού αραίωσης

ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ
Σωματίδια	< 20 mg/l
Ολικός οργανικός άνθρακας	< 2 mg/l
Μη ιονισμένη αμμωνία	< 1 μg/l
Σκληρότητα ως $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Υπολείμματα χλωρίου	< 10 μg/l
Ολικά οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα	< 50 ng/l
Ολικά οργανοχλωριούχα φυτοφάρμακα μαζί με πολυχλωριωμένα διφαινύλια	< 50 ng/l
Ολικό οργανικό χλώριο	< 25 ng/l

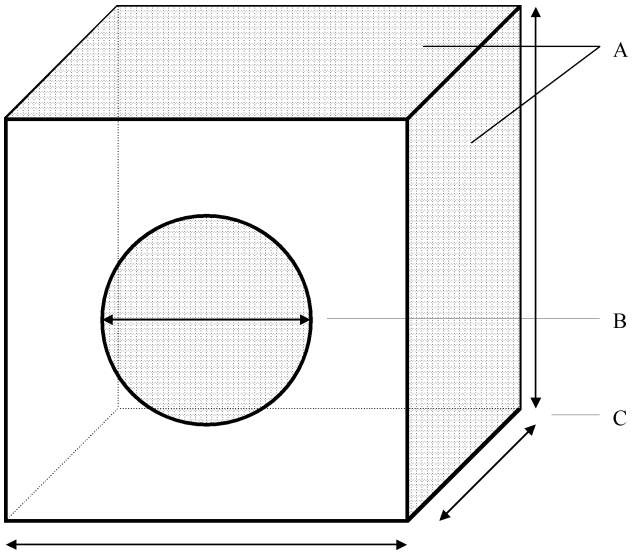
(*) Ωστόσο, σημειώνεται ότι εάν υπάρχουν υπόνοιες για αλληλεπίδραση μεταξύ ιόντων σκληρότητας και της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, θα πρέπει να χρησιμοποιείται νερό χαμηλότερης σκληρότητας (και, ως εκ τούτου, δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό Elendt M4 σε αυτήν την περίπτωση).

▼**M6**

Προσάρτημα 5

Καθοδήγησή για την εκτέλεσή της δοκιμής

Παράδειγμα κλωβού αναπαραγωγής:



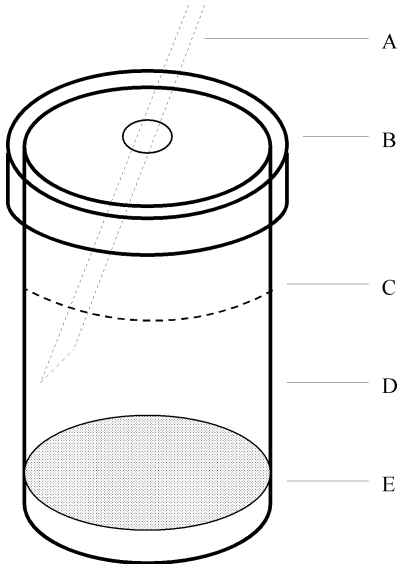
A: γάζα στο επάνω μέρος και σε μία τουλάχιστον πλευρά του κλωβού (μέγεθος πλέγματος περίπου 1 mm)

B: άνοιγμα για την τοποθέτηση των εμφανιζόμενων ενήλικων ατόμων μέσα στον κλωβό αναπαραγωγής και για την απομάκρυνση των αλυσίδων αυγών από τα δοχεία κρυστάλλωσης (δεν εμφανίζεται σε αυτήν την απεικόνιση)

Γ: κλωβός αναπαραγωγής μεγέθους τουλάχιστον 30 cm σε μήκος, 30 cm σε ύψος και 30 cm σε πλάτος

▼**M6**

Παράδειγμα δοχείου δοκιμής:



A: σιφώνιο pasteur για την παροχή αέρα στο υπερκείμενο νερό

B: γυάλινο καπάκι για την αποφυγή διαφυγής των εμφανιζόμενων χειρονόμων

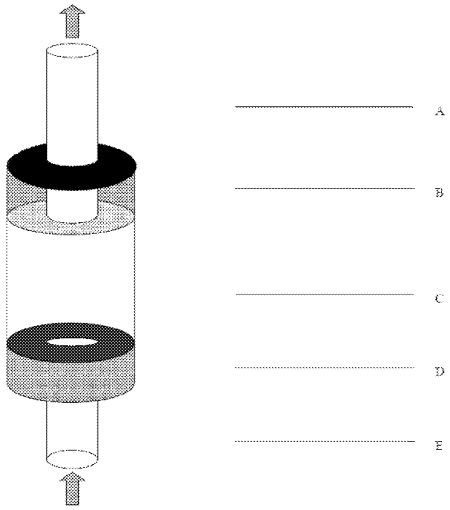
Γ: στρώμα επιφάνειας νερού

Δ: δοχείο δοκιμής (ποτήρι ζέσεως τουλάχιστον 600 ml)

E: στρώμα ιζήματος

▼**M6**

Παράδειγμα φυσητήρα εμφυσήσεως αέρα για τη λήψη ενήλικων χειρονόμων (τα βέλη υποδεικνύουν την κατεύθυνση ροής του αέρα):



A: γυάλινος σωλήνας (εσωτερική διάμετρος περίπου 5 mm) συνδεδεμένος σε αντλία αυτόματης πλήρωσης

B: πώμα από βουλκανισμένο καουτσούκ, διατρημένο με γυάλινο σωλήνα (A). Στην εσωτερική πλευρά, το άνοιγμα του γυάλινου σωλήνα (A) είναι καλυμμένο με λίγο βαμβάκι και γάζα (μέγεθος πλέγματος περίπου 1 mm) για την αποφυγή πρόκλησης ζημιάς στους χειρονόμους όταν απορροφώνται μέσα στον φυσητήρα εμφυσήσεως αέρα

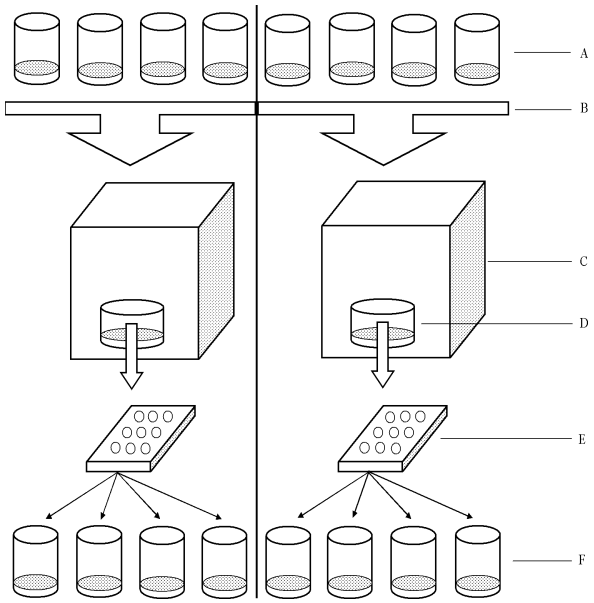
Γ: διαφανής περιέκτης (πλαστικός ή γυάλινος, μήκους περίπου 15 cm) για τη λήψη των χειρονόμων

Δ: πώμα από βουλκανισμένο καουτσούκ, διατρημένο με σωλήνα (E). Για την απελευθέρωση των χειρονόμων μέσα στον κλωβό αναπαραγωγής, το πώμα Δ αφαιρείται από τον περιέκτη Γ

E: σωλήνας (πλαστικός ή γυάλινος, εσωτερική διάμετρος περίπου 8 mm) για τη συλλογή των ενήλικων χειρονόμων από το δοχείο

▼**M6**

Σχηματική παρουσίαση μιας δοκιμής κύκλου ζωής:



Α: πατρική γενιά — δοχεία δοκιμής που περιέχουν σύστημα ιζήματος-νερού, οκτώ επαναλήψεις, 20 προνύμφες πρώτου σταδίου ανά δοχείο

Β: τέσσερα δοχεία δοκιμής για κάθε κλωβό αναπαραγωγής, Α και Β

Γ: κλωβοί αναπαραγωγής (Α και Β) για δημιουργία σμήνους, ζευγάρωμα και ωοτοκία

Δ: δίσκοι κρυστάλλωσης για την εναπόθεση των αλυσίδων αυγών

Ε: μικροπλάκες, ένα βοθρίο για κάθε αλυσίδα αυγών

ΣΤ: πρώτη θυγατρική γενιά — δοχεία δοκιμής που περιέχουν σύστημα ιζήματος-νερού, οκτώ επαναλήψεις, 20 προνύμφες πρώτου σταδίου ανά δοχείο

▼M6

Γ.41. ΔΟΚΙΜΗ ΣΕΞΟΥΑΛΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΨΑΡΙΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 234 του ΟΟΣΑ (2011). Βασίζεται σε μια απόφαση του 1998 για την εκπόνηση νέων μεθόδων δοκιμών ή την ενημέρωση των υφιστάμενων, σχετικά με τη διαλογή και τις δοκιμές δυνητικών ενδοκρινικών διαταρακτών. Η δοκιμή σεξουαλικής ανάπτυξης ψαριών (FSDT) θεωρήθηκε μια ελπιδοφόρα μέθοδος δοκιμών που καλύπτει ένα ευαίσθητο στάδιο ζωής των ψαριών το οποίο ανταποκρίνεται σε οιστρογόνα και χημικές ουσίες που μοιάζουν με ανδρογόνα. Η μέθοδος δοκιμών υποβλήθηκε σε διεργαστηριακή διαδικασία επικύρωσης από το 2006 έως το 2010, κατά την οποία πραγματοποιήθηκε επικύρωση για το ρυζόψαρο (*Oryzias latipes*), το ζεβρόψαρο (*Danio rerio*) και τον τριάκανθο γαστερόστεο (*Gasterosteus aculeatus*), ενώ πραγματοποιήθηκε μερική επικύρωση για τον λιποκέφαλο φοξίνο (*Pimephales promelas*) (41) (42) (43). Το παρόν πρωτόκολλο περιλαμβάνει το ρυζόψαρο, τον τριάκανθο γαστερόστεο και το ζεβρόψαρο. Το πρωτόκολλο είναι, κατ' αρχήν, μια βελτίωση της κατευθυντήριας γραμμής δοκιμών (TG) 210 του ΟΟΣΑ: Fish, Early Life Stage Toxicity Test (Δοκιμή τοξικότητας κατά το αρχικό στάδιο της ζωής των ψαριών) (1), όπου η έκθεση συνεχίζεται μέχρι τη σεξουαλική διαφοροποίηση των ψαριών, δηλ. περίπου 60 ημέρες μετά την εκκόλαψη (days post-hatch, dph) για το ρυζόψαρο, τον τριάκανθο γαστερόστεο και το ζεβρόψαρο (η περίοδος έκθεσης μπορεί να είναι μικρότερης ή μεγαλύτερης διάρκειας για άλλα είδη που θα επικυρωθούν στο μέλλον) και προστίθενται τελικά σημεία ευαίσθητα από ενδοκρινολογικής άποψης. Η δοκιμή FSDT εκτιμά τις επιδράσεις στα αρχικά στάδια της ζωής και τις πιθανές δυσμενείς συνέπειες των χημικών ουσιών που θεωρείται ότι διαταράσσουν το ενδοκρινικό σύστημα (π.χ. οιστρογόνα, ανδρογόνα και αναστολείς στεροειδογένεσης) στη σεξουαλική ανάπτυξη. Ο συνδυασμός των δύο βασικών ενδοκρινικών τελικών σημείων, ήτοι η συγκέντρωση λεκιθογενίνης (VTG) και η αναλογία φαινοτυπικού φύλου, παρέχει τη δυνατότητα προσδιορισμού του τρόπου δράσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας με τη δοκιμή. Λόγω της σχετιζόμενης με τον πληθυσμό αλλαγής στην αναλογία φαινοτυπικού φύλου, η δοκιμή FSDT μπορεί να χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της επικινδυνότητας και του κινδύνου. Ωστόσο, εάν η δοκιμή χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της επικινδυνότητας ή του κινδύνου, δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται ο γαστερόστεος, καθώς τα διαθέσιμα μέχρι σήμερα δεδομένα επικύρωσης έχουν δείξει ότι σε αυτό το είδος οι τροποποιήσεις της αναλογίας φαινοτυπικού φύλου από τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες δεν ήταν συχνές.

2. Το πρωτόκολλο βασίζεται στην έκθεση ψαριών σε χημικές ουσίες μέσω του νερού κατά τη διάρκεια της περιόδου σεξουαλικής ευμεταβλητότητας κατά την οποία αναμένεται ότι τα ψάρια είναι πιο ευαίσθητα στις επιδράσεις των χημικών ουσιών που διαταράσσουν το ενδοκρινικό σύστημα και παρεμβαίνουν στη σεξουαλική ανάπτυξη. Δύο βασικά τελικά σημεία μετρώνται ως δείκτες αναπτυξιακών ανωμαλιών που σχετίζονται με το ενδοκρινικό σύστημα, οι συγκεντρώσεις VTG και οι αναλογίες φύλου (ποσοστά των φύλων) που προσδιορίζονται με ιστολογική ανάλυση των γονάδων. Η ιστοπαθολογική ανάλυση των γονάδων (αξιολόγηση και προσδιορισμός σταδίου των ωοκυττάρων και των σπερματογόνων κυττάρων) είναι προαιρετική. Επιπλέον, προσδιορίζεται το γενετικό φύλο, όπου είναι δυνατόν (π.χ. στο ρυζόψαρο και στον τριάκανθο γαστερόστεο). Η παρουσία ενός δείκτη γενετικού φύλου αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα, καθώς αυξάνει την ισχύ των στατιστικών στοιχείων για την αναλογία φύλου και επιτρέπει τον εντοπισμό μιας μεμονωμένης αναστροφής του φαινοτυπικού φύλου. Άλλα κορυφαία τελικά σημεία που θα πρέπει να μετρώνται περιλαμβάνουν τον ρυθμό εκκόλαψης, την επιβίωση, το μήκος και το σωματικό βάρος. Η μέθοδος δοκιμών ενδεχομένως να μπορεί να προσαρμοστεί σε άλλα είδη εκτός από τα προαναφερόμενα, με την προϋπόθεση ότι αυτά τα άλλα είδη υποβάλλονται σε διαδικασία επικύρωσης ανάλογη με αυτήν που διεξήχθη για το ρυζόψαρο, τον τριάκανθο γαστερόστεο και το ζεβρόψαρο, ότι τα ψάρια-μάρτυρες διαφοροποιούνται σεξουαλικά στο τέλος της δοκιμής, ότι τα επίπεδα VTG είναι επαρκώς υψηλά για την ανίχνευση σημαντικών μεταβολών που σχετίζονται με τη χημική ουσία και ότι καθορίζεται η ευαισθησία του συστήματος δοκιμής με τη χρήση χημικών ουσιών αναφοράς που επιδρούν στο ενδοκρινικό σύστημα ((αντι)-οιστρογόνα, (αντι)-ανδρογόνα, αναστολείς αρωματάσης κ.λπ.). Επιπλέον, κάθε έκθεση επικύρωσης σχετικά με τα δεδομένα της δοκιμής FSDT με χρήση άλλων ειδών θα πρέπει να εξετάζεται από τον ΟΟΣΑ και το αποτέλεσμα της επικύρωσης θα πρέπει να κρίνεται ως ικανοποιητικό.

▼M6

Αρχικές εκτιμήσεις και περιορισμοί

3. Η VTG κανονικά παράγεται στο ήπαρ των θηλυκών ωοτόκων σπονδυλωτών ως απόκριση στα κυκλοφορούντα ενδογενή οιστρογόνα (2). Αποτελεί πρόδρομη ουσία των πρωτεϊνών της λεκίθου του αυγού και, μετά την παραγωγή της στο ήπαρ, φθάνει στην ωοθήκη μέσω της κυκλοφορίας του αίματος όπου προσλαμβάνεται και τροποποιείται από τα υπό ανάπτυξη αυγά. Η σύνθεση VTG είναι πολύ περιορισμένη, αλλά ανιχνεύσιμη, στα ανώριμα ψάρια και στα ενήλικα αρσενικά ψάρια, επειδή δεν διαθέτουν επαρκή επίπεδα κυκλοφορούντων οιστρογόνων. Ωστόσο, το ήπαρ είναι ικανό να συνθέτει και να εκκρίνει VTG ως απόκριση στην εξωγενή χορήγηση οιστρογόνων (3) (4) (5).

4. Η μέτρηση της VTG χρησιμεύει για την ανίχνευση χημικών ουσιών με οιστρογόνο, αντι-οιστρογόνο και ανδρογόνο δράση, καθώς και χημικών ουσιών που παρεμβαίνουν στη στεροειδογένεση, όπως οι αναστολείς αρωματάσης. Η ανίχνευση χημικών ουσιών με οιστρογόνο δράση είναι δυνατή μέσω μέτρησης της προκαλούμενης έκκρισης VTG σε αρσενικά ψάρια και έχει τεκμηριωθεί επαρκώς στην αξιολογηθείσα από ομοτίμους επιστημονική βιβλιογραφία. Η πρόκληση έκκρισης VTG έχει καταδειχθεί επίσης μετά από έκθεση σε ανδρογόνα που δύνανται να υποστούν αρωματοποίηση (6) (7). Η μείωση στα επίπεδα των κυκλοφορούντων οιστρογόνων στα θηλυκά, για παράδειγμα μέσω αναστολής της αρωματάσης που μετατρέπει τα ενδογενή ανδρογόνα στο φυσικό οιστρογόνο 17β-οιστραδιόλη, προκαλεί μείωση της συγκέντρωσης VTG, η οποία χρησιμεύει για την ανίχνευση χημικών ουσιών με ιδιότητες αναστολής αρωματάσης ή αναστολέων στεροειδογένεσης γενικότερα (33). Η βιολογική συνάφεια της απόκρισης VTG μετά από αναστολή οιστρογόνων/αρωματάσης έχει καθοριστεί και τεκμηριωθεί ευρέως (8) (9). Ωστόσο, η παραγωγή VTG στα θηλυκά είναι πιθανό να επηρεάζεται και από τη γενική τοξικότητα και τις τοξικές δράσεις που δεν σχετίζονται με το ενδοκρινικό σύστημα.

5. Διάφορες μέθοδοι μέτρησης έχουν αναπτυχθεί και τυποποιηθεί με επιτυχία για χρήση ρουτίνας στον ποσοτικό προσδιορισμό της VTG στο αίμα, στο ήπαρ και σε ομογενοποιημένα δείγματα ολόκληρου του σώματος ή κεφαλιού/ουράς που συλλέγονται από μεμονωμένα ψάρια. Αυτό ισχύει για το ζεβρόψαρο, τον τριάκανθο γαστερόστεο και το ρυζόψαρο, καθώς επίσης και για το μερικώς επικυρωμένο είδος του λιποκέφαλου φοξίνου. Υπάρχουν διαθέσιμες μέθοδοι ενζυμικής δοκιμής ανοσοπροσρόφησης (ELISA) ειδικές για το είδος που χρησιμοποιούν ανοσοχημεία για τον ποσοτικό προσδιορισμό της VTG (5) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Στο ρυζόψαρο και στο ζεβρόψαρο, υπάρχει καλή συσχέτιση μεταξύ της VTG που μετράται από το πλάσμα αίματος, το ήπαρ και τα ομογενοποιημένα δείγματα, αν και τα ομογενοποιημένα δείγματα τείνουν να εμφανίζουν ελαφρώς χαμηλότερες τιμές σε σχέση με το πλάσμα (17) (18) (19). Στο προσάρτημα 5 παρέχονται οι συνιστώμενες διαδικασίες συλλογής δειγμάτων για την ανάλυση VTG.

6. Η αλλαγή στην αναλογία φαινοτυπικού φύλου (ποσοστά των φύλων) αποτελεί ένα τελικό σημείο που αντικατοπτρίζει την αναστροφή φύλου. Κατ' αρχήν, τα οιστρογόνα, τα αντι-οιστρογόνα, τα ανδρογόνα, τα αντι-ανδρογόνα και οι χημικές ουσίες που αναστέλλουν τη στεροειδογένεση μπορούν να επηρεάσουν την αναλογία φύλου σε αναπτυσσόμενα ψάρια (20). Έχει αποδειχθεί ότι αυτή η αναστροφή φύλου είναι μερικώς αναστρέψιμη στο ζεβρόψαρο (21) μετά από έκθεση σε χημικές ουσίες που μοιάζουν με οιστρογόνα, ενώ η αναστροφή φύλου μετά από έκθεση σε χημικές ουσίες που μοιάζουν με ανδρογόνα είναι μόνιμη (30). Το φύλο ορίζεται ως θηλυκό, αρσενικό, διεμφυλικό (παρουσία ωοκυττάρων και σπερματογόνων κυττάρων σε μία γονάδα) ή αδιαφοροποίητο και προσδιορίζεται για κάθε ψάρι μέσω ιστολογικής εξέτασης των γονάδων. Παρέχεται καθοδήγηση στο προσάρτημα 7 και στο έγγραφο OECD Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads (Έγγραφο κατευθυντήριων γραμμών του ΟΟΣΑ για τη διάγνωση ιστοπαθολογικών ευρημάτων που σχετίζονται με το ενδοκρινικό σύστημα σε γονάδες ψαριών) (22).

7. Το γενετικό φύλο εξετάζεται μέσω γενετικών δεικτών όταν υπάρχουν σε ένα δεδομένο είδος ψαριού. Στο ρυζόψαρο, τα γονίδια XX για τα θηλυκά ή XY για τα αρσενικά μπορούν να ανιχνεύονται με την αλυσιδωτή

▼M6

αντίδραση πολυμεράσης (PCR) ή με την ανάλυση του γονιδίου περιοχής DM του χρωμοσώματος Y (DMY) (αρνητικό ή θετικό για το DMY), όπως περιγράφεται στα σημεία (23) (24). Για τον τριάκανθο γαστερόστεο, υπάρχει μια ισοδύναμη μέθοδος PCR για τον καθορισμό του γενετικού φύλου που περιγράφεται στο προσάρτημα 10. Όταν το γενετικό φύλο μπορεί να συνδεθεί για κάθε άτομο με το φαινοτυπικό φύλο, η ισχύς της δοκιμής βελτιώνεται. Συνεπώς, το γενετικό φύλο θα πρέπει να καθορίζεται σε είδη με τεκμηριωμένους δείκτες γενετικού φύλου.

8. Τα δύο βασικά ενδοκρινικά τελικά σημεία, η VTG και η αναλογία φύλου, μπορούν σε συνδυασμό να καταδείξουν τον τρόπο δράσης (ΤΔ) της χημικής ουσίας στο ενδοκρινικό σύστημα (πίνακας 1). Η αναλογία φύλου είναι ένας βιοδείκτης που σχετίζεται με τον πληθυσμό (25) (26) και για ορισμένους καλά καθορισμένους τρόπους δράσης, τα αποτελέσματα της δοκιμής FSDT μπορούν να χρησιμοποιούνται για σκοπούς εκτίμησης της επικινδυνότητας και του κινδύνου όταν κρίνεται σκόπιμο από τη ρυθμιστική αρχή. Προς το παρόν, αυτοί οι τρόποι δράσης είναι τα οιστρογόνα, τα ανδρογόνα και οι αναστολείς στεροειδογένεσης.

Πίνακας 1

Αντίδραση των ενδοκρινικών τελικών σημείων στους διαφορετικούς τρόπους δράσης των χημικών ουσιών:

↑ = αύξηση, ↓ = μείωση, — = δεν έχει διερευνηθεί

ΤΔ	VTG ♂	VTG ♀	Αναλογία φύλου	Παραπομπές
Ασθενής αγωνιστής οιστρογόνων	↑	↑	↑♀ ή ↑Αδιαφ.	(27) (40)
Ισχυρός αγωνιστής οιστρογόνων	↑	↑	↑♀ ή ↑Αδιαφ., Κανένα ♂	(28) (40)
Ανταγωνιστής οιστρογόνων	—	—	↓♀, ↑Αδιαφ.	(29)
Αγωνιστής ανδρογόνων	↓ ή —	↓ ή —	↑ ♂, Κανένα ♀	(28) (30)
Ανταγωνιστής ανδρογόνων	—	—	↑♀ ↑Διεμφυλικό	(31)
Αναστολέας αρωματάσης	↓	↓	↓♀	(33)

9. Η δοκιμή FSDT δεν καλύπτει το αναπαραγωγικό στάδιο ζωής των ψαριών και, επομένως, οι χημικές ουσίες για τις οποίες υπάρχει υποψία ότι επηρεάζουν την αναπαραγωγή σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με αυτές της σεξουαλικής ανάπτυξης θα πρέπει να εξετάζονται σε μια δοκιμή που καλύπτει την αναπαραγωγή.

10. Οι ορισμοί για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου δοκιμών παρέχονται στο προσάρτημα 1.

11. Η δοκιμή FSDT *in vivo* προορίζεται για τον εντοπισμό χημικών ουσιών με ανδρογόνες και οιστρογόνες ιδιότητες, καθώς και αντι-ανδρογόνες, αντι-οιστρογόνες και ανασταλτικές της στεροειδογένεσης ιδιότητες. Οι φάσεις επικύρωσης (1 και 2) της δοκιμής FSDT όντως κάλυψαν χημικές ουσίες με οιστρογόνες, ανδρογόνες και ανασταλτικές της στεροειδογένεσης ιδιότητες. Οι επιδράσεις των ανταγωνιστών οιστρογόνων και ανδρογόνων στη δοκιμή FSDT παρουσιάζονται στον πίνακα 1, αλλά προς το παρόν αυτοί οι ΤΔ είναι λιγότερο τεκμηριωμένοι.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

12. Στη δοκιμή, τα ψάρια εκτίθενται από τη φάση του προσφάτως γονιμοποιημένου αυγού έως την ολοκλήρωση της σεξουαλικής διαφοροποίησης, σε τουλάχιστον τρεις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που αραιώνεται σε νερό. Οι συνθήκες δοκιμής θα πρέπει να είναι συνεχούς ροής νερού, εκτός εάν αυτό δεν είναι δυνατό λόγω της διαθεσιμότητας ή της φύσης (π.χ. περιορισμένη διαλυτότητα) της υπό δοκιμή

▼M6

χημικής ουσίας. Η δοκιμή ξεκινάει με την τοποθέτηση προσφάτως γονιμοποιημένων αυγών (πριν από τη διαίρεση του βλαστόδισκου) στους θαλάμους δοκιμής. Η πλήρωση των θαλάμων περιγράφεται για κάθε είδος στην παράγραφο 27. Για τα επικυρωμένα είδη ψαριών, το ρυζόψαρο, τον τριάκανθο γαστερόστεο και το ζεβρόψαρο, η δοκιμή τερματίζεται στις 60 dph. Κατά τον τερματισμό της δοκιμής, όλα τα ψάρια υποβάλλονται σε ανώδυνη ευθανασία. Λαμβάνεται ένα βιολογικό δείγμα (πλάσμα αίματος, ήπαρ ή ομογενοποιημένο δείγμα κεφαλιού/ουράς) για ανάλυση της VTG από κάθε ψάρι και το υπόλοιπο μέρος μονιμοποιείται για ιστολογική αξιολόγηση των γονάδων, ώστε να καθοριστεί το φαινοτυπικό φύλο. Προαιρετικά, μπορεί να διεξαχθεί ιστοπαθολογική εξέταση (π.χ. προσδιορισμός σταδίου των γονάδων, σοβαρότητα της διεμφυλικότητας). Λαμβάνεται ένα βιολογικό δείγμα (εδρικό ή ραχιαίο πτερύγιο) για τον καθορισμό του γενετικού φύλου σε είδη που έχουν τους κατάλληλους δείκτες (προσαρτήματα 9 και 10).

13. Μια επισκόπηση των σχετικών συνθηκών της δοκιμής ειδικά για τα επικυρωμένα είδη: ρυζόψαρο, τριάκανθο γαστερόστεο και ζεβρόψαρο, παρέχεται στο προσάρτημα 2.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

14. Θα πρέπει να είναι διαθέσιμα αποτελέσματα από μια δοκιμή οξείας τοξικότητας ή άλλη βραχυχρόνια δοκιμασία τοξικότητας [π.χ. μέθοδος δοκιμών Γ.14 (34) και κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 210 του ΟΟΣΑ (1)], η οποία, κατά προτίμηση, θα έχει διεξαχθεί με το είδος που έχει επιλεγεί για αυτήν τη δοκιμή. Αυτό σημαίνει ότι η υδατοδιαλυτότητα και η τάση ατμών της υπό δοκιμή χημικής ουσίας είναι γνωστές και υπάρχει διαθέσιμη αξιόπιστη αναλυτική μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό της χημικής ουσίας στους θαλάμους δοκιμής με γνωστή και δημοσιευμένη ακρίβεια (accuracy) και όριο ανίχνευσης.

15. Στις χρήσιμες πληροφορίες περιλαμβάνονται ο συντακτικός τύπος, η καθαρότητα της χημικής ουσίας, η σταθερότητα στο νερό και το φως, η pKa, η P_{ow} και αποτελέσματα δοκιμής ως προς την άμεση βιοαποικοδομησιμότητα (μέθοδος δοκιμών Γ.4) (35).

Κριτήρια αποδοχής της δοκιμής

16. Για να θεωρηθούν αποδεκτά τα αποτελέσματα της δοκιμής, πρέπει να πληρούνται οι ακόλουθες προϋποθέσεις:

— Η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 60 τοις εκατό της τιμής κορεσμού με αέρα (air saturation value -ASV) καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής,

— Η θερμοκρασία του νερού μεταξύ των θαλάμων δοκιμής δεν θα πρέπει να διαφέρει κατά περισσότερο από ± 1,5 °C σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή κατά τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης και θα πρέπει να διατηρείται εντός του εύρους θερμοκρασιών που ορίζεται για το υπό δοκιμή είδος (προσάρτημα 2),

— Θα πρέπει να διατίθεται μια επικυρωμένη μέθοδος για την ανάλυση της χημικής ουσίας έκθεσης με όριο ανίχνευσης πολύ χαμηλότερο από την κατώτατη ονομαστική συγκέντρωση και θα πρέπει να συλλέγονται ενδείξεις που αποδεικνύουν ότι οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο διάλυμα έχουν διατηρηθεί ικανοποιητικά εντός ± 20 % των μέσων τιμών που έχουν μετρηθεί,

— Η συνολική επιβίωση των γονιμοποιημένων αυγών στους μάρτυρες και, κατά περίπτωση, στους μάρτυρες με διαλύτη, θα πρέπει να είναι ανώτερη ή ίση με τις οριακές τιμές που καθορίζονται στο προσάρτημα 2,

— Τα κριτήρια αποδοχής που σχετίζονται με την ανάπτυξη και τα ποσοστά των φύλων κατά τον τερματισμό της δοκιμής βασίζονται σε δεδομένα από τις ομάδες-μάρτυρες (συνενωμένα δεδομένα από διαλύτη και μάρτυρα νερού, εκτός εάν διαφέρουν σημαντικά, οπότε σε αυτήν την περίπτωση μόνο από διαλύτη):

▼M6

		Ρυζόψαρο	Ζεβρόψαρο	Τριάκανθος γαστερόστεος
Ανάπτυξη	Υγρό βάρος ψαριού που έχει στεγνωθεί με απορροφητικό χαρτί	> 150 mg	> 75 mg	> 120 mg
	Μήκος (τυπικό μήκος)	> 20 mm	> 14 mm	> 20 mm
Αναλογία φύλου (% αρσενικών ή θηλυκών)		30-70 %	30-70 %	30-70 %

— Όταν χρησιμοποιείται διαλύτης, αυτός δεν θα πρέπει να έχει στατιστικά σημαντική επίδραση στην επιβίωση ούτε να προκαλεί διαταραχές του ενδοκρινικού συστήματος ή άλλες δυσμενείς επιδράσεις στα αρχικά στάδια της ζωής, όπως γίνεται αντιληπτό με μάρτυρα που περιέχει διαλύτη.

Εάν παρατηρηθεί απόκλιση από τα κριτήρια αποδοχής της δοκιμής, οι συνέπειες θα πρέπει να εκτιμώνται σε σχέση με την αξιοπιστία των δεδομένων της δοκιμής και οι εκτιμήσεις αυτές θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται στην έκθεση.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Θάλαμοι δοκιμής

17. Μπορεί να χρησιμοποιείται οποιοσδήποτε θάλαμος από γυαλί, ανοξείδωτο χάλυβα ή άλλο χημικώς αδρανές υλικό. Οι διαστάσεις των θαλάμων θα πρέπει να είναι αρκετά μεγάλες ώστε να ανταποκρίνονται στα κριτήρια για τον ρυθμό πλήρωσης που παρέχονται παρακάτω. Είναι επιθυμητό οι θάλαμοι δοκιμής να τοποθετούνται με τυχαίο τρόπο στον χώρο εκτέλεσης των δοκιμών. Προτιμάται ένας τυχαιοποιημένος σχεδιασμός σε ομάδες με παρουσία κάθε συγκέντρωσης σε κάθε ομάδα αντί του πλήρως τυχαιοποιημένου σχεδιασμού. Οι θάλαμοι δοκιμής θα πρέπει να προστατεύονται από ανεπιθύμητες οχλήσεις.

Επιλογή ειδών

18. Τα συνιστώμενα είδη ψαριών περιλαμβάνονται στο προσάρτημα 2. Οι διαδικασίες για την ένταξη νέων ειδών παρέχονται στην παράγραφο 2.

Διατήρηση των γονικών ψαριών

19. Λεπτομέρειες για τη διατήρηση των γονικών ψαριών κάτω από ικανοποιητικές συνθήκες παρέχονται στην κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 210 του ΟΟΣΑ (1). Τα γονικά ψάρια θα πρέπει να σιτίζονται μία ή δύο φορές την ημέρα με κατάλληλη τροφή.

Χειρισμός των εμβρύων και των προνυμφών

20. Αρχικά, τα έμβρυα και οι προνύμφες μπορούν να εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία μέσα σε έναν κύριο θάλαμο εντός μικρότερων θαλάμων από γυαλί ή ανοξείδωτο χάλυβα, των οποίων οι πλευρές ή τα άκρα είναι από πλέγμα για να επιτρέπεται ροή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μέσα στον θάλαμο. Για να μην προκαλείται στροβιλώδης ροή διαμέσου αυτών των μικρών θαλάμων, οι εν λόγω θάλαμοι μπορούν να αναρτώνται από έναν βραχίονα στήριξης διαμορφωμένο ώστε να μετακινεί τον θάλαμο προς τα επάνω και προς τα κάτω, διατηρώντας ωστόσο τους οργανισμούς πάντα βυθισμένους στο νερό.

21. Στις περιπτώσεις όπου χρησιμοποιούνται περιέκτες αυγών, σχάρες ή πλέγματα για τη συγκράτηση των αυγών εντός του κυρίου θαλάμου δοκιμής, αυτά θα πρέπει να αφαιρούνται μετά την εκκόλαψη των προνυμφών, εκτός από τα πλέγματα που χρειάζονται για να μην διαφεύγουν τα ψάρια. Εάν είναι αναγκαίο να μεταφερθούν οι προνύμφες, δεν θα πρέπει να εκτεθούν στον αέρα και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν δίχτυα για την απελευθέρωση των ψαριών από τους περιέκτες συγκράτησης αυγών. Η μεταφορά, η χρονική στιγμή της οποίας εξαρτάται από το είδος, δεν είναι πάντοτε απαραίτητη.

▼M6

Νερό

22. Κάθε νερό, στο οποίο το είδος δοκιμής παρουσιάζει επιβίωση του μάρτυρα τουλάχιστον το ίδιο καλή με αυτή στο νερό που περιγράφεται στο προσάρτημα 3, είναι κατάλληλο ως νερό δοκιμής. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, το νερό θα πρέπει να είναι σταθερής ποιότητας. Για να διασφαλίζεται ότι το νερό της αραίωσης δεν θα επηρεάζει κατά τρόπο ανεπιθύμητο το αποτέλεσμα της δοκιμής (π.χ. αντιδρώντας με την υπό δοκιμή χημική ουσία) ή τη συμπεριφορά των γεννητόρων, θα πρέπει κατά διαστήματα να λαμβάνονται δείγματα για ανάλυση. Ο ολικός οργανικός άνθρακας, η αγωγιμότητα, το pH και τα αιωρούμενα στερεά θα πρέπει να μετρώνται, για παράδειγμα, κάθε τρεις μήνες όταν είναι γνωστό ότι το νερό αραίωσης είναι σχετικά σταθερής ποιότητας. Αν η ποιότητα του νερού είναι αμφίβολη, θα πρέπει να γίνονται μετρήσεις για βαρέα μέταλλα (π.χ. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), βασικά ανιόντα και κατιόντα (π.χ. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}) και φυτοφάρμακα. Λεπτομέρειες για τη χημική ανάλυση και τη συλλογή νερού περιλαμβάνονται στην παράγραφο 34.

Διαλύματα δοκιμής

23. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται σύστημα συνεχούς ροής νερού, εάν είναι πρακτικώς εφικτό. Στις δοκιμές συνεχούς ροής νερού, για την προσαγωγή μιας σειράς συγκεντρώσεων διαλύματος στους θαλάμους δοκιμής απαιτείται σύστημα το οποίο παρέχει συνεχώς και αραιώνει ένα διάλυμα παρακαταθήκης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (π.χ. αντλία μετρήσεως, αναλογικός αραιωτής και σύστημα κορεσμού). Οι ταχύτητες ροής των διαλυμάτων παρακαταθήκης και του νερού αραίωσης θα πρέπει να ελέγχονται κατά διαστήματα κατά τη διάρκεια της δοκιμής και δεν θα πρέπει να διαφέρουν κατά περισσότερο από 10 % καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Θεωρείται κατάλληλη μια ταχύτητα ροής ισοδύναμη με τον όγκο τουλάχιστον πέντε θαλάμων δοκιμής ανά 24 ώρες (1). Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγεται η χρήση πλαστικών σωληνώσεων ή άλλων υλικών, μερικά από τα οποία μπορεί να περιέχουν βιολογικώς δραστικές χημικές ουσίες ή να προσροφούν την υπό δοκιμή χημική ουσία.

24. Το διάλυμα παρακαταθήκης θα πρέπει να παρασκευάζεται, κατά προτίμηση, χωρίς τη χρήση διαλυτών, με απλή ανάμειξη ή ανάδευση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο νερό αραίωσης με τη χρήση μηχανικών μέσων (π.χ. ανάδευση ή κατεργασία με υπερήχους). Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι δυσδιάλυτη στο νερό, θα πρέπει να ακολουθούνται οι διαδικασίες που προβλέπονται στο έγγραφο OECD Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures (Εγγραφο κατευθυντήριας γραμμής ΟΟΣΑ σχετικά με τις δοκιμές υδατικής τοξικότητας δύσκολων ουσιών και μειγμάτων) (36). Η χρήση διαλυτών θα πρέπει να αποφεύγεται, αλλά μπορεί να είναι απαραίτητη σε ορισμένες περιπτώσεις, προκειμένου να παρασκευασθεί ένα κατάλληλα συμπυκνωμένο διάλυμα παρακαταθήκης. Παραδείγματα διαλυτών που μπορούν να χρησιμοποιούνται παρέχονται στο σημείο (36).

25. Θα πρέπει να αποφεύγονται οι ημιστατικές συνθήκες δοκιμής, εκτός εάν παρέχεται αιτιολόγηση στην οποία γίνεται αναφορά σε επιτακτικούς λόγους που σχετίζονται με την υπό δοκιμή χημική ουσία (π.χ. σταθερότητα, περιορισμένη διαθεσιμότητα, υψηλό κόστος ή υψηλός κίνδυνος). Για την ημιστατική τεχνική, είναι δυνατόν να ακολουθούνται δύο διαφορετικές διαδικασίες ανανέωσης. Είτε προετοιμάζονται καινούρια διαλύματα δοκιμής σε καθαρούς θαλάμους και τα αυγά και οι προνύμφες που επιβιώνουν μεταφέρονται προσεκτικά στους καινούριους θαλάμους, είτε οι οργανισμοί δοκιμής διατηρούνται στους θαλάμους δοκιμής και ένα μέρος (τουλάχιστον τα δύο τρίτα) του νερού δοκιμής ανανεώνεται σε καθημερινή βάση.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Συνθήκες έκθεσης

Συλλογή των αυγών και διάρκεια

26. Για την αποφυγή της μεροληψίας από γενετικής απόψεως, τα αυγά συλλέγονται από τουλάχιστον τρία ζεύγη ή ομάδες αναπαραγωγής, αναμειγνύονται και επιλέγονται τυχαία για την έναρξη της δοκιμής. Για τον τριάκανθο γαστερόστεο, βλέπε την περιγραφή της τεχνητής γονιμοποίησης στο προσάρτημα 11. Η δοκιμή θα πρέπει να ξεκινάει το συντομότερο

▼M6

δυνατόν μετά τη γονιμοποίηση των αυγών και τα έμβρυα θα πρέπει να βυθίζονται στα διαλύματα δοκιμής, κατά προτίμηση, πριν από την έναρξη διαίρεσης του βλαστόδισκου ή όσο το δυνατό συντομότερα μετά το στάδιο αυτό και όχι αργότερα από 12 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Η δοκιμή θα πρέπει να συνεχίζεται μέχρι την ολοκλήρωση της σεξουαλικής διαφοροποίησης στην ομάδα-μαρτύρα (60 dph για το ρυζόψαρο, τον τριάκανθο γαστερόστεο και το ζεβρόψαρο).

Πλήρωση

27. Ο αριθμός των γονιμοποιημένων αυγών κατά την έναρξη της δοκιμής θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 120 αυγά για κάθε συγκέντρωση, τα οποία διαιρούνται σε τουλάχιστον 4 επαναλήψεις (η κατανομή τετραγωνικής ρίζας προς τον μάρτυρα είναι αποδεκτή). Τα αυγά θα πρέπει να κατανέμονται τυχαία (με τη χρήση στατιστικών πινάκων για την τυχαιοποίηση) στις αγωγές. Ο ρυθμός πλήρωσης (για τον ορισμό, βλ. προσάρτημα 1) θα πρέπει να είναι αρκετά χαμηλός ώστε να μπορεί να διατηρείται η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου σε τιμή ίση με τουλάχιστον το 60 % της ASV χωρίς άμεσο αερισμό των θαλάμων. Για τις δοκιμές συνεχούς ροής νερού, συνιστάται ο ρυθμός πλήρωσης να μην υπερβαίνει τα 0,5 g/l ανά 24ωρο και να μην υπερβαίνει τα 5 g/l διαλύματος οποιαδήποτε στιγμή. Ο αριθμός των ψαριών ανά επανάληψη θα πρέπει να κατανέμεται εκ νέου, το αργότερο 28 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση, ώστε κάθε επανάληψη να περιέχει ίσο αριθμό ψαριών, στον βαθμό που αυτό είναι εφικτό. Εάν προκύψει θνησιμότητα που σχετίζεται με την έκθεση, ο αριθμός των επαναλήψεων θα πρέπει να μειώνεται ανάλογα, ώστε οι πυκνότητες των ψαριών μεταξύ των επιπέδων αγωγής να παραμένουν, όσο το δυνατόν περισσότερο, ίσες.

Φως και θερμοκρασία

28. Η φωτοπερίοδος και η θερμοκρασία του νερού θα πρέπει να είναι κατάλληλες για τα είδη δοκιμής (για τις πειραματικές συνθήκες σχετικά με τη δοκιμή FSDT, βλ. προσάρτημα 2).

Σίτιση

29. Η τροφή και η σίτιση αποτελούν βασικούς παράγοντες και είναι σημαντικό να παρέχεται η σωστή τροφή για κάθε στάδιο, στα κατάλληλα χρονικά διαστήματα και σε επαρκή ποσότητα ώστε να υποστηρίζεται η φυσιολογική ανάπτυξη. Η σίτιση θα πρέπει να πραγματοποιείται κατά βούληση (*ad libitum*), ενώ θα πρέπει να ελαχιστοποιείται η πλεονάζουσα ποσότητα τροφής. Για την επίτευξη επαρκούς ρυθμού ανάπτυξης, θα πρέπει να παρέχεται τροφή στα ψάρια τουλάχιστον δύο φορές την ημέρα (είναι αποδεκτή η σίτιση μία φορά ημερησίως τα σαββατοκύριακα), ενώ θα πρέπει να μεσολαβούν τουλάχιστον τρεις ώρες μεταξύ κάθε σίτισης. Η πλεονάζουσα τροφή και τα περιττώματα θα πρέπει να απομακρύνονται, κατά περίπτωση, για την αποφυγή συσσώρευσης αποβλήτων. Καθόσον αποκτάται όλο και περισσότερη εμπειρία, η τροφή και τα καθεστώτα σίτισης συνεχώς επαναπροσδιορίζονται για τη βελτίωση της επιβίωσης και τη βελτιστοποίηση της ανάπτυξης. Επομένως, θα πρέπει να γίνεται προσπάθεια ώστε να επιβεβαιώνεται το προτεινόμενο καθεστώς σίτισης από αναγνωρισμένους εμπειρογνώμονες. Η σίτιση θα πρέπει να διακόπτεται 24 ώρες πριν από τη λήξη της δοκιμής. Παραδείγματα κατάλληλων τροφών παρατίθενται στο προσάρτημα 2 (βλ. επίσης το έγγραφο OECD Fish Testing Framework (Πλαίσιο δοκιμών με ψάρια του ΟΟΣΑ)) (39).

Συγκεντρώσεις δοκιμής

30. Η κλιμάκωση των υπό δοκιμή χημικών ουσιών θα πρέπει να πραγματοποιείται όπως περιγράφεται στο προσάρτημα 4. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τρεις συγκεντρώσεις δοκιμής σε τουλάχιστον τέσσερις επαναλήψεις. Η καμπύλη που συνδέει την LC_{50} με την περίοδο έκθεσης στις διαθέσιμες μελέτες οξείας τοξικότητας θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά την επιλογή του εύρους των συγκεντρώσεων που θα χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή. Συνιστάται να χρησιμοποιούνται πέντε συγκεντρώσεις δοκιμής εάν τα δεδομένα πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για εκτίμηση του κινδύνου.

31. Δεν χρειάζεται να ελέγχονται συγκεντρώσεις της χημικής ουσίας μεγαλύτερες από το 10 % της οξείας τιμής LC_{50} για ενήλικα άτομα ή από 10 mg/l, όποια τιμή είναι μικρότερη. Η μέγιστη συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να είναι ίση με το 10 % της τιμής LC_{50} στο στάδιο ζωής προνυμφών/νεαρών ατόμων.

▼M6

Μάρτυρες

32. Εκτός από τις συγκεντρώσεις δοκιμής, θα πρέπει να εκτελούνται μετρήσεις σε μάρτυρα νερού αραίωσης (≥ 4 επαναλήψεις) και, κατά περίπτωση, σε μάρτυρα με διαλύτη (≥ 4 επαναλήψεις). Για τη δοκιμή θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο διαλύτες για τους οποίους είναι γνωστό, κατόπιν ελέγχου, ότι δεν επηρεάζουν στατιστικώς σημαντικά τα τελικά σημεία της δοκιμής.

33. Όταν χρησιμοποιείται διαλύτης, η τελική συγκέντρωσή του δεν θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 0,1 ml/l (36) και θα πρέπει να χρησιμοποιείται η ίδια συγκέντρωση σε όλους τους θαλάμους δοκιμής, εκτός από τον θάλαμο με τον μάρτυρα νερού αραίωσης. Εντούτοις, θα πρέπει να καταβάλλεται κάθε δυνατή προσπάθεια για την αποφυγή της χρήσης τέτοιων διαλυτών ή για τη διατήρηση των συγκεντρώσεων του διαλύτη στο ελάχιστο.

Συχνότητα αναλυτικών προσδιορισμών και μετρήσεων

34. Η χημική ανάλυση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να διεξάγεται πριν από την έναρξη της δοκιμής, προκειμένου να ελέγχεται η συμμόρφωση με τα κριτήρια αποδοχής. Όλες οι επαναλήψεις θα πρέπει να αναλύονται ξεχωριστά στην αρχή και κατά τον τερματισμό της δοκιμής. Θα πρέπει να αναλύεται μία επανάληψη ανά συγκέντρωση δοκιμής τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα κατά τη διάρκεια της δοκιμής, και να γίνεται συστηματικά αλλαγή μεταξύ των επαναλήψεων (1, 2, 3, 4, 1, 2 κ.λπ.). Εάν τα δείγματα αποθηκεύονται ώστε να αναλυθούν κάποια άλλη στιγμή, η μέθοδος αποθήκευσης των δειγμάτων θα πρέπει να έχει προηγουμένως επικυρωθεί. Τα δείγματα θα πρέπει να υφίστανται φιλτράρισμα (π.χ. με χρήση πόρων μεγέθους 0,45 μm) ή φυγοκέντρηση για να διασφαλίζεται ότι οι προσδιορισμοί αναφέρονται στις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε αληθές διάλυμα.

35. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, θα πρέπει να μετρώνται το διαλυμένο οξυγόνο, το pH, η συνολική σκληρότητα, η αγωγιμότητα, η αλατότητα (κατά περίπτωση) και η θερμοκρασία σε όλους τους θαλάμους δοκιμής. Θα πρέπει να μετρώνται τουλάχιστον το διαλυμένο οξυγόνο, η αλατότητα (κατά περίπτωση) και η θερμοκρασία σε εβδομαδιαία βάση, και το pH, η αγωγιμότητα και η σκληρότητα στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής. Η θερμοκρασία θα πρέπει, κατά προτίμηση, να παρακολουθείται συνεχώς σε έναν τουλάχιστον θάλαμο δοκιμής.

36. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να βασίζονται σε μετρηθείσες συγκεντρώσεις. Ωστόσο, εάν η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο διάλυμα έχει διατηρηθεί ικανοποιητικά εντός του ± 20 % της ονομαστικής συγκέντρωσης καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής, τα αποτελέσματα μπορούν να βασίζονται στις ονομαστικές ή στις μετρηθείσες τιμές.

Παρατηρήσεις και μετρήσεις

Στάδιο εμβρυϊκής ανάπτυξης

37. Η έκθεση θα πρέπει να ξεκινάει το συντομότερο δυνατόν μετά τη γονιμοποίηση και πριν από την έναρξη διαίρεσης του βλαστόδισκου, αλλά όχι αργότερα από 12 ώρες μετά τη γονιμοποίηση, προκειμένου να διασφαλίζεται έκθεση στα αρχικά στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης.

Εκκόλαψη και επιβίωση

38. Η εκκόλαψη και η επιβίωση θα πρέπει να παρατηρούνται τουλάχιστον μία φορά την ημέρα και να καταγράφονται τα αριθμητικά δεδομένα. Τα έμβρυα, οι προνύμφες και τα νεαρά ψάρια που είναι νεκρά θα πρέπει να απομακρύνονται αμέσως μόλις γίνονται αντιληπτά, καθώς μπορεί να αποσυντεθούν ταχέως και να διαλυθούν από τις ενέργειες των άλλων ψαριών. Θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή όταν απομακρύνονται τα νεκρά στοιχεία ώστε να μην χτυπηθούν ή υποστούν φυσική ζημιά τα γειτονικά αυγά/προνύμφες καθώς είναι εξαιρετικά λεπτεπίλεπτα και ευαίσθητα. Τα κριτήρια θανάτου είναι διαφορετικά αναλόγως του σταδίου ζωής:

— για τα αυγά: ιδιαίτερα στα αρχικά στάδια, αισθητή μείωση διαφάνειας και αλλαγή χρώματος λόγω πήξης ή/και καταβύθισης των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα λευκή θαμπή όψη,

▼M6

— για τις προνύμφες και τα νεαρά ψάρια: ακινησία ή/και απουσία αναπνευστικής κίνησης ή/και απουσία καρδιακού ρυθμού ή/και λευκό θαμπό χρώμα του κεντρικού νευρικού συστήματος ή/και έλλειψη αντίδρασης σε μηχανικά ερεθίσματα.

Μη φυσιολογική εμφάνιση

39. Ο αριθμός των προνυμφών ή των ψαριών που εμφανίζουν μη φυσιολογικό σχήμα σώματος θα πρέπει να καταγράφεται, ενώ θα πρέπει να περιγράφονται η εμφάνιση και η φύση της ανωμαλίας. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι είναι φυσιολογικό να εμφανίζονται μη φυσιολογικά έμβρυα και προνύμφες και μπορεί να αντιπροσωπεύουν σημαντικό ποσοστό των μαρτύρων σε ορισμένα είδη. Τα μη φυσιολογικά ζώα θα πρέπει να απομακρύνονται από τους θαλάμους δοκιμής μόνο όταν πεθάνουν. Ωστόσο, σύμφωνα με την Οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 22ας Σεπτεμβρίου 2010 περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς, εάν οι ανωμαλίες έχουν ως αποτέλεσμα την πρόκληση πόνου, ταλαιπωρίας και αγωνίας ή μόνιμης βλάβης, και ο θάνατος μπορεί να προβλεφθεί με αξιοπιστία, τα ζώα θα πρέπει να υποβάλλονται σε αναισθησία και ευθανασία σύμφωνα με την περιγραφή που δίνεται στην παράγραφο 44 και να συμπεριλαμβάνονται ως θνησιμότητα για την ανάλυση των δεδομένων.

Μη φυσιολογική συμπεριφορά

40. Οι ανωμαλίες, π.χ. υπεραερισμός, μη συγχρονισμένη κολύμβηση, άτυπη αδράνεια και άτυπη συμπεριφορά σίτισης, θα πρέπει να καταγράφονται κατά την εμφάνισή τους.

Βάρος

41. Στο τέλος της δοκιμής, όλα τα επιζώντα ψάρια θα πρέπει να υποβάλλονται σε ευθανασία (αναισθησία σε περίπτωση που πρέπει να ληφθούν δείγματα αίματος) και θα πρέπει να μετράται το υγρό βάρος του κάθε ψαριού (στεγνωμένο με απορροφητικό χαρτί).

Μήκος

42. Στο τέλος της δοκιμής, θα πρέπει να μετράται το μήκος κάθε ψαριού (τυπικό μήκος).

43. Οι παρατηρήσεις αυτές θα έχουν ως αποτέλεσμα τη διαθεσιμότητα προς αναφορά κάποιων από τα ακόλουθα δεδομένα ή όλων:

— συνολική θνησιμότητα,

— αριθμοί υγειών ψαριών στο τέλος της δοκιμής,

— χρόνος έως την έναρξη και τη λήξη της εκκόλαψης,

— μήκος και βάρος των επιβιωσάντων ζώων,

— αριθμοί παραμορφωμένων προνυμφών,

— αριθμοί ψαριών που εμφανίζουν μη φυσιολογική συμπεριφορά.

Δειγματοληψία των ψαριών

44. Η δειγματοληψία των ψαριών πραγματοποιείται κατά τον τερματισμό της δοκιμής. Τα ψάρια της δειγματοληψίας θα πρέπει να υποβάλλονται σε ευθανασία με π.χ. MS-222 (100-500 mg ανά λίτρο ρυθμισμένο με 200 mg $NaHCO_3$ ανά λίτρο) ή FA-100 (4-αλλυλο-2-μεθοξυφαινόλη: ευγενόλη) και το κάθε ψάρι θα πρέπει να μετράται και να ζυγίζεται ως προς το υγρό βάρος (στεγνωμένο με απορροφητικό χαρτί) ή να υποβάλλεται σε αναισθησία εάν πρέπει να ληφθεί δείγμα αίματος (βλ. παράγραφο 49).

Δειγματοληψία για ανάλυση της VTG και προσδιορισμό του φύλου μέσω ιστολογικής αξιολόγησης

45. Όλα τα ψάρια θα πρέπει να λαμβάνονται ως δείγμα και να προετοιμάζονται για ανάλυση του φύλου και της VTG. Όλα τα ψάρια θα πρέπει να υποβάλλονται σε ιστολογική εξέταση για τον προσδιορισμό του φύλου. Για τις μετρήσεις της VTG, είναι αποδεκτό να λαμβάνεται ένα επιμέρους

▼M6

δείγμα αποτελούμενο από τουλάχιστον 16 ψάρια από κάθε επανάληψη. Θα πρέπει να αναλύονται περισσότερα ψάρια για τη μέτρηση της VTG, εάν τα αποτελέσματα του επιμέρους δείγματος αποδειχθούν ασαφή.

46. Η διαδικασία δειγματοληψίας για ανάλυση της VTG και προσδιορισμό του φύλου εξαρτάται από τη μέθοδο ανάλυσης της VTG:

Μέθοδος ομογενοποιημένου δείγματος κεφαλιού/ουράς για ανάλυση της VTG

47. Το ψάρι υποβάλλεται σε ευθανασία. Το κεφάλι και η ουρά κάθε ψαριού διαχωρίζονται από το σώμα με τομές που πραγματοποιούνται με ένα νυστέρι ακριβώς πίσω από τα θωρακικά πτερύγια και ακριβώς πίσω από το ραχιαίο πτερύγιο (βλ. σχήμα 1). Τα μέρη του κεφαλιού και της ουράς από κάθε ψάρι συνενώνονται, ζυγίζονται και αριθμούνται καθένα χωριστά, στη συνέχεια καταψύχονται σε υγρό άζωτο και αποθηκεύονται στους – 70 °C ή χαμηλότερα για την ανάλυση της VTG. Το μέρος σώματος του ψαριού αριθμείται και μονιμοποιείται σε κατάλληλο μονιμοποιητικό υγρό για ιστολογική αξιολόγηση (22). Με τη χρήση αυτής της μεθόδου, εκτιμάται η VTG και η ιστοπαθολογία του κάθε ψαριού και, επομένως, μια πιθανή αλλαγή στο επίπεδο της VTG μπορεί να συνδεθεί με το φαινοτυπικό φύλο ή το γενετικό φύλο (ρυζόψαρο και τριάκανθος γαστερόστεος) των ψαριών. Για περισσότερες πληροφορίες, δείτε την καθοδήγηση για την ομογενοποίηση (προσάρτημα 5) και την καθοδήγηση για τον ποσοτικό προσδιορισμό της VTG (προσάρτημα 6).

Μέθοδος ομογενοποιημένου δείγματος ήπατος για ανάλυση της VTG

48. Το ψάρι υποβάλλεται σε ευθανασία. Το ήπαρ διαχωρίζεται και αποθηκεύεται στους – 70 °C ή χαμηλότερα. Συνιστώμενες διαδικασίες για την εκτομή και την προκατεργασία του ήπατος διατίθενται στην κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 229 του ΟΟΣΑ (37) ή στο κεφάλαιο Γ.37 του παρόντος παραρτήματος (38). Στη συνέχεια, γίνεται ομογενοποίηση του κάθε ήπατος ξεχωριστά όπως περιγράφεται στην κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 229 του ΟΟΣΑ ή στο Κεφάλαιο Γ.37 του παρόντος παραρτήματος. Το υπερκείμενο υγρό συλλέγεται και χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της VTG με μια ομόλογη τεχνική ELISA (βλ. προσάρτημα 6 για ένα παράδειγμα ποσοτικού προσδιορισμού στο ζεβρόψαρο ή την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 229 του ΟΟΣΑ (37) για το ρυζόψαρο). Με αυτήν την τεχνική, είναι επίσης δυνατή η λήψη δεδομένων για κάθε ψάρι τόσο για τη VTG όσο και για την ιστολογία των γονάδων.

Μέθοδος πλάσματος αίματος για ανάλυση της VTG

49. Λαμβάνεται δείγμα αίματος από αναισθητοποιημένα ψάρια μέσω καρδιακής παρακέντησης ή κοπής της ουραίας φλέβας ή της ουράς, το οποίο φυγοκεντρείται στους 4 °C για τη συλλογή πλάσματος. Το πλάσμα αποθηκεύεται στους – 70 °C ή χαμηλότερα μέχρι τη χρήση του. Ολόκληρο το ψάρι υποβάλλεται σε ευθανασία και μονιμοποιείται για ιστολογική εξέταση. Τα δείγματα του πλάσματος αίματος και το ψάρι αριθμούνται καθένα χωριστά για να συνδεθούν τα επίπεδα της VTG με το φύλο του ψαριού.

Σχήμα 1:

Τρόπος κοπής ενός ψαριού για μέτρηση της VTG από ομογενοποιημένο δείγμα κεφαλιού/ουράς και για ιστολογική αξιολόγηση του μεσαίου τμήματος



▼M6

Προσδιορισμός γενετικού φύλου

50. Λαμβάνεται βιολογικό δείγμα για τον προσδιορισμό του γενετικού φύλου από κάθε ψάρι που ανήκει σε είδος το οποίο φέρει τους κατάλληλους δείκτες. Για το ρυζόψαρο, συλλέγεται το εδρικό ή το ραχιαίο πτερύγιο. Στο προσάρτημα 9, παρέχεται μια λεπτομερής περιγραφή που περιλαμβάνει τη δειγματοληψία ιστού και τον προσδιορισμό του φύλου με μέθοδο PCR. Παρομοίως, για τον τριάκανθο γαστερόστεο, παρέχονται στο προσάρτημα 10 μια περιγραφή της δειγματοληψίας ιστού και μια μέθοδος PCR για τον προσδιορισμό του φύλου.

Μέτρηση της VTG

51. Η μέτρηση της VTG θα πρέπει να βασίζεται σε μια ποσοτική μέθοδο που έχει επικυρωθεί αναλυτικά. Θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με τη μεταβλητότητα εντός της ίδιας δοκιμασίας και μεταξύ διαφορετικών δοκιμασιών σε ό,τι αφορά τη μέθοδο που χρησιμοποιείται σε ένα δεδομένο εργαστήριο. Η προέλευση της μεταβλητότητας μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων και εντός του ίδιου εργαστηρίου βασίζεται (πιθανότατα) στα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του πληθυσμού των ψαριών. Λαμβανομένης υπόψη της μεταβλητότητας της μέτρησης της VTG, θα πρέπει να γίνεται προσεκτικός χειρισμός των NOEC που βασίζονται μόνο σε αυτό το τελικό σημείο. Υπάρχουν διαθέσιμες διαφορετικές μέθοδοι για την εκτίμηση της παραγωγής VTG στα είδη ψαριών που εξετάζονται σε αυτήν τη δοκιμασία. Μια τεχνική μέτρησης που είναι σχετικά ευαίσθητη και συγκεκριμένη είναι ο καθορισμός των συγκεντρώσεων πρωτεϊνών μέσω ενζυμικής δοκιμής ανοσοπροσρόφησης (ELISA). Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ομόλογα αντισώματα (κατά της VTG του ίδιου είδους), αλλά πιο σημαντικό είναι να χρησιμοποιούνται ομόλογα πρότυπα.

Προσδιορισμός φύλου

52. Ανάλογα με τη διαδικασία δειγματοληψίας για τη μέτρηση της VTG, ολόκληρο το ψάρι ή το μεσαίο τμήμα κάθε ψαριού που απομένει τοποθετείται σε μια προ-σημασμένη κασέτα κατεργασίας και μονιμοποιείται με ένα κατάλληλο μονιμοποιητικό υγρό για τον ιστολογικό καθορισμό του φύλου (προαιρετικά επίσης για την αξιολόγηση του σταδίου ανάπτυξης των γονάδων). Καθοδήγηση σχετικά με τη μονιμοποίηση και τη σκήνωση παρέχεται στο προσάρτημα 7, καθώς και στο έγγραφο OECD Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads (Έγγραφο κατευθυντήριας γραμμής ΟΟΣΑ σχετικά με τη διάγνωση ιστοπαθολογικών ευρημάτων που σχετίζονται με το ενδοκρινικό σύστημα στις γονάδες ψαριών) (22). Μετά την κατεργασία, τα ψάρια εγκλείονται σε μπλοκ παραφίνης. Τα ψάρια θα πρέπει να τοποθετούνται κατά μήκος στο μπλοκ παραφίνης. Από κάθε ψάρι λαμβάνονται τουλάχιστον έξι κατά μήκος τομές (πάχους 3-5 μm) σε εμπρόσθιο επίπεδο, συμπεριλαμβανομένου ιστού των γονάδων και από τις δύο γονάδες. Το διάστημα μεταξύ των εν λόγω τομών θα πρέπει να είναι περίπου 50 μm για τα αρσενικά και 250 μm για τα θηλυκά. Ωστόσο, επειδή κάθε μπλοκ συχνά περιέχει τομές από αρσενικά και θηλυκά άτομα (εάν γίνεται σκήνωση περισσότερων του ενός ψαριού σε κάθε μπλοκ), το διάστημα μεταξύ των τομών σε αυτά τα μπλοκ θα πρέπει να είναι περίπου 50 μm μέχρι να ληφθούν τουλάχιστον έξι τομές των γονάδων από κάθε αρσενικό άτομο. Στη συνέχεια, το διάστημα μεταξύ των τομών μπορεί να αυξηθεί σε περίπου 250 μm για τα θηλυκά άτομα. Οι τομές βάφονται με αιματοξυλίνη και ηωσίνη και εξετάζονται σε οπτικό μικροσκόπιο εστιάζοντας στο φύλο (αρσενικό, θηλυκό, διεμφυλικό ή αδιαφοροποίητο). Η διεμφυλικότητα ορίζεται ως παρουσία περισσοτέρων του ενός ωοκυττάρων στον όρχι ανά έξι τομές που αναλύονται ή παρουσία σπερματογόνων κυττάρων (ναι/όχι) στις ωοθήκες. Η ιστοπαθολογική εξέταση και ο προσδιορισμός σταδίου των ωοθηκών και των όρχεων είναι προαιρετικές διαδικασίες, αλλά εάν διερευνηθούν, τα αποτελέσματα θα πρέπει να αναλυθούν στατιστικά και να γίνει αναφορά τους. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι μερικά είδη ψαριών δεν διαθέτουν εκ φύσεως πλήρως αναπτυγμένο ζεύγος γονάδων και ενδεχομένως να υπάρχει μόνο μία γονάδα (π.χ. στο ρυζόψαρο και περιστασιακά στο ζεβρόψαρο). Όλες οι εν λόγω παρατηρήσεις θα πρέπει να καταγράφονται.

53. Ο προσδιορισμός του γενετικού φύλου σε κάθε ρυζόψαρο βασίζεται στην παρουσία ή απουσία του γονιδίου καθορισμού του αρσενικού φύλου, DMY, που βρίσκεται στο Y χρωμόσωμα στο ρυζόψαρο. Ο προσδιορισμός

▼M6

του γονοτυπικού φύλου στο ρυζόψαρο μπορεί να γίνει με τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του γονιδίου DMY από DNA που εκχυλίζεται π.χ. από ένα τμήμα του εδρικού ή του ραχιαίου πτερυγίου. Η παρουσία του DMY υποδεικνύει άτομο XY (αρσενικό) ανεξάρτητα από τον φαινότυπο, ενώ η απουσία του DMY υποδεικνύει άτομο XX (θηλυκό) ανεξάρτητα από τον φαινότυπο (23). Καθοδήγηση για την προετοιμασία του ιστού και τη μέθοδο PCR παρέχεται στο προσάρτημα 9. Ο προσδιορισμός του γενετικού φύλου σε κάθε τριάκανθο γαστερόστεο πραγματοποιείται επίσης με μια μέθοδο PCR, που περιγράφεται στο προσάρτημα 10.

54. Η εμφάνιση διεμφυλικών ατόμων (για τον ορισμό, βλ. προσάρτημα 1) θα πρέπει να αναφέρεται.

Δευτερεύοντα χαρακτηριστικά του φύλου

55. Τα δευτερεύοντα χαρακτηριστικά του φύλου ελέγχονται από το ενδοκρινικό σύστημα σε είδη όπως το ρυζόψαρο. Επομένως, θα πρέπει να γίνονται παρατηρήσεις της φυσικής εμφάνισης των ψαριών, εάν είναι δυνατόν, στο τέλος της έκθεσης. Στο ρυζόψαρο, ο σχηματισμός της θηλής στο οπίσθιο τμήμα του εδρικού πτερυγίου στα θηλυκά άτομα είναι ευαίσθητος στα ανδρογόνα. Στο κεφάλαιο Γ.37 του παρόντος παραρτήματος (38) παρέχονται σχετικές φωτογραφίες των δευτερευόντων χαρακτηριστικών του φύλου για τα αρσενικά άτομα, καθώς και για τα θηλυκά άτομα στα οποία έχουν χορηγηθεί ανδρογόνα.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

56. Είναι σημαντικό ο καθορισμός του τελικού σημείου να πραγματοποιείται με βάση την ισχυρότερη έγκυρη στατιστική δοκιμασία. Η επανάληψη αποτελεί την πειραματική μονάδα, αλλά η μεταβλητότητα εντός των επαναλήψεων θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται στις στατιστικές δοκιμασίες. Στο προσάρτημα 8 διατίθεται ένα διάγραμμα απόφασης που βοηθά στην επιλογή της καταλληλότερης στατιστικής δοκιμασίας που πρέπει να χρησιμοποιείται με βάση τα χαρακτηριστικά των δεδομένων που λαμβάνονται από τη δοκιμή. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας είναι 0,05 για όλα τα τελικά σημεία που συμπεριλαμβάνονται.

Ποσοστά των φύλων και γενετικό φύλο

57. Τα ποσοστά των φύλων θα πρέπει να αναλύονται για να διαπιστώνονται σημαντικές επιδράσεις (προσέγγιση NOEC/LOEC) της έκθεσης μέσω της δοκιμασίας Jonckheere-Terpstra (δοκιμασία τάσεων) εάν υπάρχει μονοτονική σχέση δόσης-απόκρισης. Εάν διαπιστωθεί μη μονοτονικότητα, θα πρέπει να εφαρμόζεται δοκιμή που βασίζεται σε ζεύγη: Εάν είναι δυνατή η επίτευξη κανονικότητας και ομοιογενούς διασποράς, χρησιμοποιείται η δοκιμασία Dunnett. Εάν υπάρχει ομοιογενής διασπορά, χρησιμοποιείται η δοκιμασία Tamhane-Dunnett. Διαφορετικά, χρησιμοποιείται η δοκιμασία Mann-Whitney με διόρθωση κατά Bonferroni-Holm. Στο προσάρτημα 8 περιλαμβάνεται ένα διάγραμμα ροής που περιγράφει τα στατιστικά στοιχεία των ποσοστών των φύλων. Τα ποσοστά των φύλων θα πρέπει να παρουσιάζονται σε πίνακες ως ποσοστά συγκέντρωσης ± τυπική απόκλιση (SD) για τα αρσενικά, τα θηλυκά, τα διεμφυλικά και τα αδιαφοροποίητα άτομα. Θα πρέπει να επισημαίνεται η στατιστική σημαντικότητα. Παραδείγματα παρουσιάζονται στην έκθεση επικύρωσης φάσης 2 της δοκιμής FSDT (42). Το γενετικό φύλο θα πρέπει να αναφέρεται ως ποσοστό αναστροφής του φαινοτυπικού φύλου των αρσενικών, θηλυκών, διεμφυλικών και αδιαφοροποίητων ατόμων.

Συγκεντρώσεις της VTG

58. Οι συγκεντρώσεις της VTG θα πρέπει να αναλύονται για να διαπιστώνονται σημαντικές επιδράσεις (προσέγγιση NOEC/LOEC) της έκθεσης. Η δοκιμασία Dunnett προτιμάται σε σχέση με τη δοκιμασία t με διόρθωση κατά Bonferroni. Όταν χρησιμοποιείται διόρθωση κατά Bonferroni, προτιμάται η διόρθωση κατά Bonferroni-Holm. Θα πρέπει να επιτρέπεται ένα περιθώριο για λογαριθμικό μετασχηματισμό της VTG για την επίτευξη κανονικότητας και ομοιογένειας της διασποράς. Επίσης, εάν η σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης συνάδει με μονοτονικότητα, προτιμάται η δοκιμασία Jonckheere-Terpstra από όλες τις παραπάνω δοκιμασίες. Εάν χρησιμοποιούνται δοκιμασίες t ή δοκιμασία Dunnett, δεν χρειάζεται να εφαρμοστεί έλεγχος F της ANOVA για συνέχιση. Για λεπτομέρειες, βλ. το διάγραμμα ροής στο προσάρτημα 8. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να παρουσιάζονται σε πίνακες ως μέσες τιμές συγκέντρωσης ± SD για τα αρσενικά,

▼M6

τα θηλυκά, τα διεμφυλικά και τα αδιαφοροποίητα άτομα ξεχωριστά. Θα πρέπει να επισημαίνεται η στατιστική σημαντικότητα για τα φαινοτυπικά θηλυκά και φαινοτυπικά αρσενικά άτομα. Παραδείγματα παρουσιάζονται στην έκθεση επικύρωσης φάσης 2 της δοκιμής FSDT (42).

Πραγματικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας

59. Οι πραγματικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον θάλαμο δοκιμής θα πρέπει να αναλύονται με τις συχνότητες που περιγράφονται στην παράγραφο 34. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να αναφέρονται σε πίνακες ως μέση συγκέντρωση ± SD των επαναλήψεων, καθώς και των συγκεντρώσεων, περιλαμβάνοντας επισημασμένες πληροφορίες σχετικά με τον αριθμό των δειγμάτων και τις έκτοπες τιμές σε σχέση με τη μέση συγκέντρωση της αγωγής ± 20 %. Παραδείγματα περιλαμβάνονται στην έκθεση επικύρωσης φάσης 2 της δοκιμής FSDT (42).

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

60. Τα αποτελέσματα της δοκιμής θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή αν οι μετρούμενες συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στα διαλύματα δοκιμής βρίσκονται σε επίπεδα κοντά στο όριο ανίχνευσης της αναλυτικής μεθόδου.

Έκθεση δοκιμής

61. Η έκθεση της δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία

— Σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, στοιχεία ταυτοποίησης της χημικής ουσίας, δεδομένα συμπεριλαμβανομένης της καθαρότητας και της αναλυτικής μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Συνθήκες δοκιμής

— Χρησιμοποιηθείσα διαδικασία δοκιμής (π.χ. συνεχούς ροής νερού ή ημιστατική/ανανέωσης), σχεδιασμός δοκιμής συμπεριλαμβανομένων των συγκεντρώσεων δοκιμής, της μεθόδου παρασκευής των διαλυμάτων παρακαταθήκης (σε ένα παράρτημα), της συχνότητας ανανέωσης (θα πρέπει να αναφέρεται το μέσο διαλυτοποίησης και η συγκέντρωσή του, όταν χρησιμοποιείται),

— Ονομαστικές συγκεντρώσεις δοκιμής, μέσες τιμές των μετρηθεισών τιμών με τις τυπικές αποκλίσεις τους στους θαλάμους δοκιμής, μέθοδος με την οποία επιτεύχθηκαν (η χρησιμοποιηθείσα αναλυτική μέθοδος θα πρέπει να παρουσιάζεται σε ένα παράρτημα), καθώς και ενδείξεις που αποδεικνύουν ότι οι μετρήσεις αναφέρονται στις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε αληθές διάλυμα,

— Ποιότητα νερού στους θαλάμους δοκιμής: pH, σκληρότητα, θερμοκρασία και συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου,

— Λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη σίτιση (π.χ. είδος τροφής, πηγή, ποσότητα και συχνότητα χορήγησης) καθώς και αναλύσεις για ανίχνευση προσμείξεων (π.χ. PCB, PAH και οργανοχλωριούχα φυτοφάρμακα), κατά περίπτωση.

Αποτελέσματα

— Ενδείξεις που αποδεικνύουν ότι οι μάρτυρες πληρούν τα κριτήρια επικύρωσης: τα δεδομένα σχετικά με τον ρυθμό εκκόλαψης θα πρέπει να παρουσιάζονται σε πίνακες ως ποσοστά ανά επανάληψη και ανά συγκέντρωση. Οι έκτοπες τιμές σε σχέση με τα κριτήρια αποδοχής (στους μάρτυρες) θα πρέπει να επισημαίνονται. Η επιβίωση θα πρέπει να παρουσιάζεται ως ποσοστό ανά επανάληψη και ανά συγκέντρωση. Οι έκτοπες τιμές σε σχέση με τα κριτήρια επικύρωσης (στους μάρτυρες) θα πρέπει να επισημαίνονται,

— Σαφής παράθεση των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν για τα διάφορα τελικά σημεία που παρατηρήθηκαν: επιβίωση εμβρύων και επιτυχία εκκόλαψης, εξωτερικές ανωμαλίες, μήκος και βάρος, μετρήσεις της VTG (ng/g ομογενοποιημένου δείγματος, ng/ml πλάσματος ή ng/mg ήπατος), ιστολογία των γονάδων, αναλογία φύλου, δεδομένα γενετικού

▼M6

φύλου, στοιχεία για οποιαδήποτε ασυνήθη αντίδραση των ψαριών και κάθε ορατή επίδραση που προκλήθηκε από την υπό δοκιμή χημική ουσία.

62. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να παρουσιάζονται ως μέσες τιμές ± τυπική απόκλιση (SD) ή τυπικό σφάλμα (SE). Στα στατιστικά στοιχεία θα πρέπει να αναφέρονται τουλάχιστον οι NOEC και LOEC και τα διαστήματα εμπιστοσύνης. Θα πρέπει να ακολουθείται το στατιστικό διάγραμμα ροής (προσάρτημα 8).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (1992), *Fish, Early Life Stage Toxicity Test,* Test Guideline Αρ. 210, Guidelines for the Testing of Chemicals, ΟΟΣΑ, Παρίσι.

(2) Jobling, S., D. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen και J.P. Sumpter, 1996, «Inhibition of testicular growth in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals», Environmental Toxicology and Chemistry 15, σελ. 194-202.

(3) Sumpter, J.P. και S. Jobling, 1995, «Vitellogenesis As A Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment», Environmental Health Perspectives 103, σελ. 173-178.

(4) Tyler, C.R., R.van Aerle, T.H. Hutchinson, S. Maddix και H. Trip (1999), «An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin», Environmental Toxicology and Chemistry 18, σελ. 337-347.

(5) Holbech, H., L. Andersen, G.I. Petersen, B. Korsgaard, K.L. Pedersen και P. Bjerregaard (2001a), «Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (Danio rerio)», Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 130, σελ. 119-131.

(6) Andersen, L., P. Bjerregaard και B. Korsgaard (2003), «Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disrupters», Fish Physiology and Biochemistry 28, σελ. 319-321.

(7) Orn, S., H. Holbech, T.H. Madsen, L. Norrgren και G.I. Petersen (2003), «Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (Danio rerio) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone», Aquatic Toxicology 65, σελ. 397-411.

(8) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, R. Lange, C.M. Lye, J.P. Sumpter, M. Zerulla και C.R. Tyler (2002), «Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-)estrogenic substances», Environmental Toxicology and Chemistry 21, σελ. 319-326.

(9) Sun, L.W., J.M. Zha, P.A. Spear και Z.J. Wang (2007), «Toxicity of the aromatase inhibitor letrozole to Japanese medaka (Oryzias latipes) eggs, larvae and breeding adults», Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 145, σελ. 533-541.

(10) Parks, L.G., A.O. Cheek, N.D. Denslow, S.A. Heppell, J.A. McLachlan, G.A. LeBlanc και C.V.Sullivan (1999), «Fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds», Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 123, σελ. 113-125.

(11) Brion, F., B.M. Nilsen, J.K. Eidem, A. Goksoyr και J.M. Porcher (2002), «Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (Danio rerio)», Environmental Toxicology and Chemistry 21, σελ. 1699-1708.

(12) Nishi, K., M. Chikae, Y. Hatano, H. Mizukami, M. Yamashita, R. Sakakibara και E. Tamiya (2002), «Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (Oryzias latipes) vitellogenin», Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 132, σελ. 161-169.

(13) Hahlbeck, E., I. Katsiadaki, I. Mayer, M. Adolfsson-Erici, J. James και B.E. Bengtsson (2004), «The juvenile three-spined stickleback (Gasterosteus

▼**M6**

aculeatus L.) as a model organism for endocrine disruption — II — kidney hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction», Aquatic Toxicology 70, σελ. 311-326.

(14) Tatarazako, N., M. Koshio, H. Hori, M. Morita και T. Iguchi (2004), «Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka», Journal of Health Science 50, σελ. 301-308.

(15) Eidem, J.K., H. Kleivdal, K. Kroll, N. Denslow, R. van Aerle, C. Tyler, G. Panter, T. Hutchinson και A. Goksoyr (2006), «Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin. Aquatic Toxicology», 78, σελ. 202-206.

(16) Jensen, K.M. και G.T. Ankley (2006), «Evaluation of a commercial kit for measuring vitellogenin in the fathead minnow (Pimephales promelas)», Ecotoxicology and Environmental Safety 64, σελ. 101-105.

(17) Holbech, H., Petersen, G. I., Norman, A., Örn, S, Norrgren, L. και Bjerregaard, P (2001b), «Suitability of zebrafish as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals. Comparison of vitellogenin in plasma and whole body homogenate from zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)», Nordic Council of Ministers, TemaNord 2001:597, σελ. 48-51.

(18) Nilsen, B.M., K. Berg, J.K. Eidem, S.I. Kristiansen, F. Brion, J.M. Porcher και A. Goksoyr (2004), «Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening», Analytical and Bioanalytical Chemistry 378, σελ. 621-633.

(19) Orn, S., S. Yamani και L. Norrgren (2006), «Comparison of vitellogenin induction, sex ratio, and gonad morphology between zebrafish and Japanese medaka after exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and 17 beta-trenbolone», Archives of Environmental Contamination and Toxicology 51, σελ. 237-243.

(20) Scholz, S. και N. Kluver (2009), «Effects of Endocrine Disrupters on Sexual, Gonadal Development in Fish, Sexual Development 3», σελ. 136-151.

(21) Fenske, M., G. Maack, C. Schafers και H. Segner (2005), «An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, Danio rerio», Environmental Toxicology and Chemistry 24, σελ. 1088-1098.

(22) OECD (2010), *Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-related Histopathology in Fish Gonads*, Series on Testing and Assessment Αρ. 123, ENV/JM/MONO(2010)14, ΟΟΣΑ, Παρίσι.

(23) Kobayashi, T., M. Matsuda, H. Kajiura-Kobayashi, A. Suzuki, N. Saito, M. Nakamoto, N. Shibata και Y. Nagahama (2004), «Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, Oryzias latipes», Developmental Dynamics 231, σελ. 518-526.

(24) Shinomiya, A., H. Otake, K. Togashi, S. Hamaguchi και M. Sakaizumi (2004), «Field survey of sex-reversals in the medaka, Oryzias latipes: genotypic sexing of wild populations», Zoological Science 21, σελ. 613-619.

(25) Kidd, K.A., P.J. Blanchfield, K.H. Mills, V.P. Palace, R.E. Evans, J.M. Lazorchak και R.W. Flick (2007), «Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen», Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, σελ. 8897-8901.

(26) Palace,V.P., R.E. Evans, K.G. Wautier, K.H. Mills, P.J. Blanchfield, B.J. Park, C.L. Baron και K.A. Kidd (2009), «Interspecies differences in biochemical, histopathological, and population responses in four wild fish species exposed to ethynylestradiol added to a whole lake», Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 66, σελ. 1920-1935.

(27) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, J. Bamforth, R.D. Stanley, S. Duffell, A. Hargreaves, S. Gimeno και C.R. Tyler (2006), «Development of chronic tests for endocrine active chemicals — Part 1. An extended fish early-life stage test for oestrogenic active chemicals in the fathead minnow (Pimephales promelas)», Aquatic Toxicology 77, σελ. 279-290.

▼**M6**

(28) Holbech, H., K. Kinnberg, G.I. Petersen, P. Jackson, K. Hylland, L. Norrgren και P. Bjerregaard (2006), «Detection of endocrine disrupters: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT)», Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 144, σελ. 57-66.

(29) Andersen, L., K. Kinnberg, H. Holbech, B. Korsgaard και P. Bjerregaard (2004), «Evaluation of a 40 day assay for testing endocrine disrupters: Effects of an anti-estrogen and an aromatase inhibitor on sex ratio and vitellogenin concentrations in juvenile zebrafish (Danio rerio)», Fish Physiology and Biochemistry 30, σελ. 257-266.

(30) Morthorst, J.E., H. Holbech και P. Bjerregaard (2010), «Trenbolone causes irreversible masculinization of zebrafish at environmentally relevant concentrations», Aquatic Toxicology 98, σελ. 336-343.

(31) Kiparissis,Y., T.L. Metcalfe, G.C. Balch και C.D. Metcalf (2003), «Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (Oryzias latipes)», Aquatic Toxicology 63, σελ. 391-403.

(32) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, A. Sherren, R.D. Stanley και C.R. Tyler (2004), «Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (Pimephales promelas) using easily measured endpoints of sexual development», Aquatic Toxicology 70, σελ. 11-21.

(33) Kinnberg, K., H. Holbech, G.I. Petersen και P. Bjerregaard (2007), «Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (Danio rerio)», Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 145, σελ. 165-170.

(34) Κεφάλαιο Γ.14 του παρόντος παραρτήματος, Δοκιμή ανάπτυξης νεαρών ψαριών.

(35) Κεφάλαιο Γ.4 του παρόντος παραρτήματος, Άμεση βιοαποικοδομησιμότητα.

(36) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Series on Testing and Assessment Αρ. 23, ΟΟΣΑ, Παρίσι.

(37) OECD (2009), *Fish Short Term Reproduction Assay,* Test Guideline Αρ. 229, Guidelines for the Testing of Chemicals, ΟΟΣΑ, Παρίσι.

(38) Κεφάλαιο Γ.37 του παρόντος παραρτήματος, Δοκιμασία ψαριών 21 ημερών: Βραχυχρόνια διαλογή για οιστρογονική και ανδρογονική δραστηριότητα, και αναστολή αρωματάσης.

(39) OECD (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Series on Testing and Assessment Αρ. 171, ΟΟΣΑ, Παρίσι

(40) Schäfers, C., Teigeler, M., Wenzel, A., Maack, G., Fenske, M., Segner, H (2007), «Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17 alpha-ethinylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, Danio rerio» Journal of Toxicology and Environmental Health-Μέρος A, 70, 9-10 σελ. 768-779.

(41) OECD (2011), *Validation Report (Phase 1) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment Αρ. 141, ENV/JM/MONO(2011)22, ΟΟΣΑ, Παρίσι.

(42) OECD (2011), *Validation Report (Phase 2) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment Αρ. 142, ENV/JM/MONO(2011)23, ΟΟΣΑ, Παρίσι.

(43) OECD (2011), *Peer Review Report of the validation of the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment Αρ. 143, ENV/JM/MONO(2011)24, ΟΟΣΑ, Παρίσι.

(44) Οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 22ας Σεπτεμβρίου 2010 περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς. ΕΕ L 276 της 20.10.2010, σελ. 33.

▼**M6**

Προσάρτημα 1

Συντμήσεις και ορισμοί

Αδιαφοροποίητο ψάρι: Ψάρι με γονάδες που δεν παρουσιάζουν κανένα ορατό γεννητικό κύτταρο

Άξονας ΥΥΓ: Άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων

Βάρος ψαριού: Υγρό βάρος ψαριού (στεγνωμένο με απορροφητικό χαρτί)

Βιοδείκτης: Δείκτης που έχει επίδραση σε ατομικό επίπεδο

Διεμφυλικό ψάρι: Ψάρι με περισσότερα του ενός ωοκύτταρα στον όρχι ανά 6 τομές που αναλύονται ή με σπερματογόνα κύτταρα στις ωοθήκες (ναι/όχι)

Υπό δοκιμή χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών

Κορυφαίο τελικό σημείο: Που έχει επίδραση σε επίπεδο πληθυσμού

Ρυθμός πλήρωσης: Υγρό βάρος ψαριών κατ' όγκο νερού

ΤΔ: Τρόπος δράσης

Χημική ουσία: Μια ουσία ή ένα μείγμα

ASV: Air saturation value (τιμή κορεσμού με αέρα)

DMY: Γονίδιο της περιοχής DM του Y χρωμοσώματος που απαιτείται για την ανάπτυξη του αρσενικού στο ρυζόψαρο

Dph: Days post hatch (ημέρες μετά την εκκόλαψη)

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ενζυμική δοκιμή ανοσοπροσρόφησης)

FSDT: Fish Sexual Development Test (δοκιμή σεξουαλικής ανάπτυξης ψαριών)

RT-PCR: Reverse Transcriptase Polymerase Chain-Reaction (αντίστροφη μεταγραφάση-αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης)

VTG: Vitellogenin (λεκιθογενίνη)

▼**M6**

Προσάρτημα 2

Πειραματικές συνθήκες για τη δοκιμή FSDT (είδη γλυκών Νέρων)

1. Συνιστώμενα είδη	Ρυζόψαρο (*Oryzias latipes*)	Ζεβρόψαρο (*Danio rerio*)	Τριάκανθος γαστερόστεος (*Gasterostreus aculeatus*)
2. Τύπος δοκιμής	Συνεχούς ροής νερού ή ημιστατική	Συνεχούς ροής νερού ή ημιστατική	Συνεχούς ροής νερού ή ημιστατική
3. Θερμοκρασία νερού	25 ± 2 °C	27 ± 2 °C	20 ± 2 °C
4. Ποιότητα φωτισμού	Λαμπτήρες φθορισμού (ευρέως φάσματος)	Λαμπτήρες φθορισμού (ευρέως φάσματος)	Λαμπτήρες φθορισμού (ευρέως φάσματος)
5. Ένταση φωτός	10-20 μE/m^2/s, 540-1 080 lux ή 50-100 ft-c (επίπεδα στο περιβάλλον του εργαστηρίου)	10-20 μE/m^2/s, 540-1 080 lux ή 50-100 ft-c (επίπεδα στο περιβάλλον του εργαστηρίου)	10-20 μE/m^2/s, 540-1 080 lux ή 50-100 ft-c (επίπεδα στο περιβάλλον του εργαστηρίου)
6. Φωτοπερίοδος	12-16 ώρες φως, 8-12 ώρες σκοτάδι	12-16 ώρες φως, 8-12 ώρες σκοτάδι	16 ώρες φως, 8 ώρες σκοτάδι
7. Ελάχιστο μέγεθος θαλάμου	Κάθε θάλαμος θα πρέπει να περιέχει όγκο νερού τουλάχιστον 7 l	Κάθε θάλαμος θα πρέπει να περιέχει όγκο νερού τουλάχιστον 7 l	Κάθε θάλαμος θα πρέπει να περιέχει όγκο νερού τουλάχιστον 7 l
8. Ανανεώσεις όγκου διαλυμάτων δοκιμής	Τουλάχιστον 5 ημερησίως	Τουλάχιστον 5 ημερησίως	Τουλάχιστον 5 ημερησίως
9. Ηλικία οργανισμών δοκιμής κατά την έναρξη της έκθεσης	Προσφάτως γονιμοποιημένα αυγά (πρώιμο βλαστικό στάδιο)	Προσφάτως γονιμοποιημένα αυγά (πρώιμο βλαστικό στάδιο)	Προσφάτως γονιμοποιημένα αυγά
10. Αρ. αυγών ανά αγωγή	Τουλάχιστον 120	Τουλάχιστον 120	Τουλάχιστον 120
11. Αρ. αγωγών	Τουλάχιστον 3 (συν κατάλληλοι μάρτυρες)	Τουλάχιστον 3 (συν κατάλληλοι μάρτυρες)	Τουλάχιστον 3 (συν κατάλληλοι μάρτυρες)
12. Αρ. επαναλήψεων ανά αγωγή	Τουλάχιστον 4 (εκτός εάν εφαρμόζεται κατανομή τετραγωνικής ρίζας προς τους μάρτυρες)	Τουλάχιστον 4 (εκτός εάν εφαρμόζεται κατανομή τετραγωνικής ρίζας προς τους μάρτυρες)	Τουλάχιστον 4 (εκτός εάν εφαρμόζεται κατανομή τετραγωνικής ρίζας προς τους μάρτυρες)
13. Καθεστώς σίτισης	Ζωντανά *Artemia*, κατεψυγμένες ενήλικες γαρίδες σε άλμη, τροφή σε νιφάδες κ.λπ. Συνιστάται να παρέχεται σίτιση δύο φορές την ημέρα	Ειδική τροφή ιχθυδίων, ζωντανά *Artemia*, κατεψυγμένες ενήλικες γαρίδες σε άλμη, τροφή σε νιφάδες κ.λπ. Συνιστάται να παρέχεται σίτιση δύο φορές την ημέρα	Ζωντανά *Artemia*, κατεψυγμένες ενήλικες γαρίδες σε άλμη, τροφή σε νιφάδες κ.λπ. Συνιστάται να παρέχεται σίτιση δύο φορές την ημέρα
14. Αερισμός	Καθόλου, εκτός εάν η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου (DO) μειωθεί κάτω από το 60 % της τιμής κορεσμού με αέρα	Καθόλου, εκτός εάν η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου (DO) μειωθεί κάτω από το 60 % της τιμής κορεσμού με αέρα	Καθόλου, εκτός εάν η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου (DO) μειωθεί κάτω από το 70 % της τιμής κορεσμού με αέρα

▼**M6**

15. Νερό αραίωσης	Καθαρό νερό από επιφανειακά ύδατα, νερό γεώτρησης ή ανασυσταθέν νερό	Καθαρό νερό από επιφανειακά ύδατα, νερό γεώτρησης ή ανασυσταθέν νερό	Καθαρό νερό από επιφανειακά ύδατα, νερό γεώτρησης ή ανασυσταθέν νερό
16. Διάρκεια έκθεσης στην υπό δοκιμή χημική ουσία	60 dph	60 dph	60 dph
17. Βιολογικά τελικά σημεία	Επιτυχία εκκόλαψης, επιβίωση, μακροσκοπική μορφολογία, VTG, ιστολογία των γονάδων, γενετικό φύλο αναλογία φύλου	Επιτυχία εκκόλαψης, επιβίωση, μακροσκοπική μορφολογία, VTG, ιστολογία των γονάδων, αναλογία φύλου	Επιτυχία εκκόλαψης, επιβίωση, μακροσκοπική μορφολογία, VTG, ιστολογία των γονάδων, αναλογία φύλου
18. Κριτήρια αποδοχής της δοκιμής για συνενωμένες επαναλήψεις μαρτύρων	Επιτυχία εκκόλαψης > 80 %	Επιτυχία εκκόλαψης > 80 %	Επιτυχία εκκόλαψης > 80 %
	Επιβίωση μετά την εκκόλαψη ≥ 70 %	Επιβίωση μετά την εκκόλαψη ≥70 %	Επιβίωση μετά την εκκόλαψη ≥70 %
	Ανάπτυξη (υγρό βάρος ψαριού, στεγνωμένο με απορροφητικό χαρτί) > 150 mg	Ανάπτυξη (υγρό βάρος ψαριού, στεγνωμένο με απορροφητικό χαρτί) > 75 mg	Ανάπτυξη (υγρό βάρος ψαριού, στεγνωμένο με απορροφητικό χαρτί) > 120 mg
	Μήκος (τυπικό μήκος) > 20 mm	Μήκος (τυπικό μήκος) > 14 mm	Μήκος (τυπικό μήκος) > 20 mm
	Αναλογία φύλου (% αρσενικών ή θηλυκών) 30 %-70 %	Αναλογία φύλου (% αρσενικών ή θηλυκών) 30 %-70 %	Αναλογία φύλου (% αρσενικών ή θηλυκών) 30 %-70 %

▼**M6**

Προσάρτημα 3

Χημικά χαρακτηριστικά ενόσω αποδεκτού νερού αραίωσης

ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
Σωματίδια	< 20 mg/l
Ολικός οργανικός άνθρακας	< 2 mg/l
Μη ιονισμένη αμμωνία	< 1 μg/l
Υπολείμματα χλωρίου	< 10 μg/l
Ολικά οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα	< 50 ng/l
Ολικά οργανοχλωριούχα φυτοφάρμακα μαζί με πολυχλωριωμένα διφαινύλια	< 50 ng/l
Ολικό οργανικό χλώριο	< 25 ng/l

▼**M6**

Προσάρτημα 4

Από τη μέθοδο δοκίμων Γ.14/καθοδηγηση για τι συγκεντρώσεις δοκιμής

Στήλη (αριθμός συγκεντρώσεων μεταξύ 100 και 10 ή μεταξύ 10 και 1) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Από μια στήλη μπορεί να επιλεγεί μια σειρά τριών (ή περισσότερων) διαδοχικών συγκεντρώσεων. Ενδιάμεσα σημεία μεταξύ συγκεντρώσεων στη στήλη (χ) βρίσκονται στη στήλη (2χ + 1). Οι καταγραφόμενες τιμές μπορεί να αντιπροσωπεύουν συγκεντρώσεις εκφραζόμενες ως % κατ' όγκο ή κατά βάρος (mg/l ή μg/l). Οι τιμές μπορούν να πολλαπλασιαστούν ή να διαιρεθούν με οποιαδήποτε δύναμη του 10, αναλόγως. Η στήλη 1 μπορεί να χρησιμοποιηθεί αν υφίσταται σημαντική αβεβαιότητα ως προς τα επίπεδα τοξικότητας.

▼M6

Προσάρτημα 5

Καθοδήγησή για την ομογενοποίηση του κεφαλιού και της ουράς από νεαρό πετρόψαρο, λιποκεφαλο όξινο, τρικαντό ξαστερώστε και ρυζόχαρτο

Σκοπός αυτής της ενότητας είναι η περιγραφή των διαδικασιών που συντελούνται πριν από τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης της VTG. Μπορούν να χρησιμοποιούνται και άλλες διαδικασίες που έχουν ως αποτέλεσμα συγκρίσιμο ποσοτικό προσδιορισμό της VTG. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της VTG από το πλάσμα αίματος ή το ήπαρ αντί του προσδιορισμού από ομογενοποιημένο δείγμα κεφαλιού/ουράς είναι θέμα επιλογής.

Διαδικασία

1. Τα ψάρια υποβάλλονται σε αναισθησία και ευθανασία, σύμφωνα με την περιγραφή της δοκιμής.

2. Το κεφάλι και η ουρά κόβονται, σύμφωνα με την περιγραφή της δοκιμής. **Σημαντική παρατήρηση**: Όλα τα εργαλεία ανατομής και η πλάκα κοπής θα πρέπει να εκπλένονται και να καθαρίζονται κατάλληλα (π.χ. με 96 % αιθανόλη) ανάμεσα στους χειρισμούς του κάθε ψαριού για την αποφυγή «επιμόλυνσης VTG» από τα θηλυκά άτομα ή τα αρσενικά άτομα στα οποία έχει πραγματοποιηθεί τεχνητή πρόκληση παραγωγής VTG προς τα αρσενικά άτομα στα οποία δεν έχει πραγματοποιηθεί τεχνητή πρόκληση παραγωγής VTG.

3. Το βάρος του συνενωμένου κεφαλιού και της ουράς από το κάθε ψάρι μετράται με ακρίβεια χιλιοστόγραμμου.

4. Αφού ζυγιστούν, τα τμήματα του ψαριού τοποθετούνται σε κατάλληλους σωλήνες (π.χ. σωλήνες Eppendorf των 1,5 ml) και καταψύχονται στους – 80 °C μέχρι να ομογενοποιηθούν ή ομογενοποιούνται απευθείας σε πάγο με δύο πλαστικούς υπέρους. (Μπορούν να χρησιμοποιούνται και άλλες μέθοδοι, εάν εκτελούνται σε πάγο και το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία μιας ομοιογενούς μάζας). **Σημαντική παρατήρηση:** *Οι σωλήνες θα πρέπει να αριθμούνται κατάλληλα, ώστε το κεφάλι και η ουρά από το ψάρι να μπορούν να σχετιστούν με το αντίστοιχο τμήμα του σώματος που χρησιμοποιείται για την ιστολογική εξέταση των γονάδων.*

5. Όταν επιτευχθεί μια ομοιογενής μάζα, προστίθεται παγωμένο **ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης** (*) σε ποσότητα ίση με 4-10 φορές το βάρος του ιστού (σημειώνεται η αραίωση). Συνεχίστε τη διαδικασία με τους υπέρους μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές. **Σημαντική σημείωση**: *Για κάθε ψάρι χρησιμοποιούνται καινούριοι ύπεροι*.

6. Τα δείγματα τοποθετούνται πάνω σε πάγο μέχρι τη φυγοκέντρησή τους σε **4 °C** και 50 000 g για 30 λεπτά.

7. Με τη χρήση ενός σιφωνίου μεταφέρονται 20 έως 50 μl (σημειώνεται η ποσότητα) υπερκείμενου υγρού σε **τουλάχιστον δύο** σωλήνες, με βύθιση της μύτης του σιφωνίου κάτω από το στρώμα λίπους στην επιφάνεια και με προσεκτική αναρρόφηση του υπερκείμενου υγρού χωρίς κλάσματα λίπους ή ιζήματος.

8. Οι σωλήνες αποθηκεύονται στους – 80 °C μέχρι τη χρήση.

(*) *Ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης:*

50 mM Tris-HCl pH 7,4, μείγμα αναστολέων πρωτεάσης 1 % (Sigma): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 μl μείγματος αναστολέων πρωτεάσης (ή ισοδύναμων μειγμάτων αναστολέων πρωτεάσης).

TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN)

Μείγμα αναστολέων πρωτεάσης: Από τη Sigma (για ιστό θηλαστικών) Κωδικός προϊόντος **P 8340**.

Σημείωση: Το ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ημέρα παρασκευής του. Κατά τη διάρκεια της χρήσης να τοποθετείται πάνω σε πάγο

▼**M6**

Προσάρτημα 6

Καθοδήγησή για τον ποσοτικό προσδιορισμό της λεκιθογενινης από το ομογενοποιημένο δείγμα κεφαλιού και ουράς στο πετρόψαρο (danio rerio) (τροποποίησή των holbech κ.α., 2001). Μπορούν να χρησιμοποιούνται και άλλες διαδικασίες οπού γίνεται χρήση ομολόγων αντισωμάτων και προτύπων διαλυμάτων

1. Πλάκες μικροτιτλοδότησης (πιστοποιημένες Maxisorp F96, Nunc, Roskilde Denmark) προεπιστρωμένες με 5 μg/ml αντι-IgG λιποβιτελλίνης ζεβρόψαρου αποψύχονται και εκπλένονται 3 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (*).

2. Κεκαθαρμένο πρότυπο διάλυμα λεκιθογενίνης ζεβρόψαρου [1] αραιώνεται διαδοχικά σε 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 και 20 ng/ml με ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης (**) και τα δείγματα αραιώνονται κατά 200 φορές τουλάχιστον (για την αποφυγή επίδρασης της μήτρας) σε ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης και τοποθετούνται στις πλάκες. Εφαρμόζεται μάρτυρας της δοκιμασίας εις διπλούν. Σε κάθε βοθρίο προστίθενται 150 μl. Τα πρότυπα διαλύματα εφαρμόζονται εις διπλούν και τα δείγματα εις τριπλούν. Ακολουθεί επώαση όλη τη νύχτα στους 4 °C επάνω σε τάρακτρο.

3. Οι πλάκες εκπλένονται 5 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (*)

4. Υπεροξειδάση του ραπανιού (HRP), συνδεδεμένη σε πολυμερές δεξτράνης (π.χ. AMDEX A/S, Δανία) και συζευγμένα αντισώματα αραιώνονται σε ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης. Η πραγματική αραίωση διαφέρει ανάλογα με την παρτίδα και την ηλικία. Σε κάθε βοθρίο προστίθενται 150 μl και οι πλάκες επωάζονται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου επάνω σε τάρακτρο.

5. Οι πλάκες εκπλένονται 5 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (*) και ο πυθμένας των πλακών καθαρίζεται προσεκτικά με αιθανόλη.

6. Σε κάθε βοθρίο προστίθενται 150 μl TMB plus (***). Σκεπάστε την πλάκα με φύλλο κασσιτέρου για προστασία από το φως και παρακολουθήστε την ανάπτυξη του χρώματος στο τάρακτρο.

7. Όταν αναπτυχθεί πλήρως η πρότυπη καμπύλη, η ενζυμική δράση διακόπτεται με την προσθήκη 150 μl H_2SO_4 0,2 M σε κάθε βοθρίο.

8. Η απορρόφηση μετριέται στα 450 nm (π.χ. σε συσκευή ανάγνωσης πλακών Molecular Devices Thermomax). Τα δεδομένα αναλύονται με χρήση του σχετικού λογισμικού (π.χ. Softmax).

(*) Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης:

Διάλυμα παρακαταθήκης PBS (****)	500,0	ml
BSA	5,0	g
Tween 20	5,0	ml

Ρυθμίστε το pH στο 7,3 και συμπληρώστε με H_2O millipore μέχρι τα 5 l. Αποθηκεύεται στους 4 °C.

(**) Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης:

Διάλυμα παρακαταθήκης PBS (****)	100,0	ml
BSA	3,0	g
Tween 20	1,0	ml

Ρυθμίστε το pH στο 7,3 και συμπληρώστε με H_2O millipore μέχρι τα 5 l. Αποθηκεύεται στους 4 °C.

(***) Το TMB plus είναι ένα υπόστρωμα «έτοιμο προς χρήση» που παράγεται από την KemEnTec (Δανία). Είναι ευαίσθητο στο φως. Αποθηκεύεται στους 4 °C.

[1] Battelle AP4.6.04 (1,18 mg/ml (AAA)), κεκαθαρμένο σύμφωνα με τους: Denslow, N.D., Chow, M.C., Kroll, K.J., Green, L. (1999). Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics. Ecotoxicology 8: 385-398.

▼**M6**

(****) Διάλυμα παρακαταθήκης PBS

NaCl	160,0	g
KH_2PO_4	4,0	g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	26,6	g
KCl	4,0	g

Ρυθμίστε το pH στο 6,8 και συμπληρώστε με H_2O millipore μέχρι τα 2 l. Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

▼M6

Προσάρτημα 7

Καθοδήγησή για την προετοιμασία των τομών των ιστών για τον προσδιορισμό του φύλου και του Σταδίου ανάπτυξής των γονάτων

Σκοπός αυτής της ενότητας είναι η περιγραφή των διαδικασιών που συντελούνται πριν από την αξιολόγηση των ιστολογικών τομών. Μπορούν να χρησιμοποιούνται και άλλες διαδικασίες που έχουν ως αποτέλεσμα ανάλογο προσδιορισμό του φύλου και του σταδίου ανάπτυξης των γονάδων.

Με λίγες εξαιρέσεις, οι διαδικασίες αυτές είναι παρόμοιες για το ρυζόψαρο (JMD) και το ζεβρόψαρο (ZF).

Ευθανασία, νεκροψία και μονιμοποίηση ιστών

Στόχοι:

1. Τα ψάρια πρέπει να θανατώνονται με τρόπο ανώδυνο.

2. Λήψη των απαραίτητων μετρήσεων σωματικού βάρους και των λοιπών μετρήσεων.

3. Αξιολόγηση των δευτερευόντων χαρακτηριστικών του φύλου.

4. Διατομή ιστών για ανάλυση της VTG.

5. Μονιμοποίηση των γονάδων.

Διαδικασίες:

1. Τα ψάρια θα πρέπει να θανατώνονται αμέσως πριν από τη νεκροψία. Συνεπώς, εάν δεν υπάρχουν διαθέσιμα πολλά εξειδικευμένα άτομα για τις ανατομές, δεν θα πρέπει να θανατώνονται πολλά ψάρια ταυτόχρονα.

2. Με τη χρήση μιας μικρής απόχης, απομακρύνεται ένα ψάρι από τον πειραματικό θάλαμο και μεταφέρεται μέσα σε ένα δοχείο μεταφοράς στον χώρο όπου διεξάγονται οι νεκροψίες.

3. Το ψάρι τοποθετείται μέσα στο διάλυμα ευθανασίας. Το ψάρι απομακρύνεται από το διάλυμα όταν έχει σταματήσει να αναπνέει και δεν ανταποκρίνεται σε εξωτερικά ερεθίσματα.

4. Ζυγίζεται το υγρό βάρος του ψαριού.

5. Για την προετοιμασία των ιστών προς ανάλυση VTG, το ψάρι μπορεί να τοποθετείται σε μια πλάκα φελλού επάνω στην τράπεζα ενός στερεοσκοπικού μικροσκοπίου.

   α. Για το ζεβρόψαρο, το κεφάλι κόβεται ακριβώς πίσω από το θωρακικό πτερύγιο και η ουρά κόβεται ακριβώς πίσω από το ραχιαίο πτερύγιο.

   β. Στο ρυζόψαρο, για τη διατομή της κοιλιάς εκτελείται προσεκτικά μια τομή που εκτείνεται κατά μήκος της κοιλιακής μέσης γραμμής ξεκινώντας από το θωρακικό τόξο μέχρι το πρόσθιο σημείο του πρωκτού. Με τη χρήση μιας μικρής λαβίδας και ενός μικρού ψαλιδιού, το ήπαρ αφαιρείται προσεκτικά.

6. Τα δείγματα για ανάλυση VTG τοποθετούνται σε σωλήνες Eppendorf και καταψύχονται αμέσως σε υγρό άζωτο.

7. Το νεκρό σώμα μαζί με τις γονάδες τοποθετείται σε προεπισημασμένη πλαστική κασέτα ιστών, η οποία μεταφέρεται σε μονιμοποιητικό υγρό του Davidson ή του Bouin. Ο όγκος του μονιμοποιητικού υγρού θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 10 φορές μεγαλύτερος από τον κατά προσέγγιση όγκο των ιστών. Ο περιέκτης με το μονιμοποιητικό υγρό ανακινείται απαλά για πέντε δευτερόλεπτα για να απομακρυνθούν οι φυσαλίδες αέρα από την κασέτα.

8. α. Όλοι οι ιστοί μένουν στο μονιμοποιητικό υγρό του Davidson όλη τη νύχτα και την επόμενη ημέρα μεταφέρονται σε ξεχωριστούς περιέκτες που περιέχουν ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμαλδεΰδης (φορμόλη) 10 %. Οι περιέκτες με τις κασέτες ανακινούνται απαλά για 5 δευτερόλεπτα για να διασφαλιστεί η επαρκής διείσδυση της φορμαλδεΰδης εντός των κασετών.

▼M6

β. Οι ιστοί μένουν στο μονιμοποιητικό υγρό του Bouins για 24 ώρες και, στη συνέχεια, μεταφέρονται σε αιθανόλη 70 %.

Επεξεργασία ιστών

Στόχοι:

1. Αφυδάτωση των ιστών για επαρκή διείσδυση της παραφίνης.

2. Εμποτισμός των ιστών με παραφίνη για τη διατήρηση της ακεραιότητάς τους και τη δημιουργία μιας σκληρής επιφάνειας για πραγματοποίηση μικροτομών.

Διαδικασίες:

3. Οι επισημασμένες κασέτες ιστών αφαιρούνται από τη φορμαλδεΰδη/αιθανόλη και τοποθετούνται σε καλάθια επεξεργασίας. Το καλάθι επεξεργασίας τοποθετείται στον σταθμό επεξεργασίας ιστών.

4. Επιλέγεται το πρόγραμμα επεξεργασίας.

5. Μετά την ολοκλήρωση του κύκλου επεξεργασίας στον σταθμό επεξεργασίας ιστών, τα καλάθια μπορούν να μεταφερθούν στον σταθμό σκήνωσης.

Σκήνωση ιστών

Στόχος:

Τοποθέτηση του δείγματος με τον σωστό προσανατολισμό σε στερεοποιημένη παραφίνη για τη δημιουργία μικροτομών.

Διαδικασίες:

1. Τα καλάθια με τις κασέτες αφαιρούνται από τον σταθμό επεξεργασίας και βυθίζονται στον πρόσθιο θάλαμο της θερμικής μονάδας του σταθμού σκήνωσης, ο οποίος είναι γεμάτος με παραφίνη, ή μεταφέρονται σε ξεχωριστό σύστημα θέρμανσης παραφίνης.

2. Η πρώτη κασέτα που θα υποβληθεί σε σκήνωση αφαιρείται από τον πρόσθιο θάλαμο της θερμικής μονάδας ή από το σύστημα θέρμανσης παραφίνης. Το καπάκι της κασέτας αφαιρείται και απορρίπτεται, και ελέγχεται η ετικέτα της κασέτας ως προς τα στοιχεία του ζώου για να επιλυθούν τυχόν ασυμφωνίες πριν από τη σκήνωση.

3. Επιλέγεται καλούπι σκήνωσης κατάλληλου μεγέθους.

4. Το καλούπι τοποθετείται κάτω από το στόμιο του διανεμητή και γεμίζεται με λιωμένη παραφίνη.

5. Το δείγμα αφαιρείται από την κασέτα και τοποθετείται μέσα στη λιωμένη παραφίνη του καλουπιού. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται με 4 έως 8 δείγματα για κάθε καλούπι παραφίνης. Η θέση του κάθε ψαριού επισημαίνεται με την τοποθέτηση του ψαριού αρ.1 κατά 180 μοίρες προς το ψάρι 2-4/8.

6. Προστίθεται επιπλέον παραφίνη για να καλυφθεί το δείγμα.

7. Το καλούπι με τη βάση κασέτας τοποθετείται στην ψυχόμενη πλάκα της μονάδας ψύξης.

8. Μετά τη στερεοποίηση της παραφίνης, το μπλοκ (δηλ. η σκληρή παραφίνη που περιέχει τους ιστούς και τη βάση κασέτας) αφαιρείται από το καλούπι.

Πραγματοποίηση μικροτομών

Στόχος:

Κοπή και στερέωση ιστολογικών τομών για χρώση.

Διαδικασίες:

1. Η αρχική φάση για τη δημιουργία μικροτομών που καλείται «διαμόρφωση δείγματος» διεξάγεται ως εξής:

   α. Το μπλοκ παραφίνης τοποθετείται στον σφιγκτήρα του μικροτόμου.

   β. Ο σφιγκτήρας προωθείται με περιστροφή του τροχού του μικροτόμου και πραγματοποιούνται παχιές τομές από την επιφάνεια της παραφίνης του μπλοκ μέχρι η λεπίδα να φτάσει στους εγκλεισμένους ιστούς.

▼M6

γ. Το πάχος τομής του μικροτόμου ρυθμίζεται σε τιμή από 3-5 μικρά. Ο σφιγκτήρας προωθείται και κόβονται πολλές τομές από το μπλοκ για την απομάκρυνση τεχνημάτων που έχουν δημιουργηθεί στην κομμένη επιφάνεια του ιστού κατά τη διάρκεια της αδρής περικοπής.

δ. Το μπλοκ μπορεί να απομακρύνεται από τον σφιγκτήρα και να τοποθετείται σε πάγο με την όψη προς τα κάτω για τη διαπότιση του ιστού.

2. Η επόμενη φάση της δημιουργίας μικροτομών είναι η τελική κοπή και στερέωση των τομών των ιστών σε αντικειμενοφόρες πλάκες. Οι διαδικασίες αυτές διεξάγονται ως εξής:

α. Εάν το μπλοκ έχει τοποθετηθεί σε πάγο, απομακρύνεται από τον πάγο και τοποθετείται ξανά στον σφιγκτήρα του μικροτόμου.

β. Με τη ρύθμιση του πάχους τομής στον μικροτόμο σε 3 έως 5 μικρά, ο σφιγκτήρας προωθείται με περιστροφή του τροχού του μικροτόμου. Κόβονται τομές από το μπλοκ, μέχρι να παραχθεί μια «κορδέλα» που περιέχει τουλάχιστον μία αποδεκτή τομή στην οποία περιλαμβάνονται οι γονάδες. (Κατά τη διάρκεια κοπής των τομών, κατά περίπτωση, το μπλοκ μπορεί να αφαιρείται από τον σφιγκτήρα, να τοποθετείται σε πάγο για τη διαπότιση του ιστού και, στη συνέχεια, να τοποθετείται ξανά στον σφιγκτήρα).

γ. Οι τομές τοποθετούνται στην επιφάνεια του νερού ενός υδατόλουτρου ώστε να επιπλέουν σε οριζόντια θέση. Γίνεται προσπάθεια λήψης τουλάχιστον μίας τομής χωρίς πτυχώσεις και χωρίς παγιδευμένες φυσαλίδες αέρα κάτω από αυτήν.

δ. Μια αντικειμενοφόρος πλάκα μικροσκοπίου βυθίζεται στο νερό κάτω από την καλύτερη τομή και την ανασηκώνει για να τη βγάλει από το νερό. Η διαδικασία αυτή αναφέρεται ως «στερέωση» της τομής επάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα.

ε. Προετοιμάζονται τρεις τομές για κάθε σετ ψαριού. Η δεύτερη και τρίτη τομή λαμβάνονται διατηρώντας διαστήματα 50 μικρών μετά την πρώτη τομή. Εάν δεν έχει πραγματοποιηθεί σκήνωση του ψαριού με τις γονάδες του στο ίδιο επίπεδο τομής, πραγματοποιούνται επιπλέον τομές για να διασφαλιστεί η λήψη τουλάχιστον έξι τομών που περιλαμβάνουν τις γονάδες από κάθε ψάρι.

στ. Με ειδικό στυλό για την επισήμανση αντικειμενοφόρων πλακών, σημειώνεται στην αντικειμενοφόρο πλάκα ο αριθμός του μπλοκ από το οποίο δημιουργήθηκε η συγκεκριμένη πλάκα.

ζ. Η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετείται σε μια βάση χρώσης.

η. Το μπλοκ αφαιρείται από τον σφιγκτήρα και αποθηκεύεται με την όψη προς τα κάτω.

Χρώση, τοποθέτηση καλυπτρίδας και επισήμανση αντικειμενοφόρου πλάκας

Στόχοι:

— Χρώση των τομών για ιστοπαθολογική εξέταση.

— Μόνιμη σφράγιση των στερεωμένων και χρωσμένων ιστών.

— Μόνιμη ταυτοποίηση των χρωσμένων τομών με τρόπο που επιτρέπει την πλήρη ανιχνευσιμότητα.

Διαδικασίες:

1. Χρώση

α. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες ξηραίνονται στον αέρα όλη τη νύχτα πριν από τη διαδικασία χρώσης.

β. Οι τομές βάφονται με αιματοξυλίνη-ηωσίνη.

2. Τοποθέτηση καλυπτρίδας

α. Οι καλυπτρίδες τοποθετούνται χειροκίνητα ή αυτόματα.

β. Η αντικειμενοφόρος πλάκα βυθίζεται σε ξυλόλιο ή TissueClear, και η περίσσεια ξυλολίου/TissueClear αφαιρείται με απαλή ανακίνηση.

▼**M6**

γ. Τοποθετούνται περίπου 0,1 ml επικαλυπτικού μέσου κοντά στο άκρο της αντικειμενοφόρου πλάκας στην αντίθετη πλευρά από το ματ άκρο ή επάνω στην καλυπτρίδα.

δ. Η καλυπτρίδα τοποθετείται υπό γωνία μικρής κλίσης στην αντικειμενοφόρο πλάκα.

3. Επισήμανση

ε. Κάθε ετικέτα της αντικειμενοφόρου πλάκας θα πρέπει να περιέχει τα ακόλουθα στοιχεία.

i. Ονομασία εργαστηρίου

ii. Είδος

iii. Αρ. δείγματος / Αρ. αντικειμένου πλάκας

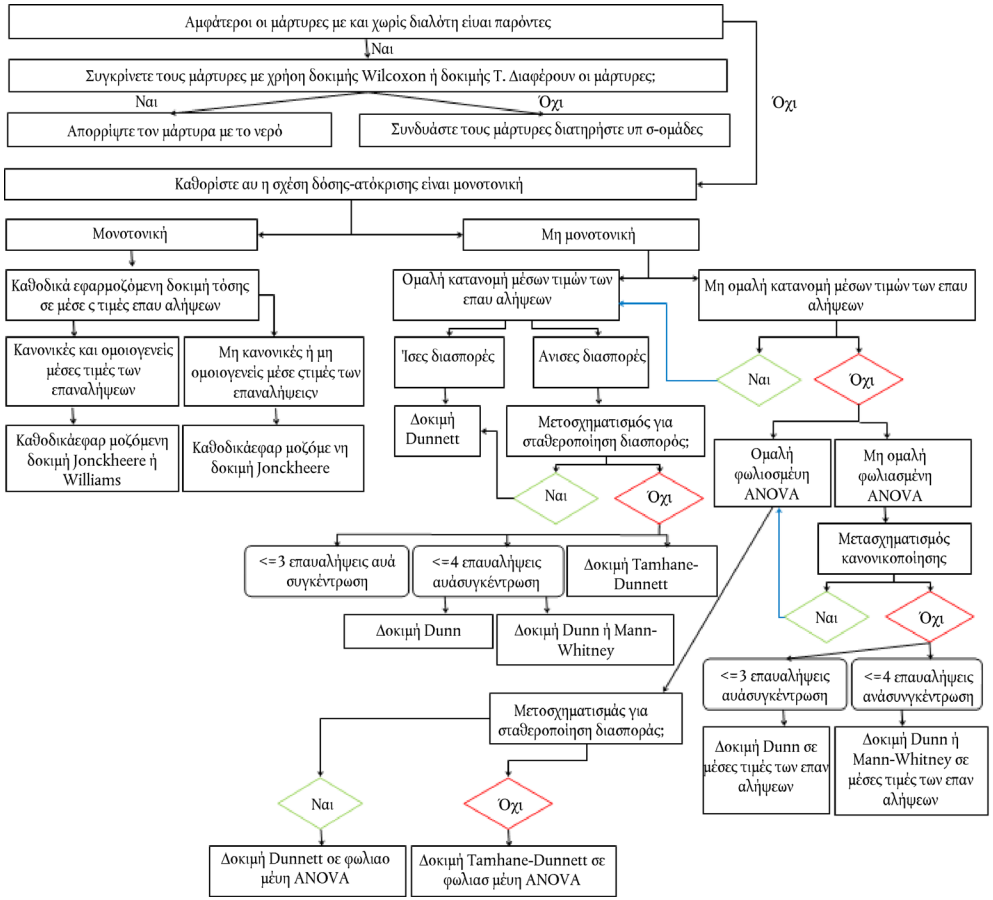
iv. Χημική ουσία / Ομάδα αγωγής

v. Ημερομηνία

▼M6

Προσάρτημα 8

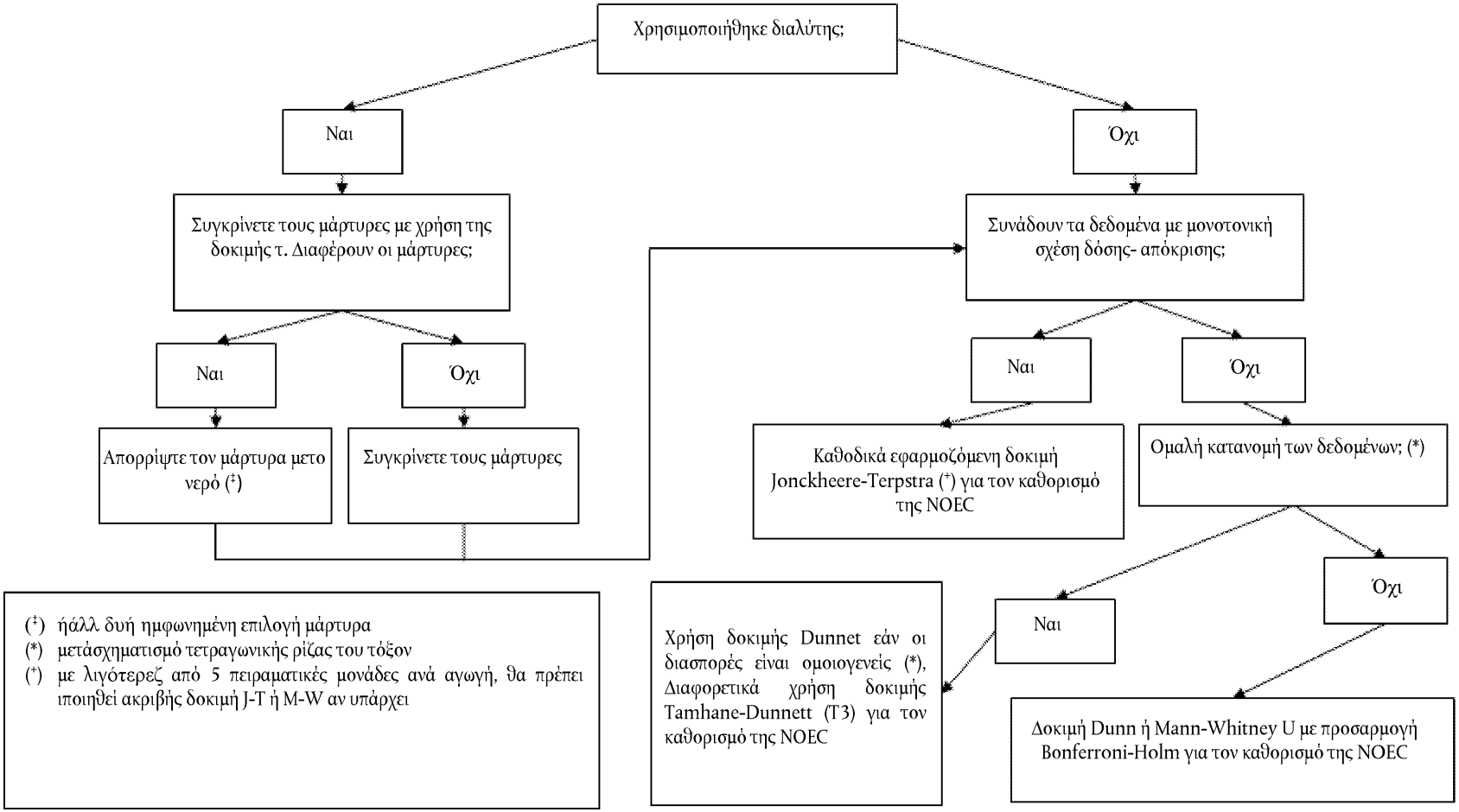
Στατιστικό διάγραμμα ροή για ανάλυσή λεκιθογενινησ



02008R0440 — EL — 16.10.2019 — 008.001 — 2318

▼M6

Στατιστικό διάγραμμα ροή για ανάλυσή αναλογίας φύλου



02008R0440 — EL — 16.10.2019 — 008.001 — 2319

▼M6

Προσάρτημα 9

Καθοδήγησή για δειγματοληψία ιστού για προσδιορισμό του γενετικού φύλου, καθώς και για προσδιορισμό του γενετικού φύλου μέσω μεθόδου PCR

Δειγματοληψία ιστού, προετοιμασία και φύλαξη πριν από τον προσδιορισμό του γενετικού φύλου μέσω μεθόδου PCR στο ρυζόψαρο (προετοιμάστηκε από το εργαστήριο για υδρόβιους οργανισμούς της Bayer CropScience AG)

1. Το εδρικό ή το ραχιαίο πτερύγιο κάθε ψαριού κόβονται με λεπτό ψαλίδι και τοποθετούνται σε έναν σωλήνα με 100 μl ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης 1 (για λεπτομέρειες σχετικά με την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος, βλ. παρακάτω). Το ψαλίδι καθαρίζεται μετά από τη χρήση σε κάθε ψάρι σε ένα ποτήρι ζέσεως γεμάτο με απεσταγμένο H_2O και στεγνώνεται με ένα χαρτί.

2. Στη συνέχεια, οι ιστοί των πτερυγίων ομογενοποιούνται με χρήση ενός υπέρου από τεφλόν για μικροσωλήνες προκειμένου να επιτευχθεί η λύση των κυττάρων. Για κάθε σωλήνα χρησιμοποιείται καινούριος ύπερος για την αποφυγή τυχόν επιμολύνσεων. Οι ύπεροι τοποθετούνται σε NaOH 0,5 M όλη τη νύχτα, εκπλένονται για 5 λεπτά σε απεσταγμένο H_2O και αποθηκεύονται σε αιθανόλη ή αποστειρώνονται στο αυτόκαυστο μέχρι τη χρήση.

3. Είναι επίσης δυνατή η αποθήκευση του ιστού των πτερυγίων σε ξηρό πάγο χωρίς ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης 1 και, στη συνέχεια, σε καταψύκτη στους – 80 °C για την αποφυγή τυχόν υποβάθμισης της ποιότητας του DNA. Ωστόσο, η εκχύλιση είναι πιο αποτελεσματική εάν γίνει εκχύλιση του DNA την ίδια στιγμή (για πληροφορίες σχετικά με τον χειρισμό, βλ. παραπάνω. Τα δείγματα θα πρέπει να αποψύχονται στον πάγο μετά τη φύλαξη στους – 80 °C και πριν από την πλήρωση των σωλήνων με ρυθμιστικό διάλυμα).

4. Μετά την ομογενοποίηση, όλοι οι σωλήνες τοποθετούνται σε ένα υδατόλουτρο και υποβάλλονται σε βρασμό επί 15 λεπτά στους 100 °C.

5. Κατόπιν, προστίθενται με σιφώνιο 100 μl του ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης 2 (για λεπτομέρειες σχετικά με την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος, βλ. παρακάτω) σε κάθε σωλήνα. Τα δείγματα αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά, ενώ στο διάστημα αυτό συχνά ανακινούνται απαλά με το χέρι.

6. Κατόπιν, όλοι οι σωλήνες τοποθετούνται σε ένα υδατόλουτρο και υποβάλλονται σε βρασμό ξανά για επιπλέον 15 λεπτά στους 100 °C.

7. Μέχρι την περαιτέρω ανάλυση, οι σωλήνες καταψύχονται στους – 20 °C.

Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος

Ρυθμιστικό διάλυμα PCR 1:

500 mg N-λαυρυλο σαρκοσίνη (π.χ. Merck KGaA, Darmstadt, GE)

2 ml NaCl 5M

προσθήκη 100 ml απεσταγμ. H_2O

→ αυτόκαυστο

Ρυθμιστικό διάλυμα PCR 2:

20 g Chelex (π.χ. Biorad, Munich, GE)

Για διόγκωση σε 100 ml απεσταγμ. H_2O

→ αυτόκαυστο

Προσδιορισμός του γενετικού φύλου (με μέθοδο PCR) στο ρυζόψαρο (προετοιμάστηκε από το εργαστήριο για υδρόβιους οργανισμούς της Bayer CropScience AG και το Πανεπιστήμιο Universität Würzburg Biozentrum)

Οι προετοιμασμένοι και κατεψυγμένοι σωλήνες (περιγράφονται στην ενότητα παραπάνω) αποψύχονται σε πάγο. Στη συνέχεια, υποβάλλονται σε φυγοκέντρηση με τη χρήση φυγοκέντρου Eppendorf (30 δευτ. στη μέγ. ταχύτητα, σε θερμοκρασία δωματίου). Για την PCR, χρησιμοποιείται το διαυγές υπερκείμενο υγρό που έχει διαχωριστεί από το ίζημα. Πρέπει <u>οπωσδήποτε να αποφεύγεται</u> η μεταφορά κάθε ίχνους Chelex (εντοπίζεται στο ίζημα) στην αντίδραση PCR, επειδή αυτό παρεμβαίνει στη δράση της Taq πολυμεράσης. Το υπερκείμενο υγρό χρησιμοποιείται απευθείας ή μπορεί να αποθηκευτεί κατεψυγμένο (στους – 20 °C) και να υποβληθεί σε αρκετούς κύκλους επαναπόψυξης χωρίς δυσμενείς επιπτώσεις στο DNA προκειμένου να αναλυθεί αργότερα.

▼**M6**

1. *Παρασκευή του μείγματος αντίδρασης (25 μl ανά δείγμα):*

	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Εκμαγείο DNA	0,5 μl-2 μl	
10x ρυθμιστικό διάλυμα PCR με MgCl2	2,5 μl	1x
Νουκλεοτίδια (καθένα από dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	4 μl (5 mM)	200 μM
Πρόσθιος εκκινητής (10 μM) (βλ. 3-5 παρακάτω)	0,5 μl	200 nM
Αντίστροφος εκκινητής (10 μM) (βλ. 3-5 παρακάτω)	0,5 μl	200 nM
DMSO	1,25 μl	5 %
Νερό (βαθμού PCR)	έως 25 μl	
Taq E πολυμεράση	0,3 μl	1,5 U
10x ρυθμιστικό διάλυμα PCR με $MgCl_2$: 670 mM Tris/HCl (pH 8,8 στους 25 °C), 160 mM $(NH_4)_2SO_4$, 25 mM MgCl2, Tween 20 0,1 %		

Για κάθε αντίδραση PCR (βλ. 3-5 παρακάτω), απαιτείται ένας ειδικός εκκινητής που είναι ένας νέος συνδυασμός του μείγματος αντίδρασης και της απαιτούμενης ποσότητας εκμαγείου DNA για κάθε δείγμα (βλ. παραπάνω). Οι αντίστοιχοι όγκοι μεταφέρονται με τη χρήση σιφωνίων σε καινούριους σωλήνες. Στη συνέχεια, όλοι οι σωλήνες πωματίζονται, αναδεύονται (περίπου 10 δευτ.) και υποβάλλονται σε φυγοκέντρηση (10 δευτ., σε θερμοκρασία δωματίου). Τα αντίστοιχα προγράμματα PCR μπορούν πλέον να ξεκινήσουν. Επιπλέον, σε κάθε πρόγραμμα PCR χρησιμοποιείται ένας θετικός μάρτυρας (πρότυπο δείγμα DNA με γνωστή δράση και σαφή αποτελέσματα) και ένας αρνητικός μάρτυρας (1 μl απεσταγμένου H_2O).

2. *Παρασκευή της πηκτής αγαρόζης (1 %) — Κατά την εκτέλεση των προγραμμάτων PCR:*

— 3 g αγαρόζης διαλύονται σε 300 ml 1 × ρυθμιστικού διαλύματος TAE (πηκτή αγαρόζης 1 %)

— Το διάλυμα αυτό θα πρέπει να υποβάλλεται σε βρασμό σε φούρνο μικροκυμάτων (περίπου 2-3 λεπτά)

— Το θερμό διάλυμα μεταφέρεται σε ειδικό καλούπι, το οποίο είναι τοποθετημένο επάνω σε πάγο

— Μετά από περίπου 20 λεπτά, η πηκτή αγαρόζης είναι έτοιμη για χρήση

— Η πηκτή αγαρόζης φυλάσσεται σε 1 × ρυθμιστικού διαλύματος TAE μέχρι να ολοκληρωθούν τα προγράμματα PCR

3. *Πρόγραμμα PCR της ακτίνης:*

Σκοπός αυτής της αντίδρασης PCR είναι να καταδείξει ότι το DNA στο δείγμα δεν έχει υποστεί βλάβη.

— Ειδικός εκκινητής:

«Mact1 (άνω/πρόσθιος)» → TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA

«Mact2 (κάτω/αντίστροφος)» → GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG

— Πρόγραμμα:

5 λεπτά στους 95 °C

Κύκλος (35 φορές):

Αποδιάταξη του DNA → 45 δευτ. στους 95 °C

Πρόσδεση των εκκινητών → 45 δευτ. στους 56 °C

Επιμήκυνση των εκκινητών → 1 λεπτό στους 68 °C

15 λεπτά στους 68 °C

▼**M6**

4. *Πρόγραμμα PCR των X και Y γονιδίων:*

Σε αυτό το πρόγραμμα PCR χρησιμοποιούνται δείγματα με άθικτο DNA για την ανίχνευση των X και Y γονιδίων. Το DNA των αρσενικών ατόμων αναμένεται να εμφανίζει μία διπλή ζώνη και το DNA των θηλυκών ατόμων αναμένεται να εμφανίζει μία μονή ζώνη (μετά από χρώση και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή). Για αυτήν την εκτέλεση του προγράμματος, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται ένας θετικός μάρτυρας για τα αρσενικά άτομα (δείγμα XY) και ένας θετικός μάρτυρας για τα θηλυκά άτομα (δείγμα XX).

— Ειδικός εκκινητής:

«PG 17,5» (άνω/πρόσθιος) → CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG

«PG 17,6» (κάτω/αντίστροφος) → GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA

— Πρόγραμμα:

5 λεπτά στους 95 C

Κύκλος (40 φορές):

Αποδιάταξη του DNA	→ 45 δευτ. στους 95 °C
Πρόσδεση των εκκινητών	→ 45 δευτ. στους 55 °C
Επιμήκυνση των εκκινητών	→ 1 λεπτό 30 δευτ. στους 68 °C

15 λεπτά στους 68 °C

5. *Πρόγραμμα PCR του Y γονιδίου ως «μάρτυρας» για το πρόγραμμα PCR των X και Y γονιδίων:*

Με αυτό το πρόγραμμα PCR επαληθεύονται τα αποτελέσματα του «προγράμματος PCR των γονιδίων X και Y». Τα «δείγματα αρσενικών ατόμων» αναμένεται να εμφανίζουν μία ζώνη και τα «δείγματα θηλυκών ατόμων» δεν αναμένεται να εμφανίζουν καμία ζώνη (μετά από χρώση και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή).

— Ειδικός εκκινητής:

«DMTYa (άνω/πρόσθιος)» → GGC CGG GTC CCC GGG TG

«DMTYd (κάτω/αντίστροφος)» → TTT GGG TGA ACT CAC ATG G

— Πρόγραμμα:

5 λεπτά στους 95 °C

Κύκλος (40 φορές):

Αποδιάταξη του DNA	→ 45 δευτ. στους 95 °C
Πρόσδεση των εκκινητών	→ 45 δευτ. στους 56 °C
Επιμήκυνση των εκκινητών	→ 1 λεπτό στους 68 °C

15 λεπτά στους 68 °C

6. *Χρώση των δειγμάτων PCR:*

Διάλυμα χρώσης:

Γλυκερόλη 50 %

EDTA 100 mM

SDS 1 %

Κυανό της βρωμοφαινόλης 0,25 %

Κυανόλη του ξυλενίου 0,25 %

Με σιφώνιο μεταφέρεται 1 μl του διαλύματος χρώσης σε κάθε σωλήνα

7. *Έναρξη της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή:*

— Η έτοιμη πηκτή αγαρόζης 1 % μεταφέρεται σε θάλαμο ηλεκτροφόρησης σε πηκτή γεμάτο με 1x ρυθμιστικό διάλυμα TAE

— Σε κάθε υποδοχή της πηκτής αγαρόζης μεταφέρονται με σιφώνιο 10-15 μl κάθε χρωσμένου δείγματος PCR

— Επίσης, σε μια ξεχωριστή υποδοχή μεταφέρονται με σιφώνιο 5-15 μl ενός «Ladder» 1kb (Invitrogen)

— Η ηλεκτροφόρηση εκκινείται στα 200 V

— Διακόπτεται μετά από 30-45 λεπτά

▼**M6**

8. *Καθορισμός των ζωνών:*

— Η πηκτή αγαρόζης καθαρίζεται σε απεσταγμένο H_2O

— Στη συνέχεια, η πηκτή αγαρόζης μεταφέρεται σε βρωμιούχο αιθίδιο για 15-30 λεπτά

— Κατόπιν, φωτογραφίζεται η πηκτή αγαρόζης σε θάλαμο υπεριώδους ακτινοβολίας

— Τέλος, τα δείγματα εξετάζονται σε σύγκριση με τη ζώνη (ή τις ζώνες) του θετικού μάρτυρα και το ladder

▼M6

Προσάρτημα 10

Καθοδήγησή σχετικά με τη δειγματοληψία ιστού για τον προσδιορισμό του γενετικού φύλου με μέθοδο PCR στον τρικαντό ξαστερώστε

Δειγματοληψία ιστού και εκχύλιση DNA

Η εκχύλιση του DNA μπορεί να πραγματοποιείται με τη χρήση διαφόρων αντιδραστηρίων που διατίθενται στο εμπόριο και με αυτοματοποιημένα ή μη αυτοματοποιημένα συστήματα εκχύλισης. Παρακάτω περιγράφεται το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται στο εργαστήριο Cefas Weymouth και έχουν προστεθεί εναλλακτικές προσεγγίσεις, κατά περίπτωση.

1. Με λεπτό ψαλίδι, αφαιρείται από κάθε ψάρι ένα μικρό κομμάτι ιστού (10-20 mg) από την οπισθοπλάγια περιοχή (μετά την αφαίρεση του κεφαλιού και της ουράς για ανάλυση VTG). Ο ιστός μεταφέρεται σε έναν σωλήνα και τοποθετείται απευθείας σε υγρό άζωτο (για αποθήκευση στους – 80 °C) ή συμπληρώνεται με αιθανόλη 70 % (για μεταφορά και επακόλουθη αποθήκευση στους 4 °C). Το ψαλίδι καθαρίζεται μετά από τη χρήση σε κάθε ψάρι σε αιθανόλη 70 % και μετά σε απεσταγμένο νερό και, στη συνέχεια, στεγνώνεται με χαρτί.

2. Η αιθανόλη (εάν υπάρχει) αφαιρείται με αναρρόφηση και ο ιστός υφίσταται χώνευση όλη τη νύχτα με πρωτεϊνάση Κ σε 400 μl ρυθμιστικού διαλύματος ATL (Qiagen). Ένα κλάσμα (200 μl) του διαλύματος χώνευσης μεταφέρεται σε μπλοκ S των 96 βοθρίων (Qiagen) και το DNA εκχυλίζεται από τη διάταξη 96 βοθρίων μέσω του κιτ Qiagen Universal BioRobot και QIamp Investigator BioRobot. Το DNA εκλούεται σε 50 μl νερό απαλλαγμένο από DNAάση και RNAάση. Εάν το DNA εκχυλίζεται από σκληρούς ιστούς (όπως η ραχοκοκαλιά ή ένα θωρακικό πτερύγιο), μπορεί να χρειαστεί να γίνει ομογενοποίηση του δείγματος στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης με τη χρήση ενός συστήματος λύσης ιστών FastPrep® ή ισοδύναμου συστήματος διάσπασης ιστών.

   Εναλλακτικά,

   (α) ο ιστός υφίσταται χώνευση όλη τη νύχτα με πρωτεϊνάση Κ σε 400 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης G2 (Qiagen) και το DNA εκχυλίζεται από 200 μl του διαλύματος χώνευσης με χρήση είτε του κιτ EZ-1 DNA Easy Tissue και του EZ-1 BioRobot είτε του κιτ DNA Easy Tissue Mini Kit. Το DNA εκλούεται σε όγκο 50 μl.

   (β) Οι ιστοί υφίστανται κατεργασία με το αντιδραστήριο DNAzol. Τα δείγματα ιστού υφίστανται σύντομη λύση σε 1 ml DNAzol για 10 λεπτά σε σωλήνα μικροφυγοκέντρησης των 1,5 ml και, στη συνέχεια, φυγοκεντρούνται στις 13 000 σ.α.λ. για 5 λεπτά για την απομάκρυνση τυχόν σωματιδίων. Στη συνέχεια, το δείγμα που έχει υποστεί λύση μεταφέρεται σε καινούριο σωλήνα μικροφυγοκέντρησης των 1,5 ml που περιέχει 500 μl αιθανόλη 100 % μοριακού βαθμού καθαρότητας και φυγοκεντρείται στις 13 000 σ.α.λ. για 10 λεπτά για να επιτευχθεί καθίζηση του DNA. Η αιθανόλη αφαιρείται και αντικαθίσταται από 400 μl αιθανόλης 70 % μοριακού βαθμού καθαρότητας, φυγοκεντρείται στις 13 000 σ.α.λ. για 5 λεπτά και το ίζημα DNA διαλύεται σε 50 μl νερό μοριακού βαθμού καθαρότητας απαλλαγμένο από DNAάση και RNAάση. Παρομοίως, όταν χρησιμοποιούνται σκληροί ιστοί (θωρακικό πτερύγιο) μπορεί να χρειαστεί να γίνει ομογενοποίηση του δείγματος στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης με τη χρήση ενός συστήματος λύσης ιστών FastPrep® ή ισοδύναμου συστήματος διάσπασης ιστών πριν από την εκχύλιση του DNA.

3. Το DNA αποθηκεύεται στους – 20 °C, όσο απαιτείται.

Σημαντική σημείωση: Η εκτέλεση των διαδικασιών πρέπει να πραγματοποιείται με γάντια.

Ανάλυση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Πραγματοποιήθηκαν ενισχύσεις του DNA με χρήση 2,5 μl εκχυλίσματος DNA σε όγκο αντίδρασης 50 μl με εκκινητές για τη γενετική θέση Idh (όπως περιγράφηκε από τους Peichel κ.ά., 2004. Current Biology 1:1416-1424):

Πρόσθιος εκκινητής	5′ GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3′
Αντίστροφος εκκινητής	5′ TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3′

▼**M6**

Υπάρχουν πολλοί προμηθευτές κατάλληλων αντιδραστηρίων PCR. Παρακάτω περιγράφεται η μέθοδος που χρησιμοποιείται επί του παρόντος στο εργαστήριο Cefas Weymouth.

1. *Παρασκευή του μείγματος αντίδρασης (50 μl ανά δείγμα):*

Το Mastermix παρασκευάζεται όπως περιγράφεται παρακάτω. Μπορεί να παρασκευάζεται από πριν και να αποθηκεύεται κατεψυγμένο στους – 20 °C όσο απαιτείται. Πρέπει να παρασκευάζεται επαρκής ποσότητα Mastermix για αρνητικό μάρτυρα (μόνο νερό μοριακού βαθμού καθαρότητας).

	Όγκος (συγκέντρωση διαλύματος παρακαταθήκης)/δείγμα	Τελική συγκέντρωση
Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης 5xGoTaq®	10 μl	1x
$MgCl_2$	5 μl (25 mM)	2,5 mM
Νουκλεοτίδια (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,5 μl (25 mM έκαστο)	250 μM έκαστο
Πρόσθιος εκκινητής	0,5 μl (0,1 nmol/μl)	2,0 μM
Αντίστροφος εκκινητής	0,5 μl (0,1 nmol/μl)	2,0 μM
Νερό μοριακού βαθμού καθαρότητας	30,75 μl	
Πολυμεράση GoTaq	0,25 μl	1,25 U

— Διανέμονται 47,5 μl σε έναν επισημασμένο σωλήνα PCR με λεπτά τοιχώματα των 0,5 ml.

— Προστίθενται 2,5 μl κεκαθαρμένου DNA στον κατάλληλα επισημασμένο σωλήνα. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για όλα τα δείγματα και τον αρνητικό μάρτυρα.

— Προστίθενται στην επιφάνεια 2 σταγόνες ορυκτελαίου. Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί θερμοκυκλοποιητής με θερμαινόμενο καπάκι.

— Κλείνονται τα καπάκια.

— Η αποδιάταξη των δειγμάτων πραγματοποιείται σε θερμοκυκλοποιητή Peltier PTC-225 στους 94 ± 2 °C για 5 λεπτά και ακολουθούν 39 κύκλοι στους 94 ± 2 °C για 1 λεπτό, στους 55 ± 2 °C για 1 λεπτό, στους 72 ± 2 °C για 1 λεπτό και ένας τελικός κύκλος επέκτασης στους 72 ± 2 °C για 10 λεπτά.

2. *Παρασκευή της πηκτής αγαρόζης (2 %):*

Κατά κανόνα, τα προϊόντα της PCR αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης 20 % που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο.

Μπορούν ωστόσο να χρησιμοποιηθούν και συστήματα ηλεκτροφόρησης βασιζόμενα σε τριχοειδή.

— 2 g αγαρόζης προστίθενται σε 100 ml 1× ρυθμιστικού διαλύματος TAE.

— Το μείγμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων (περίπου 2-3 λεπτά) για να διαλυθεί η αγαρόζη.

— Προστίθενται 2 σταγόνες βρωμιούχου αιθιδίου τελικής συγκέντρωσης 0,5 μg/ml.

— Το θερμό διάλυμα μεταφέρεται στον εξοπλισμό χύτευσης της πηκτής.

— Η πηκτή αφήνεται να στερεοποιηθεί.

3. *Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή:*

— Η πηκτή αγαρόζης μεταφέρεται στον εξοπλισμό ηλεκτροφόρησης και βυθίζεται σε 1× ρυθμιστικό διάλυμα TAE.

— 20 μl από κάθε δείγμα φορτώνονται σε κάθε βοθρίο και προστίθεται ένας δείκτης μοριακού βάρους (100bp DNA ladder, Promega) σε ένα εφεδρικό βοθρίο.

— Διεξάγεται ηλεκτροφόρηση στα 120 V για 30-45 λεπτά.

▼**M6**

4. *Οπτικοποίηση των προϊόντων ενίσχυσης*

Εάν προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο στην πηκτή αγαρόζης, όπως περιγράφεται ανωτέρω, τα προϊόντα DNA ανιχνεύονται κάτω από πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας. Εναλλακτικά, γίνεται χρώση της πηκτής αγαρόζης με κάλυψη της πηκτής με αραιό διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (0,5 μg/ml σε νερό) για 30 λεπτά πριν από την οπτικοποίηση.

▼M6

Προσάρτημα 11

Καθοδήγησή σχετικά με τη διαδικασία τεχνητής γονιμοποίησης για τον τρικαντό ξαστερώστε

Σκοπός αυτής της ενότητας είναι η περιγραφή των διαδικασιών λήψης γονιμοποιημένων αυγών από τον τριάκανθο γαστερόστεο εν όψει της χρήσης τους στη δοκιμή FSDT.

Διαδικασίες

Λήψη σπέρματος από τα αρσενικά άτομα

1. Ένα αρσενικό άτομο με καλό χρωματισμό από τον επιθυμητό πληθυσμό υποβάλλεται σε ευθανασία.

2. Οι όρχεις διαχωρίζονται από την κάθε πλευρά του ψαριού. *Οι όρχεις γενικά είναι ραβδοειδείς δομές έντονης χρώσης που είναι εύκολα αντιληπτοί στην πλευρική διάμεση γραμμή του σώματος.* Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε από τις ακόλουθες μεθόδους:

3. Με ένα λεπτό ψαλίδι, ξεκινώντας από την αμάρα πραγματοποιείται τομή 1-1,5 cm με μία μοναδική περικοπή υπό γωνία περίπου 45 μοιρών.

4. Με ένα νυστέρι, πραγματοποιείται μια μικρή τομή στο πλάι του ψαριού λίγο πιο πίσω από την πύελο και ελαφρώς κοιλιακά των πλευρικών πλακών.

5. Οι όρχεις αφαιρούνται με μια λεπτή λαβίδα και τοποθετούνται σε ένα τρυβλίο petri.

6. Κάθε όρχις καλύπτεται με 100 μl **τελικού διαλύματος Hank** (*) που έχει παρασκευαστεί προσφάτως.

7. Οι όρχεις τεμαχίζονται σε κύβους με μια λεπίδα ή ένα νυστέρι. Με αυτόν τον τρόπο, απελευθερώνεται το σπέρμα και το διάλυμα Hank αποκτά μια γαλακτώδη εμφάνιση.

8. Το υγρό που περιέχει το σπέρμα προστίθεται σε έναν σωλήνα με προσοχή ώστε να αποφευχθεί η αναρρόφηση τμημάτων ιστών των όρχεων με το σιφώνιο.

9. Προστίθενται 800 μl τελικού διαλύματος Hank στον σωλήνα και το διάλυμα αναμειγνύεται καλά.

10. Εάν απαιτείται, το αρσενικό άτομο μπορεί να διατηρηθεί μέσω μονιμοποίησης σε αιθανόλη 100 % ή άλλο κατάλληλο μέσο μονιμοποίησης. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό να γίνεται εάν η μελέτη πρόκειται να εξετάσει τη γονική προέλευση των απογόνων.

Σημαντική σημείωση: *Ενώ σχεδόν όλα τα διαλύματα παρακαταθήκης μπορούν να παρασκευάζονται εκ των προτέρων,* ***το διάλυμα παρακαταθήκης 5*** *και εν συνέχεια το* ***τελικό διάλυμα*** *θα πρέπει να είναι* ***προσφάτως*** *παρασκευασμένα την ημέρα της χρήσης.*

Διάλυμα παρακαταθήκης 1	
NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
Απεσταγμένο νερό (DW)	100 ml
Διάλυμα παρακαταθήκης 2	
Na_2HPO_4 (άνυδρο)	0,358 g
KH_2PO_4	0,60 g
DW	100 ml
Διάλυμα παρακαταθήκης 3	
$CaCl_2$	0,72 g
DW	50 ml

(*) Ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων Hank (Hank's Buffered Salt Solution — HBSS):

Το διάλυμα HBSS απαιτείται για τη διατήρηση του σπέρματος ενώ γίνεται προετοιμασία για τη γονιμοποίηση.

▼**M6**

Διάλυμα παρακαταθήκης 4

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,23 g
DW	50 ml

Διάλυμα παρακαταθήκης 5 (προσφάτως παρασκευασμένο)

$NaHCO_3$	0,35 g
DW	10 ml

Σημείωση: Εάν ήδη υπάρχουν διαθέσιμα στο εργαστήριο μερικά από τα παραπάνω άλατα αλλά με διαφορετική περιεκτικότητα σε νερό (δηλ. $2H_2O$ αντί για άνυδρο), μπορούν να χρησιμοποιηθούν αλλά πρέπει πρώτα να προσαρμοστεί το βάρος βάσει του μοριακού βάρους.

Για το τελικό διάλυμα Hank προστίθενται με την ακόλουθη σειρά τα εξής:

διάλυμα παρακαταθήκης 1	1,0 ml
διάλυμα παρακαταθήκης 2	0,1 ml
διάλυμα παρακαταθήκης 3	0,1 ml
DW	8,6 ml
διάλυμα παρακαταθήκης 4	0,1 ml
διάλυμα παρακαταθήκης 5	0,1 ml

Αναμείξτε καλά πριν από τη χρήση.

Γονιμοποίηση

1. Προσδιορίζονται τα μεγάλα, κυοφορούντα θηλυκά άτομα από τον πληθυσμόστόχο. Τα θηλυκά άτομα είναι έτοιμα για συμπίεση μόνο όταν φαίνονται αυγά να προεξέχουν από την αμάρα. Τα έτοιμα θηλυκά άτομα έχουν τη χαρακτηριστική στάση με το κεφάλι προς τα επάνω.

2. Περάστε απαλά το δάκτυλο ή τον αντίχειρα κατά μήκος της πλευρικής όψης του ψαριού προς την ουρά για να παρακινήσετε την αποβολή ενός σάκου αυγών σε ένα καινούριο τρυβλίο petri. Επαναλάβετε τη διαδικασία από την άλλη πλευρά και τοποθετήστε ξανά το ψάρι στη δεξαμενή του.

3. Τα αυγά απλώνονται (σχηματίζοντας μια μονή στιβάδα) με τη χρήση ενός λεπτού πινέλου. Είναι σημαντικό να εκτίθεται όσο το δυνατόν μεγαλύτερος αριθμός αυγών στο σπέρμα, συνεπώς είναι χρήσιμο να μεγιστοποιείται η έκταση της επιφάνειας που καλύπτουν τα αυγά. Σημαντική σημείωση: Τα αυγά πρέπει να διατηρούνται υγρά με τοποθέτηση βρεγμένων χαρτομάντιλων γύρω από αυτά (είναι σημαντικό τα αυγά να μην έρχονται σε άμεση επαφή με το νερό, καθώς αυτό μπορεί να προκαλέσει πρόωρη σκλήρυνση του χορίου αποτρέποντας τη γονιμοποίηση). Ο αριθμός των αυγών που μπορεί να παράγει κάθε θηλυκό παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις, αλλά, κατά μέσο όρο, αναμένεται η εύκολη λήψη περίπου 150 αυγών από κάθε θηλυκό που κυοφορεί.

4. Με ένα πινέλο απλώνονται ομοιόμορφα 25μl σπέρματος στο μείγμα Hank καλύπτοντας ολόκληρη την επιφάνεια των αυγών. Τα αυγά θα σκληρύνουν και θα αλλάξουν χρώμα γρήγορα (εντός ενός λεπτού), μόλις γίνει έναρξη της γονιμοποίησης. Εάν ο εκτιμώμενος αριθμός αυγών είναι μεγαλύτερος από 150, η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Κατά τον ίδιο τρόπο, εάν τα αυγά δεν σκληρύνουν εντός ενός λεπτού, προστίθεται λίγο ακόμη σπέρμα. Σημαντική σημείωση: Η προσθήκη επιπλέον σπέρματος δεν βελτιώνει οπωσδήποτε το ποσοστό γονιμοποίησης.

5. Τα αυγά και το διάλυμα σπέρματος παραμένουν σε ηρεμία για να «αλληλεπιδράσουν» επί τουλάχιστον 15 λεπτά και, στη συνέχεια, τα γονιμοποιημένα αυγά μεταφέρονται στα ενυδρεία έκθεσης εντός 1,5 ώρας μετά τη γονιμοποίηση.

6. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται με ένα άλλο θηλυκό μέχρι να συλλεχθεί ο επιθυμητός αριθμός αυγών.

7. Λίγα αυγά από την τελευταία παρτίδα φυλάσσονται και μονιμοποιούνται σε οξικό οξύ 10 %.

▼M6

Καταμέτρηση και κατανομή των αυγών στα ενυδρεία δοκιμής

1. Τα αυγά θα πρέπει να διανέμονται ομοιόμορφα μεταξύ κάθε επιπέδου αγωγής για την αποφυγή γενετικής μεροληψίας. Κάθε παρτίδα γονιμοποιημένων αυγών θα πρέπει να διαχωρίζεται σε ομάδες ίδιου μεγέθους (ίδιος αριθμός με τα επίπεδα αγωγής) με ένα αμβλύ εργαλείο (δηλ. λαβίδα εντομολογίας με πλατιά άκρα ή βρόχος εμβολιασμού). Εάν ο στόχος είναι 4 επαναλήψεις για κάθε αγωγή, με 20 αυγά σε κάθε επανάληψη, θα πρέπει να κατανεμηθούν 80 αυγά ανά ενυδρείο έκθεσης. Σημαντική σημείωση: Συνιστάται να προστίθεται επιπλέον ποσότητα 20 % (δηλ. 96 αυγά ανά επίπεδο αγωγής) μέχρι να διασφαλιστεί η επίτευξη ποσοστών γονιμοποίησης 100 %.

2. Τα αυγά του γαστερόστεου είναι πολύ ευαίσθητα σε λοιμώξεις από μύκητες όταν βρίσκονται εκτός της υπό πατρικής προστασίας φωλιάς. Για τον λόγο αυτό, η κατεργασία όλων των αυγών με κυανό του μεθυλενίου κατά τη διάρκεια των πρώτων 5 ημερών της δοκιμής είναι εξαιρετικά σημαντική. Παρασκευάζεται ένα διάλυμα παρακαταθήκης κυανού του μεθυλενίου με συγκέντρωση 1 mg/ml και προστίθεται στα ενυδρεία έκθεσης για την επίτευξη μέγιστης τελικής συγκέντρωσης της τάξεως των 2,125 mg/l. Σημαντική σημείωση: Οι γαστερόστεοι δεν θα πρέπει να εκτίθενται σε κυανό του μεθυλενίου μετά την εκκόλαψη των αυγών, επομένως το σύστημα θα πρέπει να έχει απαλλαγεί από κυανό του μεθυλενίου μέχρι την 6η ημέρα.

3. Τα αυγά επιθεωρούνται καθημερινά και τυχόν νεκρά ή μη γονιμοποιημένα αυγά καταγράφονται ανάλογα. Σημαντική σημείωση: Τα αυγά δεν θα πρέπει ποτέ να παραμένουν εκτός νερού μέχρι την εκκόλαψή τους, ακόμη και για πολύ σύντομες χρονικές περιόδους.

▼M6

Γ.42. ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΣΕ ΘΑΛΑΣΣΙΟ ΝΕΡΟ

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 306 του ΟΟΣΑ (1992). Όταν αναπτύχθηκαν οι αρχικές μέθοδοι δοκιμών, δεν ήταν γνωστό σε ποιο βαθμό θα μπορούσαν να εφαρμοστούν στο θαλάσσιο περιβάλλον τα αποτελέσματα από τις δοκιμές διαλογής σχετικά με την άμεση βιοαποικοδομησιμότητα με χρήση γλυκών νερών και εκροών εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων ή ενεργοποιημένης ιλύος ως εμβολίου. Έχουν αναφερθεί διάφορα αποτελέσματα σχετικά με αυτό το θέμα (π.χ. (1)).

2. Πολλά βιομηχανικά απόβλητα, τα οποία περιέχουν πολλά είδη χημικών ουσιών, φτάνουν στη θάλασσα είτε μέσω άμεσης εισόδου είτε μέσω ποταμοκόλπων και ποταμών, στα οποία οι χρόνοι παραμονής είναι σύντομοι σε σχέση με τη χρονική περίοδο που απαιτείται για την πλήρη βιοαποικοδόμηση πολλών από τις χημικές ουσίες που υπάρχουν σε αυτά. Λόγω της αυξανόμενης συνειδητοποίησης της ανάγκης για προστασία του θαλάσσιου περιβάλλοντος από τα όλο και μεγαλύτερα φορτία των χημικών ουσιών, καθώς και της ανάγκης για εκτίμηση της πιθανής συγκέντρωσης των χημικών ουσιών στη θάλασσα, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι δοκιμών σχετικά με τη βιοαποικοδομησιμότητα σε θαλάσσιο νερό.

3. Οι μέθοδοι που περιγράφονται στο παρόν χρησιμοποιούν φυσικό θαλάσσιο νερό τόσο ως υδατική φάση όσο και ως πηγή μικροοργανισμών. Με στόχο τη συμμόρφωση προς τις μεθόδους άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας σε γλυκά νερά, διερευνήθηκε η χρήση υπερδιηθημένου και φυγοκεντρημένου θαλάσσιου νερού, καθώς και η χρήση θαλάσσιων ιζημάτων ως εμβόλια. Οι διερευνήσεις αυτές ήταν ανεπιτυχείς. Επομένως, το μέσο δοκιμής είναι το φυσικό θαλάσσιο νερό που έχει υποστεί προκατεργασία για την αφαίρεση χονδρόκοκκων σωματιδίων.

4. Προκειμένου να εκτιμηθεί η τελική βιοαποικοδομησιμότητα με τη μέθοδο της ανακινούμενης φιάλης, πρέπει να χρησιμοποιούνται σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας λόγω της χαμηλής ευαισθησίας της αναλυτικής μεθόδου του διαλυμένου οργανικού άνθρακα (DOC). Αυτό με τη σειρά του καθιστά απαραίτητη την προσθήκη ανόργανων θρεπτικών συστατικών (N και P) στο θαλάσσιο νερό, η χαμηλή συγκέντρωση των οποίων, σε αντίθετη περίπτωση, θα περιόριζε την απομάκρυνση του DOC. Είναι επίσης απαραίτητη η προσθήκη των θρεπτικών συστατικών στη μέθοδο κλειστής φιάλης, λόγω της συγκέντρωσης της προστιθέμενης υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

5. Ως εκ τούτου, οι μέθοδοι δεν αποτελούν δοκιμές άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας επειδή δεν προστίθεται εμβόλιο επιπλέον των μικροοργανισμών που υπάρχουν ήδη στο θαλάσσιο νερό. Αλλά ούτε προσομοιώνουν το θαλάσσιο περιβάλλον, επειδή γίνεται προσθήκη των θρεπτικών συστατικών και η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας είναι πάρα πολύ υψηλότερη σε σύγκριση με αυτή που θα υπήρχε στη θάλασσα. Για τους λόγους αυτούς, οι μέθοδοι προτείνονται στο πλαίσιο μιας νέας υποενότητας που καλείται «Βιοαποικοδομησιμότητα σε θαλάσσιο νερό».

ΕΦΑΡΜΟΓΗ

6. Τα αποτελέσματα των δοκιμών, τα οποία εφαρμόζονται επειδή το σχήμα χρήσης και απόρριψης της εν λόγω ουσίας υποδεικνύει μια πορεία προς τη θάλασσα, δίνουν μια πρώτη εντύπωση της βιοαποικοδομησιμότητας σε θαλάσσιο νερό. Εάν το αποτέλεσμα είναι θετικό (αφαίρεση DOC > 70 %, θεωρητικά απαιτούμενο οξυγόνο (ThOD) >60 %), μπορεί να συναχθεί ότι υπάρχει δυνατότητα βιοαποικοδόμησης στο θαλάσσιο περιβάλλον. Ωστόσο, ένα αρνητικό αποτέλεσμα δεν αποκλείει ένα τέτοιο ενδεχόμενο, αλλά υποδεικνύει ότι απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση, για παράδειγμα με χρήση όσο το δυνατό χαμηλότερης συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας.

▼M6

7. Σε κάθε περίπτωση, εάν απαιτείται μια πιο οριστική τιμή για τον ρυθμό ή τον βαθμό βιοαποικοδόμησης στο θαλάσσιο νερό σε μια συγκεκριμένη τοποθεσία, θα πρέπει να εφαρμοστούν άλλες πιο πολύπλοκες και εξειδικευμένες, και επομένως πιο δαπανηρές, μέθοδοι. Για παράδειγμα, θα μπορούσε να εφαρμοστεί μια δοκιμή προσομοίωσης με χρήση συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας που προσεγγίζει περισσότερο την πιθανή περιβαλλοντική συγκέντρωση. Επίσης, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί μη εμπλουτισμένο θαλάσσιο νερό που δεν έχει υποστεί προκατεργασία, το οποίο λαμβάνεται από την τοποθεσία ενδιαφέροντος, καθώς και ειδικές χημικές αναλύσεις για την παρακολούθηση της πρωτογενούς βιοαποικοδόμησης. Σε ό,τι αφορά την τελική βιοαποικοδομησιμότητα, θα ήταν αναγκαία η χρήση ουσιών επισημασμένων με ^{14}C προκειμένου να μετρηθούν οι ρυθμοί εξαφάνισης του διαλυτού οργανικού ^{14}C και παραγωγής του $^{14}CO_2$ σε περιβαλλοντικά ρεαλιστικές συνθήκες.

ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

8. Η επιλογή της μεθόδου που θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Ο παρακάτω πίνακας παρέχεται για να βοηθήσει σε αυτήν την επιλογή. Ενώ οι ουσίες με υδατοδιαλυτότητα χαμηλότερη από το ισοδύναμο των 5 mg C/l περίπου δεν είναι δυνατόν να ελεγχθούν με τη μέθοδο ανακινούμενης φιάλης, τουλάχιστον, κατ' αρχήν, οι δυσδιάλυτες ουσίες μπορούν να ελεγχθούν με τη μέθοδο κλειστής φιάλης.

Πίνακας

Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της δοκιμής ανακινούμενης φιάλης και της δοκιμής κλειστής φιάλης

ΜΕΘΟΔΟΣ	ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ	ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ
ΑΝΑΚΙΝΟΥΜΕΝΗΣ ΦΙΑΛΗΣ	— απλή συσκευή εκτός από τον αναλυτή C — η διάρκεια των 60 ημερών δεν δημιουργεί πρόβλημα — απουσία παρεμβολής από τη νιτροποίηση — δυνατότητα προσαρμογής για πτητικές ουσίες	— απαιτείται αναλυτής C — χρησιμοποιεί 5-40 mg DOC/1, μπορεί να έχει ανασταλτική επίδραση — ο προσδιορισμός DOC είναι δύσκολος σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο θαλάσσιο νερό (επίδραση χλωριδίων) — ο DOC είναι μερικές φορές υψηλός στο θαλάσσιο νερό
ΚΛΕΙΣΤΗΣ ΦΙΑΛΗΣ	— απλή συσκευή — απλός τελικός προσδιορισμός — χρησιμοποιεί χαμηλή συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας (2 mg/l), επομένως υπάρχει μικρότερη πιθανότητα αναστολής — δυνατότητα εύκολης προσαρμογής για πτητικές ουσίες	— πιθανώς δύσκολη η διατήρηση της αεροστεγανότητας των φιαλών — η ανάπτυξη βακτηρίων στα τοιχώματα μπορεί να οδηγήσει σε ψευδείς τιμές — οι τιμές πρόσληψης O_2 από το τυφλό μπορεί να είναι υψηλές, ειδικά μετά από 28 ημέρες. Ωστόσο, αυτό μπορεί να ξεπεραστεί με την παλαίωση του θαλάσσιου νερού — πιθανή παρεμβολή από την πρόσληψη O_2 μέσω νιτροποίησης

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΚΙΝΟΥΜΕΝΗΣ ΦΙΑΛΗΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος είναι μια παραλλαγή με θαλάσσιο νερό της τροποποιημένης δοκιμής διαλογής του ΟΟΣΑ που περιγράφεται στο Κεφάλαιο Γ.4Β του παρόντος παραρτήματος (2). Οριστικοποιήθηκε μετά από μια κυκλική δοκιμή που οργανώθηκε για την Ευρωπαϊκή Επιτροπή από το Water Quality Institute της Δανίας (3).

2. Από κοινού με την αντίστοιχη θαλάσσια μέθοδο κλειστής φιάλης, τα αποτελέσματα από αυτήν τη δοκιμή δεν πρέπει να λαμβάνονται ως ενδείξεις άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας, αλλά πρέπει να χρησιμοποιούνται ειδικά για τη λήψη πληροφοριών σχετικά με τη βιοαποικοδομησιμότητα ουσιών σε θαλάσσια περιβάλλοντα.

▼M6

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

3. Μια προκαθορισμένη ποσότητα της υπό δοκιμή ουσίας διαλύεται στο μέσο δοκιμής για να επιτευχθεί συγκέντρωση 5-40 mg διαλυμένου οργανικού άνθρακα (DOC)/l. Εάν τα όρια ευαισθησίας των αναλύσεων οργανικού άνθρακα βελτιωθούν, ενδεχομένως να είναι πλεονεκτική η χρήση χαμηλότερων συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή ουσίας, ιδιαίτερα για ανασταλτικές ουσίες. Το διάλυμα της υπό δοκιμή ουσίας στο μέσο δοκιμής επωάζεται υπό ανάδευση στο σκοτάδι ή στο διάχυτο φως κάτω από αερόβιες συνθήκες και σε σταθερή θερμοκρασία (με αποκλίσεις όχι μεγαλύτερες από ± 2 °C) η οποία θα κυμαίνεται, συνήθως, μεταξύ 15 και 20 °C. Σε περιπτώσεις όπου ο στόχος της μελέτης είναι η προσομοίωση περιβαλλοντικών συνθηκών, οι δοκιμές μπορούν να διεξάγονται εκτός αυτού του συνήθους εύρους θερμοκρασίας. Η συνιστώμενη μέγιστη διάρκεια της δοκιμής είναι περίπου 60 ημέρες. Μετά την αποικοδόμηση ακολουθούν μετρήσεις DOC (τελική αποικοδόμηση) και, σε ορισμένες περιπτώσεις, ειδική ανάλυση (πρωτογενής αποικοδόμηση).

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ

4. Για να διαπιστωθεί εάν η δοκιμή μπορεί να εφαρμοστεί σε μια συγκεκριμένη ουσία, πρέπει να είναι γνωστές κάποιες ιδιότητες της ουσίας. Πρέπει να έχει προσδιοριστεί η περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα της ουσίας, η πτητικότητά της πρέπει να είναι τέτοια ώστε να μην προκύπτουν σημαντικές απώλειες κατά τη διάρκεια της δοκιμής και η υδατοδιαλυτότητά της θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από το ισοδύναμο των 2.5-40 mg C/l. Επίσης, η υπό δοκιμή ουσία δεν θα πρέπει να προσροφάται σημαντικά σε γυάλινες επιφάνειες. Για την ερμηνεία των λαμβανομένων αποτελεσμάτων, ειδικά όταν αυτά είναι οριακά, απαιτούνται στοιχεία για την καθαρότητα ή τις σχετικές αναλογίες των βασικών συστατικών της υπό δοκιμή ουσίας.

5. Οι πληροφορίες που αφορούν την τοξικότητα της υπό δοκιμή ουσίας για βακτήρια, για παράδειγμα σύμφωνα με μετρήσεις βραχυχρόνιων δοκιμών της ταχύτητας αναπνοής (4), μπορεί να είναι χρήσιμες κατά την επιλογή κατάλληλων συγκεντρώσεων δοκιμής και να έχουν ουσιαστική σημασία για την ορθή ερμηνεία χαμηλών τιμών βιοαποικοδόμησης. Ωστόσο, για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμής βιοαποικοδόμησης, δεν επαρκούν πάντα οι εν λόγω πληροφορίες και η διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 18 είναι καταλληλότερη.

ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

6. Για τον έλεγχο της μικροβιακής δραστηριότητας του δείγματος θαλάσσιου νερού πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες ουσίες αναφοράς. Παραδείγματα ουσιών που μπορούν να χρησιμοποιούνται για τον σκοπό αυτό είναι το βενζοϊκό νάτριο, το οξικό νάτριο και η ανιλίνη. Οι ουσίες αναφοράς πρέπει να αποικοδομούνται σε ένα ευλόγως σύντομο χρονικό διάστημα, διαφορετικά συνιστάται να επαναλαμβάνεται η δοκιμή με χρήση άλλου δείγματος θαλάσσιου νερού.

7. Στην κυκλική δοκιμή της Ευρωπαϊκής Επιτροπής όπου τα δείγματα θαλάσσιου νερού ελήφθησαν από διαφορετικές τοποθεσίες και σε διαφορετικές χρονικές στιγμές μέσα στο έτος (3), η λανθάνουσα φάση (t_L) και ο χρόνος για να επιτευχθεί αποικοδόμηση κατά 50 τοις εκατό (t_{50}), εξαιρώντας τη λανθάνουσα φάση, ήταν 1 έως 4 ημέρες και 1 έως 7 ημέρες αντίστοιχα για το βενζοϊκό νάτριο. Για την ανιλίνη, η t_L κυμαινόταν από 0 έως 10 ημέρες, ενώ ο χρόνος t_{50} κυμαινόταν από 1 έως 10 ημέρες.

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

8. Η αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου καθορίστηκε στην κυκλική δοκιμή (3). Η χαμηλότερη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας, για την οποία μπορεί να χρησιμοποιείται η παρούσα μέθοδος με την ανάλυση DOC, προσδιορίζεται κατά κύριο λόγο από το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης οργανικού άνθρακα (περίπου 0,5 mg C/l, επί του παρόντος) και τη συγκέντρωση του διαλυμένου οργανικού άνθρακα στο χρησιμοποιούμενο θαλάσσιο νερό (συνήθως της τάξεως των 3-5 mg/l για νερό από την ανοικτή θάλασσα). Η συγκέντρωση

▼M6

υποβάθρου του DOC δεν θα πρέπει να υπερβαίνει περίπου το 20 % της συνολικής συγκέντρωσης DOC μετά την προσθήκη της υπό δοκιμή ουσίας. Εάν αυτό δεν είναι εφικτό, η συγκέντρωση υποβάθρου του DOC μπορεί μερικές φορές να μειωθεί με την παλαίωση του θαλάσσιου νερού πριν από τη δοκιμή. Εάν η μέθοδος χρησιμοποιείται μόνο με ειδική χημική ανάλυση (με την οποία μετράται η πρωτογενής αποικοδόμηση), ο ερευνητής πρέπει να παράσχει επιπλέον πληροφορίες προκειμένου να τεκμηριώσει εάν μπορεί να αναμένεται τελική αποικοδόμηση. Οι εν λόγω επιπλέον πληροφορίες μπορεί να συμπεριλαμβάνουν αποτελέσματα από άλλες δοκιμές άμεσης ή εγγενούς βιοαποικοδομησιμότητας.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Συσκευές

9. Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός, καθώς και:

α. Συσκευή ανατάραξης που δέχεται φιάλες Erlenmeyer 0,5-2 λίτρων, η οποία διαθέτει αυτόματο έλεγχο θερμοκρασίας ή χρησιμοποιείται εντός θαλάμου σταθερής θερμοκρασίας 15-20 °C με αποκλίσεις όχι μεγαλύτερες από ± 2 °C,

β. Φιάλες Erlenmeyer 0,5-2 λίτρων με στενό στόμιο,

γ. Συσκευή διήθησης με μεμβράνη ή φυγόκεντρος,

δ. Διηθητικές μεμβράνες, 0,2-0,45 μm,

ε. Αναλυτής άνθρακα,

στ. Εξοπλισμός για ειδική ανάλυση (προαιρετικός).

Θαλάσσιο νερό

10. Συλλέγεται ένα δείγμα θαλάσσιου νερού μέσα σε έναν επιμελώς καθαρισμένο περιέκτη, ο οποίος μεταφέρεται στο εργαστήριο, κατά προτίμηση εντός μίας ή δύο ημερών από τη συλλογή. Κατά τη μεταφορά, η θερμοκρασία του δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει σε σημαντικό βαθμό τη θερμοκρασία που θα χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή. Η τοποθεσία δειγματοληψίας προσδιορίζεται με ακρίβεια και περιγράφεται όσον αφορά την κατάσταση ρύπανσης και θρεπτικών συστατικών της. Ειδικά για παράκτια ύδατα, πρέπει να συμπεριλαμβάνεται στον εν λόγω χαρακτηρισμό ο αριθμός των ετερότροφων μικροβιακών αποικιών και ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων διαλυμένων νιτρικών, αμμωνιακών και φωσφορικών ιόντων.

11. Για το ίδιο το δείγμα θαλάσσιου νερού, πρέπει να παρέχονται οι ακόλουθες πληροφορίες:

— ημερομηνία συλλογής,

— βάθος από το οποίο έχει συλλεγεί το δείγμα,

— εμφάνιση του δείγματος, π.χ. θολό κ.λπ.,

— θερμοκρασία κατά τον χρόνο συλλογής,

— αλατότητα,

— DOC,

— χρόνος που μεσολάβησε μεταξύ της συλλογής και της χρήσης του δείγματος στη δοκιμή.

12. Εάν η περιεκτικότητα σε DOC του δείγματος θαλάσσιου νερού αποδειχθεί υψηλή (παράγραφος 8), συνιστάται το θαλάσσιο νερό να υφίσταται παλαίωση για περίπου μία εβδομάδα πριν από τη χρήση. Η παλαίωση πραγματοποιείται με τη φύλαξη του δείγματος κάτω από αερόβιες συνθήκες στη

▼M6

θερμοκρασία δοκιμής, είτε στο σκοτάδι είτε σε διάχυτο φως. Εάν είναι απαραίτητο, εφαρμόζεται ήπιος αερισμός για τη διατήρηση των αερόβιων συνθηκών. Κατά τη διάρκεια της παλαίωσης, η περιεκτικότητα της ευκόλως αποικοδομήσιμης οργανικής ύλης μειώνεται. Στην κυκλική δοκιμή (3), δεν αποδείχθηκε καμία διαφορά μεταξύ του δυναμικού αποικοδόμησης των παλαιωμένων και προσφάτως συλλεγμένων δειγμάτων θαλάσσιου νερού. Πριν από τη χρήση του δείγματος, το θαλάσσιο νερό υποβάλλεται σε προκατεργασία για την αφαίρεση των χονδρόκοκκων σωματιδίων, π.χ. με διήθηση μέσω ηθμού νάιλον ή μέσω αδρού χάρτινου ηθμού (όχι μεμβράνη ή φίλτρα GF-C) ή μέσω καθίζησης και μετάγγισης. Πρέπει να αναφέρεται η διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε. Σε περίπτωση παλαίωσης, η διαδικασία προκατεργασίας διεξάγεται μετά την παλαίωση.

Διαλύματα παρακαταθήκης για ανόργανα θρεπτικά συστατικά

13. Παρασκευάζονται τα ακόλουθα διαλύματα παρακαταθήκης, με χρήση αντιδραστηρίων αναλυτικής καθαρότητας:

(α)	Δισόξινο ορθοφωσφορικό κάλιο, KH_2PO_4	8,50 g
	Μονόξινο ορθοφωσφορικό κάλιο, K_2HPO4	21,75 g
	Διένυδρο μονόξινο ορθοφωσφορικό νάτριο, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	33,30 g
	Χλωριούχο αμμώνιο, NH_4Cl	0,50 g
	Διαλύεται σε όγκο 1 λίτρου με απεσταγμένο νερό.	
(β)	Χλωριούχο ασβέστιο, $CaCl_2$	27,50 g
	Διαλύεται σε όγκο 1 λίτρου με απεσταγμένο νερό.	
(γ)	Επταένυδρο θειικό μαγνήσιο, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	22,50 g
	Διαλύεται σε όγκο 1 λίτρου με απεσταγμένο νερό.	
(δ)	Εξαένυδρος χλωριούχος σίδηρος (III), $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,25 g
	Διαλύεται σε όγκο 1 λίτρου με απεσταγμένο νερό.	

Μπορεί να αποτραπεί ο σχηματισμός ιζήματος στο διάλυμα (δ) με την προσθήκη μίας σταγόνας συμπυκνωμένου HCl ή 0,4 g αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA, δινάτριο άλας) ανά λίτρο. Εάν σχηματιστεί ίζημα στο διάλυμα παρακαταθήκης, παρασκευάζεται καινούριο διάλυμα.

Παρασκευή του μέσου δοκιμής

14. Προστίθεται 1 ml από κάθε ένα από τα παραπάνω διαλύματα παρακαταθήκης ανά λίτρο προκατεργασμένου θαλάσσιου νερού.

Εμβόλιο

15. Δεν προστίθεται ειδικό εμβόλιο επιπλέον των μικροοργανισμών που υπάρχουν ήδη στο θαλάσσιο νερό. Προσδιορίζεται (προαιρετικά) στο μέσο δοκιμής του θαλάσσιου νερού ο αριθμός των ετεροτρόφων που σχηματίζουν αποικίες (και κατά προτίμηση και στα αρχικά δείγματα θαλάσσιου νερού), π.χ. μέσω μέτρησης της περιεκτικότητας σε μικρόβια (plate count), με χρήση του θρεπτικού υλικού Marine Agar. Αυτό είναι ιδιαίτερα επιθυμητό για δείγματα από παράκτιες ή μολυσμένες περιοχές. Ελέγχεται η ετεροτροφική μικροβιακή δραστηριότητα στο θαλάσσιο νερό με τη διεξαγωγή μιας δοκιμής με ουσία αναφοράς.

▼M6

Προετοιμασία των φιαλών

16. Πριν από τη χρήση, όλα τα γυάλινα σκεύη πρέπει να καθαρίζονται πάρα πολύ καλά, όχι απαραιτήτως να αποστειρώνονται (π.χ. με τη χρήση αλκοολικού διαλύματος υδροχλωρικού οξέος), να εκπλένονται και να στεγνώνονται για την αποφυγή μόλυνσης από κατάλοιπα προηγούμενων δοκιμών. Οι φιάλες πρέπει επίσης να καθαρίζονται πριν από την πρώτη χρήση.

17. Οι υπό δοκιμή ουσίες αξιολογούνται ταυτόχρονα σε διπλές φιάλες, μαζί με μία φιάλη για την ουσία αναφοράς. Διεξάγεται μια δοκιμή τυφλού, εις διπλούν, που δεν περιέχει ούτε υπό δοκιμή ουσία ούτε ουσία αναφοράς για τον καθορισμό των τυφλών δειγμάτων της ανάλυσης. Οι υπό δοκιμή ουσίες διαλύονται στο μέσο της δοκιμής. Η προσθήκη τους μπορεί να γίνει με πρακτικό τρόπο μέσω ενός συμπυκνωμένου διαλύματος παρακαταθήκης για να επιτευχθούν οι επιθυμητές αρχικές συγκεντρώσεις, κατά κανόνα, των 5-40 mg DOC/l. Διεξάγεται δοκιμή της ουσίας αναφοράς, κατά κανόνα, σε αρχική συγκέντρωση των 20 mg DOC/l. Εάν χρησιμοποιούνται διαλύματα παρακαταθήκης της υπό δοκιμή ουσίας ή/και της ουσίας αναφοράς, πρέπει να διασφαλίζεται ότι δεν τροποποιείται σημαντικά η αλατότητα του μέσου του θαλάσσιου νερού.

18. Εάν αναμένονται ή δεν μπορούν να αποκλειστούν τοξικές επιδράσεις, ίσως θα ήταν σκόπιμο να συμπεριληφθεί ένα πείραμα αναστολής, εις διπλούν, στον σχεδιασμό της δοκιμής. Η υπό δοκιμή ουσία και η ουσία αναφοράς προστίθενται στο ίδιο δοχείο, ενώ η συγκέντρωση της ουσίας αναφοράς είναι συνήθως ίδια με αυτήν της δοκιμής-μάρτυρα (δηλ. 20 mg DOC/l) ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση.

19. Κατανέμονται επαρκείς ποσότητες των διαλυμάτων δοκιμής στις φιάλες Erlenmeyer (μια πρακτική ποσότητα είναι περίπου το μισό του όγκου της φιάλης) και, στη συνέχεια, κάθε φιάλη καλύπτεται με ένα χαλαρό κάλυμμα (π.χ. αλουμινόχαρτο) ώστε να είναι δυνατή η ανταλλαγή αερίων μεταξύ της φιάλης και του αέρα του περιβάλλοντος. (Τα βύσματα από υαλοβάμβακα δεν είναι κατάλληλα εάν διεξάγεται ανάλυση DOC). Τα δοχεία τοποθετούνται στο τάρακτρο και ακολουθεί συνεχής και ήπια ανάδευση (π.χ. στις 100 σ.α.λ.) καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Απαιτείται έλεγχος της θερμοκρασίας (15-20 °C με αποκλίσεις όχι μεγαλύτερες από ± 2 °C) και προστασία των δοχείων από το φως για την αποφυγή ανάπτυξης φυκών. Πρέπει να διασφαλίζεται ότι ο αέρας είναι απαλλαγμένος από τοξικά υλικά.

Φυσικοχημική δοκιμή-μάρτυρας (προαιρετική)

20. Εάν υπάρχει υποψία αβιοτικής αποικοδόμησης ή μηχανισμών απώλειας, όπως υδρόλυση (αποτελεί πρόβλημα μόνο για ειδική ανάλυση), πτητικότητα ή προσρόφηση, θα ήταν σκόπιμη η διεξαγωγή ενός φυσικοχημικού πειράματος ελέγχου. Αυτό μπορεί να διεξαχθεί με την προσθήκη χλωριούχου υδραργύρου (II) ($HgCl_2$) ([1]) (50-100 mg/l) στα δοχεία με την υπό δοκιμή ουσία, προκειμένου να διακοπεί η μικροβιακή δραστηριότητα. Μια σημαντική μείωση της συγκέντρωσης του DOC ή της ειδικής ουσίας στη φυσικοχημική δοκιμή-μάρτυρα υποδεικνύει την παρουσία αβιοτικών μηχανισμών απομάκρυνσης. (Εάν χρησιμοποιείται χλωριούχος υδράργυρος, θα πρέπει να δίνεται προσοχή στις αλληλεπιδράσεις ή στη δηλητηρίαση από καταλύτη κατά την ανάλυση DOC.)

Αριθμός φιαλών

21. Σε μια τυπική εκτέλεση, χρησιμοποιούνται οι ακόλουθες φιάλες:

Φιάλες 1 και 2 — περιέχουν την υπό δοκιμή ουσία (εναιώρημα δοκιμής),

Φιάλες 3 και 4 — περιέχουν μόνο θαλάσσιο νερό (τυφλό),

Φιάλη 5 — περιέχει την ουσία αναφοράς (μάρτυρας διαδικασίας),

Φιάλη 6 — περιέχει την υπό δοκιμή ουσία και την ουσία αναφοράς (μάρτυρας τοξικότητας) — προαιρετική,

Φιάλη 7 — περιέχει την υπό δοκιμή ουσία και τον φορέα αποστείρωσης (στείρος αβιοτικός μάρτυρας) — προαιρετική.

([1]) Ο χλωριούχος υδράργυρος (II) ($HgCl_2$) είναι μια πολύ τοξική ουσία και θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οι κατάλληλες προφυλάξεις κατά τον χειρισμό του. Τα υδατικά απόβλητα που περιέχουν την εν λόγω χημική ουσία θα πρέπει να απορρίπτονται κατάλληλα. Δεν θα πρέπει να απορρίπτονται στο σύστημα επεξεργασίας λυμάτων.

▼M6

Ανάλυση DOC

22. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, τα δείγματα αποσύρονται σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα για την ανάλυση DOC (προσάρτημα 1). Τα δείγματα πρέπει πάντα να λαμβάνονται κατά την έναρξη της δοκιμής (ημέρα 0) και την 60η ημέρα. Απαιτούνται συνολικά τουλάχιστον πέντε δείγματα για να περιγραφεί η χρονική πορεία της αποικοδόμησης. Δεν είναι δυνατόν να καθοριστεί πάγιο χρονοδιάγραμμα για τη δειγματοληψία, δεδομένου ότι η ταχύτητα βιοαποικοδόμησης ποικίλλει. Ο προσδιορισμός DOC πρέπει να διεξάγεται εις διπλούν σε κάθε δείγμα.

Δειγματοληψία

23. Ο απαιτούμενος όγκος των δειγμάτων εξαρτάται από την αναλυτική μέθοδο (ειδική ανάλυση), τον αναλυτή άνθρακα που χρησιμοποιείται και τη διαδικασία (διήθηση με μεμβράνη ή φυγοκέντρηση) που επιλέγεται για την κατεργασία των δειγμάτων πριν από τον προσδιορισμό του άνθρακα (παράγραφοι 25 και 26). Πριν από τη δειγματοληψία, πρέπει να διασφαλίζεται η καλή ανάμειξη του μέσου δοκιμής και η διάλυση ή διασπορά τυχόν υλικού που έχει προσκολληθεί στο τοίχωμα της φιάλης.

24. Αμέσως μετά τη δειγματοληψία διεξάγεται διήθηση με μεμβράνη ή φυγοκέντρηση. Εάν είναι απαραίτητο, τα δείγματα που έχουν υποστεί διήθηση ή φυγοκέντρηση φυλάσσονται στους 2-4 °C για έως 48 ώρες ή κάτω από τους – 18°C για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα (εάν είναι γνωστό ότι η ουσία δεν θα επηρεαστεί, εκτελείται οξίνιση σε pH 2 πριν από τη φύλαξη).

25. Οι διηθητικές μεμβράνες (0,2-0,45 μm) θεωρούνται κατάλληλες, εφόσον εξασφαλίζεται ότι δεν ελευθερώνουν άνθρακα ούτε προσροφούν την ουσία στο στάδιο της διήθησης, π.χ. διηθητικές μεμβράνες πολυανθρακικών πολυμερών. Μερικές διηθητικές μεμβράνες είναι εμποτισμένες με επιφανειοδραστικές ουσίες για υδροφιλίωση και ενδέχεται να ελευθερώνουν σημαντικές ποσότητες διαλυμένου άνθρακα. Τα εν λόγω φίλτρα προετοιμάζονται με βρασμό σε απιονισμένο νερό για τρεις διαδοχικές χρονικές περιόδους, διάρκειας μίας ώρας η κάθε μία. Μετά τον βρασμό, τα φίλτρα φυλάσσονται σε απιονισμένο νερό. Τα πρώτα 20 ml του διηθήματος απορρίπτονται.

26. Μπορεί να διεξαχθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων ως εναλλακτική επιλογή της διήθησης μέσω μεμβράνης. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται σε 40 000 $m.s^{-2}$ (~ 4 000 g) για 15 λεπτά, κατά προτίμηση σε καταψυχόμενο φυγόκεντρο.

Σημείωση: Η διαφοροποίηση του ολικού οργανικού άνθρακα (TOC) έναντι του DOC (TOC/DOC) μέσω φυγοκέντρησης σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις δεν φαίνεται να είναι αποτελεσματική, αφού είτε δεν απομακρύνονται όλα τα βακτήρια είτε ο άνθρακας ως μέρος του βακτηριακού πλάσματος επαναδιαλύεται. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις δοκιμής (> 10 mg C ανά λίτρο), το σφάλμα φυγοκέντρησης φαίνεται να είναι σχετικά μικρό.

Συχνότητα της δειγματοληψίας

27. Εάν οι αναλύσεις πραγματοποιούνται αμέσως μετά τη δειγματοληψία, ο χρόνος μέχρι την επόμενη δειγματοληψία εκτιμάται λαμβάνοντας υπόψη το αποτέλεσμα του αναλυτικού προσδιορισμού.

28. Εάν τα δείγματα διατηρούνται (παράγραφος 24) ώστε να αναλυθούν κάποια άλλη στιγμή, πρέπει να λαμβάνεται μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων από τον ελάχιστο απαιτούμενο αριθμό των πέντε δειγμάτων. Πρέπει να αναλύονται τα τελευταία δείγματα πρώτα και, ακολουθώντας μια στρατηγική σταδιακής επιλογής «προς τα πίσω» των κατάλληλων δειγμάτων προς ανάλυση, είναι δυνατό να εξασφαλιστεί μια καλή περιγραφή της καμπύλης βιοαποικοδόμησης με σχετικά μικρό αριθμό αναλυτικών προσδιορισμών. Εάν δεν έχει πραγματοποιηθεί αποικοδόμηση μέχρι το τέλος της δοκιμής, δεν χρειάζεται να αναλυθούν άλλα δείγματα και, σε αυτήν την περίπτωση, η στρατηγική της «προς τα πίσω» επιλογής ενδέχεται να εξοικονομήσει σημαντικές δαπάνες για αναλύσεις.

▼M6

29. Εάν παρατηρηθεί φάση οριζοντίωσης (σταθερή κατάσταση) στην καμπύλη αποικοδόμησης πριν από την 60ή ημέρα, η δοκιμή τερματίζεται. Εάν η έναρξη της αποικοδόμησης είναι εμφανής μέχρι την 60ή ημέρα, αλλά δεν έχει επιτευχθεί φάση οριζοντίωσης, το πείραμα παρατείνεται για μεγαλύτερη χρονική περίοδο.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

30. Τα αναλυτικά αποτελέσματα καταγράφονται στο συνημμένο φύλλο δεδομένων (προσάρτημα 2) και υπολογίζονται οι τιμές βιοαποικοδόμησης τόσο για την υπό δοκιμή ουσία όσο και για την ουσία αναφοράς βάσει της εξίσωσης:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$$

όπου:

D_t = αποικοδόμηση σε ποσοστιαία απομάκρυνση DOC ή ειδικής ουσίας κατά τον χρόνο t,

C_o = αρχική συγκέντρωση του DOC ή της ειδικής ουσίας στο μέσο δοκιμής,

C_t = συγκέντρωση του DOC ή της ειδικής ουσίας στο μέσο δοκιμής κατά τον χρόνο t,

$C_{bl(0)}$ = αρχική συγκέντρωση του DOC ή της ειδικής ουσίας στο τυφλό,

$C_{bl(t)}$ = συγκέντρωση του DOC ή της ειδικής ουσίας στο τυφλό κατά τον χρόνο t.

31. Η αποικοδόμηση αναφέρεται ως ποσοστιαία απομάκρυνση DOC (τελική αποικοδόμηση) ή ποσοστιαία απομάκρυνση ειδικής ουσίας (πρωτογενής αποικοδόμηση) κατά τον χρόνο t. Οι συγκεντρώσεις DOC υπολογίζονται με ακρίβεια 0,1 mg ανά λίτρο και οι μέσες τιμές των τιμών D_t στρογγυλοποιούνται στο πλησιέστερο ακέραιο ποσοστό.

32. Η πορεία της αποικοδόμησης απεικονίζεται γραφικά σε μορφή διαγράμματος, όπως εμφανίζεται στο σχήμα της ενότητας «Εγκυρότητα και ερμηνεία των αποτελεσμάτων». Εάν υπάρχουν επαρκή δεδομένα, υπολογίζονται από την καμπύλη η λανθάνουσα φάση (t_L) και ο χρόνος μέχρι την επίτευξη 50 τοις εκατό απομάκρυνσης από το τέλος της λανθάνουσας φάσης (t_{50}).

Έκθεση δοκιμής

33. Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Υπό δοκιμή ουσία:

— φυσική μορφή και, εφόσον έχουν σημασία, φυσικοχημικές ιδιότητες,

— στοιχεία ταυτότητας.

Συνθήκες δοκιμής:

— τοποθεσία και περιγραφή του σημείου δειγματοληψίας, κατάσταση ρύπανσης και θρεπτικών συστατικών (αριθμός αποικιών, συγκέντρωση νιτρικών, αμμωνιακών και φωσφορικών ιόντων, εάν απαιτείται),

— χαρακτηριστικά του δείγματος (ημερομηνία δειγματοληψίας, βάθος, εμφάνιση, θερμοκρασία, αλατότητα, DOC (προαιρετικό), χρόνος που μεσολάβησε μεταξύ της συλλογής και της χρήσης του δείγματος στη δοκιμή),

▼M6

— μέθοδος που χρησιμοποιείται (κατά περίπτωση) για την παλαίωση του θαλάσσιου νερού,

— μέθοδος που χρησιμοποιείται για την προκατεργασία (φιλτράρισμα/καθίζηση) του θαλάσσιου νερού,

— μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του DOC,

— μέθοδος που χρησιμοποιείται για ειδική ανάλυση (προαιρετική),

— μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του αριθμού των ετεροτρόφων στο θαλάσσιο νερό [μέθοδος μέτρησης της περιεκτικότητας σε βακτήρια (plate count) ή εναλλακτική διαδικασία] (προαιρετική),

— άλλες μέθοδοι (προαιρετικές) που χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό του θαλάσσιου νερού (μετρήσεις ATP κ.λπ.).

Αποτελέσματα:

— αναφορά αναλυτικών δεδομένων σε φύλλο δεδομένων (προσάρτημα 2),

— η πορεία της δοκιμής αποικοδόμησης απεικονίζεται γραφικά σε μορφή διαγράμματος όπου παρουσιάζεται η λανθάνουσα φάση (t_L), η κλίση και ο χρόνος (ξεκινώντας από το τέλος της λανθάνουσας φάσης) μέχρι την επίτευξη 50 τοις εκατό απομάκρυνσης (t_{50}). Η λανθάνουσα φάση μπορεί να εκτιμηθεί γραφικά όπως εμφανίζεται στο σχήμα της ενότητας «Εγκυρότητα και ερμηνεία των αποτελεσμάτων» ή μπορεί να θεωρηθεί ευκόλως ως ο χρόνος που απαιτείται για αποικοδόμηση της τάξεως του 10 τοις εκατό,

— ποσοστιαία αποικοδόμηση μετρηθείσα μετά από 60 ημέρες ή στο τέλος της δοκιμής.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων.

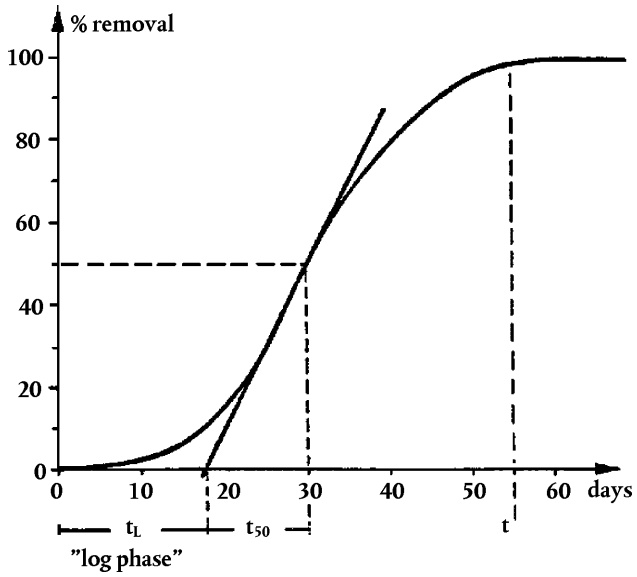
Εγκυρότητα και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

34. Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με τις ουσίες αναφοράς, π.χ. βενζοϊκό νάτριο, οξικό νάτριο ή ανιλίνη, αναμένεται ότι θα είναι συγκρίσιμα με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν στην κυκλική δοκιμή (3) (ανατρέξτε στην ενότητα «Ουσίες αναφοράς», παράγραφος 7). Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με τις ουσίες αναφοράς είναι ασυνήθιστα, η δοκιμή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται με χρήση άλλου δείγματος θαλάσσιου νερού. Παρότι η ερμηνεία των αποτελεσμάτων των δοκιμών αναστολής μπορεί να μην είναι πάντα μια απλή διαδικασία λόγω της συνεισφοράς σε DOC από την υπό δοκιμή ουσία, μια σημαντική μείωση του συνολικού ρυθμού απομάκρυνσης DOC, σε σύγκριση με αυτόν του μάρτυρα, αποτελεί θετικό σημάδι τοξικών επιδράσεων.

35. Λόγω των σχετικά υψηλών συγκεντρώσεων δοκιμής που χρησιμοποιούνται σε σχέση με τα περισσότερα φυσικά συστήματα (και κατά συνέπεια της δυσμενούς αναλογίας μεταξύ των συγκεντρώσεων των υπό δοκιμή ουσιών και άλλων πηγών άνθρακα), η μέθοδος πρέπει να θεωρείται μια προκαταρκτική δοκιμή που μπορεί να χρησιμοποιείται για να διαπιστωθεί εάν μια ουσία είναι εύκολα βιοαποικοδομήσιμη ή όχι. Αντίστοιχα, ένα χαμηλό αποτέλεσμα δεν σημαίνει απαραιτήτως ότι η υπό δοκιμή ουσία δεν είναι βιοαποικοδομήσιμη στα θαλάσσια περιβάλλοντα, αλλά υποδεικνύει ότι χρειάζεται περισσότερη εργασία προκειμένου να αποδειχθεί αυτό.

Στο παρακάτω σχήμα παρέχεται ένα παράδειγμα ενός πειράματος θεωρητικής αποικοδόμησης όπου απεικονίζεται ένας εφικτός τρόπος εκτίμησης της τιμής t_L (διάρκεια της «λανθάνουσας φάσης») και της τιμής t_{50} (διάστημα χρόνου, ξεκινώντας από t_L) που απαιτείται για να επιτευχθεί απομάκρυνση 50 τοις εκατό.

▼M6



ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΛΕΙΣΤΗΣ ΦΙΑΛΗΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος είναι μια παραλλαγή σε θαλάσσιο νερό της δοκιμής κλειστής φιάλης (5) και οριστικοποιήθηκε μετά από μια κυκλική δοκιμή που οργανώθηκε για την Ευρωπαϊκή Επιτροπή από το Water Quality Institute της Δανίας (3).

2. Από κοινού με την αντίστοιχη θαλάσσια μέθοδο ανακινούμενης φιάλης, τα αποτελέσματα από αυτήν τη δοκιμή δεν πρέπει να θεωρούνται ενδείξεις άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας, αλλά πρέπει να χρησιμοποιούνται ειδικά για τη λήψη πληροφοριών σχετικά με τη βιοαποικοδομησιμότητα ουσιών σε θαλάσσια περιβάλλοντα.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

3. Μια προκαθορισμένη ποσότητα της υπό δοκιμή ουσίας διαλύεται στο μέσο δοκιμής συνήθως σε συγκέντρωση 2-10 mg υπό δοκιμή ουσίας ανά λίτρο (μπορούν να χρησιμοποιούνται μία ή περισσότερες συγκεντρώσεις). Το διάλυμα διατηρείται σε μια γεμάτη κλειστή φιάλη στο σκοτάδι, εντός ενός λουτρού ή θαλάμου σταθερής θερμοκρασίας, η οποία κυμαίνεται μεταξύ 15 και 20 °C με αποκλίσεις όχι μεγαλύτερες από ± 1 °C. Σε περιπτώσεις όπου ο στόχος της μελέτης είναι η προσομοίωση περιβαλλοντικών συνθηκών, οι δοκιμές μπορούν να διεξάγονται εκτός αυτού του συνήθους εύρους θερμοκρασίας, υπό την προϋπόθεση ότι πραγματοποιούνται κατάλληλες ρυθμίσεις για τον έλεγχο της θερμοκρασίας. Μετά την αποικοδόμηση διεξάγονται αναλύσεις οξυγόνου κατά τη διάρκεια χρονικής περιόδου 28 ημερών.

4. Από την κυκλική δοκιμή διαπιστώθηκε ότι εάν η δοκιμή παραταθεί πέραν των 28 ημερών, δεν είναι δυνατή η συλλογή χρήσιμων πληροφοριών, στις περισσότερες περιπτώσεις, λόγω σοβαρών παρεμβολών. Οι τιμές του βιολογικά απαιτούμενου οξυγόνου (BOD) του τυφλού ήταν υπερβολικά υψηλές, πιθανώς λόγω της ανάπτυξης βακτηρίων στο τοίχωμα που προκλήθηκε από την έλλειψη ανάδευσης, καθώς και της νιτροποίησης. Επομένως, η συνιστώμενη διάρκεια είναι 28 ημέρες, αλλά εάν η τιμή BOD του τυφλού διατηρείται εντός του ορίου του 30 τοις εκατό (παράγραφοι 15 και 40) η δοκιμή μπορεί να παραταθεί.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ

5. Για να διαπιστωθεί εάν η δοκιμή μπορεί να εφαρμοστεί σε μια συγκεκριμένη ουσία, πρέπει να είναι γνωστές κάποιες ιδιότητες της ουσίας. Προκειμένου να υπολογιστεί το θεωρητικά απαιτούμενο οξυγόνο (ThOD) απαιτείται ο εμπειρικός τύπος (βλ. προσάρτημα 3). Διαφορετικά, πρέπει να προσδιοριστεί το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD) της ουσίας ώστε να χρησιμοποιηθεί ως τιμή αναφοράς. Η χρήση του COD είναι λιγότερο ικανοποιητική επειδή μερικές ουσίες δεν οξειδώνονται πλήρως στη δοκιμή COD.

▼M6

6. Η διαλυτότητα της ουσίας θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 2 mg/l. Ωστόσο, κατ' αρχήν, μπορούν να υποβάλλονται σε δοκιμή λιγότερο διαλυτές ουσίες (π.χ. με κατεργασία με υπερήχους), καθώς και πτητικές ουσίες. Για την ερμηνεία των λαμβανομένων αποτελεσμάτων, ειδικά όταν αυτά είναι οριακά, απαιτούνται στοιχεία για την καθαρότητα ή τις σχετικές αναλογίες των βασικών συστατικών της υπό δοκιμή ουσίας.

7. Οι πληροφορίες που αφορούν την τοξικότητα της ουσίας για βακτήρια, π.χ. σύμφωνα με μετρήσεις βραχυχρόνιων δοκιμών αναπνοής (4), μπορεί να είναι χρήσιμες κατά την επιλογή κατάλληλων συγκεντρώσεων δοκιμής και να έχουν ουσιαστική σημασία για την ορθή ερμηνεία χαμηλών τιμών βιοαποικοδόμησης. Ωστόσο, για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμής βιοαποικοδόμησης, δεν επαρκούν πάντα οι εν λόγω πληροφορίες και η διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 27 είναι καταλληλότερη.

ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

8. Για τον έλεγχο της μικροβιακής δραστηριότητας του δείγματος θαλάσσιου νερού πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες ουσίες αναφοράς. Για τον σκοπό αυτό μπορούν να χρησιμοποιούνται (για παράδειγμα) η ανιλίνη, το οξικό νάτριο ή το βενζοϊκό νάτριο. Οι ουσίες αυτές πρέπει να αποικοδομούνται κατά τουλάχιστον 60 τοις εκατό (του ThOD τους) σε ένα ευλόγως σύντομο χρονικό διάστημα, διαφορετικά συνιστάται να επαναλαμβάνεται η δοκιμή με χρήση άλλου δείγματος θαλάσσιου νερού.

9. Στην κυκλική δοκιμή της Ευρωπαϊκής Επιτροπής όπου τα δείγματα θαλάσσιου νερού ελήφθησαν από διαφορετικές τοποθεσίες και σε διαφορετικές χρονικές στιγμές μέσα στο έτος, η λανθάνουσα φάση (t_L) και ο χρόνος για να επιτευχθεί αποικοδόμηση κατά 50 τοις εκατό (t_{50}), μη συμπεριλαμβανομένης της λανθάνουσας φάσης, ήταν 0 έως 2 ημέρες και 1 έως 4 ημέρες αντίστοιχα για το βενζοϊκό νάτριο. Για την ανιλίνη, οι τιμές t_L και t_{50} ήταν 0 έως 7 και 2 έως 12 ημέρες αντίστοιχα.

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ

10. Η αναπαραγωγιμότητα των μεθόδων καθορίστηκε στην κυκλική δοκιμή της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (3).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Συσκευές

11. Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός, καθώς και τα εξής:

(α) Μπορούν να χρησιμοποιούνται φιάλες BOD των 250-300 ml με γυάλινα πώματα ή φιάλη με στενό στόμιο των 250 ml με γυάλινα πώματα,

(β) Μερικές φιάλες των 2-, 3- και 4- λίτρων με ενδείξεις που αντιστοιχούν στα λίτρα για τις διαδικασίες προετοιμασίας του πειράματος και για την πλήρωση των φιαλών BOD,

(γ) Υδατόλουτρο ή θάλαμος σταθερής θερμοκρασίας για να διατηρούνται οι φιάλες σε σταθερή θερμοκρασία (± 1 °C) μακριά από το φως.

(δ) Εξοπλισμός για την ανάλυση του διαλυμένου οξυγόνου,

(ε) Διηθητικές μεμβράνες, 0,2-0,45 μm (προαιρετικές),

(στ) Εξοπλισμός για ειδική ανάλυση (προαιρετικός).

Θαλάσσιο νερό

12. Συλλέγεται ένα δείγμα θαλάσσιου νερού μέσα σε έναν επιμελώς καθαρισμένο περιέκτη, ο οποίος μεταφέρεται στο εργαστήριο, κατά προτίμηση εντός μίας ή δύο ημερών από τη συλλογή. Κατά τη μεταφορά, η θερμοκρασία του δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει σε σημαντικό βαθμό τη θερμοκρασία που θα χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή.

▼**M6**

13. Η τοποθεσία δειγματοληψίας προσδιορίζεται με ακρίβεια και περιγράφεται όσον αφορά την κατάσταση ρύπανσης και θρεπτικών συστατικών της. Ειδικά για παράκτια ή μολυσμένα ύδατα, πρέπει να συμπεριλαμβάνεται στον εν λόγω χαρακτηρισμό ο αριθμός των ετερότροφων μικροβιακών αποικιών και ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων διαλυμένων νιτρικών, αμμωνιακών και φωσφορικών ιόντων.

14. Για το ίδιο το δείγμα θαλάσσιου νερού, πρέπει να παρέχονται οι ακόλουθες πληροφορίες:

— ημερομηνία συλλογής,

— βάθος από το οποίο έχει συλλεγεί το δείγμα,

— εμφάνιση του δείγματος, π.χ. θολό κ.λπ.,

— θερμοκρασία κατά τον χρόνο συλλογής,

— αλατότητα,

— διαλυμένος οργανικός άνθρακας (DOC),

— χρόνος που μεσολάβησε μεταξύ της συλλογής και της χρήσης του δείγματος στη δοκιμή.

15. Εάν η περιεκτικότητα σε DOC του δείγματος αποδειχθεί υψηλή ή εάν θεωρηθεί ότι η τιμή BOD του τυφλού μετά από 28 ημέρες θα είναι μεγαλύτερη από το 30 τοις εκατό σε σχέση με αυτήν των ουσιών αναφοράς, συνιστάται η παλαίωση του θαλάσσιου νερού για περίπου μία εβδομάδα πριν από τη χρήση.

16. Η παλαίωση του δείγματος πραγματοποιείται με τη φύλαξή του κάτω από αερόβιες συνθήκες στη θερμοκρασία δοκιμής, είτε στο σκοτάδι είτε σε διάχυτο φως. Εάν είναι απαραίτητο, εφαρμόζεται ήπιος αερισμός για τη διατήρηση των αερόβιων συνθηκών. Κατά τη διάρκεια της παλαίωσης, η περιεκτικότητα της ευκόλως αποικοδομήσιμης οργανικής ύλης μειώνεται. Στην κυκλική δοκιμή (3), δεν αποδείχθηκε καμία διαφορά μεταξύ του δυναμικού αποικοδόμησης των παλαιωμένων και προσφάτως συλλεγμένων δειγμάτων θαλάσσιου νερού.

17. Πριν από τη χρήση του δείγματος, το θαλάσσιο νερό υποβάλλεται σε προκατεργασία για την αφαίρεση των χονδρόκοκκων σωματιδίων, π.χ. με διήθηση μέσω ηθμού νάιλον ή μέσω αδρού χάρτινου ηθμού (όχι μεμβράνη ή φίλτρα GF-C) ή μέσω καθίζησης και μετάγγισης. Πρέπει να αναφέρεται η διαδικασία που χρησιμοποιείται. Σε περίπτωση παλαίωσης, η διαδικασία προκατεργασίας διεξάγεται μετά την παλαίωση.

Διαλύματα παρακαταθήκης για ανόργανα θρεπτικά συστατικά

18. Παρασκευάζονται τα ακόλουθα διαλύματα παρακαταθήκης, με χρήση αντιδραστηρίων αναλυτικής καθαρότητας:

(α)	Δισόξινο ορθοφωσφορικό κάλιο, KH_2PO_4	8,50 g
	Μονόξινο ορθοφωσφορικό κάλιο, K_2HPO_4	21,75 g
	Διένυδρο μονόξινο ορθοφωσφορικό νάτριο, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	33,30 g
	Χλωριούχο αμμώνιο, NH_4Cl	0,50 g
	Διαλύεται σε όγκο 1 λίτρου με απεσταγμένο νερό.	
(β)	Χλωριούχο ασβέστιο, $CaCl_2$	27,50 g
	Διαλύεται σε όγκο 1 λίτρου με απεσταγμένο νερό.	
(γ)	Επταένυδρο θειικό μαγνήσιο, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	22,50 g
	Διαλύεται σε όγκο 1 λίτρου με απεσταγμένο νερό.	
(δ)	Εξάνυδρος χλωριούχος σίδηρος (III), $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,25 g
	Διαλύεται σε όγκο 1 λίτρου με απεσταγμένο νερό.	

▼M6

Μπορεί να αποτραπεί ο σχηματισμός ιζήματος στο διάλυμα (δ) με την προσθήκη μίας σταγόνας συμπυκνωμένου HCl ή 0,4 g αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA, δινάτριο άλας) ανά λίτρο. Εάν σχηματιστεί ίζημα στο διάλυμα παρακαταθήκης, παρασκευάζεται καινούριο διάλυμα.

Παρασκευή του μέσου δοκιμής

19. Προστίθεται 1 ml από κάθε ένα από τα παραπάνω διαλύματα παρακαταθήκης ανά λίτρο προκατεργασμένου θαλάσσιου νερού. Εκτελείται κορεσμός του μέσου δοκιμής με αέρα στη θερμοκρασία δοκιμής μέσω αερισμού με καθαρό πεπιεσμένο αέρα για περίπου 20 λεπτά. Προσδιορίζεται η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου για να χρησιμεύσει σαν μάρτυρας. Η κορεσμένη συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου σε συνάρτηση με την αλατότητα και τη θερμοκρασία μπορεί να προσδιοριστεί από το νομόγραμμα που εσωκλείεται σε αυτήν τη μέθοδο δοκιμών (προσάρτημα 4).

Εμβόλιο

20. Δεν προστίθεται ειδικό εμβόλιο επιπλέον των μικροοργανισμών που υπάρχουν ήδη στο θαλάσσιο νερό. Προσδιορίζεται (προαιρετικά) στο μέσο δοκιμής του θαλάσσιου νερού ο αριθμός των ετεροτρόφων που σχηματίζουν αποικίες (και κατά προτίμηση, και στο αρχικό δείγμα θαλάσσιου νερού) π.χ. μέσω μέτρησης της περιεκτικότητας σε μικρόβια (plate count), με χρήση του θρεπτικού υλικού Marine Agar. Αυτό είναι ιδιαίτερα επιθυμητό για δείγματα από παράκτιες ή μολυσμένες περιοχές. Ελέγχεται η ετεροτροφική μικροβιακή δραστηριότητα στο θαλάσσιο νερό με τη διεξαγωγή μιας δοκιμής με ουσία αναφοράς.

Παρασκευή των φιαλών δοκιμής

21. Πραγματοποιούνται όλες οι απαραίτητες διαδικασίες συμπεριλαμβανομένης της παλαίωσης και της προκατεργασίας του θαλάσσιου νερού στην επιλεγμένη θερμοκρασία δοκιμής μεταξύ 15 και 20 °C, ενώ εξασφαλίζεται η καθαρότητα, αλλά όχι η στειρότητα, όλων των γυάλινων σκευών.

22. Ετοιμάζονται ομάδες φιαλών BOD για τον προσδιορισμό του BOD της υπό δοκιμή ουσίας και της ουσίας αναφοράς σε ταυτόχρονες πειραματικές σειρές. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιούνται σε διπλές φιάλες (τυφλά, ουσία αναφοράς και υπό δοκιμή ουσία), δηλ. ετοιμάζονται δύο φιάλες για κάθε προσδιορισμό. Οι αναλύσεις εκτελούνται τουλάχιστον τις ημέρες 0, 5, 15 και 28 (τέσσερις προσδιορισμοί). Για τις αναλύσεις οξυγόνου, οι τέσσερις προσδιορισμοί απαιτούν συνολικά 3 × 2 × 4 = 24 φιάλες (τυφλό, ουσία αναφοράς και υπό δοκιμή ουσία) και συνεπώς περίπου 8 λίτρα μέσου δοκιμής (για μία συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας).

23. Παρασκευάζονται ξεχωριστά διαλύματα της υπό δοκιμή ουσίας και της ουσίας αναφοράς σε μεγάλες φιάλες επαρκούς όγκου (παράγραφος 11), με αρχική προσθήκη στις μεγάλες φιάλες που είναι μερικώς γεμάτες της υπό δοκιμή ουσίας και της ουσίας αναφοράς είτε απευθείας είτε με τη χρήση συμπυκνωμένου διαλύματος παρακαταθήκης. Προστίθεται περαιτέρω μέσο δοκιμής για να επιτευχθούν οι τελικές επιθυμητές συγκεντρώσεις. Εάν χρησιμοποιούνται διαλύματα παρακαταθήκης της υπό δοκιμή ουσίας ή/και της ουσίας αναφοράς, πρέπει να διασφαλίζεται ότι δεν τροποποιείται σημαντικά η αλατότητα του μέσου του θαλάσσιου νερού.

24. Οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας και της ουσίας αναφοράς επιλέγονται λαμβανομένων υπόψη των εξής:

(α) διαλυτότητα του διαλυμένου οξυγόνου στο θαλάσσιο νερό στην επικρατούσα θερμοκρασία και αλατότητα της δοκιμής (βλ. το νομόγραμμα που εσωκλείεται,- προσάρτημα 4),

(β) BOD του τυφλού για το θαλάσσιο νερό και

(γ) αναμενόμενη βιοαποικοδομησιμότητα της υπό δοκιμή ουσίας.

▼M6

25. Στους 15 °C και στους 20 °C και με αλατότητα 32 τοις χιλίοις (ωκεάνιο νερό), η διαλυτότητα του διαλυμένου οξυγόνου είναι περίπου 8,1 και 7,4 mg/l αντίστοιχα. Η κατανάλωση οξυγόνου του ίδιου του θαλάσσιου νερού (αναπνοή τυφλού) μπορεί να είναι 2 mg O_2/l ή μεγαλύτερη, εάν το θαλάσσιο νερό δεν είναι παλαιωμένο. Επομένως, προκειμένου να εξασφαλίζεται ότι η συγκέντρωση οξυγόνου που θα απομένει μετά την οξείδωση της υπό δοκιμή ουσίας θα είναι σημαντική, χρησιμοποιείται αρχική συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας περίπου 2-3 mg/l (ανάλογα με το ThOD) για τις ουσίες που αναμένεται ότι θα αποικοδομηθούν πλήρως υπό τις συνθήκες της δοκιμής (όπως οι ουσίες αναφοράς). Οι λιγότερο αποικοδομήσιμες ουσίες ελέγχονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, έως περίπου 10 mg/l, με την προϋπόθεση ότι δεν προκύπτουν τοξικές επιδράσεις. Θα ήταν σκόπιμο να εκτελούνται παράλληλες δοκιμές με μια χαμηλή (περίπου 2 mg/l) και μια υψηλή (περίπου 10 mg/l) συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας.

26. Πρέπει να προσδιορίζεται παράλληλα και ένα τυφλό οξυγόνου σε φιάλες χωρίς υπό δοκιμή ουσία ή ουσία αναφοράς.

27. Εάν πρόκειται να προσδιοριστούν ανασταλτικές επιδράσεις, προετοιμάστε τις ακόλουθες σειρές διαλυμάτων σε ξεχωριστές μεγάλες φιάλες (παράγραφος 13):

(α) 2 mg ανά λίτρο μιας εύκολα αποικοδομήσιμης ουσίας, π.χ. οποιαδήποτε από τις αναφερόμενες ουσίες αναφοράς,

(β) x mg ανά λίτρο της υπό δοκιμή ουσίας (το x συνήθως είναι 2),

(γ) 2 mg ανά λίτρο της εύκολα αποικοδομήσιμης ουσίας συν x mg ανά λίτρο της υπό δοκιμή ουσίας.

Φυσικοχημική δοκιμή-μάρτυρας (προαιρετική)

28. Εάν χρησιμοποιείται η επιλογή των ειδικών αναλύσεων, μπορεί να διεξαχθεί ένα φυσικοχημικό πείραμα προκειμένου να ελεγχθεί εάν η υπό δοκιμή ουσία απομακρύνεται μέσω αβιοτικών μηχανισμών, όπως υδρόλυση ή προσρόφηση. Μια φυσικοχημική δοκιμή-μάρτυρας μπορεί να διεξαχθεί με την προσθήκη χλωριούχου υδραργύρου (II) ($HgCl_2$) [1] (50-100 mg/l) σε διπλές φιάλες με την υπό δοκιμή ουσία, προκειμένου να διακοπεί η μικροβιακή δραστηριότητα. Μια σημαντική μείωση της συγκέντρωσης της ειδικής ουσίας κατά την πορεία της δοκιμής υποδεικνύει την παρουσία αβιοτικών μηχανισμών απομάκρυνσης.

Αριθμός φιαλών BOD σε μια τυπική εκτέλεση

29. Σε μια τυπική εκτέλεση, χρησιμοποιούνται οι ακόλουθες φιάλες:

— τουλάχιστον 8 που περιέχουν την υπό δοκιμή ουσία,

— τουλάχιστον 8 που περιέχουν μόνο θαλάσσιο νερό ενισχυμένο με θρεπτικά συστατικά,

— τουλάχιστον 8 που περιέχουν την ουσία αναφοράς, και όταν απαιτείται

— 6 φιάλες που περιέχουν την υπό δοκιμή ουσία και την ουσία αναφοράς (μάρτυρας τοξικότητας).

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

30. Μετά την παρασκευή, κάθε διάλυμα μεταφέρεται αμέσως με σιφώνιο που ξεκινά από το κατώτερο τέταρτο (όχι από τον πυθμένα) της κατάλληλης μεγάλης φιάλης, έτσι ώστε να πληρωθούν οι φιάλες BOD της αντίστοιχης ομάδας. Οι μηδενικοί μάρτυρες (χρόνος μηδέν) αναλύονται αμέσως ως προς το διαλυμένο οξυγόνο (παράγραφος 33) ή διατηρούνται για μετέπειτα χημική ανάλυση μέσω καθίζησης με $MnCl_2$ (χλωριούχο μαγγάνιο (II)) και NaOH (υδροξείδιο του νατρίου).

[1] Ο χλωριούχος υδράργυρος (II) ($HgCl_2$) είναι μια πολύ τοξική ουσία και θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οι κατάλληλες προφυλάξεις κατά τον χειρισμό του. Τα υδατικά απόβλητα που περιέχουν την εν λόγω χημική ουσία θα πρέπει να απορρίπτονται κατάλληλα. Δεν θα πρέπει να απορρίπτονται απευθείας στο σύστημα επεξεργασίας λυμάτων.

▼M6

31. Οι υπόλοιπες παράλληλες φιάλες BOD επωάζονται στη θερμοκρασία δοκιμής (15-20 °C), διατηρούνται στο σκοτάδι, απομακρύνονται από τον θάλαμο επώασης σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα (π.χ. μετά από 5, 15 και 28 ημέρες τουλάχιστον) και αναλύονται ως προς το διαλυμένο οξυγόνο (παράγραφος 33).

32. Τα δείγματα για ειδικές αναλύσεις (προαιρετικές) διηθούνται μέσω μεμβρανών (0,2-0,45 μm) ή φυγοκεντρούνται για 15 λεπτά. Εάν τα δείγματα δεν αναλυθούν αμέσως, φυλάσσονται για έως 48 ώρες στους 2-4 °C ή για μεγαλύτερες χρονικές περιόδους στους – 18°C (εάν είναι γνωστό ότι δεν θα επηρεαστεί η υπό δοκιμή ουσία, εκτελείται οξίνιση σε pH 2 πριν από τη φύλαξη).

Προσδιορισμός διαλυμένου οξυγόνου

33. Προσδιορίζεται η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου με τη χρήση χημικής ή ηλεκτροχημικής μεθόδου, η οποία είναι αναγνωρισμένη σε εθνικό ή διεθνές επίπεδο.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

34. Τα αναλυτικά αποτελέσματα καταγράφονται στα συνημμένα φύλλα δεδομένων (προσάρτημα 5).

35. Υπολογίζεται το BOD ως διαφορά της ελάττωσης του οξυγόνου μεταξύ του τυφλού και ενός διαλύματος της υπό δοκιμή ουσίας κάτω από τις συνθήκες της δοκιμής. Η καθαρή ελάττωση του οξυγόνου διαιρείται με τη συγκέντρωση (w/v) της ουσίας προκειμένου να εκφραστεί το BOD ως mg BOD/mg υπό δοκιμή ουσίας. Η αποικοδόμηση ορίζεται ως ο λόγος του βιοχημικά απαιτούμενου οξυγόνου, κατά προτίμηση, προς το θεωρητικά απαιτούμενο οξυγόνο (ThOD) ή προς το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD) και εκφράζεται ως ποσοστό (βλ. παράγραφο 36).

36. Υπολογίζονται οι τιμές βιοαποικοδόμησης για κάθε χρόνο δειγματοληψίας τόσο για την υπό δοκιμή ουσία όσο και για την ουσία αναφοράς με χρήση μίας από τις δύο εξισώσεις:

$$\%\ biodegradation = \frac{mg\ O_2/mg tested\ substance}{mg\ ThOD/mg tested\ substance} \times 100$$

$$\%\ biodegradation = \frac{mg\ O_2/mg tested\ substance}{mg\ COD/mg tested\ substance} \times 100$$

όπου:

ThOD = θεωρητικά απαιτούμενο οξυγόνο (υπολογισμός, προσάρτημα 3)

COD = χημικά απαιτούμενο οξυγόνο, προσδιορίζεται πειραματικά.

Σημείωση: Μερικές φορές οι δύο τρόποι υπολογισμού (ποσοστό του ThOD ή ποσοστό του COD) δεν δίνουν τα ίδια αποτελέσματα. Προτιμάται η χρήση του ThOD, επειδή μερικές ουσίες δεν οξειδώνονται πλήρως στη δοκιμή COD.

37. Η πορεία της δοκιμής αποικοδόμησης απεικονίζεται γραφικά σε μορφή διαγράμματος (βλ. παράδειγμα στην ενότητα «Εγκυρότητα και ερμηνεία των αποτελεσμάτων»). Εάν υπάρχουν επαρκή δεδομένα, υπολογίζονται από την καμπύλη βιοαποικοδόμησης η λανθάνουσα φάση (t_L) και ο χρόνος (t_{50}) μέχρι την επίτευξη 50 τοις εκατό απομάκρυνσης από το τέλος της λανθάνουσας φάσης.

38. Εάν χρησιμοποιείται ειδική ανάλυση (προαιρετική), αναφέρεται το ποσοστό της πρωτογενούς αποικοδόμησης ως το ποσοστό απομάκρυνσης της ειδικής ουσίας εντός της περιόδου δοκιμής (διορθωμένο λαμβανομένων υπόψη των τυφλών δειγμάτων της ανάλυσης).

▼M6

Έκθεση δοκιμής

39. Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Υπό δοκιμή ουσία:

— φυσική μορφή και, εφόσον έχουν σημασία, φυσικοχημικές ιδιότητες,

— στοιχεία ταυτότητας.

Συνθήκες δοκιμής:

— τοποθεσία και περιγραφή του σημείου δειγματοληψίας: κατάσταση ρύπανσης και θρεπτικών συστατικών (αριθμός αποικιών, συγκέντρωση νιτρικών, αμμωνιακών και φωσφορικών ιόντων, εάν απαιτείται),

— χαρακτηριστικά του δείγματος (ημερομηνία δειγματοληψίας, βάθος, εμφάνιση, θερμοκρασία, αλατότητα, DOC (προαιρετικό), χρόνος που μεσολάβησε μεταξύ της συλλογής και της χρήσης του δείγματος στη δοκιμή),

— μέθοδος που χρησιμοποιείται (κατά περίπτωση) για την παλαίωση του θαλάσσιου νερού,

— μέθοδος που χρησιμοποιείται για την προκατεργασία (φιλτράρισμα/καθίζηση) του θαλάσσιου νερού,

— μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του COD (εάν διεξάγεται),

— μέθοδος που χρησιμοποιείται για τις μετρήσεις οξυγόνου,

— διαδικασία διασποράς για ουσίες που είναι δυσδιάλυτες κάτω από τις συνθήκες της δοκιμής,

— μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του αριθμού των ετεροτρόφων στο θαλάσσιο νερό (μέθοδος μέτρησης της περιεκτικότητας σε βακτήρια (plate count) ή εναλλακτική διαδικασία),

— μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του DOC σε θαλάσσιο νερό (προαιρετική),

— μέθοδος που χρησιμοποιείται για ειδική ανάλυση (προαιρετική),

— άλλες προαιρετικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό του θαλάσσιου νερού (μετρήσεις ATP κ.λπ.).

Αποτελέσματα:

— αναφορά αναλυτικών δεδομένων σε φύλλο δεδομένων (σύμφωνα με το συνημμένο, προσάρτημα 5),

— η πορεία της δοκιμής αποικοδόμησης απεικονίζεται γραφικά σε μορφή διαγράμματος όπου παρουσιάζεται η λανθάνουσα φάση (t_L), η κλίση και ο χρόνος (ξεκινώντας από το τέλος της λανθάνουσας φάσης) μέχρι την επίτευξη του 50 τοις εκατό της τελικής πρόσληψης οξυγόνου που οφείλεται στην οξείδωση της υπό δοκιμή ουσίας (t_{50}). Η λανθάνουσα φάση μπορεί να εκτιμηθεί γραφικά όπως εμφανίζεται στο συνημμένο σχήμα ή μπορεί να θεωρηθεί ευκόλως ως ο χρόνος που απαιτείται για αποικοδόμηση της τάξεως του 10 τοις εκατό,

— ποσοστιαία αποικοδόμηση, μετρούμενη μετά από 28 ημέρες.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων.

Εγκυρότητα και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

40. Η αναπνοή του τυφλού δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 30 τοις εκατό του οξυγόνου στη φιάλη δοκιμής. Εάν δεν είναι εφικτή η ικανοποίηση αυτού του κριτηρίου με χρήση προσφάτως συλλεγμένου θαλάσσιου νερού, το θαλάσσιο νερό πρέπει να υποστεί παλαίωση (σταθεροποίηση) πριν από τη χρήση.

41. Θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η πιθανότητα να επηρεαστούν τα αποτελέσματα από ουσίες που περιέχουν άζωτο.

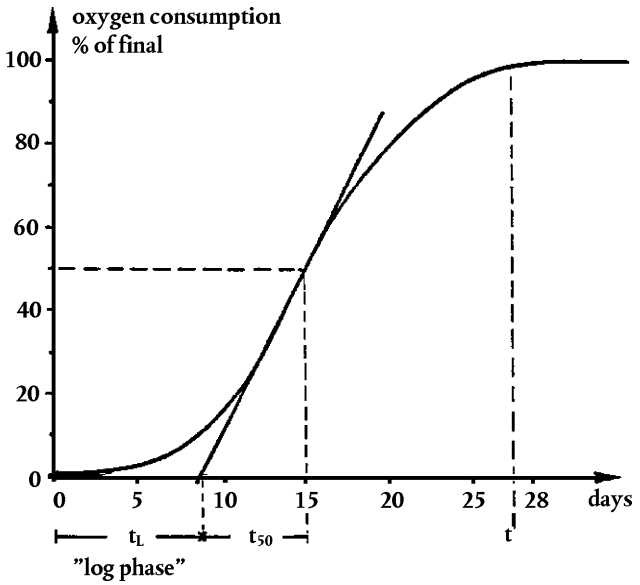
▼M6

42. Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με τις ουσίες αναφοράς, βενζοϊκό νάτριο και ανιλίνη, αναμένεται να είναι συγκρίσιμα με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από την κυκλική δοκιμή (3) (παράγραφος 9). Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με τις ουσίες αναφοράς είναι ασυνήθιστα, η δοκιμή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται με χρήση άλλου δείγματος θαλάσσιου νερού.

43. Η υπό δοκιμή ουσία μπορεί να θεωρείται ότι ασκεί ανασταλτική δράση στα βακτήρια (στη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση), εάν το BOD του μείγματος της ουσίας αναφοράς και της υπό δοκιμή ουσίας είναι χαμηλότερο από το άθροισμα των BOD των ξεχωριστών διαλυμάτων των δύο ουσιών.

44. Λόγω των σχετικά υψηλών συγκεντρώσεων δοκιμής σε σχέση με τα περισσότερα φυσικά συστήματα, και κατά συνέπεια της δυσμενούς αναλογίας μεταξύ των συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή ουσίας και άλλων πηγών άνθρακα, η μέθοδος πρέπει να θεωρείται μια προκαταρκτική δοκιμή που μπορεί να χρησιμοποιείται για να διαπιστωθεί εάν μια ουσία είναι εύκολα βιοαποικοδομήσιμη ή όχι. Αντίστοιχα, ένα χαμηλό αποτέλεσμα δεν σημαίνει απαραιτήτως ότι η υπό δοκιμή ουσία δεν είναι βιοαποικοδομήσιμη στα θαλάσσια περιβάλλοντα, αλλά υποδεικνύει ότι χρειάζεται περισσότερη εργασία προκειμένου να αποδειχθεί αυτό.

Παρακάτω παρέχεται ένα παράδειγμα ενός πειράματος θεωρητικής αποικοδόμησης όπου απεικονίζεται ένας εφικτός τρόπος εκτίμησης της τιμής t_L (διάρκεια της «λανθάνουσας φάσης») και της τιμής t_{50}, διάστημα χρόνου (ξεκινώντας από t_L) που απαιτείται για να επιτευχθεί το 50 % της τελικής πρόσληψης οξυγόνου που οφείλεται στην οξείδωση της υπό δοκιμή ουσίας:



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) de Kreuk J.F. και Hanstveit A.O. (1981). Determination of the biodegradability of the organic fraction of chemical wastes. Chemosphere, 10 (6), 561-573.

(2) Κεφάλαιο Γ.4-Β του παρόντος παραρτήματος: Προσδιορισμός «άμεσης» βιοαποικοδομησιμότητας, Μέρος ΙΙΙ, τροποποιημένη δοκιμή διαλογής του ΟΟΣΑ

(3) Nyholm N. και Kristensen P. (1987). Screening Test Methods for Assessment of Biodegradability of Chemical Substances in Seawater. Final Report of the ring test programme 1984–1985, Μάρτιος 1987, Επιτροπή των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων.

(4) Κεφάλαιο Γ.11 του παρόντος παραρτήματος: Βιοαποικοδόμηση — Δοκιμή αναστολής αναπνοής ενεργοποιημένης ιλύος.

(5) Κεφάλαιο Γ.4-Ε του παρόντος παραρτήματος: Προσδιορισμός «άμεσης» βιοαποικοδομησιμότητας, Μέρος VI. Δοκιμή κλειστής φιάλης.

▼M6

Προσάρτημα 1

Προσδιορισμός οργανικού άνθρακα σε θαλάσσιο ΝΕΡΟ

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΚΙΝΟΥΜΕΝΗΣ ΦΙΑΛΗΣ

Για τον προσδιορισμό του οργανικού άνθρακα ενός δείγματος νερού, οι οργανικές ενώσεις στο δείγμα οξειδώνονται προς διοξείδιο του άνθρακα μέσω γενικά μίας από τις ακόλουθες τρεις τεχνικές:

— υγρή οξείδωση μέσω υπερθειικού/υπεριώδους ακτινοβολίας,

— υγρή οξείδωση μέσω υπερθειικού/αυξημένης θερμοκρασίας (116-130 °C),

— καύση.

Το εκλυόμενο CO_2 προσδιορίζεται ποσοτικά με την εφαρμογή υπέρυθρης φασματομετρίας ή ογκομετρίας. Εναλλακτικά, το CO_2 ανάγεται σε μεθάνιο, το οποίο προσδιορίζεται ποσοτικά σε ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID).

Η μέθοδος υπερθειικού/υπεριώδους ακτινοβολίας χρησιμοποιείται συχνά για την ανάλυση «καθαρού» νερού με χαμηλή περιεκτικότητα σε σωματίδια. Οι τελευταίες δύο μέθοδοι μπορούν να εφαρμόζονται στα περισσότερα είδη δειγμάτων νερού, με τη μέθοδο οξείδωσης μέσω υπερθειικού/αυξημένης θερμοκρασίας να είναι καταλληλότερη για δείγματα χαμηλού επιπέδου και την τεχνική καύσης να μπορεί να εφαρμοστεί για δείγματα με περιεκτικότητα σε μη πτητικό οργανικό άνθρακα (NVOC) πολύ πάνω από 1 mg C/l.

Παρεμβολές

Και οι τρεις μέθοδοι εξαρτώνται από την απομάκρυνση ή την αναπλήρωση του ανόργανου άνθρακα (IC) που υπάρχει στο δείγμα. Ο καθαρισμός του CO_2 από το δείγμα που έχει υποστεί οξίνιση αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδο για την απομάκρυνση του IC. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή έχει ως αποτέλεσμα και την απώλεια πτητικών οργανικών ενώσεων (1). Η πλήρης απομάκρυνση ή αναπλήρωση του IC πρέπει να εξασφαλίζεται για κάθε μήτρα δείγματος, ενώ πρέπει να προσδιορίζεται ο πτητικός οργανικός άνθρακας (VOC) επιπλέον του NVOC ανάλογα με τον τύπο του δείγματος.

Οι υψηλές συγκεντρώσεις χλωριδίων έχουν ως αποτέλεσμα μειωμένη αποτελεσματικότητα της οξείδωσης με τη μέθοδο υπερθειικού/UV (2). Η εφαρμογή ενός οξειδωτικού αντιδραστηρίου τροποποιημένου με την προσθήκη νιτρικού υδραργύρου (II) ενδέχεται, ωστόσο, να απομακρύνει αυτή την παρεμβολή. Συνιστάται να χρησιμοποιείται ο μέγιστος ανεκτός όγκος δείγματος για την αξιολόγηση κάθε τύπου δείγματος που περιέχει χλωριούχα. Οι υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων στο δείγμα που αναλύεται με τη μέθοδο καύσης μπορεί να προκαλέσουν επικάλυψη του καταλύτη με άλατα και υπερβολική διάβρωση του σωλήνα καύσης. Θα πρέπει να λαμβάνονται προφυλάξεις σύμφωνα με το εγχειρίδιο του παρασκευαστή.

Δείγματα υψηλής θολερότητας, καθώς και δείγματα που περιέχουν σωματίδια, ενδέχεται να οξειδωθούν ατελώς όταν εφαρμόζεται η μέθοδος υπερθειικού/UV.

Παράδειγμα κατάλληλης μεθόδου

Ο μη πτητικός οργανικός άνθρακας προσδιορίζεται μέσω οξείδωσης με τη μέθοδο υπερθειικού/υπεριώδους ακτινοβολίας και επακόλουθο ποσοτικό προσδιορισμό του εκλυόμενου CO_2 με την εφαρμογή υπέρυθρης φασματομετρίας χωρίς διάχυση.

Το αντιδραστήριο οξείδωσης τροποποιείται σύμφωνα με τις υποδείξεις που δίνονται στο σημείο (2), όπως περιγράφεται στο εγχειρίδιο του παρασκευαστή:

α) 8,2 g $HgCl_2$ και 9,6 g $Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$ διαλύονται σε μερικές εκατοντάδες χιλιοστόλιτρα νερού αντίδρασης χαμηλής συγκέντρωσης σε άνθρακα.

β) 20 g $K_2S_2O_8$ διαλύονται στο διάλυμα υδραργυρικού άλατος.

▼**M6**

γ) 5 ml HNO_3 (πυκνό) προστίθενται στο μείγμα.

δ) το αντιδραστήριο διαλύεται στα 1 000 ml.

Η παρεμβολή από το χλωρίδιο απομακρύνεται με τη χρήση όγκου δείγματος 40 μl για το 10 τοις εκατό του χλωριδίου και όγκου δείγματος 200 μl για το 1,9 τοις εκατό του χλωριδίου. Δείγματα με υψηλές συγκεντρώσεις σε χλωρίδιο ή/και μεγαλύτεροι όγκοι δείγματος μπορούν να αναλύονται σύμφωνα με αυτήν τη μέθοδο, με την προϋπόθεση ότι αποτρέπεται η συσσώρευση χλωριδίων στο δοχείο οξείδωσης. Στη συνέχεια, είναι δυνατός ο προσδιορισμός του πτητικού οργανικού άνθρακα, εφόσον ισχύει, για τον υπό εξέταση τύπο δείγματος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) ISO, Water quality — determination of total organic carbon. Draft International Standard ISO/DIS 8245, 16 Ιανουαρίου 1986.

(2) American Public Health Association, Standard Methods for the Estimation of Water and Wastewater. American Water Works Association & Water Pollution Control Federation, 16η έκδοση, 1985.

Ανάλογου ενδιαφέροντος (παρέχεται μια περιγραφή ενός συστήματος αυτοανάλυσης):

(3) Schreurs W. (1978). An automated colorimetric method for the determination of dissolved organic carbon in seawater by UV destruction. Hydrobiological Bulletin 12, 137-142.

▼**M6**

Προσάρτημα 2

Βιοαποικοδομηση σε θαλάσσιο ΝΕΡΟ

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΚΙΝΟΥΜΕΝΗΣ ΦΙΑΛΗΣ

ΦΥΛΛΟ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

1. **ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ:**

2. **ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΝΑΡΞΗΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ:**

3. **ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ:**

Ονομασία:

Συγκέντρωση διαλύματος παρακαταθήκης:	mg/l ως ουσία
Αρχική συγκέντρωση στο μέσο, t_o:	mg/l ως ουσία
	mg DOC/l

4. **ΘΑΛΛΑΣΙΟ ΝΕΡΟ:**

Πηγή:

Ημερομηνία συλλογής:

Βάθος από το οποίο έχει συλλεγεί το δείγμα:

Εμφάνιση κατά τον χρόνο της συλλογής (π.χ. θολό κ.λπ.):

Αλατότητα κατά τη συλλογή:	‰
Θερμοκρασία κατά τη συλλογή:	°C
DOC «x» ώρες μετά τη συλλογή:	mg/l

Προκατεργασία πριν από τη δοκιμή (πχ. διήθηση, καθίζηση, παλαίωση κ.λπ.):

Αριθμός μικροβιακών αποικιών	— αρχικό δείγμα:	αποικίες/ml
	— στην αρχή της δοκιμής:	αποικίες/ml

Λοιπά χαρακτηριστικά:

5. **ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ ΑΝΘΡΑΚΑ:**

Αναλυτής άνθρακα:

	Αρ. φιάλης.		DOC μετά από n ημέρες (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Δοκιμή: θαλάσσιο νερό εμπλουτισμένο με θρεπτικά συστατικά με την υπό δοκιμή ουσία	1	a_1					
		a_2					
		μέση τιμή, $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		μέση τιμή, $C_{b(t)}$					

▼**M6**

	Αρ. φιάλης.		DOC μετά από n ημέρες (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Τυφλό: θαλάσσιο νερό εμπλουτισμένο με θρεπτικά συστατικά χωρίς την υπό δοκιμή ουσία	1	c_1					
		c_2					
		μέση τιμή, $C_{c(t)}$					
	2	d_1					
		d_2					
		μέση τιμή, $C_{d(t)}$					
	μέση τιμή, $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΝΕΠΕΞΕΡΓΑΣΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ:**

Αρ. φιάλης	Υπολογισμός των αποτελεσμάτων	% αποικοδόμησης μετά από n ημέρες				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = 1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
2	$D_2 = 1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
Μέση τιμή (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(*) Τα D_1 και D_2 δεν θα πρέπει να παράγουν μέσο όρο αν υπάρχει ανάμεσά τους σοβαρή διαφορά.

Σημείωση: Παρόμοιες διατάξεις μπορούν να χρησιμοποιούνται όταν μετά την αποικοδόμηση ακολουθεί ειδική ανάλυση, καθώς και για την ουσία αναφοράς και τους μάρτυρες τοξικότητας.

7. **ΑΒΙΟΤΙΚΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ (προαιρετική)**

	Χρόνος (ημέρες)	
	0	t
Συγκέντρωση DOC (mg/l) σε στείρο μάρτυρα	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \ abiotic \ degradation = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

▼**M6**

Προσάρτημα 3

Υπολογισμός του θεωρητικά βιοχημικών απαιτουμένου οξυγόνου

ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΛΕΙΣΤΗΣ ΦΙΑΛΗΣ

Το ThOD της ουσίας $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ με μοριακό βάρος MW υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$ThOD_{NH3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

Ο υπολογισμός αυτός σημαίνει ότι ο C ανοργανοποιείται σε CO_2, το H σε H_2O, ο P σε P_2O_5 και το Na σε Na_2O. Το αλογόνο απομακρύνεται ως υδραλογόνο και το άζωτο ως αμμωνία.

Παράδειγμα:

Γλυκόζη $C_6H_{12}O_6$, MW = 180

$$ThOD = \frac{16\left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6\right)}{180} = 1{,}07 \ \ mg\ O_2/mg\ glucose$$

Τα μοριακά βάρη των αλάτων, πλην των αλκαλικών μετάλλων, υπολογίζονται με την υπόθεση ότι τα άλατα έχουν υδρολυθεί.

Το θείο θεωρείται ότι έχει οξειδωθεί στην κατάσταση + 6.

Παράδειγμα:

n-δωδεκαβενζολοσουλφονικό νάτριο $C_{18}H_{29}SO_3Na$, MW = 348

$$ThOD = \frac{16\left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3\right)}{348} = 2{,}34 \ \ mg\ O_2/mg\ substance$$

Στην περίπτωση ουσιών που περιέχουν άζωτο, το άζωτο μπορεί να απομακρύνεται ως αμμωνία, νιτρώδεις ενώσεις ή νιτρικές ενώσεις που αντιστοιχούν σε διαφορετικό θεωρητικά βιοχημικώς απαιτούμενο οξυγόνο.

$$ThOD_{NO2} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2^n} + \frac{5}{2_p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2^n} + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

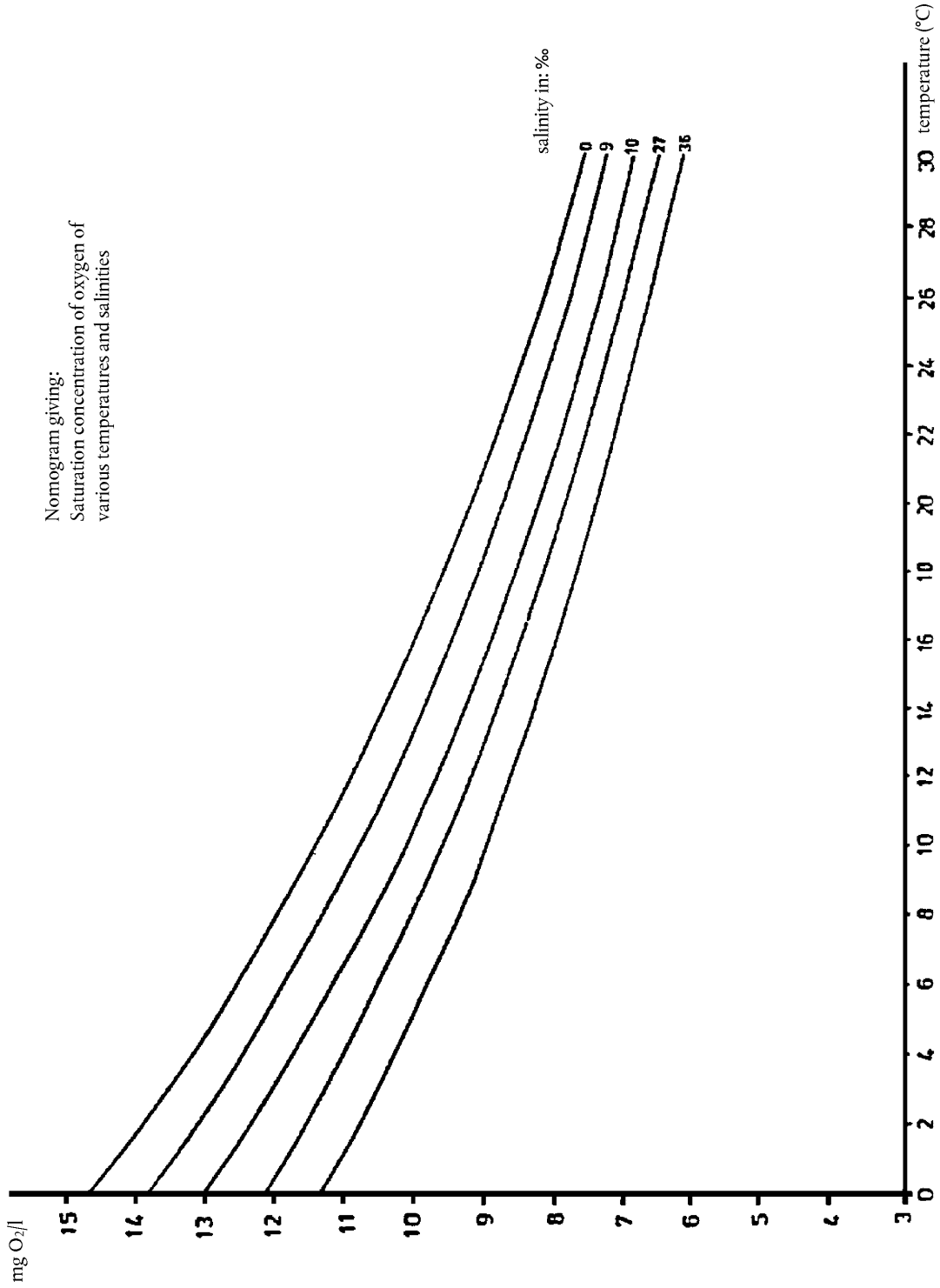
Γίνεται η υπόθεση ότι παρατηρήθηκε μέσω ανάλυσης πλήρης σχηματισμός νιτρικών στην περίπτωση μιας δευτεροταγούς αμίνης:

$(C_{12}H_{25})_2$ NH, MW = 353

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2}\right)}{353} = 3{,}44 \ \ mg\ O_2/mg\ substance$$

▼**M6**

Προσάρτημα 4



▼**M6**

Προσάρτημα 5

Βιοαποικοδομηση σε θαλάσσιο ΝΕΡΟ

ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΛΕΙΣΤΗΣ ΦΙΑΛΗΣ

ΦΥΛΛΟ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

1. **ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ:**

2. **ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΝΑΡΞΗΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ:**

3. **ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ:**

Ονομασία:

Συγκέντρωση διαλύματος παρακαταθήκης:	mg/l
Αρχική συγκέντρωση στο μέσο θαλάσσιου νερού:	mg/l
ThOD ή COD:	mg O_2/mg υπό δοκιμή ουσίας

4. **ΘΑΛΛΑΣΙΟ ΝΕΡΟ:**

Πηγή:

Ημερομηνία συλλογής:

Βάθος από το οποίο έχει συλλεγεί το δείγμα:

Εμφάνιση κατά τον χρόνο της συλλογής (π.χ. θολό κ.λπ.):

Αλατότητα κατά τη συλλογή:	‰
Θερμοκρασία κατά τη συλλογή:	°C
DOC «x» ώρες μετά τη συλλογή:	mg/l

Προκατεργασία πριν από τη δοκιμή (πχ. διήθηση, καθίζηση, παλαίωση κ.λπ.):

Αριθμός μικροβιακών αποικιών	— αρχικό δείγμα:	αποικίες/ml
	— στην αρχή της δοκιμής:	αποικίες/ml

Λοιπά χαρακτηριστικά:

5. **ΜΕΣΟ ΔΟΚΙΜΗΣ:**

Θερμοκρασία μετά τον αερισμό:	°C
Συγκέντρωση O_2 μετά τον αερισμό και σε ηρεμία πριν από την έναρξη της δοκιμής:	mg O_2/l

6. **ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ DO:**

Μέθοδος: Winkler/ηλεκτρόδιο

	Αρ. φιάλης		mg O_2/l μετά από n ημέρες			
			0	5	15	28
Δοκιμή: Θαλάσσιο νερό εμπλουτισμένο με θρεπτικά συστατικά με την υπό δοκιμή ουσία	1	a_1				
	2	a_2				
	Μέση τιμή δοκιμής	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

▼**M6**

	Αρ. φιάλης		mg O_2/l μετά από n ημέρες			
			0	5	15	28
Τυφλό: Θαλάσσιο νερό εμπλουτισμένο με θρεπτικά συστατικά, αλλά χωρίς την υπό δοκιμή ουσία	1	c_1				
	2	c_2				
	Μέση τιμή τυφλού	$m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$				

Σημείωση: Παρόμοια διάταξη μπορεί να χρησιμοποιείται για την ουσία αναφοράς και τους μάρτυρες τοξικότητας.

7. **ΕΛΑΤΤΩΣΗ DO: % ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ (%D):**

	Ελάττωση DO μετά από n ημέρες		
	5	15	28
$(m_b - m_t)$ [1]			
$\%D = \frac{(m_b - m_t)(1)}{test\ substance(mg/l) \times ThOD} \times 100$			

[1] (Γίνεται υπόθεση ότι $m_{b(o)} = m_{t(o)}$, όπου
$m_{b(o)}$ = τιμή τυφλού την ημέρα 0,
$m_{t(o)}$ = τιμή υπό δοκιμή ουσίας την ημέρα 0.
Εάν το $m_{b(o)}$ δεν ισούται με το $m_{t(o)}$, χρησιμοποιείται $(m_{t(o)} — m_{t(x)}) — (m_{b(o)} — m_{b(x)})$, όπου
$m_{b(x)}$ = τιμή τυφλού την ημέρα x,
$m_{t(x)}$ = τιμή υπό δοκιμή ουσίας την ημέρα x.

▼M6

Γ.43. ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΧΩΝΕΥΜΕΝΗ ΙΛΥ: ΜΕΣΩ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΑΕΡΙΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 311 του ΟΟΣΑ (2006). Υπάρχουν πολλές δοκιμές διαλογής για την εκτίμηση της αερόβιας βιοαποικοδομησιμότητας οργανικών ουσιών (μέθοδοι δοκιμών Γ.4, Γ.9, Γ.10 και Γ.11 (1) και κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 302C του ΟΟΣΑ (2)) και τα αποτελέσματα από την εφαρμογή τους έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για να προβλεφθεί η τύχη ουσιών στο αερόβιο περιβάλλον, ιδίως στα αερόβια στάδια της επεξεργασίας λυμάτων. Διάφορες αναλογίες αδιάλυτων στο νερό ουσιών, καθώς και των ουσιών που προσροφώνται σε στερεά λύματα, υπόκεινται επίσης σε αερόβια επεξεργασία, καθώς οι ουσίες αυτές υπάρχουν σε καθιζημένα λύματα. Ωστόσο, τα μεγαλύτερα κλάσματα αυτών των ουσιών δεσμεύονται στην πρωτογενή καθιζημένη ιλύ, η οποία διαχωρίζεται από τα ανεπεξέργαστα λύματα στις δεξαμενές καθίζησης, πριν από την αερόβια επεξεργασία των καθιζημένων ή υπερκείμενων λυμάτων. Κατόπιν η ιλύς, η οποία περιέχει κάποιες από τις διαλυτές ουσίες στο διάμεσο υγρό, προωθείται σε θερμαινόμενα χωνευτήρια για αναερόβια επεξεργασία. Καθώς δεν υπάρχουν ακόμη δοκιμές σε αυτήν τη σειρά για την εκτίμηση της αναερόβιας βιοαποικοδομησιμότητας σε αναερόβια χωνευτήρια και δεδομένου ότι στόχος αυτής της δοκιμής είναι να καλύψει αυτό το κενό, η παρούσα δοκιμή δεν εφαρμόζεται απαραίτητα σε άλλα ανοξικά περιβαλλοντικά διαμερίσματα.

2. Για την εκτίμηση της αναερόβιας βιοαποικοδομησιμότητας έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς αναπνευσιομετρικές τεχνικές που μετρούν τις ποσότητες των παραγόμενων αερίων, κυρίως του μεθανίου (CH_4) και του διοξειδίου του άνθρακα (CO_2), κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Οι Birch κ.α. (3) εξέτασαν αυτές τις διαδικασίες και κατέληξαν ότι η εργασία των Shelton και Tiedje (4), που βασίστηκε σε προηγούμενες μελέτες (5)(6)(7), ήταν η πιο περιεκτική. Η μέθοδος (4), η οποία αναπτύχθηκε περαιτέρω από άλλους ερευνητές (8) και οδήγησε στα αμερικανικά πρότυπα (9) (10), δεν έδωσε λύση στα προβλήματα που σχετίζονται με τις διαφορετικές διαλυτότητες του CO_2 και του CH_4 στο μέσο δοκιμής και τον υπολογισμό της θεωρητικής παραγωγής αερίων μιας υπό δοκιμή ουσίας. Σύμφωνα με την έκθεση ECETOC (3), προτάθηκε να μετράται επιπλέον η περιεκτικότητα του υπερκείμενου υγρού σε διαλυμένο ανόργανο άνθρακα (DIC), γεγονός που κατέστησε δυνατή την εφαρμογή της τεχνικής σε ευρύτερο πεδίο. Η μέθοδος ECETOC υποβλήθηκε σε μια διεθνή διαδικασία βαθμονόμησης (ή κυκλική δοκιμή) και έγινε το πρότυπο ISO 11734 (11).

3. Αυτή η μέθοδος δοκιμών, που βασίζεται στο πρότυπο ISO 11734 (11), περιγράφει μια μέθοδο διαλογής για την αξιολόγηση της δυνητικής αναερόβιας βιοαποικοδομησιμότητας οργανικών ουσιών υπό συγκεκριμένες συνθήκες (δηλ. σε ένα αναερόβιο χωνευτήριο σε μια δεδομένη χρονική στιγμή και περιοχή συγκέντρωσης μικροοργανισμών). Καθώς χρησιμοποιείται αραιωμένη ιλύς με σχετικά υψηλή συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας και η διάρκεια της δοκιμής είναι, κατά κανόνα, μεγαλύτερη από τον χρόνο παραμονής στα αναερόβια χωνευτήρια, οι συνθήκες της δοκιμής δεν ανταποκρίνονται απαραίτητα στις συνθήκες των αναερόβιων χωνευτηρίων, ούτε μπορεί να εφαρμοστεί η δοκιμή για την εκτίμηση της αναερόβιας βιοαποικοδομησιμότητας οργανικών ουσιών υπό διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Η ιλύς εκτίθεται στην υπό δοκιμή ουσία για έως 60 ημέρες, διάρκεια η οποία είναι μεγαλύτερη από τον κανονικό χρόνο παραμονής της ιλύος (25 έως 30 ημέρες) στα αναερόβια χωνευτήρια, ενώ σε βιομηχανικές εγκαταστάσεις οι χρόνοι παραμονής ενδέχεται να είναι πολύ μεγαλύτεροι. Δεν είναι δυνατό να γίνουν προβλέψεις από τα αποτελέσματα αυτής της δοκιμής όσο πειστικά μπορούν να γίνουν στην περίπτωση της αερόβιας αποικοδόμησης, επειδή οι ενδείξεις που προκύπτουν για τη συμπεριφορά των υπό δοκιμή ουσιών σε «άμεσες» αερόβιες δοκιμές και δοκιμές προσομοίωσης, καθώς και για το αερόβιο περιβάλλον επαρκούν μόνο για να στηρίξουν με βεβαιότητα ότι υπάρχει μια σχέση. Παρόμοιες ενδείξεις για το αναερόβιο περιβάλλον είναι περιορισμένες. Μπορεί να θεωρηθεί ότι προέκυψε πλήρης αναερόβια βιοαποικοδόμηση εάν επιτευχθεί το 75 %-80 % της θεωρητικής παραγωγής αερίων. Οι υψηλές αναλογίες ουσίας προς βιομάζα που χρησιμοποιούνται σε αυτές τις

▼M6

δοκιμές σημαίνουν ότι μια διερχόμενη ουσία είναι πιο πιθανό να αποικοδομηθεί σε ένα αναερόβιο χωνευτήριο. Επιπλέον, οι ουσίες που δεν μετατρέπονται σε αέριο στη δοκιμή δεν είναι απαραίτητο ότι θα παραμείνουν σε πιο ρεαλιστικές περιβαλλοντικά αναλογίες ουσίας προς βιομάζα. Επίσης, λαμβάνουν χώρα άλλες αναερόβιες αντιδράσεις με τις οποίες οι ουσίες μπορεί να υποστούν τουλάχιστον μερική αποικοδόμηση, π.χ. μέσω αποχλωρίωσης, αλλά η παρούσα δοκιμή δεν ανιχνεύει τις εν λόγω αντιδράσεις. Ωστόσο, με την εφαρμογή ειδικών αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό της υπό δοκιμή ουσίας, ενδέχεται να είναι δυνατή η παρακολούθηση της εξαφάνισής της (βλ. παραγράφους 6, 30, 44 και 53).

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

4. Πλυμένη χωνευμένη ιλύς ([1]), που περιέχει χαμηλές συγκεντρώσεις (< 10 mg/l) ανόργανου άνθρακα (IC), αραιώνεται κατά περίπου 10 φορές σε συγκέντρωση ολικών στερεών της τάξεως των 1 g/l έως 3 g/l και επωάζεται στους 35 °C ± 2 °C σε σφραγισμένα δοχεία με την υπό δοκιμή ουσία σε συγκέντρωση από 20 έως 100 mg C/l για έως 60 ημέρες. Παρέχεται η δυνατότητα μέτρησης της δραστηριότητας της ιλύος, με παράλληλη εκτέλεση τυφλών μαρτύρων με εμβόλιο ιλύος στο μέσο αλλά χωρίς την υπό δοκιμή ουσία.

5. Μετριέται η αύξηση της πίεσης του υπερκείμενου χώρου στα δοχεία που είναι το αποτέλεσμα της παραγωγής διοξειδίου του άνθρακα και μεθανίου. Ένα μεγάλο μέρος του παραγόμενου CO_2 θα διαλυθεί στην υγρή φάση ή θα μετατραπεί σε ανθρακικές ή όξινες ανθρακικές ενώσεις κάτω από τις συνθήκες της δοκιμής. Αυτός ο ανόργανος άνθρακας μετράται στο τέλος της δοκιμής.

6. Η ποσότητα του άνθρακα (ανόργανος άνθρακας συν μεθάνιο) που προκύπτει από τη βιοαποικοδόμηση της υπό δοκιμή ουσίας υπολογίζεται από την καθαρή παραγωγή αερίου και τον καθαρό σχηματισμό IC στην υγρή φάση που υπερβαίνουν τις τιμές του τυφλού μάρτυρα. Ο βαθμός της βιοαποικοδόμησης υπολογίζεται από το συνολικό IC και μεθάνιο-C που παράγεται ως ποσοστό της μετρηθείσας ή υπολογισθείσας ποσότητας άνθρακα που προστίθεται ως υπό δοκιμή ουσία. Η παρακολούθηση της πορείας της βιοαποικοδόμησης μπορεί να πραγματοποιείται μόνο με τη λήψη ενδιάμεσων μετρήσεων της παραγωγής αερίων. Επιπλέον, η πρωτογενής βιοαποικοδόμηση μπορεί να προσδιορίζεται με ειδικές αναλύσεις στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ

7. Για να είναι δυνατή η ορθή ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει να είναι γνωστά τα χαρακτηριστικά καθαρότητας, υδατοδιαλυτότητας, πτητικότητας και προσρόφησης της υπό δοκιμή ουσίας. Η περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (% w/w) της υπό δοκιμή ουσίας πρέπει να είναι γνωστή, είτε από τη χημική δομή της είτε με μέτρηση. Για πτητικές υπό δοκιμή ουσίες, είναι χρήσιμη η μέτρηση ή ο υπολογισμός της σταθεράς του Νόμου του Henry προκειμένου να αποφασίζεται εάν η δοκιμή μπορεί να εφαρμοστεί. Οι πληροφορίες σχετικά με την τοξικότητα της υπό δοκιμή ουσίας στα αναερόβια βακτήρια είναι χρήσιμες για την επιλογή μιας κατάλληλης συγκέντρωσης δοκιμής, καθώς και για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων που παρουσιάζουν ανεπαρκή βιοαποικοδομησιμότητα. Συνιστάται να περιλαμβάνεται ο μάρτυρας αναστολής, εκτός εάν είναι γνωστό ότι η υπό δοκιμή ουσία δεν είναι ανασταλτική στην αναερόβια μικροβιακή δραστηριότητα (βλ. παράγραφο 21 και ISO 13641-1 (12)).

([1]) Η χωνευμένη ιλύς είναι ένα μείγμα των καθιζημένων φάσεων των λυμάτων και της ενεργοποιημένης ιλύος, τα οποία έχουν επωαστεί σε αναερόβιο χωνευτήριο στους 35 °C περίπου για τη μείωση της βιομάζας και των προβλημάτων δυσωδίας, καθώς και για τη βελτίωση της δυνατότητας αφυδάτωσης της ιλύος. Αποτελείται από μια ομάδα αναερόβιων ζυμωτικών και μεθανογόνων βακτηρίων που παράγουν διοξείδιο του άνθρακα και μεθάνιο (11).

▼**M6**

ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

8. Η μέθοδος δοκιμών μπορεί να εφαρμόζεται σε υδατοδιαλυτές ουσίες. Ωστόσο, μπορεί να εφαρμόζεται επίσης σε δυσδιάλυτες και αδιάλυτες ουσίες, υπό την προϋπόθεση ότι χρησιμοποιείται μια μέθοδος ακριβούς δοσολογίας π.χ. βλ. ISO 10634 (13). Γενικά, για πτητικές ουσίες η απόφαση λαμβάνεται κατά περίπτωση. Ενδεχομένως να πρέπει να τηρούνται ειδικά μέτρα, για παράδειγμα να μην εκλύεται αέριο κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

9. Για τον έλεγχο της διαδικασίας, υποβάλλεται σε δοκιμή μια ουσία αναφοράς με την προετοιμασία κατάλληλων δοχείων τα οποία εκτελούνται παράλληλα ως μέρος των κανονικών εκτελέσεων της δοκιμής. Η φαινόλη, το βενζοϊκό νάτριο και η πολυαιθυλενογλυκόλη 400 αποτελούν μερικά παραδείγματα και αναμένεται να αποικοδομούνται κατά περισσότερο από 60 % της θεωρητικής παραγωγής αερίου (δηλ. μεθανίου και ανόργανου άνθρακα) εντός 60 ημερών (3) (14).

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

10. Σε μια διεθνή κυκλική δοκιμή (14), η αναπαραγωγιμότητα των μετρήσεων της πίεσης αερίου μεταξύ των τριπλών δοχείων ήταν καλή. Η σχετική τυπική απόκλιση (συντελεστής μεταβλητότητας, COV) ήταν κυρίως κάτω από 20 %, ωστόσο παρουσία τοξικών ουσιών ή προς το τέλος της περιόδου επώασης των 60 ημερών η τιμή αυτή συχνά παρουσίαζε αύξηση σε > 20 %. Υψηλότερες αποκλίσεις βρέθηκαν επίσης σε δοχεία με όγκο < 150 ml. Οι τελικές τιμές pH του μέσου δοκιμής ήταν από 6,5 έως 7,0.

11. Στην κυκλική δοκιμή λήφθηκαν τα ακόλουθα αποτελέσματα.

Υπό δοκιμή ουσία	Συνολικά δεδομένα n_1	Μέση αποικοδόμηση (των συνολικών δεδομένων) (%)	Σχετική τυπική απόκλιση (των συνολικών δεδομένων) (%)	Έγκυρα δεδομένα n_2	Μέση αποικοδόμηση (των έγκυρων δεδομένων) (%)	Σχετική τυπική απόκλιση (των έγκυρων δεδομένων) (%)	Δεδομένα > 60 % αποικοδόμηση σε έγκυρες δοκιμές n_3
Παλμιτικό οξύ	36	68,7 ± 30,7	45	27	72,2 ± 18,8	26	19 = 70 % (*)
Πολυαιθυλενογλυκόλη 400	38	79,8 ± 28,0	35	29	77,7 ± 17,8	23	24 = 83 % (*)

(*) Ποσοστό του n_2

12. Οι συντελεστές μεταβλητότητας της μέσης τιμής για όλες τις τιμές που ελήφθησαν με το παλμιτικό οξύ και την πολυαιθυλενογλυκόλη 400 ήταν υψηλοί έως 45 % (n = 36) και 35 % (n = 38) αντίστοιχα. Όταν παραλείπονταν οι τιμές < 40 % και > 100 % (η πρώτη τιμή θεωρείται οφειλόμενη σε μη βέλτιστες συνθήκες και η δεύτερη σε άγνωστα αίτια), οι COV μειώνονταν σε 26 % και 23 %, αντίστοιχα. Τα ποσοστά των «έγκυρων» τιμών με τουλάχιστον 60 % αποικοδόμηση ήταν 70 % για το παλμιτικό οξύ και 83 % για την πολυαιθυλενογλυκόλη 400. Οι αναλογίες της ποσοστιαίας βιοαποικοδόμησης που προέκυψαν από τις μετρήσεις DIC ήταν σχετικά χαμηλές αλλά μεταβλητές. Για το παλμιτικό οξύ, το εύρος ήταν 0-35 %, η μέση τιμή 12 %, με COV 92 % και για την πολυαιθυλενογλυκόλη 400 το εύρος ήταν 0-40 %, η μέση τιμή 24 %, με COV 54 %.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Συσκευές

13. Απαιτείται συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός και τα ακόλουθα:

α) Επωαστήρας — ανθεκτικός στους σπινθήρες και με ελεγχόμενη θερμοκρασία στους 35 °C ± 2 °C,

▼M6

β) Γυάλινα δοχεία δοκιμήςανθεκτικάστην πίεση, κατάλληλου ονομαστικού μεγέθους ([1]), εκ των οποίων το καθένα διαθέτει αεροστεγές διάφραγμα που αντέχει στα 2 bar περίπου. Ο όγκος του υπερκείμενου χώρου θα πρέπει να καταλαμβάνει περίπου το 10 % έως 30 % του συνολικού όγκου. Εάν εκλύεται βιοαέριο ανά τακτά χρονικά διαστήματα, ενδείκνυται ο υπερκείμενος χώρος να καταλαμβάνει περίπου το 10 %, ενώ εάν η έκλυση του αερίου πραγματοποιείται μόνο στο τέλος της δοκιμής ενδείκνυται να καταλαμβάνει το 30 %. Όταν η πίεση απελευθερώνεται σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας, συνιστάται η χρήση γυάλινων φιαλών ορού με ονομαστικό όγκο 125 ml και συνολικό όγκο περίπου 160 ml, σφραγισμένων με διαφράγματα ([2]) και επιπώματα από αλουμίνιο,

γ) Διάταξη μέτρησης της πίεσης ([3]) προσαρμοσμένη ώστε να παρέχει τη δυνατότητα μέτρησης και εκτόνωσης του παραγόμενου αερίου, για παράδειγμα ένας χειροκατευθυνόμενος μετρητής πίεσης ακριβείας συνδεδεμένος σε κατάλληλη βελόνα σύριγγας. Μια τριοδική αεροστεγανή βαλβίδα διευκολύνει την απελευθέρωση της υπερπίεσης (προσάρτημα 1). Ο εσωτερικός όγκος της σωλήνωσης και της βαλβίδας του μεταδότη πίεσης πρέπει να διατηρείται όσο το δυνατό χαμηλότερος, ώστε τα σφάλματα που προκαλούνται λόγω μη υπολογισμού του όγκου του εξοπλισμού να είναι ασήμαντα,

Σημείωση — Οι ενδείξεις πίεσης χρησιμοποιούνται απευθείας για τον υπολογισμό της ποσότητας του άνθρακα που παράγεται στον υπερκείμενο χώρο (παράγραφοι 42 έως 44). Εναλλακτικά, οι ενδείξεις πίεσης μπορούν να μετατρέπονται σε όγκους (στους 35° C, ατμοσφαιρική πίεση) παραγόμενου αερίου με τη χρήση ενός διαγράμματος μετατροπής. Το διάγραμμα αυτό δημιουργείται από δεδομένα που λαμβάνονται από την έγχυση γνωστών όγκων αερίου αζώτου σε μια σειρά από δοχεία δοκιμής (π.χ. φιάλες ορού) στους 35° +/- 2°C και την καταγραφή των σταθεροποιημένων ενδείξεων πίεσης που προκύπτουν (βλ. προσάρτημα 2). Ο υπολογισμός φαίνεται στη σημείωση της παραγράφου 44.

Προειδοποίηση — Πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγονται οι τραυματισμοί από τη βελόνα κατά τη χρήση μικροσύριγγας.

δ) Αναλυτής άνθρακα, κατάλληλος για τον άμεσο προσδιορισμό ανόργανου άνθρακα μεταξύ 1 mg/l και 200 mg/l,

ε) Σύριγγες μεγάλης ακρίβειας για αέρια και υγρά δείγματα,

στ) Μαγνητικοί αναδευτήρες και ράβδοι (προαιρετικά),

ζ) Συσκευή με χειριστήρια (glove box) (συνιστάται).

Αντιδραστήρια

14. Χρησιμοποιούνται αντιδραστήρια αναλυτικής καθαρότητας σε όλη τη δοκιμή.

([1]) Το συνιστώμενο μέγεθος είναι από 0,1 έως 1 λίτρο.

([2]) Συνιστάται η χρήση αεροστεγούς διαφράγματος σιλικόνης. Συνιστάται επίσης να ελέγχεται η αεροστεγανότητα των πωμάτων, ιδίως των διαφραγμάτων από βουτυλοκαουτσούκ, επειδή ορισμένα διαφράγματα που διατίθενται στο εμπόριο δεν είναι επαρκώς αεροστεγή έναντι του μεθανίου και μερικά διαφράγματα δεν παραμένουν στεγανά όταν υφίστανται διάτρηση με βελόνα κάτω από τις συνθήκες της δοκιμής.

([3]) Η διάταξη θα πρέπει να χρησιμοποιείται και να βαθμονομείται σε τακτά διαστήματα, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Εάν χρησιμοποιείται μετρητής πίεσης της προβλεπόμενης ποιότητας, π.χ. με περίβλημα από ατσάλινη μεμβράνη, δεν απαιτείται βαθμονόμηση στο εργαστήριο. Η ακρίβεια της βαθμονόμησης μπορεί να ελέγχεται στο εργαστήριο με τη μέτρηση ενός σημείου στα 1×10^5 Pa σε σύγκριση με έναν μετρητή πίεσης με μηχανική ένδειξη. Όταν το σημείο αυτό μετρηθεί με ακρίβεια, η γραμμικότητα θα είναι επίσης αμετάβλητη. Εάν χρησιμοποιούνται άλλες διατάξεις μέτρησης (χωρίς πιστοποιημένη βαθμονόμηση από τον κατασκευαστή), συνιστάται να διεξάγεται βαθμονόμηση στο σύνολο των διατάξεων ανά τακτά διαστήματα.

▼M6

Νερό

15. Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό (αποξυγονωμένο μέσω ψεκασμού με αέριο άζωτο με περιεκτικότητα σε οξυγόνο μικρότερη από 5 μl/l), που περιέχει διαλυμένο οργανικό άνθρακα (DOC) λιγότερο από 2 mg/l.

Μέσο δοκιμής

16. Παρασκευάζεται το μέσο αραίωσης που περιλαμβάνει τα ακόλουθα συστατικά στις καθορισμένες ποσότητες:

Άνυδρο δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4)	0,27 g
Δωδεκαένυδρο όξινο φωσφορικό νάτριο ($Na_2HPO_4 \times 12H_2O$)	1,12 g
Χλωριούχο αμμώνιο (NH_4Cl)	0,53 g
Διένυδρο χλωριούχο ασβέστιο ($CaCl_2 \times 2H_2O$)	0,075g
Εξάνυδρο χλωριούχο μαγνήσιο ($MgCl_2 \times 6H_2O$)	0,10 g
Τετραένυδρος χλωριούχος σίδηρος (II) ($FeCl_2 \times 4H_2O$)	0,02 g
Ρεσαζουρίνη (δείκτης οξυγόνου)	0,001g
Θειούχο νάτριο εννεαϋδρικό ($Na_2S \times 9H_2O$)	0,10 g
Διάλυμα παρακαταθήκης ιχνοστοιχείων (προαιρετικό, παράγραφος 18)	10 ml
Προστίθεται αποξυγονωμένο νερό (παράγραφος 15)	μέχρι 1 λίτρο

Σημείωση: Θα πρέπει να χρησιμοποιείται προσφάτως παρασκευασμένο θειούχο νάτριο ή να πλένεται και να στεγνώνεται πριν από τη χρήση, για να εξασφαλίζεται επαρκής αναγωγική ικανότητα. Η δοκιμή μπορεί να διεξάγεται χωρίς τη συσκευή με χειριστήρια (glove box) (βλ. παράγραφο 26). Σε αυτήν την περίπτωση, η τελική συγκέντρωση του θειούχου νατρίου στο μέσο θα πρέπει να αυξάνεται σε 0,20 g $Na_2S \times 9H_2O$ ανά λίτρο. Το θειούχο νάτριο μπορεί επίσης να προστίθεται από κατάλληλο αναερόβιο διάλυμα παρακαταθήκης μέσω του διαφράγματος των κλειστών δοχείων δοκιμής, καθώς η διαδικασία αυτή μειώνει τον κίνδυνο οξείδωσης. Το θειούχο νάτριο μπορεί να αντικατασταθεί από κιτρικό τιτάνιο (III), το οποίο προστίθεται μέσω του διαφράγματος των κλειστών δοχείων δοκιμής σε τελική συγκέντρωση 0,8 έως 1,0 mmol/l. Το κιτρικό τιτάνιο (III) είναι ένα πολύ αποτελεσματικό αναγωγικό μέσο χαμηλής τοξικότητας, το οποίο παρασκευάζεται ως εξής: Διαλύονται 2,94 g διένυδρου κιτρικού τρινατρίου σε 50 ml αποξυγονωμένου νερού (για την επίτευξη διαλύματος 200 mmol/l) και προστίθενται 5 ml ενός διαλύματος χλωριούχου τιτανίου (III) 15 % (w/v). Εξουδετερώνεται σε pH 7 ± 0,2 με ανόργανο αλκάλιο και κατανέμεται σε κατάλληλο δοχείο υπό ρεύμα αζώτου. Η συγκέντρωση του κιτρικού τιτανίου (III) σε αυτό το διάλυμα παρακαταθήκης είναι 164 mmol/l.

17. Τα συστατικά του μέσου δοκιμής πλην του αναγωγικού μέσου (θειούχο νάτριο, κιτρικό τιτάνιο) αναμιγνύονται και το διάλυμα υποβάλλεται σε ψεκασμό με αέριο άζωτο για περίπου 20 λεπτά αμέσως πριν από τη χρήση για την απομάκρυνση του οξυγόνου. Κατόπιν προστίθεται κατάλληλος όγκος προσφάτως παρασκευασμένου διαλύματος αναγωγικού μέσου (παρασκευασμένο σε αποξυγονωμένο νερό) ακριβώς πριν από τη χρήση του μέσου δοκιμής. Το pH του μέσου ρυθμίζεται, εάν είναι απαραίτητο, με αραιό ανόργανο οξύ ή αλκάλιο σε 7 ± 0,2.

▼M6

Διάλυμα παρακαταθήκης ιχνοστοιχείων (προαιρετικό)

18. Συνιστάται το μέσο δοκιμής να περιέχει τα ακόλουθα ιχνοστοιχεία για τη βελτίωση των διαδικασιών αναερόβιας αποικοδόμησης, ιδίως εάν χρησιμοποιούνται χαμηλές συγκεντρώσεις (π.χ. 1g/l) εμβολίου (11).

Τετραένυδρο χλωριούχο μαγγάνιο ($MnCl_2 \times 4H_2O$)	50 mg
Βορικό οξύ (H_3BO_3)	5 mg
Χλωριούχος ψευδάργυρος ($ZnCl_2$)	5 mg
Χλωριούχος χαλκός (II) ($CuCl_2$)	3 mg
Διένυδρο μολυβδαινικό νάτριο ($Na_2MoO_4 \times 2H_2O$)	1 mg
Εξάνυδρο χλωριούχο κοβάλτιο ($CoCl_2 \times 6H_2O$)	100 mg
Εξάνυδρο χλωριούχο νικέλιο ($NiCl_2 \times 6H_2O$)	10 mg
Σεληνιώδες νάτριο (Na_2SeO_3)	5 mg
Προστίθεται αποξυγονωμένο νερό (παράγραφος 15)	μέχρι 1 λίτρο

Υπό δοκιμή ουσία

19. Προστίθεται η υπό δοκιμή ουσία ως διάλυμα παρακαταθήκης, εναιώρημα, γαλάκτωμα ή απευθείας σε στερεή ή υγρή μορφή, ή προσροφημένη σε φίλτρο από υαλοβάμβακα για να προκύψει συγκέντρωση μέχρι 100 mg/l οργανικού άνθρακα. Εάν χρησιμοποιούνται διαλύματα παρακαταθήκης, προετοιμάζεται ένα κατάλληλο διάλυμα με νερό (παράγραφος 15) (το οποίο έχει προηγουμένως αποξυγονωθεί μέσω ψεκασμού με αέριο άζωτο) του οποίου η περιεκτικότητα θα είναι τέτοια ώστε ο όγκος που προστίθεται να είναι μικρότερος από το 5 % του συνολικού όγκου του μείγματος αντίδρασης. Το pH του διαλύματος παρακαταθήκης ρυθμίζεται σε pH 7 ± 0,2, εάν είναι απαραίτητο. Για υπό δοκιμή ουσίες που δεν είναι επαρκώς διαλυτές στο νερό, ανατρέξτε στο ISO 10634 (13). Εάν χρησιμοποιείται διαλύτης, παρασκευάζεται ένας επιπλέον μάρτυρας ενώ ο διαλύτης προστίθεται μόνο στο εμβολιασμένο μέσο. Θα πρέπει να αποφεύγονται οργανικοί διαλύτες που είναι γνωστό ότι αναστέλλουν την παραγωγή μεθανίου, όπως το χλωροφόρμιο και ο τετραχλωριούχος άνθρακας.

Προειδοποίηση — Πρέπει να επιδεικνύεται προσοχή κατά τον χειρισμό τοξικών υπό δοκιμή ουσιών, καθώς και ουσιών των οποίων οι ιδιότητες δεν είναι γνωστές.

Ουσίες αναφοράς

20. Για τον έλεγχο της διαδικασίας έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς ουσίες αναφοράς, όπως το βενζοϊκό νάτριο, η φαινόλη και η πολυαιθυλενογλυκόλη 400, οι οποίες παρουσιάζουν βιοαποικοδόμηση πάνω από 60 % εντός 60 ημερών. Προετοιμάζεται ένα διάλυμα παρακαταθήκης (σε αποξυγονωμένο νερό) της επιλεγμένης ουσίας αναφοράς με τον ίδιο τρόπο όπως και για την υπό δοκιμή ουσία και το pH ρυθμίζεται στο 7 ± 0,2 εάν είναι απαραίτητο.

Μάρτυρας αναστολής (υπό όρους)

21. Προκειμένου να ληφθούν πληροφορίες σχετικά με την τοξικότητα της υπό δοκιμή ουσίας για τους αναερόβιους μικροοργανισμούς ώστε να διαπιστωθεί η καταλληλότερη συγκέντρωση δοκιμής, η υπό δοκιμή ουσία και η ουσία αναφοράς προστίθενται σε ένα δοχείο που περιέχει το μέσο δοκιμής (βλ. παράγραφο 16), στην ίδια συγκέντρωση, ανά ουσία, με εκείνη που προστέθηκε, αντίστοιχα (βλ. παραγράφους 19 και 20, καθώς και το ISO 13641-1 (12)).

▼M6

Χωνευμένη ιλύς

22. Συλλέγεται χωνευμένη ιλύς από ένα χωνευτήριο σε μια εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων που επεξεργάζεται, κατά κύριο λόγο, οικιακά λύματα. Η ιλύς θα πρέπει να χαρακτηρίζεται πλήρως, καθώς και να αναφέρονται τα βασικά στοιχεία της (βλ. παράγραφο 54). Εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί εμβόλιο που έχει εγκλιματιστεί στην ουσία, μπορεί να εξεταστεί το ενδεχόμενο χρήσης χωνευμένης ιλύος από μονάδα επεξεργασίας βιομηχανικών λυμάτων. Χρησιμοποιούνται φιάλες με πλατύ στόμιο κατασκευασμένες από πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας ή παρόμοιο υλικό, το οποίο μπορεί να διαστέλλεται, για τη συλλογή της χωνευμένης ιλύος. Προστίθεται ιλύς έως περίπου 1 cm από το πάνω μέρος των φιαλών και οι φιάλες σφραγίζονται σφικτά, κατά προτίμηση με βαλβίδα ασφαλείας. Μετά τη μεταφορά στο εργαστήριο, η συλλεγμένη ιλύς μπορεί είτε να χρησιμοποιείται άμεσα είτε να τοποθετείται σε χωνευτήριο εργαστηριακής κλίμακας. Η περίσσια βιοαερίου εκλύεται με προσεκτικό άνοιγμα των φιαλών ιλύος. Εναλλακτικά, ως πηγή εμβολίου μπορεί να χρησιμοποιείται αναερόβια ιλύς που έχει αναπτυχθεί στο εργαστήριο, όμως το φάσμα δράσης της ενδέχεται να έχει επηρεαστεί δυσμενώς.

Προειδοποίηση — Η χωνευμένη ιλύς παράγει εύφλεκτα αέρια τα οποία ενέχουν κινδύνους πρόκλησης πυρκαγιάς και έκρηξης. Επίσης, περιέχει δυνητικώς παθογόνους οργανισμούς, οπότε απαιτείται η λήψη κατάλληλων προφυλάξεων κατά τον χειρισμό της ιλύος. Για λόγους ασφαλείας, δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται γυάλινα δοχεία για τη συλλογή της ιλύος.

23. Προκειμένου να μειωθεί η παραγωγή αερίων προερχόμενων από το περιβάλλον και να μειωθούν οι επιδράσεις των μαρτύρων τυφλού, μπορεί να εξεταστεί το ενδεχόμενο η ιλύς να υποστεί προχώνευση. Εάν απαιτείται προχώνευση, η ιλύς θα πρέπει να αφήνεται να υποστεί χώνευση χωρίς την προσθήκη θρεπτικών συστατικών ή υποστρωμάτων στους 35 °C ±2 °C για έως 7 ημέρες. Έχει διαπιστωθεί ότι η προχώνευση για περίπου 5 ημέρες συνήθως παρέχει βέλτιστη μείωση στην παραγωγή αερίων του τυφλού χωρίς μη αποδεκτές αυξήσεις στη λανθάνουσα φάση ή στη φάση επώασης κατά τη διάρκεια της φάσης δοκιμής ή απώλεια δράσης προς έναν μικρό αριθμό ουσιών που ελέγχθηκαν.

24. Για υπό δοκιμή ουσίες που είναι, ή αναμένεται να είναι, ανεπαρκώς βιοαποικοδομήσιμες, μπορεί να εξεταστεί το ενδεχόμενο προέκθεσης της ιλύος στην υπό δοκιμή ουσία ώστε να ληφθεί ένα εμβόλιο που είναι καλύτερα εγκλιματισμένο. Σε αυτήν την περίπτωση, η υπό δοκιμή ουσία με περιεκτικότητα σε ανόργανο άνθρακα από 5 mg/l έως 20 mg/l προστίθεται στη χωνευμένη ιλύ και επωάζεται για έως 2 εβδομάδες. Η ιλύς που υποβάλλεται σε προέκθεση πλένεται προσεκτικά πριν από τη χρήση (βλ. παράγραφο 25) και στην έκθεση της δοκιμής αναφέρονται οι συνθήκες της προέκθεσης.

Εμβόλιο

25. Η ιλύς πλένεται (βλ. παραγράφους 22 έως 24) ακριβώς πριν από τη χρήση για να μειωθεί η συγκέντρωση IC κάτω από 10 mg/l στο τελικό εναιώρημα της δοκιμής. Η ιλύς φυγοκεντρείται σε σφραγισμένους σωλήνες (π.χ. 3 000 g για 5 λεπτά) και απορρίπτεται το υπερκείμενο υγρό. Σχηματίζεται εναιώρημα του ιζήματος που προκύπτει σε αποξυγονωμένο μέσο (παράγραφοι 16 και 17), το εναιώρημα επαναφυγοκεντρείται και απορρίπτεται το υπερκείμενο υγρό. Εάν δεν έχει μειωθεί επαρκώς ο IC, η διαδικασία πλύσης της ιλύος μπορεί να επαναληφθεί μέχρι δύο φορές το μέγιστο. Η διαδικασία αυτή δεν φαίνεται να επηρεάζει δυσμενώς τους μικροοργανισμούς. Τέλος, σχηματίζεται εναιώρημα του ιζήματος στον απαιτούμενο όγκο του μέσου δοκιμής και προσδιορίζεται η συγκέντρωση των ολικών στερεών [π.χ. ISO 11923 (15)]. Η τελική συγκέντρωση των ολικών στερεών στα δοχεία δοκιμής θα πρέπει να κυμαίνεται από 1 g/l έως 3 g/l (ή περίπου στο 10 % της συγκέντρωσης σε μη αραιωμένη χωνευμένη ιλύ). Οι παραπάνω διαδικασίες πρέπει να διεξάγονται με τρόπο ώστε η ιλύς να έρχεται σε ελάχιστη επαφή με το οξυγόνο (π.χ. χρήση ατμόσφαιρας αζώτου).

▼**M6**

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

26. Πραγματοποιούνται οι ακόλουθες αρχικές διαδικασίες με χρήση τεχνικών για τη διατήρηση της επαφής μεταξύ της χωνευμένης ιλύος και του οξυγόνου στο χαμηλότερο δυνατό επίπεδο, για παράδειγμα μπορεί να είναι απαραίτητο να γίνουν εργασίες εντός της συσκευής με χειριστήρια (glove box) σε ατμόσφαιρα αζώτου ή/και εκκένωση των φιαλών με άζωτο (4).

Προετοιμασία της δοκιμής και των δοκιμασιών-μαρτύρων

27. Προετοιμάζονται τουλάχιστον τριπλά δοχεία δοκιμής (βλ. παράγραφο 13-β) για την υπό δοκιμή ουσία, τους μάρτυρες τυφλού, την ουσία αναφοράς, τους μάρτυρες αναστολής (υπό όρους) και τους θαλάμους ελέγχου πίεσης (προαιρετική διαδικασία) (βλ. παραγράφους 7, 19 έως 21). Μπορούν να προετοιμαστούν επίσης επιπλέον δοχεία για το σκοπό της αξιολόγησης της πρωτογενούς βιοαποικοδόμησης με χρήση ειδικών αναλύσεων για την υπό δοκιμή ουσία. Η ίδια ομάδα μαρτύρων τυφλού μπορεί να χρησιμοποιείται για αρκετές υπό δοκιμή ουσίες στην ίδια δοκιμή, εφόσον οι όγκοι του υπερκείμενου χώρου είναι συνεπείς.

28. Προετοιμάζεται το αραιωμένο εμβόλιο και προστίθεται στα δοχεία, π.χ. με ένα σιφώνιο με ευρύ στόμιο. Προστίθενται κλάσματα ενός καλά αναμεμειγμένου εμβολίου (παράγραφος 25), ώστε η συγκέντρωση των ολικών στερεών να είναι ίδια σε όλα τα δοχεία (από 1 g/l έως 3 g/l). Προστίθενται διαλύματα παρακαταθήκης της υπό δοκιμή ουσίας και της ουσίας αναφοράς μετά τη ρύθμισή τους σε pH 7 ± 0,2, εάν είναι απαραίτητο. Η υπό δοκιμή ουσία και η ουσία αναφοράς θα πρέπει να προστίθενται με χρήση της καταλληλότερης οδού χορήγησης (παράγραφος 19).

29. Η συγκέντρωση δοκιμής του οργανικού άνθρακα θα πρέπει κανονικά να κυμαίνεται μεταξύ 20 και 100 mg/l (παράγραφος 4). Εάν η υπό δοκιμή ουσία είναι τοξική, η συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να μειώνεται σε 20 mg C/l ή σε ακόμη χαμηλότερο επίπεδο εάν πρόκειται να μετρηθεί μόνο η πρωτογενής βιοαποικοδόμηση με ειδικές αναλύσεις. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων της δοκιμής αυξάνεται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις δοκιμής.

30. Για δοχεία τυφλού, προστίθεται ισοδύναμη ποσότητα του φορέα που χρησιμοποιείται για τη δοσολογία της υπό δοκιμή ουσίας αντί ενός διαλύματος παρακαταθήκης, εναιωρήματος ή γαλακτώματος. Εάν η υπό δοκιμή ουσία έχει χορηγηθεί με φίλτρα από υαλοβάμβακα ή οργανικούς διαλύτες, προστίθεται στα τυφλά ένα φίλτρο ή διαλύτης ισοδύναμου όγκου που έχει εξατμιστεί. Προετοιμάζεται μια επιπλέον επανάληψη με την υπό δοκιμή ουσία για τη μέτρηση της τιμής του pH. Το pH ρυθμίζεται σε τιμή 7 ± 0,2, εάν είναι απαραίτητο, με μικρές ποσότητες αραιού ανόργανου οξέος ή αλκαλίου. Θα πρέπει να προστίθενται οι ίδιες ποσότητες παραγόντων εξουδετέρωσης σε όλα τα δοχεία δοκιμής. Οι προσθήκες αυτές δεν θα πρέπει να είναι αναγκαίο να γίνουν, καθώς η τιμή pH των διαλυμάτων παρακαταθήκης της υπό δοκιμή ουσίας και της ουσίας αναφοράς έχει ήδη ρυθμιστεί (βλ. παραγράφους 19 και 20). Εάν πρόκειται να μετρηθεί η πρωτογενής βιοαποικοδόμηση, θα πρέπει να ληφθεί κατάλληλο δείγμα από το δοχείο μάρτυρα pH ή από ένα επιπλέον δοχείο δοκιμής, και η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας θα πρέπει να μετρηθεί με χρήση ειδικών αναλύσεων. Μπορούν να προστεθούν επικαλυμμένοι μαγνήτες σε όλα τα δοχεία, εάν τα μείγματα αντίδρασης πρόκειται να αναδευτούν (προαιρετικά).

31. Διασφαλίζεται ότι ο συνολικός όγκος του υγρού V_l και ο όγκος του υπερκείμενου χώρου V_h είναι ίδιοι σε όλα τα δοχεία. Σημειώνονται και καταγράφονται οι τιμές των V_l και V_h. Κάθε δοχείο θα πρέπει να σφραγίζεται με διάφραγμα αερίου και να μεταφέρεται από τη συσκευή με χειριστήρια (glove box) (βλ. παράγραφο 26) στον επωαστήρα (βλ. παράγραφο 13-α).

▼M6

Αδιάλυτες υπό δοκιμή ουσίες

32. Προστίθενται ζυγισμένες ποσότητες ουσιών, οι οποίες είναι δυσδιάλυτες στο νερό, απευθείας στα προετοιμασμένα δοχεία. Όταν απαιτείται η χρήση ενός διαλύτη (βλ. παράγραφο 19), το διάλυμα ή το εναιώρημα της υπό δοκιμή ουσίας μεταφέρεται σε άδεια δοχεία. Όπου είναι δυνατό, ο διαλύτης εξατμίζεται με τη διέλευση αέριου αζώτου μέσω των δοχείων και, στη συνέχεια, προστίθενται τα υπόλοιπα συστατικά, ήτοι αραιωμένη ιλύς (παράγραφος 25) και αποξυγονωμένο νερό, όπως απαιτείται. Θα πρέπει να παρασκευάζεται επίσης ένας επιπλέον μάρτυρας με διαλύτη (βλ. παράγραφο 19). Άλλες μέθοδοι προσθήκης αδιάλυτων ουσιών διατίθενται στο ISO 10634 (13). Η δοσολογία των υγρών υπό δοκιμή ουσιών μπορεί να χορηγείται με σύριγγα στα πλήρως προετοιμασμένα σφραγισμένα δοχεία, εάν αναμένεται ότι το αρχικό pH δεν θα υπερβεί την τιμή 7 ± 1, διαφορετικά η δόση χορηγείται όπως περιγράφεται ανωτέρω (βλ. παράγραφο 19).

Επώαση και μετρήσεις πίεσης αερίου

33. Τα προετοιμασμένα δοχεία επωάζονται στους 35 °C ± 2 °C για περίπου 1 ώρα, προκειμένου να επιτευχθεί εξισορρόπηση και έκλυση της περίσσιας αερίου στην ατμόσφαιρα, για παράδειγμα με ανακίνηση κάθε δοχείου με τη σειρά, εισαγωγή της βελόνας στον μετρητή πίεσης (παράγραφος 13-γ) μέσω της σφράγισης και άνοιγμα της βαλβίδας μέχρι η ένδειξη του μετρητή πίεσης να μηδενιστεί. Εάν στο στάδιο αυτό ή κατά την πραγματοποίηση ενδιάμεσων μετρήσεων, η πίεση στον υπερκείμενο χώρο είναι μικρότερη από την ατμοσφαιρική πίεση, θα πρέπει να εισαχθεί αέριο άζωτο για να επιτευχθεί ξανά η ατμοσφαιρική πίεση. Κλείνεται η βαλβίδα (βλ. παράγραφο 13-γ) και συνεχίζεται η επώαση στο σκοτάδι, αφού διασφαλιστεί ότι όλα τα μέρη των δοχείων διατηρούνται στη θερμοκρασία χώνευσης. Τα δοχεία πρέπει να παρατηρούνται μετά την επώαση για 24 έως 48 ώρες. Τα δοχεία των οποίων το περιεχόμενο παρουσιάζει διακριτό ροζ χρωματισμό στο υπερκείμενο υγρό απορρίπτονται, εάν δηλ. η ρεσαζουρίνη (βλ. παράγραφο 16) έχει αλλάξει χρώμα υποδεικνύοντας την παρουσία οξυγόνου (βλ. παράγραφο 50). Ενώ μικρές ποσότητες οξυγόνου μπορεί να είναι ανεκτές από το σύστημα, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορούν να αναστείλουν σημαντικά την πορεία της αναερόβιας βιοαποικοδόμησης. Η περιστασιακή απόρριψη ενός δοχείου από μια ομάδα τριπλών δοχείων μπορεί να είναι αποδεκτή, αλλά εάν παρουσιαστούν περισσότερες αποτυχίες πρέπει να ακολουθήσει διερεύνηση των πειραματικών διαδικασιών, καθώς και επανάληψη της δοκιμής.

34. Τα περιεχόμενα κάθε δοχείου αναμιγνύονται προσεκτικά με ανάδευση ή ανακίνηση για λίγα λεπτά, τουλάχιστον 2 ή 3 φορές την εβδομάδα και λίγο πριν από κάθε μέτρηση πίεσης. Με την ανακίνηση γίνεται επανεναιώρηση του εμβολίου και διασφαλίζεται η εξισορρόπηση των αερίων. Όλες οι μετρήσεις πίεσης θα πρέπει να γίνονται γρήγορα, επειδή τα δοχεία δοκιμής μπορεί να υποβληθούν σε μείωση της θερμοκρασίας, πράγμα που οδηγεί σε ψευδείς ενδείξεις. Κατά τη μέτρηση της πίεσης, ολόκληρο το δοχείο δοκιμής, συμπεριλαμβανομένου του υπερκείμενου χώρου, θα πρέπει να διατηρείται στη θερμοκρασία χώνευσης. Μετριέται η πίεση αερίων, για παράδειγμα με την εισαγωγή μιας βελόνας σύριγγας μέσω του διαφράγματος (παράγραφος 13-γ) η οποία είναι συνδεδεμένη στον μετρητή παρακολούθησης της πίεσης. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποτρέπεται η είσοδος νερού στη βελόνα σύριγγας. Εάν συμβεί αυτό, τα υγρά μέρη θα πρέπει να στεγνώνονται και να προσαρμόζεται νέα βελόνα. Η πίεση θα πρέπει να μετριέται σε millibar (βλ. παράγραφο 42). Η πίεση αερίων στα δοχεία μπορεί να μετριέται περιοδικά, π.χ. εβδομαδιαίως, και η περίσσια αερίου να εκλύεται στην ατμόσφαιρα προαιρετικά. Εναλλακτικά, η πίεση μετριέται μόνο στο τέλος της δοκιμής για να προσδιοριστεί η ποσότητα του παραγόμενου βιοαερίου.

35. Συνιστάται να γίνονται ενδιάμεσες μετρήσεις της πίεσης αερίων, επειδή η αύξηση της πίεσης παρέχει καθοδήγηση σχετικά με το πότε μπορεί να τερματιστεί η δοκιμή και επιτρέπει την παρακολούθηση της κινητικής (βλ. παράγραφο 6).

▼M6

36. Κανονικά, η δοκιμή τερματίζεται μετά από περίοδο επώασης 60 ημερών, εκτός εάν η καμπύλη βιοαποικοδόμησης που προκύπτει από τις μετρήσεις πίεσης έχει φτάσει τη φάση οριζοντίωσης νωρίτερα. Οριζοντίωση είναι η φάση κατά την οποία έχει επιτευχθεί η μέγιστη αποικοδόμηση και η καμπύλη βιοαποικοδόμησης έχει σταθεροποιηθεί. Εάν η τιμή οριζοντίωσης είναι μικρότερη από 60 %, η ερμηνεία παρουσιάζει προβλήματα επειδή υποδεικνύει ότι μόνο ένα μέρος του μορίου έχει ανοργανοποιηθεί ή ότι έχει προκύψει σφάλμα. Εάν στο τέλος της κανονικής περιόδου επώασης, παράγεται αέριο αλλά είναι εμφανές ότι δεν έχει επιτευχθεί φάση οριζοντίωσης, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο παράτασης της δοκιμής για να ελεγχθεί εάν θα επιτευχθεί η οριζοντίωση (> 60 %).

Μέτρηση ανόργανου άνθρακα

37. Στο τέλος της δοκιμής, μετά την τελευταία μέτρηση της πίεσης αερίου, η ιλύς αφήνεται να καθιζάνει. Κάθε δοχείο ανοίγεται με τη σειρά και λαμβάνεται αμέσως δείγμα για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης (mg/l) ανόργανου άνθρακα (IC) στο υπερκείμενο υγρό. Δεν θα πρέπει να εφαρμόζεται φυγοκέντρηση ή διήθηση στο υπερκείμενο υγρό, επειδή θα προέκυπτε μη αποδεκτή απώλεια διαλυμένου διοξειδίου του άνθρακα. Εάν το υγρό δεν είναι δυνατό να αναλυθεί κατά τη δειγματοληψία, φυλάσσεται σε σφραγισμένο φιαλίδιο χωρίς υπερκείμενο χώρο και ψύχεται περίπου στους 4 °C για έως 2 ημέρες. Μετά τη μέτρηση IC, μετράται και καταγράφεται η τιμή pH.

38. Εναλλακτικά, ο IC στο υπερκείμενο υγρό μπορεί να προσδιορίζεται έμμεσα από τον διαλυμένο IC που εκλύεται ως διοξείδιο του άνθρακα και μετράται στον υπερκείμενο χώρο. Μετά την τελευταία μέτρηση της πίεσης αερίου, η πίεση σε κάθε δοχείο δοκιμής προσαρμόζεται στην ατμοσφαιρική πίεση. Εκτελείται οξίνιση των περιεχομένων του κάθε δοχείου σε pH 1 περίπου με την προσθήκη συμπυκνωμένου ανόργανου οξέος (π.χ. H_2SO_4) μέσω του διαφράγματος των σφραγισμένων δοχείων. Τα δοχεία που έχουν ανακινηθεί επωάζονται στους 35 °C ± 2 °C για περίπου 24 ώρες και μετράται η πίεση αερίου που προκύπτει από το εκλυόμενο διοξείδιο του άνθρακα με χρήση του μετρητή πίεσης.

39. Πραγματοποιούνται παρόμοιες μετρήσεις για τα αντίστοιχα δοχεία του τυφλού, της ουσίας αναφοράς και, εάν συμπεριλαμβάνεται, του μάρτυρα αναστολής (βλ. παράγραφο 21).

40. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ιδίως εάν τα ίδια δοχεία μάρτυρα χρησιμοποιούνται για αρκετές υπό δοκιμή ουσίες, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο πραγματοποίησης μετρήσεων της ενδιάμεσης συγκέντρωσης IC στα δοχεία δοκιμής και μάρτυρα, κατά περίπτωση. Σε αυτήν την περίπτωση, θα πρέπει να προετοιμάζεται ένας επαρκής αριθμός δοχείων για όλες τις ενδιάμεσες μετρήσεις. Η διαδικασία αυτή προτιμάται από τη λήψη όλων των δειγμάτων μόνο από ένα δοχείο. Το τελευταίο μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο εάν ο απαιτούμενος όγκος για την ανάλυση DIC δεν θεωρείται πολύ υψηλός. Η μέτρηση DIC θα πρέπει να πραγματοποιείται μετά τη μέτρηση της πίεσης αερίου χωρίς έκλυση περίσσιας αερίου, όπως περιγράφεται παρακάτω:

— λαμβάνεται όσο το δυνατό μικρότερος όγκος υπερκείμενων δειγμάτων με μια σύριγγα μέσω του διαφράγματος χωρίς να ανοίγονται τα δοχεία και προσδιορίζεται ο IC στο δείγμα,

— μετά τη λήψη του δείγματος, η περίσσια αερίου μπορεί να εκλύεται ή όχι,

— θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι ακόμη και μια μικρή μείωση στον όγκο του υπερκείμενου υγρού (π.χ. περίπου 1 %) μπορεί να προκαλέσει σημαντική αύξηση στον όγκου αερίου του υπερκείμενου χώρου (V_h),

— οι εξισώσεις (βλ. παράγραφο 44) διορθώνονται με την αύξηση του V_h στην εξίσωση 3, όπως απαιτείται.

▼M6

Ειδικές αναλύσεις

41. Εάν πρόκειται να προσδιοριστεί η πρωτογενής αναερόβια αποικοδόμηση (βλ. παράγραφο 30), λαμβάνεται ένας κατάλληλος όγκος δείγματος για ειδικές αναλύσεις από τα δοχεία που περιέχουν την υπό δοκιμή ουσία στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής. Εάν γίνει αυτό, πρέπει να σημειωθεί ότι οι όγκοι του υπερκείμενου χώρου (V_h) και του υγρού (V_l) θα αλλάξουν, γεγονός το οποίο πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων της παραγωγής αερίου. Εναλλακτικά, τα δείγματα μπορούν να λαμβάνονται για ειδικές αναλύσεις από επιπλέον μείγματα που έχουν ετοιμαστεί προηγουμένως για τον σκοπό αυτό (παράγραφος 30).

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

42. Για πρακτικούς λόγους, η πίεση του αερίου μετριέται σε millibar (1 mbar = 1h Pa = 10^2 Pa, 1 Pa = 1 N/m^2), ο όγκος σε λίτρα και η θερμοκρασία σε βαθμούς Κελσίου.

Άνθρακας στον υπερκείμενο χώρο

43. Καθώς 1 mol μεθανίου και 1 mol διοξειδίου του άνθρακα περιέχουν το καθένα 12 g άνθρακα, η μάζα του άνθρακα σε έναν δεδομένο όγκο εκλυόμενου αερίου μπορεί να εκφράζεται ως εξής:

$$m = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Εξίσωση [1]}$$

όπου:

m = μάζα άνθρακα (mg) σε έναν δεδομένο όγκο εκλυόμενου αερίου,

12 = σχετική ατομική μάζα του άνθρακα,

n = αριθμός γραμμομορίων του αερίου σε έναν δεδομένο όγκο.

Εάν παράγεται άλλο αέριο εκτός από το μεθάνιο ή το διοξείδιο του άνθρακα (π.χ. N_2O) σε σημαντικές ποσότητες, η εξίσωση [1] θα πρέπει να τροποποιείται προκειμένου να περιγραφεί η πιθανότητα επιδράσεων από τα παραγόμενα αέρια.

44. Σύμφωνα με τους νόμους των αερίων, το n μπορεί να εκφράζεται ως εξής:

$$n = \frac{pV}{RT} \quad \text{Εξίσωση [2]}$$

όπου:

p = πίεση του αερίου (Pascal),

V = όγκος του αερίου (m^3),

R = γραμμομοριακή σταθερά αερίου [8,314 J/(mol K)],

T = θερμοκρασία επώασης (Kelvin).

Με τον συνδυασμό των εξισώσεων [1] και [2] και τον εξορθολογισμό ώστε να επιτρέπεται η παραγωγή αερίου του μάρτυρα τυφλού:

$$m_h = \frac{12\,000 \times 0{,}1(\Delta p \cdot V_h)}{RT} \quad \text{Εξίσωση [3]}$$

όπου:

m_h = μάζα καθαρού άνθρακα που παράγεται ως αέριο στον υπερκείμενο χώρο (mg),

Δp = μέση τιμή της διαφοράς μεταξύ της αρχικής και τελικής πίεσης στα δοχεία δοκιμής μείον την αντίστοιχη μέση τιμή των δοχείων τυφλού (millibar),

▼M6

V_h = όγκος υπερκείμενου χώρου στο δοχείο (l),

0,1 = μετατροπή των newton/m^2 σε millibar και των m^3 σε λίτρα.

Η εξίσωση [4] θα πρέπει να χρησιμοποιείται για την κανονική θερμοκρασία επώασης των 35 °C (308 K):

$$m_h = 0{,}468(\Delta p \cdot V_h) \quad \text{Εξίσωση [4]}$$

Σημείωση: Εναλλακτικός υπολογισμός του όγκου. Οι ενδείξεις του μετρητή πίεσης μετατρέπονται σε ml του αερίου που παράγεται με χρήση της πρότυπης καμπύλης, η οποία δημιουργείται από τη γραφική παράσταση του όγκου (ml) που εγχέεται συναρτήσει της ένδειξης του μετρητή (προσάρτημα 2). Ο αριθμός γραμμομορίων (n) του αερίου στον υπερκείμενο χώρο κάθε δοχείου υπολογίζεται με διαίρεση της αθροιστικής παραγωγής αερίου (ml) με 25.286 ml/mole, που είναι ο όγκος που καταλαμβάνεται από ένα γραμμομόριο αερίου στους 35 °C και σε τυπική ατμοσφαιρική πίεση. Καθώς 1 mole CH_4 και 1 mole CO_2 περιέχουν το καθένα 12 g άνθρακα, η ποσότητα του άνθρακα (mg) στον υπερκείμενο χώρο (m_h) δίνεται από την εξίσωση [5]:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Εξίσωση [5]}$$

Εξορθολογισμός για να επιτραπεί η παραγωγή αερίου του μάρτυρα τυφλού:

$$m_h = \frac{12\,000 \times \Delta V}{25\,286} = 0{,}475\Delta V \qquad \text{Εξίσωση [6]}$$

όπου:

m_h = μάζα καθαρού άνθρακα που παράγεται ως αέριο στον υπερκείμενο χώρο (mg),

ΔV = μέση τιμή της διαφοράς μεταξύ του όγκου του αερίου που παράγεται στον υπερκείμενο χώρο των δοχείων δοκιμής και των δοχείων μάρτυρα τυφλού,

25286 = όγκος που καταλαμβάνεται από 1 γραμμομόριο αερίου στους 35 °C, 1 atm.

45. Η παρακολούθηση της πορείας της βιοαποικοδόμησης μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη γραφική παράσταση της αθροιστικής αύξησης της πίεσης Δp (millibar) συναρτήσει του χρόνου, κατά περίπτωση. Από την καμπύλη αυτή, αναγνωρίζεται και καταγράφεται η λανθάνουσα φάση (ημέρες). Η λανθάνουσα φάση είναι ο χρόνος από την έναρξη της δοκιμής μέχρι να ξεκινήσει σημαντική αποικοδόμηση (για παράδειγμα, βλ. προσάρτημα 3). Εάν έχουν ληφθεί και αναλυθεί ενδιάμεσα δείγματα υπερκείμενου υγρού (βλ. παραγράφους 40, 46 και 47), τότε μπορεί να παρασταθεί γραφικά ο συνολικός C που παράγεται (στο αέριο και στο υγρό μαζί) αντί της αθροιστικής πίεσης μόνο.

Άνθρακας στο υγρό

46. Η ποσότητα του μεθανίου στο υγρό δεν λαμβάνεται υπόψη, επειδή η διαλυτότητά του στο νερό είναι γνωστό ότι είναι πολύ μικρή. Υπολογίζεται η μάζα του ανόργανου άνθρακα στο υγρό των δοχείων δοκιμής με χρήση της εξίσωσης [7]:

$$m_l = C_{net} \times V_l \quad \text{Εξίσωση [7]}$$

όπου:

m_l = μάζα ανόργανου άνθρακα στο υγρό (mg),

C_{net} = συγκέντρωση του ανόργανου άνθρακα στα δοχεία δοκιμής μείον τη συγκέντρωσή του στα δοχεία μάρτυρα στο τέλος της δοκιμής (mg/l),

V_h = όγκος υγρού στο δοχείο (l).

▼M6

Ολικός αεριοποιημένος άνθρακας

47. Υπολογίζεται η συνολική μάζα του αεριοποιημένου άνθρακα στο δοχείο με χρήση της εξίσωσης [8]:

$$m_t = m_h + m_l \quad \text{Εξίσωση [8]}$$

όπου:

m_t = συνολική μάζα αεριοποιημένου άνθρακα (mg),

Τα m_h και m_l έχουν όπως ορίζεται παραπάνω.

Άνθρακας της υπό δοκιμή ουσίας

48. Υπολογίζεται η μάζα του άνθρακα στα δοχεία δοκιμής που προκύπτει από την προστιθέμενη υπό δοκιμή ουσία με χρήση της εξίσωσης [9]:

$$m_v = C_c \times V_l \quad \text{Εξίσωση [9]}$$

όπου:

m_v = μάζα του άνθρακα της υπό δοκιμή ουσίας (mg),

C_c = συγκέντρωση του άνθρακα της υπό δοκιμή ουσίας στο δοχείο δοκιμής (mg/l)

V_l = όγκος του υγρού στο δοχείο δοκιμής (l).

Βαθμός της βιοαποικοδόμησης

49. Υπολογίζεται το ποσοστό της βιοαποικοδόμησης από το αέριο του υπερκείμενου χώρου με χρήση της εξίσωσης [10] και το συνολικό ποσοστό της βιοαποικοδόμησης με χρήση της εξίσωσης [11]:

$$D_h = (m_h \,/\, m_v) \times 100 \quad \text{Εξίσωση [10]}$$

$$D_t = (m_t \,/\, m_v) \times 100 \quad \text{Εξίσωση [11]}$$

όπου:

D_h = βιοαποικοδόμηση από το αέριο του υπερκείμενου χώρου (%),

D_t = συνολική βιοαποικοδόμηση (%),

Τα m_h, m_v και m_t έχουν όπως ορίζεται παραπάνω.

Ο βαθμός πρωτογενούς βιοαποικοδόμησης υπολογίζεται από τις (προαιρετικές) μετρήσεις της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στην αρχή και στο τέλος της επώασης, με χρήση της εξίσωσης [12]:

$$D_p = (1 - S_e \,/\, S_i) \times 100 \quad \text{Εξίσωση [12]}$$

όπου:

D_p = πρωτογενής αποικοδόμηση της υπό δοκιμή ουσίας (%),

S_i = αρχική συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας (mg/l),

S_e = συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο τέλος της δοκιμής (mg/l).

Εάν η μέθοδος ανάλυσης υποδεικνύει σημαντικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας στο μη τροποποιημένο αναερόβιο εμβόλιο ιλύος, χρησιμοποιείται η εξίσωση [13]:

▼M6

$$D_p^{\,1} = [1 - (S_e - S_{eb}) / (S_i - S_{ib})] \times 100 \quad \text{Εξίσωση [13]}$$

όπου:

$D_p^{\,1}$ = διορθωμένη πρωτογενής αποικοδόμηση της υπό δοκιμή ουσίας (%),

S_{ib} = αρχική «φαινόμενη» συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στους μάρτυρες τυφλού (mg/l),

S_{eb} = «φαινόμενη» συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στους μάρτυρες τυφλού στο τέλος της δοκιμής (mg/l).

Εγκυρότητα των αποτελεσμάτων

50. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οι ενδείξεις πίεσης μόνο από δοχεία που δεν παρουσιάζουν ροζ χρωματισμό (βλ. παράγραφο 33). Η επιμόλυνση με οξυγόνο ελαχιστοποιείται με τη χρήση ορθών αναερόβιων τεχνικών χειρισμού.

51. Η δοκιμή θα πρέπει να θεωρείται έγκυρη εάν η ουσία αναφοράς φτάσει σε φάση οριζοντίωσης που αντιπροσωπεύει βιοαποικοδόμηση μεγαλύτερη από 60 % ([1]).

52. Εάν το pH στο τέλος της δοκιμής υπερβαίνει την τιμή 7 ± 1 και δεν έχει πραγματοποιηθεί επαρκής βιοαποικοδόμηση, η δοκιμή επαναλαμβάνεται με αύξηση της ρυθμιστικής ικανότητας του μέσου.

Αναστολή της αποικοδόμησης

53. Η παραγωγή αερίου στα δοχεία που περιέχουν τόσο την υπό δοκιμή ουσία όσο και την ουσία αναφοράς θα πρέπει να είναι τουλάχιστον ίση με αυτή στα δοχεία που περιέχουν μόνο την ουσία αναφοράς. Διαφορετικά, υποδεικνύεται αναστολή της παραγωγής αερίου. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η παραγωγή αερίου σε δοχεία που περιέχουν την υπό δοκιμή ουσία χωρίς την ουσία αναφοράς θα είναι μικρότερη από αυτή στους μάρτυρες τυφλού, γεγονός που υποδεικνύει ότι η υπό δοκιμή ουσία είναι ανασταλτική.

Έκθεση δοκιμής

54. Η έκθεση της δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Υπό δοκιμή ουσία:

— κοινή ονομασία, χημική ονομασία, αριθμός CAS, συντακτικός τύπος και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

— καθαρότητα (ξένες προσμείξεις) της υπό δοκιμή ουσίας.

Συνθήκες δοκιμής:

— όγκοι του αραιωμένου υγρού χωνευτηρίου (V_l) και του υπερκείμενου χώρου (V_h) στο δοχείο,

— περιγραφή των δοχείων δοκιμής, των κύριων χαρακτηριστικών της μέτρησης βιοαερίου (π.χ. τύπος μετρητή πίεσης) και του αναλυτή IC,

— εφαρμογή της υπό δοκιμή ουσίας και της ουσίας αναφοράς στο σύστημα δοκιμής: χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση δοκιμής και κάθε χρήση διαλυτών,

— λεπτομέρειες του χρησιμοποιούμενου εμβολίου: ονομασία της εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων, περιγραφή της πηγής των λυμάτων που υπέστησαν επεξεργασία (π.χ. θερμοκρασία λειτουργίας, χρόνος παραμονής της ιλύος, κατά κύριο λόγο οικιακά λύματα κ.λπ.), συγκέντρωση, κάθε πληροφορία που απαιτείται για επιβεβαίωση και πληροφορίες σχετικά με τυχόν προκατεργασία του εμβολίου (π.χ. προχώνευση, προέκθεση),

— θερμοκρασία επώασης,

— αριθμός των επαναλήψεων.

([1]) Θα πρέπει να γίνεται επανεκτίμηση εάν συμπεριλαμβάνονται προσροφητικές και αδιάλυτες χημικές ουσίες αναφοράς.

▼M6

Αποτελέσματα:

— τιμές pH και IC στο τέλος της δοκιμής,

— συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής, εάν έχει πραγματοποιηθεί ειδική μέτρηση,

— όλα τα μετρηθέντα δεδομένα που συλλέγονται στα δοχεία δοκιμής, τυφλού, ουσίας αναφοράς και μάρτυρα αναστολής, κατά περίπτωση [π.χ. πίεση σε millibar, συγκέντρωση ανόργανου άνθρακα (mg/l)] σε μορφή πίνακα (τα μετρηθέντα δεδομένα για τον υπερκείμενο χώρο και το υγρό θα πρέπει να μετρώνται χωριστά),

— στατιστική επεξεργασία των δεδομένων, διάρκεια δοκιμής και διάγραμμα της βιοαποικοδόμησης της υπό δοκιμή ουσίας, της ουσίας αναφοράς και του μάρτυρα αναστολής,

— ποσοστό βιοαποικοδόμησης της υπό δοκιμή ουσίας και της ουσίας αναφοράς,

— αιτιολογία οποιασδήποτε απόρριψης των αποτελεσμάτων των δοκιμών,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Τα ακόλουθα κεφάλαια του παρόντος παραρτήματος:

Γ.4, Προσδιορισμός της άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας,

Γ.9, Βιοαποικοδόμηση — Δοκιμή Zahn-Wellens,

Γ.10, Δοκιμή προσομοίωσης — Αερόβια επεξεργασία λυμάτων:

Α: Μονάδες ενεργοποιημένης ιλύος, Β: Βιομεμβράνες

Γ.11, Βιοαποικοδόμηση — Αναστολή αναπνοής ενεργοποιημένης ιλύος

(2) OECD (2009) Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II), OECD Guideline for Testing of Chemicals, Αρ. 302C, ΟΟΣΑ, Παρίσι

(3) Birch, R. R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga,U., Steber, J., Reust, H. και Bontinck, W.J. (1989) Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527-1550. (Έχει εκδοθεί επίσης ως τεχνική έκθεση ECETOC Αρ. 28, Ιούνιος 1988).

(4) Shelton D.R. και Tiedje, J.M. (1984) General method for determining anaerobic biodegradation potential. Appl. Environ. Mircobiology, 47, 850-857.

(5) Owen, W.F., Stuckey, DC., Healy J.B., Jr, Young L.Y. και McCarty, P.L. (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. Water Res. 13, 485-492.

(6) Healy, J.B.Jr. και Young, L.Y. (1979) Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. Appl. Environ. Microbiol. 38, 84-89.

(7) Gledhill, W.E. (1979) Proposed standard practice for the determination of the anaerobic biodegradation of organic chemicals. Έγγραφο εργασίας. Προσχέδιο 2 Αρ. 35.24. Αμερικανική εταιρεία δοκιμών υλικών, Φιλαδέλφεια.

(8) Battersby, N.S. και Wilson, V. (1988) Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic chemicals under methanogenic conditions. Chemosphere, 17, 2441-2460.

(9) E1192-92. Standard Test Method for Determining the Anaerobic Biodegradation Potential of Organic Chemicals. ASTM, Φιλαδέλφεια.

▼**M6**

(10) US-EPA (1998) Fate, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS 835.3400 Anaerobic Biodegradability of Organic Chemicals.

(11) Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης (1995) ISO 11 734 Water Quality — Evaluation of the ultimate anaerobic biodegradation of organic compounds in digested sludge — Method by measurement of the biogas production.

(12) Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης (2003) ISO 13 641-1 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 1 General Test.

(13) Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης (1995) ISO 10 634 Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

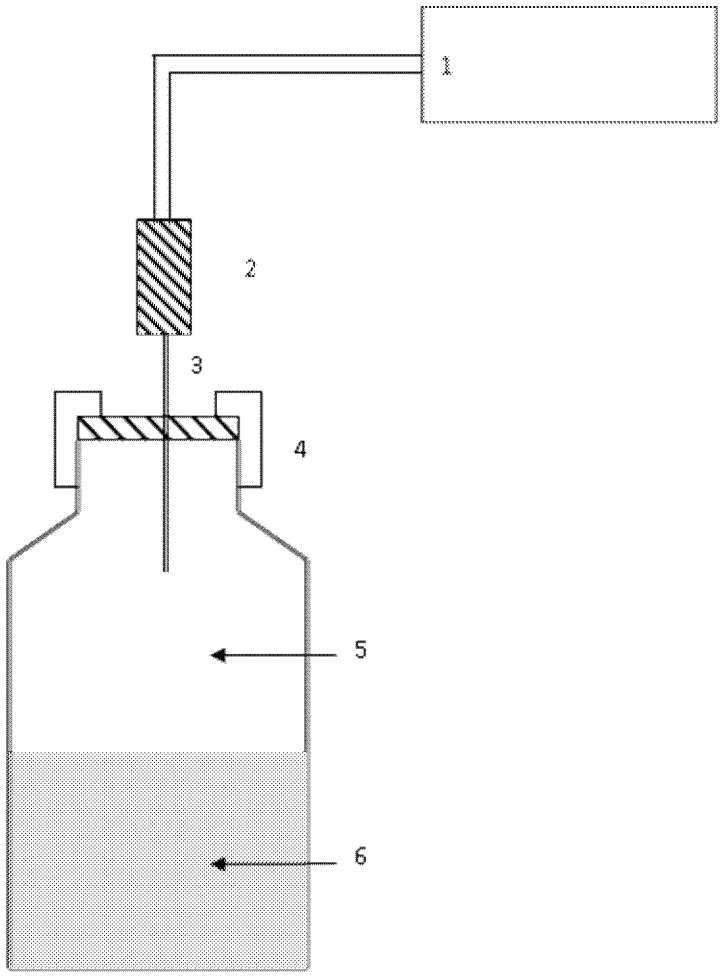
(14) Pagga, U. και Beimborn, D.B., (1993) Anaerobic biodegradation test for organic compounds. Chemosphere, 27, 1499-1509.

(15) Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης (1997) ISO 11 923 Water Quality — Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼**M6**

Προσάρτημα 1

Παράδειγμά συσκευής για μέτρησή τη παράγωγης βιοαερίου μέσω τη πίεσης αέριου



Υπόμνημα:

1 — Μετρητής πίεσης

2 — Τριοδική αεροστεγανή βαλβίδα

3 — Βελόνα σύριγγας

4 — Αεροστεγανή σφράγιση (πώμα και διάφραγμα)

5 — Υπερκείμενος χώρος (V_h)

6 — Εμβόλιο χωνευμένης ιλύος (V_l)

Δοχεία δοκιμής σε περιβάλλον με θερμοκρασία 35 °C ± 2 °C

▼M6

Προσάρτημα 2

Μετατροπή του μετρητή πίεσης

Οι ενδείξεις του μετρητή πίεσης μπορεί να σχετίζονται με τους όγκους αερίου μέσω μιας πρότυπης καμπύλης που δημιουργείται από την έγχυση γνωστών όγκων αέρα στους 35 °C ± 2 °C σε φιάλες ορού που περιέχουν όγκο νερού ίσο με τον όγκο του μείγματος αντίδρασης, V_R:

— Διανέμονται κλάσματα νερού V_R ml, τα οποία διατηρούνται στους 35 °C ± 2 °C σε πέντε φιάλες ορού. Οι φιάλες σφραγίζονται και τοποθετούνται σε ένα υδατόλουτρο στους 35 °C για 1 ώρα για επίτευξη εξισορρόπησης,

— Ενεργοποιείται ο μετρητής πίεσης, αφήνεται να σταθεροποιηθεί και προσαρμόζεται στο μηδέν,

— Εισάγεται η βελόνα σύριγγας μέσω της σφράγισης σε μία από τις φιάλες, ανοίγεται η βαλβίδα μέχρι η ένδειξη του μετρητή πίεσης να μηδενιστεί και μετά κλείνεται η βαλβίδα,

— Η διαδικασία επαναλαμβάνεται με τις υπόλοιπες φιάλες.

— Εγχέεται 1 ml αέρα στους 35 °C ± 2 °C σε κάθε φιάλη. Εισάγεται η βελόνα (στον μετρητή) μέσω της σφράγισης σε μία από τις φιάλες και αφήνεται ώστε να σταθεροποιηθεί η ένδειξη πίεσης. Καταγράφεται η πίεση, ανοίγεται η βαλβίδα μέχρι η ένδειξη του μετρητή πίεσης να μηδενιστεί και μετά κλείνεται η βαλβίδα,

— Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για τις υπόλοιπες φιάλες,

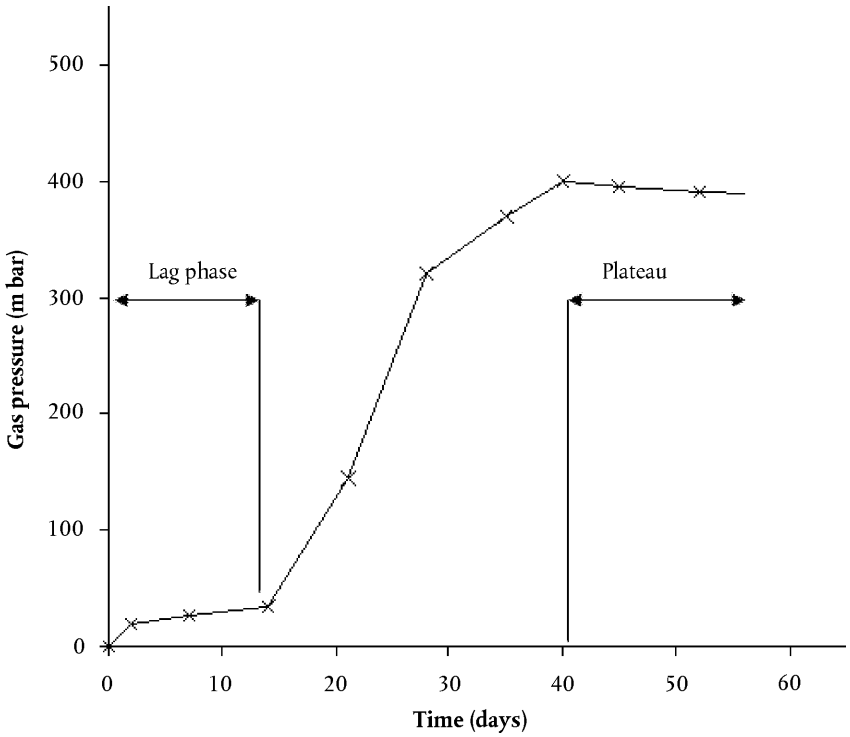
— Επαναλαμβάνεται ολόκληρη η παραπάνω διαδικασία με χρήση 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml και 50 ml αέρα,

— Σχεδιάζεται μια καμπύλη μετατροπής της πίεσης (Pa) συναρτήσει του όγκου αερίου που εγχύθηκε Vb (ml). Η ανταπόκριση του οργάνου είναι γραμμική στην περιοχή από 0 Pa έως 70 000 Pa και για παραγωγή αερίου από 0 ml έως 50 ml.

▼**M6**

Προσάρτημα 3

Παράδειγμά Καμπύλης βιοαποικοδημησησ (αθροιστική καθαρή αύξησή πίεσης)



▼M6

Προσάρτημα 4

Παράδειγμά φύλλων δεδομένων για τη δοκιμή αναερόβιας βιοαποικοδομήσιμος — φύλλο δεδομένων για την ελεγχομένη ουσία

Εργαστήριο: ..... Υπό δοκιμή ουσία: ..... Αρ. δοκιμής: .....

Θερμοκρασία δοκιμής:(°C): ..... Όγκος υπερκείμενου χώρου (V_h): .....(l) Όγκος υγρού (V_l): .....(l)

Άνθρακας στην υπό δοκιμή ουσία $C_{c,v}$: .....(mg/l) m_v [1]: .....(mg)

Ημέρα	p_1 (δοκιμή) (mbar)	p_2 (δοκιμή) (mbar)	p_3 (δοκιμή) (mbar)	p (δοκιμή) μέση τιμή (mbar)	p_4 (τυφλό) (mbar)	p_5 (τυφλό) (mbar)	p_6 (τυφλό) (mbar)	p (τυφλό) μέση τιμή (mbar)	p (καθαρό) δοκιμή — τυφλό μέση τιμή (mbar)	Δp (καθαρό) Αθροιστικά στοιχεία (mbar)	m_h υπερκείμενος χώρος C [2] (mg)	D_h Βιοαποικοδόμηση [3] (%)
	$C_{IC,\ 1}$ δοκιμή (mg)	$C_{IC,\ 2}$ δοκιμή (mg)	$C_{IC,\ 3}$ δοκιμή (mg)	C_{IC} μέση τιμή δοκιμής (mg)	$C_{IC,\ 4}$ τυφλό (mg)	$C_{IC,\ 5}$ τυφλό (mg)	$C_{IC,\ 6}$ τυφλό (mg)	C_{IC} μέση τιμή τυφλού (mg)	$C_{IC,\ net}$ δοκιμή — τυφλό μέση τιμή (mg)	m_l υγρός C [4] (mg)	m_t συνολικός C [5] (mg)	D_t Βιοαποικοδόμηση [6] (%)
IC (τέλος)												
pH (τέλος)												

([1]) Άνθρακας στο δοχείο δοκιμής, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$

([2]) Άνθρακας στον υπερκείμενο χώρο, m_h (mg) σε κανονική θερμοκρασία επώασης (35 °C): $m_h = 0{,}468\ \Delta p \times V_h$

([3]) Βιοαποικοδόμηση που υπολογίζεται από το αέριο του υπερκείμενου χώρου, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$

([4]) Άνθρακας στο υγρό, ml (mg): ml = CIC,net×Vl

([5]) Συνολικός αεριοποιημένος άνθρακας, mt (mg): mt + ml

([6]) Συνολική βιοαποικοδόμηση, Dt (%): Dt = (mt×100) / mv

▼M6

Εργαστήριο: ..... Ουσία αναφοράς: ..... Αρ. δοκιμής: .....

Θερμοκρασία δοκιμής:(°C): ..... Όγκος υπερκείμενου χώρου (V_h): .....(l) Όγκος υγρού (V_l) (λίτρα):.....

Άνθρακας στην ουσία αναφοράς $C_{c,v}$ (mg/l):..... m_v [1]*(mg):*

Ημέρα	p_1 (αναφ.) (mbar)	p_2 (αναφ.) (mbar)	p_3 (αναφ.) (mbar)	p (αναφ.) μέση τιμή (mbar)	p_4 (αναστ.) (mbar)	p_5 (αναστ.) (mbar)	p_6 (αναστ.) (mbar)	p (αναστ.) μέση τιμή (mbar)	p (αναφ.) αναφ. — τυφλό (mbar)	Δp (αναφ.) αθροιστικά στοιχεία (mbar)	m_h υπερκείμενος χώρος C [2] (mg)	D_h Βιοαποικοδόμηση [3] (%)
	$C_{IC,\ 1}$ αναφ. (mg)	$C_{IC,\ 2}$ αναφ. (mg)	$C_{IC,\ 3}$ αναφ. (mg)	C_{IC} μέση τιμή αναφ. (mg)	$C_{IC,\ 4}$ αναστ. (mg)	$C_{IC,\ 5}$ αναστ. (mg)	$C_{IC,\ 6}$ αναστ. (mg)	C_{IC} μέση τιμή αναστ. (mg)	$C_{IC,\ net}$ αναφ. — αναστ. (mg)	m_l υγρός C [4] (mg)	m_t συνολικός C [5] (mg)	D_t Βιοαποικοδόμηση [6] (%)
IC (τέλος)												
pH (τέλος)												

([1]) Άνθρακας στο δοχείο δοκιμής, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$
([2]) Άνθρακας στον υπερκείμενο χώρο, m_h (mg) σε κανονική θερμοκρασία επώασης (35 °C): $m_h = 0{,}468\ \Delta p \times V_h$
([3]) Βιοαποικοδόμηση που υπολογίζεται από το αέριο του υπερκείμενου χώρου, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$
([4]) Άνθρακας στο υγρό, m_l (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$
([5]) Συνολικός αεριοποιημένος άνθρακας, m_t (mg): $m_t + m_l$
([6]) Συνολική βιοαποικοδόμηση, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100) / m_v$

▼M6

Γ.44. ΑΠΟΠΛΥΣΗ ΣΕ ΣΤΗΛΕΣ ΕΔΑΦΟΥΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 312 του ΟΟΣΑ (2004). Οι ανθρωπογενείς χημικές ουσίες μπορεί να φτάσουν στο έδαφος άμεσα μέσω σκόπιμης εφαρμογής (π.χ. αγροχημικά προϊόντα) ή μέσω έμμεσων οδών (π.χ. μέσω λυμάτων → λυματολάσπης → εδάφους ή αέρα → υγρής/ξηρής εναπόθεσης). Για να εκτιμηθεί ο κίνδυνος αυτών των χημικών ουσιών, είναι σημαντικό να υπολογιστεί το δυναμικό τους για μετατροπή στο έδαφος και για μετακίνηση (απόπλυση) στα βαθύτερα στρώματα του εδάφους και εν τέλει στα υπόγεια ύδατα.

2. Υπάρχουν διαθέσιμες αρκετές μέθοδοι για τη μέτρηση του δυναμικού απόπλυσης χημικών ουσιών στο έδαφος κάτω από ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες, δηλ. χρωματογραφία λεπτής στιβάδας του εδάφους, χρωματογραφία παχιάς στοιβάδας του εδάφους, χρωματογραφία στήλης του εδάφους και μετρήσεις προσρόφησης — εκρόφησης (1)(2). Για μη ιονισμένες χημικές ουσίες, ο συντελεστής κατανομής n-οκτανόλης/νερού (P_{ow}) επιτρέπει την πρώιμη εκτίμηση του δυναμικού προσρόφησης και απόπλυσής τους (3)(4)(5).

3. Η μέθοδος που περιγράφεται σε αυτήν τη μέθοδο δοκιμών βασίζεται στη χρωματογραφία στήλης του εδάφους σε διαταραγμένο έδαφος (για τον ορισμό, βλ. προσάρτημα 1). Διενεργούνται δύο είδη πειραμάτων για τον προσδιορισμό (i) του δυναμικού απόπλυσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και (ii) του δυναμικού απόπλυσης των προϊόντων μετατροπής (μελέτη με παλαιωμένα υπολείμματα) σε εδάφη κάτω από ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες ([1]). Η μέθοδος δοκιμών βασίζεται σε υφιστάμενες μεθόδους (6)(7)(8)(9)(10)(11).

4. Σε συνάντηση εργασίας του ΟΟΣΑ για την επιλογή εδαφών/ιζημάτων, που πραγματοποιήθηκε στο Belgirate, στην Ιταλία, το 1995 (12) συμφωνήθηκε ο αριθμός και ο τύπος των προς χρήση εδαφών στην παρούσα μέθοδο δοκιμών. Επίσης διατυπώθηκαν συστάσεις σχετικά με τη συλλογή, τον χειρισμό και την αποθήκευση δειγμάτων εδάφους για πειράματα απόπλυσης.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

5. Στήλες κατασκευασμένες από κατάλληλα αδρανές υλικό (π.χ. γυαλί, ανοξείδωτος χάλυβας, αλουμίνιο, teflon, PVC κ.λπ.) συσκευάζονται με έδαφος και στη συνέχεια υπόκεινται σε κορεσμό και εξισορρόπηση με διάλυμα «τεχνητής βροχής» (για τον ορισμό, βλ. προσάρτημα 1) και αφήνονται για αποστράγγιση. Κατόπιν, στην επιφάνεια κάθε στήλης εδάφους τοποθετείται η υπό δοκιμή χημική ουσία ή/και παλαιωμένα υπολείμματα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Στη συνέχεια, εφαρμόζεται τεχνητή βροχή στις στήλες εδάφους και συλλέγεται το απόπλυμα. Μετά τη διαδικασία απόπλυσης, το έδαφος αφαιρείται από τις στήλες και χωρίζεται στον ανάλογο αριθμό τμημάτων με βάση τις πληροφορίες που απαιτούνται από τη μελέτη. Στη συνέχεια, κάθε τμήμα εδάφους καθώς και το απόπλυμα αναλύονται για την ανίχνευση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και, κατά περίπτωση, των προϊόντων μετατροπής ή άλλων χημικών ουσιών ενδιαφέροντος.

ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

6. Η μέθοδος δοκιμών εφαρμόζεται στις υπό δοκιμή χημικές ουσίες (μη επισημασμένες ή ραδιοσημασμένες: π.χ. ^{14}C) για τις οποίες υπάρχει διαθέσιμη αναλυτική μέθοδος επαρκούς ακρίβειας και ευαισθησίας. Η μέθοδος δοκιμών δεν θα πρέπει να εφαρμόζεται σε χημικές ουσίες που είναι πτητικές από το έδαφος και το νερό και επομένως δεν παραμένουν στο έδαφος ή/και στο απόπλυμα κάτω από τις πειραματικές συνθήκες αυτής της μεθόδου δοκιμών.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

7. Μπορούν να χρησιμοποιούνται μη επισημασμένες ή ραδιοσημασμένες υπό δοκιμή χημικές ουσίες για τη μέτρηση της συμπεριφοράς απόπλυσης σε στήλες εδάφους. Για τη μελέτη της απόπλυσης των προϊόντων μετατροπής

([1]) Μελέτες απόπλυσης στήλης με φυτοπροστατευτικά προϊόντα ενδέχεται να παράσχουν πληροφορίες για την κινητικότητα μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας και των προϊόντων μετατροπής της, καθώς και να συμπληρώσουν ένα σύνολο μελετών ρόφησης.

▼**M6**

(παλαιωμένα υπολείμματα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας) και για προσδιορισμούς ισοζυγίων μάζας απαιτείται ραδιοσημασμένο υλικό. Συνιστάται η επισήμανση ^{14}C, πλην όμως η χρήση άλλων ισοτόπων, όπως των ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P, ενδέχεται να είναι επίσης χρήσιμη. Στο μέτρο του δυνατού, το ισότοπο πρέπει να τοποθετείται στο/στα σταθερότερο(-α) μέρος(-η) του μορίου. Η καθαρότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 95 %.

8. Οι περισσότερες χημικές ουσίες θα πρέπει να εφαρμόζονται ως μεμονωμένη ουσία. Ωστόσο, για δραστικές ουσίες σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα, μπορούν να χρησιμοποιούνται σκευάσματα για τη μελέτη της απόπλυσης της μητρικής υπό δοκιμή χημικής ουσίας, αλλά απαιτείται ιδιαίτερα να πραγματοποιούνται δοκιμές σε αυτά όταν το μείγμα είναι πιθανό να επηρεάσει τον ρυθμό αποδέσμευσης (π.χ. κοκκώδη σκευάσματα ή σκευάσματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης). Σχετικά με τις ειδικές απαιτήσεις του μείγματος για τον σχεδιασμό της δοκιμής, ενδέχεται να είναι χρήσιμες οι διαβουλεύσεις με τη ρυθμιστική αρχή πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμής. Για μελέτες απόπλυσης παλαιωμένων υπολειμμάτων, θα πρέπει να χρησιμοποιείται η καθαρή μητρική υπό δοκιμή χημική ουσία.

9. Πριν από τη διεξαγωγή δοκιμών απόπλυσης σε στήλες εδάφους, θα πρέπει, κατά προτίμηση, να είναι διαθέσιμα τα ακόλουθα στοιχεία για την υπό δοκιμή χημική ουσία:

(1) υδατοδιαλυτότητα [μέθοδος δοκιμών Α.6] (13),

(2) διαλυτότητα σε οργανικούς διαλύτες,

(3) τάση ατμών [μέθοδος δοκιμών Α.4](13) και σταθερά του νόμου του Henry,

(4) συντελεστής κατανομής n-οκτανόλης/νερού [μέθοδοι δοκιμών Α.8 και Α.24] (13),

(5) συντελεστής προσρόφησης (K_d, K_f ή K_{OC}) [μέθοδοι δοκιμών Γ.18 ή/και Γ.19] (13),

(6) υδρόλυση [μέθοδος δοκιμών Γ.7] (13),

(7) σταθερά διαστάσεως (pK_a) [κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 112 του ΟΟΣΑ] (25),

(8) αερόβια και αναερόβια μετατροπή στο έδαφος [μέθοδος δοκιμών Γ.23] (13)

Σημείωση: Η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιήθηκαν αυτές οι μετρήσεις θα πρέπει να αναφέρεται στις αντίστοιχες εκθέσεις της δοκιμής.

10. Η ποσότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που εφαρμόζεται στις στήλες εδάφους θα πρέπει να είναι επαρκής για να καθίσταται δυνατή η ανίχνευση τουλάχιστον 0,5 % της εφαρμοζόμενης δόσης σε οποιοδήποτε μεμονωμένο τμήμα. Για δραστικές χημικές ουσίες σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα, η ποσότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που εφαρμόζεται μπορεί να αντιστοιχεί στη μέγιστη συνιστώμενη αναλογία χρήσης (μία εφαρμογή).

11. Πρέπει να υπάρχει κατάλληλη αναλυτική μέθοδος γνωστής ακρίβειας (accuracy), πιστότητας (precision) και ευαισθησίας, για τον ποσοτικό προσδιορισμό της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και, κατά περίπτωση, των προϊόντων μετατροπής της σε έδαφος και απόπλυμα. Θα πρέπει επίσης να είναι γνωστό το αναλυτικό όριο ανίχνευσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και των σημαντικών προϊόντων μετατροπής της (κανονικά τουλάχιστον όλα τα προϊόντα μετατροπής ≥10 % της εφαρμοζόμενης δόσης που παρατηρούνται στις μελέτες της οδού μετατροπής, αλλά κατά προτίμηση κάθε σχετικό προϊόν μετατροπής ενδιαφέροντος) (βλ. παράγραφο 17).

▼M6

ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣΑΝΑΦΟΡΑΣ

12. Για την αξιολόγηση της σχετικής κινητικότητας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο έδαφος, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται χημικές ουσίες αναφοράς με γνωστή συμπεριφορά απόπλυσης, όπως η ατραζίνη ή το μονουρόν που μπορούν να θεωρούνται μέτριοι παράγοντες απόπλυσης στο έδαφος (1)(8)(11). Μια μη προσροφητική και μη αποικοδομήσιμη πολική χημική ουσία αναφοράς (π.χ. τρίτιο, βρωμίδιο, φλουορεσκεΐνη, ηωσίνη) για την παρακολούθηση της κίνησης του νερού στη στήλη ενδέχεται να είναι επίσης χρήσιμη για την επιβεβαίωση των υδροδυναμικών ιδιοτήτων της στήλης εδάφους.

13. Για τον χαρακτηρισμό ή/και την ταυτοποίηση προϊόντων μετατροπής που περιέχονται στα τμήματα εδάφους και στα αποπλύματα μέσω χρωματογραφικής, φασματοσκοπικής ή άλλης σχετικής μεθόδου ενδέχεται να είναι χρήσιμες και τυποποιημένες χημικές ουσίες ανάλυσης.

ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

14. Βλέπε προσάρτημα 1.

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Ανάκτηση

15. Το άθροισμα των ποσοστών της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που βρίσκεται στα τμήματα του εδάφους και στο απόπλυμα της στήλης μετά την απόπλυση παρέχει την ανάκτηση για ένα πείραμα απόπλυσης. Τα ποσοστά ανάκτησης θα πρέπει να κυμαίνονται από 90 έως 110 % για ραδιοσημασμένες χημικές ουσίες (11) και από 70 έως 110 % για μη επισημασμένες χημικές ουσίες (8).

Επαναληψιμότητα και ευαισθησία της αναλυτικής μεθόδου

16. Η επαναληψιμότητα της αναλυτικής μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και των προϊόντων μετατροπής μπορεί να ελέγχεται με μια δεύτερη ανάλυση του ίδιου εκχυλίσματος ενός τμήματος εδάφους ή ενός αποπλύματος (βλ. παράγραφο 11).

17. Το όριο ανίχνευσης (LOD) της αναλυτικής μεθόδου για την υπό δοκιμή χημική ουσία και τα προϊόντα μετατροπής θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 0,01 $mg \cdot kg^{-1}$ σε κάθε τμήμα εδάφους ή απόπλυμα (ως υπό δοκιμή χημική ουσία) ή 0,5 % της εφαρμοζόμενης δόσης σε οποιοδήποτε μεμονωμένο τμήμα, όποια τιμή είναι χαμηλότερη. Θα πρέπει επίσης να προσδιορίζεται και το όριο του ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Σύστημα δοκιμής

18. Για τη δοκιμή χρησιμοποιούνται στήλες απόπλυσης (με ή χωρίς δυνατότητα διαχωρισμού σε τμήματα) κατασκευασμένες από κατάλληλα αδρανές υλικό (π.χ. γυαλί, ανοξείδωτος χάλυβας, αλουμίνιο, teflon, PVC κ.λπ.) με εσωτερική διάμετρο τουλάχιστον 4 cm και ελάχιστο ύψος 35 cm. Τα υλικά των στηλών θα πρέπει να ελέγχονται για πιθανές αλληλεπιδράσεις με την υπό δοκιμή χημική ουσία ή/και τα προϊόντα μετατροπής της. Παραδείγματα κατάλληλων στηλών με ή χωρίς δυνατότητα διαχωρισμού σε τμήματα παρουσιάζονται στο προσάρτημα 2.

19. Για την πλήρωση και συσκευασία των στηλών εδάφους χρησιμοποιείται κουτάλι, έμβολο και συσκευή δόνησης.

20. Για την εφαρμογή τεχνητής βροχής στις στήλες εδάφους μπορούν να χρησιμοποιούνται εμβολοφόρες ή περισταλτικές αντλίες, κεφαλές κατάβρεξης, φιάλες Mariotte ή απλές σταγονομετρικές χοάνες.

▼M6

Εργαστηριακός εξοπλισμός και χημικές ουσίες

21. Απαιτείται συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός, και ειδικότερα:

(1) αναλυτικά όργανα, όπως συσκευές αέριας χρωματογραφίας υγρού-αέριου (GLC), υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) και χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC), συμπεριλαμβανομένων κατάλληλων συστημάτων ανίχνευσης για την ανάλυση επισημασμένων ή μη επισημασμένων χημικών ουσιών ή για τη μέθοδο αντίστροφης αραίωσης ισοτόπων,

(2) όργανα ταυτοποίησης (π.χ. φασματομετρίας μάζας (MS), αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (GC-MS), υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης-φασματομετρίας μάζας (HPLC-MS), φασματομετρίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) κ.λπ.),

(3) μετρητής υγρού σπινθηρισμού για ραδιοσημασμένη υπό δοκιμή χημική ουσία,

(4) οξειδωτής για την καύση του επισημασμένου υλικού,

(5) συσκευή εκχυλίσεως (π.χ. σωλήνες φυγοκέντρου για ψυχρή εκχύλιση και συσκευή Soxhlet για συνεχή εκχύλιση υπό αναρροή),

(6) συσκευές για τη συμπύκνωση διαλυμάτων και εκχυλισμάτων (π.χ. περιστρεφόμενος εξατμιστήρας).

22. Οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν: οργανικούς διαλύτες αναλυτικής καθαρότητας, όπως ακετόνη, μεθανόλη κ.λπ., υγρό σπινθηρισμού, διάλυμα $CaCl_2$ 0,01 M σε απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό (= τεχνητή βροχή).

Υπό δοκιμή χημική ουσία

23. Για την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στη στήλη εδάφους, η ουσία θα πρέπει να διαλύεται σε νερό (απιονισμένο ή απεσταγμένο). Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι δυσδιάλυτη στο νερό, μπορεί να εφαρμόζεται είτε ως σκεύασμα (εάν είναι απαραίτητο, κατόπιν σχηματισμού εναιωρήματος ή γαλακτώματος σε νερό) ή μέσα σε οποιονδήποτε οργανικό διαλύτη. Σε περίπτωση που χρησιμοποιείται οργανικός διαλύτης, θα πρέπει να περιορίζεται στο ελάχιστο και να εξατμίζεται από την επιφάνεια της στήλης εδάφους πριν από την έναρξη της διαδικασίας απόπλυσης. Τα στερεά σκευάσματα, όπως κοκκία, θα πρέπει να εφαρμόζονται στη στερεά μορφή χωρίς νερό. Για την καλύτερη κατανομή σε ολόκληρη την επιφάνεια της στήλης εδάφους, το σκεύασμα μπορεί να αναμειγνύεται με μια μικρή ποσότητα χαλαζιακής άμμου (π.χ. 1 g) πριν από την εφαρμογή.

24. Η ποσότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που εφαρμόζεται στις στήλες εδάφους θα πρέπει να είναι επαρκής για να καθίσταται δυνατή η ανίχνευση τουλάχιστον 0,5 % της εφαρμοζόμενης δόσης σε οποιοδήποτε μεμονωμένο τμήμα. Για δραστικές χημικές ουσίες σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα, αυτή μπορεί να βασίζεται στη μέγιστη συνιστώμενη αναλογία χρήσης (αναλογία μίας εφαρμογής) και θα πρέπει να σχετίζεται με την επιφάνεια της στήλης εδάφους που χρησιμοποιείται, τόσο για την απόπλυση της μητρικής υπό δοκιμή χημικής ουσίας όσο και των παλαιωμένων υπολειμμάτων ([1]).

Χημική ουσία αναφοράς

25. Στα πειράματα απόπλυσης θα πρέπει να χρησιμοποιείται μια χημική ουσία αναφοράς (βλ. παράγραφο 12). Θα πρέπει να εφαρμόζεται στην επιφάνεια της στήλης εδάφους με παρόμοιο τρόπο όπως και για την υπό δοκιμή

([1]) Η ποσότητα προς εφαρμογή σε κυλινδρικές στήλες εδάφους μπορεί να υπολογίζεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$M\ [\mu g] = \frac{A\ [kg/ha] \cdot 10^9 [\mu g/kg] \cdot d^2 [cm^2] \cdot \pi}{10^8 [cm^2/ha] \cdot 4}$$

όπου:

M = εφαρμοζόμενη ποσότητα ανά στήλη [μg]

A = αναλογία εφαρμογής [$kg \cdot ha^{-1}$]

d = διάμετρος της στήλης εδάφους [cm]

π = 3,14

▼M6

χημική ουσία και σε κατάλληλη αναλογία η οποία επιτρέπει την επαρκή ανίχνευσή της είτε ως εσωτερικό πρότυπο μαζί με την υπό δοκιμή χημική ουσία στην ίδια στήλη εδάφους είτε ξεχωριστά σε άλλη στήλη εδάφους. Προτιμάται οι δύο χημικές ουσίες να εφαρμόζονται στην ίδια στήλη, εκτός εάν έχουν και οι δύο παρόμοια επισήμανση.

Εδάφη

Επιλογή εδάφους

26. Για μελέτες απόπλυσης με τη μητρική υπό δοκιμή χημική ουσία, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται 3 έως 4 εδάφη διαφορετικού pH, διαφορετικής περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα και διαφορετικής υφής (12). Καθοδήγηση για την επιλογή εδαφών για πειράματα απόπλυσης παρέχεται παρακάτω στον πίνακα 1. Για ιοντικές υπό δοκιμή χημικές ουσίες, τα επιλεγμένα εδάφη θα πρέπει να καλύπτουν ένα μεγάλο εύρος pH, προκειμένου να αξιολογείται η κινητικότητα της χημικής ουσίας στις ιοντικές και μη ιοντικές μορφές της. Τουλάχιστον 3 εδάφη θα πρέπει να έχουν pH στο οποίο η υπό δοκιμή χημική ουσία βρίσκεται στην κινητή μορφή της.

Πίνακας 1

Καθοδήγηση για την επιλογή εδαφών για μελέτες απόπλυσης

Αρ. εδάφους	Τιμή pH	Οργανικός άνθρακας %	Περιεκτικότητα αργίλου %	Υφή (*)
1	> 7,5	3,5-5,0	20-40	αργιλώδης πηλός
2	5,5-7,0	1,5-3,0	15-25	προσχωσιγενής άργιλος
3	4,0-5,5	3,0-4,0	15-30	πηλός
4	< 4,0-6,0 §	< 0,5-1,5 § ‡	< 10-15 §	αργιλώδης άμμος
5	< 4,5	> 10 #	< 10	αργιλώδης άμμος/άμμος

(*) Σύμφωνα με τα συστήματα FAO και USDA (14).

§ Οι αντίστοιχες μεταβλητές θα πρέπει, κατά προτίμηση, να έχουν τιμές μέσα στην προβλεπόμενη περιοχή. Εάν, εντούτοις, συναντώνται δυσκολίες στην ανεύρεση κατάλληλων εδαφών, είναι αποδεκτές και τιμές κάτω της υποδεικνυόμενης ελάχιστης τιμής.

‡ Εδάφη με λιγότερο από 0,3 % οργανικό άνθρακα μπορεί να διαταράξουν τη σχέση μεταξύ περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα και προσρόφησης. Συνιστάται λοιπόν η χρήση εδαφών με περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα τουλάχιστον 0,3 %.

Τα εδάφη με πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε άνθρακα (π.χ. > 10 %) ενδεχομένως να μην είναι νομικώς αποδεκτά, π.χ. για λόγους καταχώρισης φυτοφαρμάκων.

27. Ορισμένες φορές μπορεί να απαιτούνται άλλοι τύποι εδαφών ώστε να αντιπροσωπεύονται ψυχρότερες, εύκρατες και τροπικές περιοχές. Επομένως, εάν προτιμώνται άλλοι τύποι εδάφους, θα πρέπει να χαρακτηρίζονται από τις ίδιες παραμέτρους και να παρουσιάζουν παρόμοιες διακυμάνσεις στις ιδιότητες με αυτές που περιγράφονται στην καθοδήγηση όσον αφορά την επιλογή εδαφών για μελέτες απόπλυσης (βλ. πίνακα 1 παραπάνω), ακόμη και εάν δεν ανταποκρίνονται στα κριτήρια επακριβώς.

28. Για μελέτες απόπλυσης με «παλαιωμένα υπολείμματα», θα πρέπει να χρησιμοποιείται ένα έδαφος (12). Θα πρέπει να έχει περιεκτικότητα άμμου > 70 % και περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα μεταξύ 0,5-1,5 % (π.χ. έδαφος αρ. 4 στον πίνακα 1). Ενδεχομένως να απαιτείται η χρήση περισσότερων τύπων εδάφους εάν τα δεδομένα για τα προϊόντα μετατροπής είναι σημαντικά.

29. Όλα τα εδάφη θα πρέπει να χαρακτηρίζονται τουλάχιστον όσον αφορά την υφή [% άμμου, % ιλύος, % αργίλου σύμφωνα με τα συστήματα ταξινόμησης FAO και USDA (14)], το pH, το δυναμικό ανταλλαγής κατιόντων, την περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, τη φαινόμενη πυκνότητα (για διαταραγμένα εδάφη) και την ικανότητα κατακράτησης ύδατος. Η μέτρηση

▼M6

της μικροβιακής βιομάζας απαιτείται μόνο για έδαφος που χρησιμοποιείται κατά την περίοδο παλαίωσης/επώασης, η οποία διεξάγεται πριν από το πείραμα απόπλυσης παλαιωμένων υπολειμμάτων. Για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων αυτής της μελέτης, μπορεί να είναι χρήσιμες πληροφορίες για πρόσθετες ιδιότητες του εδάφους (π.χ. ταξινόμηση του εδάφους, ορυκτολογία αργίλου, ειδική έκταση επιφάνειας). Για τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών των εδαφών, μπορούν να χρησιμοποιούνται οι μέθοδοι που συνιστώνται στις παραπομπές (15)(16)(17)(18)(19).

Συλλογή και αποθήκευση εδαφών

30. Τα εδάφη θα πρέπει να λαμβάνονται από το ανώτερο στρώμα (ορίζοντας A) σε μέγιστο βάθος 20 cm. Τα υπολείμματα από βλάστηση, μικροπανίδα και πέτρες θα πρέπει να απομακρύνονται. Τα εδάφη (εκτός αυτών που χρησιμοποιούνται για την παλαίωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας) ξηραίνονται στον αέρα σε θερμοκρασία δωματίου (κατά προτίμηση μεταξύ 20 και 25 °C). Τυχόν αποσυσσωμάτωση θα πρέπει να πραγματοποιείται με την ελάχιστη δυνατή δύναμη, έτσι ώστε η αρχική υφή του εδάφους να παραμένει κατά το δυνατόν αναλλοίωτη. Τα εδάφη κοσκινίζονται με κόσκινο ≤ 2 mm. Συνιστάται προσεκτική ομοιογενοποίηση, καθώς έτσι ενισχύεται η αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων. Πριν από τη χρήση, τα εδάφη μπορούν να αποθηκεύονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και να διατηρούνται αερόξηρα (12). Δεν προβλέπεται κάποιο χρονικό όριο στην αποθήκευση, τα εδάφη όμως που αποθηκεύονται για διάστημα μεγαλύτερο των 3 χρόνων θα πρέπει να επανυποβάλλονται, προτού χρησιμοποιηθούν, σε ανάλυση ως προς την περιεκτικότητά τους σε οργανικό άνθρακα και το pH.

31. Θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμες λεπτομερείς πληροφορίες για το ιστορικό των τόπων απ' όπου συλλέγονται τα εδάφη δοκιμής. Οι λεπτομέρειες περιλαμβάνουν την ακριβή τοποθεσία [καθορίζεται επακριβώς από το UTM (Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum) ή τις γεωγραφικές συντεταγμένες], την κάλυψη της βλάστησης, τις αγωγές με φυτοπροστατευτικές χημικές ουσίες, τις αγωγές με οργανικά και ανόργανα λιπάσματα, τις προσθήκες βιολογικών υλικών ή την τυχαία ρύπανση (12). Εάν το έδαφος έχει υποστεί κατεργασία με την υπό δοκιμή χημική ουσία ή δομικά της ανάλογα μέσα στα προηγούμενα τέσσερα χρόνια, αυτό το έδαφος δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για μελέτες απόπλυσης.

Συνθήκες δοκιμής

32. Κατά τη διάρκεια της περιόδου δοκιμής, οι στήλες απόπλυσης εδάφους θα πρέπει να διατηρούνται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος εφόσον η θερμοκρασία αυτή δεν παρουσιάζει αποκλίσεις μεγαλύτερες από ± 2 °C. Οι συνιστώμενες θερμοκρασίες κυμαίνονται μεταξύ 18 και 25 °C.

33. Στην επιφάνεια των στηλών εδάφους θα πρέπει να εφαρμόζεται συνεχώς τεχνητή βροχή ($CaCl_2$ 0,01 M) με ρυθμό 200 mm για περίοδο 48 ωρών ([1]). Ο ρυθμός αυτός ισοδυναμεί με την εφαρμογή 251 ml για μια στήλη με εσωτερική διάμετρο 4 cm. Εάν απαιτείται για τον σκοπό της δοκιμής, μπορούν να χρησιμοποιούνται επιπλέον άλλοι ρυθμοί και μεγαλύτερες διάρκειες τεχνητής βροχόπτωσης.

Εκτέλεση της δοκιμής

Απόπλυση με μητρική υπό δοκιμή χημική ουσία

34. Συσκευάζονται τουλάχιστον διπλές στήλες απόπλυσης με μη κατεργασμένο, αερόξηρο και κοσκινισμένο έδαφος (< 2 mm) σε ύψος μέχρι περίπου 30 cm. Για την επίτευξη ομοιόμορφης συσκευασίας, το έδαφος προστίθεται στις στήλες σε μικρές ποσότητες με ένα κουτάλι και πιέζεται με ένα έμβολο υπό ταυτόχρονη ήπια δόνηση της στήλης μέχρι να μην είναι δυνατό να βυθιστεί περαιτέρω το επάνω μέρος της στήλης εδάφους. Η ομοιόμορφη

([1]) Με αυτόν τον τρόπο, προσομοιώνονται εξαιρετικά υψηλές βροχοπτώσεις. Η μέση ετήσια βροχόπτωση, για παράδειγμα, στην Κεντρική Ευρώπη είναι της τάξεως των 800-1 000 mm.

▼M6

συσκευασία είναι απαραίτητη προκειμένου να λαμβάνονται αναπαραγόμενα αποτελέσματα από τις στήλες απόπλυσης. Για λεπτομέρειες σχετικά με τις τεχνικές συσκευασίας της στήλης, βλ. τις παραπομπές (20)(21) και (22). Για τον έλεγχο της αναπαραγωγιμότητας της διαδικασίας συσκευασίας, προσδιορίζεται το συνολικό βάρος του εδάφους που συσκευάζεται στις στήλες ([1]). Τα βάρη των διπλών στηλών θα πρέπει να είναι παρόμοια.

35. Μετά τη συσκευασία, οι στήλες εδάφους υφίστανται προδιαβροχή με τεχνητή βροχή ($CaCl_2$ 0,01 M) από κάτω προς τα επάνω, προκειμένου το νερό να μετατοπίσει τον αέρα από τους πόρους του εδάφους. Στη συνέχεια, οι στήλες εδάφους αφήνονται για να επιτευχθεί εξισορρόπηση και η περίσσεια νερού αποστραγγίζεται μέσω της βαρύτητας. Μέθοδοι για τον κορεσμό της στήλης εξετάζονται στην παραπομπή (23).

36. Κατόπιν, η υπό δοκιμή χημική ουσία ή/και η χημική ουσία αναφοράς εφαρμόζεται στις στήλες εδάφους (βλ. επίσης παραγράφους 23-25). Για την επίτευξη ομοιόμορφης κατανομής, τα διαλύματα, τα εναιωρήματα ή τα γαλακτώματα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ή/και της ουσίας αναφοράς θα πρέπει να εφαρμόζονται ομοιόμορφα στην επιφάνεια των στηλών εδάφους. Εάν για την εφαρμογή μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας συνιστάται ενσωμάτωση στο έδαφος, αυτή θα πρέπει να αναμειγνύεται με μια μικρή ποσότητα (π.χ. 20 g) εδάφους και να προστίθεται στην επιφάνεια της στήλης εδάφους.

37. Κατόπιν, οι επιφάνειες των στηλών εδάφους καλύπτονται από δίσκο συντηγμένου γυαλιού, γυάλινους κόκκους, φίλτρα υαλοϊνών ή ένα στρογγυλό διηθητικό χαρτί για την ομοιόμορφη κατανομή της τεχνητής βροχής σε ολόκληρη την επιφάνεια και για την αποφυγή διαταραχής της επιφάνειας του εδάφους από τις σταγόνες της βροχής. Όσο μεγαλύτερη είναι η διάμετρος της στήλης, τόσο περισσότερη μέριμνα απαιτείται για την εφαρμογή της τεχνητής βροχής στις στήλες εδάφους, ώστε να διασφαλίζεται η ομοιόμορφη κατανομή της τεχνητής βροχής στην επιφάνεια του εδάφους. Στη συνέχεια, εφαρμόζεται τεχνητή βροχόπτωση στις στήλες εδάφους, υπό μορφή σταγόνων, με τη βοήθεια εμβολοφόρας ή περισταλτικής αντλίας ή σταγονομετρικής χοάνης. Κατά προτίμηση, τα αποπλύματα θα πρέπει να συλλέγονται σε κλάσματα και να καταγράφονται οι αντίστοιχοι όγκοι τους ([2]).

38. Μετά την απόπλυση και την αποστράγγιση των στηλών, οι στήλες εδάφους χωρίζεται στον κατάλληλο αριθμό τμημάτων, ανάλογα με τις πληροφορίες που απαιτείται να ληφθούν από τη μελέτη, τα τμήματα εκχυλίζονται με κατάλληλους διαλύτες ή μείγματα διαλυτών και αναλύονται για την ανίχνευση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και, κατά περίπτωση, των προϊόντων μετατροπής, της συνολικής ραδιενέργειας και της χημικής ουσίας αναφοράς. Τα αποπλύματα ή τα κλάσματα αποπλυμάτων αναλύονται άμεσα ή κατόπιν εκχύλισης για τα ίδια προϊόντα. Όταν χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένη υπό δοκιμή χημική ουσία, θα πρέπει να ταυτοποιούνται όλα τα κλάσματα που περιέχουν ≥ 10 % της εφαρμοζόμενης ραδιενέργειας.

Απόπλυση με παλαιωμένα υπολείμματα

39. Φρέσκο έδαφος (που δεν έχει ξηρανθεί προηγουμένως στον αέρα) υποβάλλεται σε κατεργασία με τη ραδιοσημασμένη υπό δοκιμή χημική ουσία με ρυθμό που αντιστοιχεί στην έκταση επιφάνειας των στηλών εδάφους (βλ. παράγραφο 24) και επωάζεται κάτω από αερόβιες συνθήκες σύμφωνα με τη μέθοδο δοκιμών Γ.23 (13). Η διάρκεια της περιόδου επώασης

([1]) Παραδείγματα φαινόμενων πυκνοτήτων για διαταραγμένα εδάφη είναι τα εξής:για αμμώδες έδαφος 1,66 g · ml^{-1}
για αργιλώδες αμμώδες έδαφος 1,58 g · ml^{-1}
για αργιλώδες έδαφος 1,17 g · ml^{-1}
για λασπώδες έδαφος 1,11 · g ml^{-1}

([2]) Οι τυπικοί όγκοι αποπλυμάτων κυμαίνονται από 230-260 ml, που αντιστοιχούν σε περίπου 92 έως 104 % της ολικής εφαρμοζόμενης τεχνητής βροχής (251 ml) όταν χρησιμοποιούνται στήλες εδάφους διαμέτρου 4 cm και μήκους 30 cm.

▼M6

(παλαίωσης) θα πρέπει να είναι αρκετά μεγάλη ώστε να παράγονται σημαντικές ποσότητες προϊόντων μετατροπής. Συνιστάται περίοδος παλαίωσης διάρκειας ενός χρόνου ημιζωής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ([1]), η οποία όμως δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τις 120 ημέρες. Πριν από την απόπλυση, το παλαιωμένο έδαφος αναλύεται για την ανίχνευση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και των προϊόντων μετατροπής της.

40. Οι στήλες απόπλυσης συσκευάζονται σε ύψος έως 28 cm με το ίδιο έδαφος (αλλά αερόξηρο) με αυτό που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα παλαίωσης, το οποίο περιγράφεται στην παράγραφο 34, και προσδιορίζεται επίσης το συνολικό βάρος των συσκευασμένων στηλών εδάφους. Κατόπιν, οι στήλες εδάφους υποβάλλονται σε προδιαβροχή, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 35.

41. Η υπό δοκιμή χημική ουσία και τα προϊόντα μετατροπής της εφαρμόζονται, στη συνέχεια, στην επιφάνεια των στηλών εδάφους με τη μορφή παλαιωμένων υπολειμμάτων εδάφους (βλ. παράγραφο 39) ως τμήμα εδάφους 2 cm. Το συνολικό ύψος των στηλών εδάφους (μη κατεργασμένο έδαφος + παλαιωμένο έδαφος) δεν θα πρέπει να υπερβαίνει, κατά προτίμηση, τα 30 cm (βλ. παράγραφο 34).

42. Η διαδικασία απόπλυσης διεξάγεται όπως περιγράφεται στην παράγραφο 37.

43. Μετά την απόπλυση, τα τμήματα εδάφους και τα αποπλύματα αναλύονται, όπως υποδεικνύεται στην παράγραφο 38, για την ανίχνευση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, των προϊόντων μετατροπής της και της μη εξαχθείσας ραδιενέργειας. Για να προσδιοριστεί πόση ποσότητα του παλαιωμένου υπολείμματος συγκρατείται στο ανώτερο στρώμα των 2 cm μετά την απόπλυση, το τμήμα αυτό θα πρέπει να αναλύεται ξεχωριστά.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

44. Οι ποσότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, των προϊόντων μετατροπής, των μη εξαχθέντων προϊόντων και, εάν περιλαμβάνεται, της χημικής ουσίας αναφοράς θα πρέπει να δίνονται σε % της εφαρμοζόμενης αρχικής δόσης για κάθε τμήμα εδάφους και κλάσμα αποπλύματος. Για κάθε στήλη θα πρέπει να παρέχεται μια γραφική παράσταση των ποσοστών που εντοπίζονται σε συνάρτηση με τα βάθη του εδάφους.

45. Όταν σε αυτές τις μελέτες απόπλυσης στήλης περιλαμβάνεται μια χημική ουσία αναφοράς, η απόπλυση μιας χημικής ουσίας μπορεί να αξιολογείται σε μια σχετική κλίμακα με χρήση παραγόντων σχετικής κινητικότητας (relative mobility factors, RMF, για τον ορισμό, βλ. προσάρτημα 3) (1)(11), γεγονός που παρέχει τη δυνατότητα σύγκρισης των δεδομένων απόπλυσης για τις διάφορες χημικές ουσίες που λαμβάνονται από τους διαφορετικούς τύπους εδάφους. Παραδείγματα τιμών RMF για διάφορες φυτοπροστατευτικές χημικές ουσίες παρέχονται στο προσάρτημα 3.

46. Από τα αποτελέσματα απόπλυσης στήλης μπορούν επίσης να λαμβάνονται εκτιμήσεις του K_{oc} (κανονικοποιημένος συντελεστής προσρόφησης οργανικού άνθρακα) και του K_{om} (κανονικοποιημένος συντελεστής κατανομής οργανικής ύλης) με χρήση της μέσης απόστασης απόπλυσης ή καθιερωμένων συσχετισμών μεταξύ του RMF και του K_{om} και αντίστοιχα του K_{oc} (4) ή με την εφαρμογή απλής χρωματογραφικής θεωρίας (24). Ωστόσο, η τελευταία μέθοδος θα πρέπει να χρησιμοποιείται με επιφύλαξη, ιδίως όταν λαμβάνεται υπόψη ότι στη διαδικασία απόπλυσης δεν ισχύουν αποκλειστικά συνθήκες κορεσμένης ροής, αλλά μάλλον μη κορεσμένα συστήματα.

([1]) Μπορεί να σχηματίζονται περισσότερα από ένα σημαντικά προϊόντα μετατροπής στο έδαφος, τα οποία μπορεί επίσης να εμφανίζονται σε διαφορετικά χρονικά σημεία κατά τη διάρκεια της μελέτης μετατροπής. Σε αυτές τις περιπτώσεις, μπορεί να χρειαστεί να διεξαχθούν μελέτες απόπλυσης με παλαιωμένα υπολείμματα διαφορετικής ηλικίας.

▼M6

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

47. Οι μελέτες απόπλυσης στήλης που περιγράφονται σε αυτήν τη μέθοδο επιτρέπουν τον προσδιορισμό του δυναμικού απόπλυσης ή κινητικότητας στο έδαφος της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (στη μελέτη απόπλυσης μητρικής ουσίας) ή/και των προϊόντων μετατροπής της (στη μελέτη απόπλυσης παλαιωμένων υπολειμμάτων). Οι δοκιμές αυτές δεν προβλέπουν ποσοτικά τη συμπεριφορά απόπλυσης υπό τις συνθήκες της υπαίθρου, αλλά μπορούν να χρησιμοποιούνται για να συγκρίνεται η «αποπλυσιμότητα» μίας χημικής ουσίας σε σχέση με άλλες χημικές ουσίες γνωστής συμπεριφοράς απόπλυσης (24). Παρομοίως, δεν μετρούν ποσοτικά το ποσοστό της εφαρμοζόμενης χημικής ουσίας που ενδεχομένως φτάνει στα υπόγεια ύδατα (11). Ωστόσο, τα αποτελέσματα από τις μελέτες απόπλυσης στήλης ενδέχεται να βοηθήσουν στη λήψη απόφασης σχετικά με το εάν πρέπει να διεξαχθούν πρόσθετες δοκιμές προσομοίωσης υπαίθρου ή δοκιμές στην ύπαιθρο για χημικές ουσίες που εμφανίζουν υψηλό δυναμικό κινητικότητας σε εργαστηριακές δοκιμές.

Έκθεση δοκιμής

48. Η έκθεση πρέπει να περιλαμβάνει τα εξής:

Υπό δοκιμή χημική ουσία και χημική ουσία αναφοράς (όταν χρησιμοποιείται):

— κοινή ονομασία, χημική ονομασία (ονοματολογία κατά IUPAC και CAS), αριθμός CAS, χημική δομή (που υποδεικνύει τη θέση της σήμανσης όταν χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένο υλικό) και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

— καθαρότητες (ξένες προσμείξεις) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας,

— ραδιοχημική καθαρότητα της επισημασμένης χημικής ουσίας και ειδική ραδιενέργεια (κατά περίπτωση).

Εδάφη δοκιμής:

— στοιχεία για τον τόπο συλλογής,

— ιδιότητες των εδαφών, όπως pH, περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα και άργιλο, υφή και φαινόμενη πυκνότητα (για διαταραγμένο έδαφος),

— μικροβιακή δραστηριότητα εδάφους (μόνο για εδάφη που χρησιμοποιούνται για την παλαίωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας),

— διάρκεια αποθήκευσης εδάφους και συνθήκες αποθήκευσης.

Συνθήκες δοκιμής:

— ημερομηνίες διενέργειας των μελετών,

— μήκος και διάμετρος των στηλών απόπλυσης,

— συνολικό βάρος εδάφους των στηλών εδάφους,

— ποσότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και, κατά περίπτωση, της εφαρμοζόμενης χημικής ουσίας αναφοράς,

— ποσότητα, συχνότητα και διάρκεια εφαρμογής της τεχνητής βροχής,

— θερμοκρασία πειράματος,

— αριθμός επαναλήψεων (τουλάχιστον δύο),

— μέθοδοι ανάλυσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, των προϊόντων μετατροπής και, κατά περίπτωση, της χημικής ουσίας αναφοράς στα διάφορα τμήματα εδάφους και στα αποπλύματα,

— μέθοδοι για τον χαρακτηρισμό και την ταυτοποίηση των προϊόντων μετατροπής στα τμήματα εδάφους και στα αποπλύματα.

▼**M6**

Αποτελέσματα της δοκιμής:

— πίνακες των αποτελεσμάτων που εκφράζονται ως συγκεντρώσεις και % της εφαρμοζόμενης δόσης για τμήματα εδάφους και αποπλύματα,

— ισοζύγιο μάζας, κατά περίπτωση,

— όγκοι αποπλύματος,

— αποστάσεις απόπλυσης και, κατά περίπτωση, παράγοντες σχετικής κινητικότητας,

— γραφική απεικόνιση του % που εντοπίζεται στα τμήματα εδάφους έναντι του βάθους του τμήματος εδάφους,

— συζήτηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Guth, J.A., Burkhard, N. και Eberle, D.O. (1976). Experimental Models for Studying the Persistence of Pesticides in Soil. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides.

(2) Russel, M.H. (1995). Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil. In progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Τόμος 9 (Environmental Behaviour of Agrochemicals — T.R. Roberts και P.C. Kearney, εκδ.). J. Wiley & Sons.

(3) Briggs, G.G. (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficient, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J.Agric. Food Chem. 29, 1050-1059.

(4) Chiou, C.T., Porter, P.E. και Schmedding, D.W. (1983). Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol. 17, 227-231.

(5) Guth, J.A. (1983). Untersuchungen zum Verhalten von Pflanzenschutzmitteln im Boden. Bull. Bodenkundliche Gesellschaft Schweiz 7, 26-33.

(6) US-Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(7) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(8) Παράρτημα I της οδηγίας 95/36/ΕΚ της Επιτροπής, της 14ης Ιουλίου 1995, για τροποποίηση της οδηγίας 91/414/ΕΟΚ του Συμβουλίου σχετικά με τη διάθεση στην αγορά φυτοπροστατευτικών προϊόντων, ΕΕ L 172 της 22.7.1995, σελ. 8.

(9) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(10) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-2. Versickerungsverhalten von Pflanzenschutzmitteln.

(11) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(12) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Ιταλία, 18-20 Ιανουαρίου 1995.

(13) Τα ακόλουθα κεφάλαια του παρόντος παραρτήματος:

Κεφάλαιο Α.4, Τάση ατμών

Κεφάλαιο Α.6, Υδατοδιαλυτότητα

▼**M6**

Κεφάλαιο Α.8, Συντελεστής κατανομής, μέθοδος ανακινούμενης φιάλης

Κεφάλαιο Α.24, Συντελεστής κατανομής, μέθοδος HPLC

Κεφάλαιο Γ.7, Αποικοδόμηση — Αβιοτική αποικοδόμηση: υδρόλυση συναρτήσει του pH

Κεφάλαιο Γ.18, Προσρόφηση/εκρόφηση με μέθοδο εξισορρόπησης κατά παρτίδα

Κεφάλαιο Γ.23, Αερόβια και αναερόβια μετατροπή στο έδαφος

(14) Soil Texture Classification (US and FAO systems). Weed Science, 33, Συμπλ. 1 (1985) και Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26, 305 (1962).

(15) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties (A.L. Page, R.H. Miller και D.R. Kelney, εκδ.). Agronomy Series Αρ. 9, 2η έκδοση.

(16) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties (A.L. Page, R.H. Miller και D.R. Kelney, εκδ.). Agronomy Series Αρ. 9, 2η έκδοση.

(17) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality — General aspects, chemical and physical methods of analysis, biological methods of analysis. Πρώτη έκδοση.

(18) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt/Main.

(19) Scheffer, F. και Schachtschabel, P. (1998). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(20) Weber, J.B. και Peeper, T.F. (1977). In Research Methods in Weed Science, 2η έκδοση (B. Truelove, εκδ.). Soc. Weed Sci., Auburn, Alabama, 73-78.

(21) Weber, J.B., Swain, L.R., Strek, H.J. και Sartori, J.L. (1986). In Research Methods in Weed Science, 3η έκδοση (N.D. Camper, εκδ.). Soc. Weed Sci., Champaign, IL, 190-200.

(22) Oliviera, κ.ά. (1996). Packing of sands for the production of homogeneous porous media. Soil Sci. Soc. Soc. Amer. J. 60 (1): 49-53.

(23) Shackelford, C. D. (1991). Laboratory diffusion testing for waste disposal. — A review. J. Contam. Hydrol. 7, 177-217.

(24) Hamaker, J.W. (1975). Interpretation of soil leaching experiments. In Environmental Dynamics of Pesticides (R. Haque, V.H. Freed, εκδ.), 115-133. Plenum Press, Νέα Υόρκη.

(25) OECD (1981). Dissociation constants in water. OECD Guideline for Testing of Chemicals, Αρ. 4112, ΟΟΣΑ, Παρίσι

▼M6

Προσάρτημα 1

Ορισμοί και μονάδες

Απόπλυμα: Υδατική φάση που έχει διυλιστεί μέσω μιας εδαφικής κατατομής ή στήλης εδάφους (1).

Απόπλυση: Διεργασία με την οποία μια χημική ουσία μετακινείται προς τα κάτω μέσω της εδαφικής κατατομής ή μιας στήλης εδάφους (1).

Απόσταση απόπλυσης: Το βαθύτερο τμήμα εδάφους στο οποίο εντοπίζεται ≥ 0,5 % της εφαρμοζόμενης υπό δοκιμή χημικής ουσίας ή του παλαιωμένου υπολείμματος μετά τη διαδικασία απόπλυσης (ισοδυναμεί με το βάθος διείσδυσης).

Έδαφος: Μείγμα ανόργανων και οργανικών χημικών συστατικών, όπου στα τελευταία περιλαμβάνονται ενώσεις υψηλής περιεκτικότητας σε άνθρακα και άζωτο και υψηλού μοριακού βάρους, στο οποίο εμφανίζεται ζωή με τη μορφή μικρών (κυρίως μικρο-) οργανισμών. Το έδαφος μπορεί να χρησιμοποιείται υπό δύο καταστάσεις:

αδιατάρακτο, όπως έχει διαμορφωθεί με τον καιρό, σε χαρακτηριστικά στρώματα διαφόρων τύπων εδαφών,: διαταραγμένο, όπως συνήθως βρίσκεται σε αρώσιμες εκτάσεις ή όπως εμφανίζεται όταν λαμβάνονται δείγματα με σκάψιμο και χρησιμοποιούνται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών (2).

Υπό δοκιμή χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Μέση απόσταση απόπλυσης: Κάτω μέρος του τμήματος εδάφους όπου βρίσκεται η αθροιστική ανακτημένη χημική ουσία = 50 % της συνολικής ανακτημένης υπό δοκιμή χημικής ουσίας [κανονικό πείραμα απόπλυσης] ή (κάτω μέρος του τμήματος εδάφους όπου βρίσκεται η αθροιστική ανακτημένη χημική ουσία = 50 % της συνολικής ανακτημένης υπό δοκιμή χημικής ουσίας) — ((πάχος του στρώματος παλαιωμένου υπολείμματος)/2) [μελέτη απόπλυσης παλαιωμένου υπολείμματος]

Όριο ανίχνευσης (LOD) και **όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ)**: Το όριο ανίχνευσης (LOD) είναι η συγκέντρωση μιας χημικής ουσίας κάτω από την οποία δεν είναι δυνατόν να γίνει διάκριση της ταυτότητας της χημικής ουσίας από τις αναλυτικές τεχνητές ενδείξεις. Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) είναι η συγκέντρωση μιας χημικής ουσίας κάτω από την οποία δεν είναι δυνατός ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης με αποδεκτή ακρίβεια.

Παράγοντας σχετικής κινητικότητας RMF: (απόσταση απόπλυσης υπό δοκιμή χημικής ουσίας (cm)) / (απόσταση απόπλυσης χημικής ουσίας αναφοράς (cm))

Προϊόντα μετατροπής: Όλες οι χημικές ουσίες που προκύπτουν από αντιδράσεις βιοτικής ή αβιοτικής μετατροπής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, συμπεριλαμβανομένου του CO_2 και προϊόντων που δεσμεύονται σε υπολείμματα.

Τεχνητή βροχή: Διάλυμα $CaCl_2$ 0,01 M σε απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό.

Υπόλειμμα παλαιωμένου εδάφους: Υπό δοκιμή χημική ουσία και προϊόντα μετατροπής που υπάρχουν στο έδαφος μετά την εφαρμογή και κατόπιν μιας χρονικής περιόδου επαρκούς διάρκειας ώστε οι διεργασίες μεταφοράς, προσρόφησης, μεταβολισμού και διασποράς να τροποποιήσουν την κατανομή και τη χημική φύση κάποιου μέρους της εφαρμοζόμενης χημικής ουσίας (1).

— **Χημική ουσία**

— μια ουσία ή ένα μείγμα.

(1) Holland, P.T. (1996). Glossary of Terms Relating to Pesticides. IUPAC Reports on Pesticide (36). Pure & Appl. Chem. 68, 1167-1193.

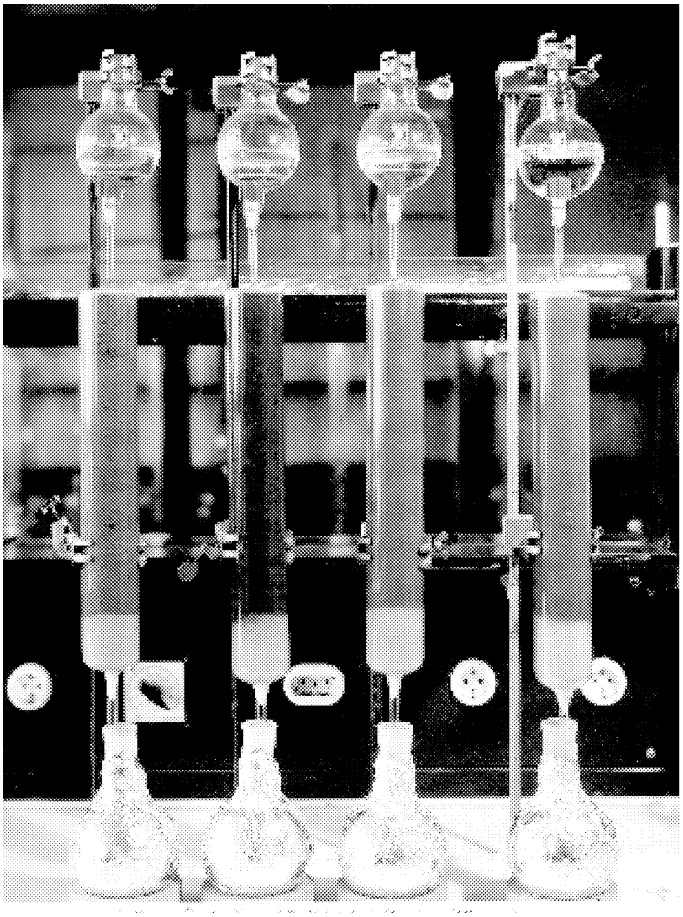
(2) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (εκδόθηκε στις 12 Μαΐου 1981).

▼**M6**

Προσάρτημα 2

Σχήμα 1:

Παράδειγμα γυάλινων στηλών απόπλυσης χωρίς δυνατότητα διαχωρισμού σε τμήματα,μήκους 35 cm και εσωτερικής διαμέτρου 5 cm (1)



← Σταγονομετρικές χοάνες για την εφαρμογή τεχνητής βροχής

← Δίσκος συντηγμένου γυαλιού για την αποφυγή διαταραχής της επιφάνειας του εδάφους και για την ομοιόμορφη κατανομή της τεχνητής βροχής

← Γυάλινη στήλη γεμισμένη με το έδαφος δοκιμής (κατά τη δοκιμή προϊόντων που είναι ασταθή παρουσία φωτός, οι στήλες θα πρέπει να τυλίγονται με αλουμινόχαρτο)

← Στρώμα χαλαζιακής άμμου

← Πώμα υαλοβάμβακα για τη διατήρηση του εδάφους εντός της στήλης

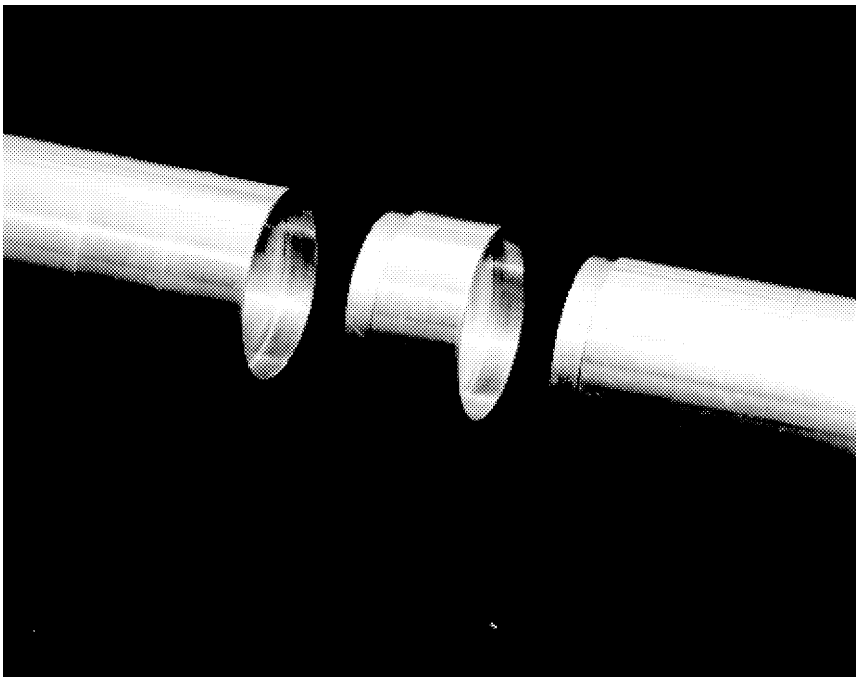
← Φιάλη με σφαιρικό πυθμένα για τη συλλογή του αποπλύματος, τυλιγμένη με αλουμινόχαρτο για την αποφυγή φωτόλυσης

(1) Drescher, N. (1985). Moderner Acker- und Pflanzenbau aus Sicht der Pflanzenschutzmittelindustrie. In Unser Boden — 70 Jahre Agrarforschung der BASF AG, 225-236. Verlag Wissenschaft und Politik, Köln.

▼**M6**

Σχήμα 2:

Παράδειγμα μεταλλικής στήλης με δυνατότητα διαχωρισμού σε τμήματα, εσωτερικής διαμέτρου 4 cm (1)



(1) Burkhard, N., Eberle D.O. και Guth, J.A. (1975). Model systems for studying the environmental behaviour of pesticides. Environmental Quality and Safety, Συμπλ. Τόμος III, 203-213.

▼**M6**

Προσάρτημα 3

Παραδείγματα παραγόντων σχετικής κινητικότητας (*) (RMF) για διάφορες φυτοπροστατευτικές χημικές ουσίες (1)(2) και αντίστοιχες τάξεις κινητικότητας (+)

RMF-Εύρος	Χημική ουσία (RMF)	Τάξη κινητικότητας
≤ 0,15	Parathion (< 0,15), Flurodifen (0,15)	I μη κινητές
0,15-0,8	Profenophos (0,18), Propiconazole (0,23), Diazinon (0,28), Diuron (0,38), Terbuthylazine (0,52), Methidathion (0,56), Prometryn (0,59), Propazine (0,64), Alachlor (0,66), Metolachlor (0,68)	II ελαφρώς κινητές
0,8-1,3	Monuron (**) (1,00), Atrazine (1,03), Simazine (1,04), Fluometuron (1,18)	III μέτρια κινητές
1,3-2,5	Prometon (1,67), Cyanazine (1,85), Bromacil (1,91), Karbutilate (1,98)	IV σχετικά κινητές
2,5-5,0	Carbofuran (3,00), Dioxacarb (4,33)	V κινητές
> 5,0	Monocrotophos (> 5,0), Dicrotophos (> 5,0)	VI πολύ κινητές

(*) Ο παράγοντας σχετικής κινητικότητας προκύπτει ως εξής (3):

$$\text{RMF} = \frac{\text{απόσταση απόπλυσης υπό δοκιμή χημικής ουσίας(cm)}}{\text{απόσταση απόπλυσης χημικής ουσίας αναφοράς(cm)}}$$

(**) Χημική ουσία αναφοράς

\+ Άλλα συστήματα ταξινόμησης της κινητικότητας μιας χημικής ουσίας στο έδαφος βασίζονται σε τιμές R_f από χρωματογραφία λεπτής στιβάδας του εδάφους (4) και σε τιμές K_{oc} (5)(6).

(1) Guth, J.A. (1985). Adsorption/desorption. In Joint International Symposium «Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment.» Canterbury, HB, 1-3 Ιουλίου 1985.

(2) Guth, J.A. και Hörmann, W.D. (1987). Problematik und Relevanz von Pflanzenschutzmittel-Spuren im Grund (Trink-) Wasser. Schr.Reihe Verein WaBoLu, 68, 91-106.

(3) Harris, C.I. (1967). Movement of herbicides in soil. Weeds 15, 214-216.

(4) Helling, C.S. (1971). Pesticide mobility in soils. Soil Sci. Soc. Soc. Am. Proc. 35, 743-748.

(5) McCall, P.J., Laskowski, D.A., Swann, R.L. και Dishburger, H.J. (1981). Measurements of sorption coefficients of organic chemicals and their use in environmental fate analysis. In Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington D.C.

(6) Hollis, J.M. (1991). Mapping the vulnerability of aquifers and surface waters to pesticide contamination at the national/regional scale. BCPC Monograph No. 47 Pesticides in Soil and Water, 165-174.

▼M6

Γ.45. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΕΚΠΟΜΠΩΝ ΑΠΟ ΞΥΛΟ ΚΑΤΕΡΓΑΣΜΕΝΟ ΜΕ ΣΥΝΤΗΡΗΤΙΚΑ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ: ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΓΙΑ ΞΥΛΙΝΑ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΕΙΝΑΙ ΚΑΛΥΜΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΡΧΟΝΤΑΙ ΣΕ ΕΠΑΦΗ ΜΕ ΓΛΥΚΟ ΝΕΡΟ Η ΘΑΛΑΣΣΙΟ ΝΕΡΟ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 313 του ΟΟΣΑ (2007). Πρέπει να γίνει ποσοτικός προσδιορισμός των εκπομπών από ξύλο κατεργασμένο με συντηρητικά στο περιβάλλον, για να είναι δυνατή η εκτίμηση του περιβαλλοντικού κινδύνου από το κατεργασμένο ξύλο. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών περιγράφει μια εργαστηριακή μέθοδο για την εκτίμηση των εκπομπών από ξύλο κατεργασμένο με συντηρητικά σε δύο περιπτώσεις κατά τις οποίες οι εκπομπές μπορούν να εισέλθουν στο περιβάλλον:

   — Εκπομπές από κατεργασμένο ξύλο σε επαφή με γλυκό νερό. Οι εκπομπές από την επιφάνεια του κατεργασμένου ξύλου μπορούν να εισέλθουν στο νερό.

   — Εκπομπές από κατεργασμένο ξύλο σε επαφή με θαλάσσιο νερό. Οι εκπομπές από την επιφάνεια του κατεργασμένου ξύλου μπορούν να εισέλθουν στο θαλάσσιο νερό.

2. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών προορίζεται για τη δοκιμή εκπομπών από ξύλο και ξύλινα αντικείμενα που δεν είναι καλυμμένα και έρχονται σε επαφή με γλυκό νερό ή θαλάσσιο νερό. Οι κατηγορίες χρήσης χρησιμοποιούνται διεθνώς και ταξινομούν τον βιολογικό κίνδυνο στον οποίο θα υποβάλλεται το κατεργασμένο αντικείμενο. Οι κατηγορίες χρήσης ορίζουν επίσης την κατάσταση στην οποία χρησιμοποιείται το κατεργασμένο αντικείμενο και προσδιορίζουν τα περιβαλλοντικά διαμερίσματα (αέρας, νερό, έδαφος) που διατρέχουν δυνητικά κίνδυνο από το κατεργασμένο με συντηρητικά ξύλο.

3. Η μέθοδος δοκιμών είναι μια εργαστηριακή διαδικασία για τη λήψη δειγμάτων (με εκπομπές -emissate) από νερό που χρησιμοποιείται για την εμβάπτιση του κατεργασμένου ξύλου, σε αυξανόμενα διαστήματα χρόνου μετά την έκθεση. Η ποσότητα των εκπομπών στο δείγμα με τις εκπομπές (emissate) σχετίζεται με την έκταση επιφάνειας του ξύλου και τη διάρκεια της έκθεσης, προκειμένου να εκτιμηθεί η ροή σε mg/m^2/ημέρα. Συνεπώς μπορεί να εκτιμηθεί η ροή (ρυθμός απόπλυσης) μετά από αυξανόμενες περιόδους έκθεσης.

4. Η ποσότητα των εκπομπών μπορεί να χρησιμοποιείται για την εκτίμηση του περιβαλλοντικού κινδύνου από το κατεργασμένο ξύλο.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

5. Η φύση και η σοβαρότητα του μηχανισμού απόπλυσης στην επιφάνεια του ξύλου από το γλυκό νερό δεν θεωρούνται πανομοιότυπες με αυτές της απόπλυσης στην επιφάνεια του ξύλου από το θαλάσσιο νερό. Συνεπώς, για συντηρητικά προϊόντα ξύλου ή μείγματα για την κατεργασία του ξύλου το οποίο χρησιμοποιείται σε θαλάσσια περιβάλλοντα, απαιτείται μια μελέτη απόπλυσης ξύλου για το θαλάσσιο νερό.

6. Στην περίπτωση ξύλου κατεργασμένου με συντηρητικό, το ξύλο θα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικό ενός ξύλου εμπορικής χρήσης. Θα πρέπει να υφίσταται κατεργασία σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή του συντηρητικού και να συμμορφώνεται με τα κατάλληλα πρότυπα και τις προδιαγραφές. Οι παράμετροι που ισχύουν για τον εγκλιματισμό του ξύλου που έχει υποστεί κατεργασία πριν από την έναρξη της δοκιμής θα πρέπει να αναφέρονται.

7. Τα δείγματα ξύλου που χρησιμοποιούνται θα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικά των χρησιμοποιούμενων αντικειμένων (π.χ. σε ό,τι αφορά το είδος, την πυκνότητα και άλλα χαρακτηριστικά).

▼M6

8. Η δοκιμή μπορεί να εφαρμόζεται σε ξύλο με τη χρήση διεισδυτικής διεργασίας ή επιφανειακής εφαρμογής ή σε κατεργασμένο ξύλο στο οποίο έχει εφαρμοστεί επιπλέον υποχρεωτική επιφανειακή κατεργασία (π.χ. μπογιά που εφαρμόζεται ως απαίτηση για εμπορική χρήση).

9. Η σύνθεση, η ποσότητα, το pH και η φυσική μορφή του νερού είναι σημαντικοί παράγοντες για τον προσδιορισμό της ποσότητας, της περιεκτικότητας και της φύσης των εκπομπών από το ξύλο.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

10. Τα δείγματα δοκιμής του ξύλου που έχει υποστεί κατεργασία με συντηρητικό εμβαπτίζονται σε νερό. Το νερό (δείγμα με εκπομπές -emissate) συλλέγεται και υποβάλλεται σε χημική ανάλυση πολλές φορές κατά τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης ώστε να υπάρχουν αρκετά δεδομένα για την εκτέλεση στατιστικών υπολογισμών. Από τα αναλυτικά αποτελέσματα υπολογίζονται οι ρυθμοί εκπομπής σε mg/m^2/ημέρα. Οι περίοδοι δειγματοληψίας θα πρέπει να καταγράφονται. Οι δοκιμές με μη κατεργασμένα δείγματα μπορούν να διακόπτονται εάν δεν ανιχνευτεί υπόβαθρο στα πρώτα τρία σημεία δεδομένων.

11. Η συμπερίληψη δειγμάτων μη κατεργασμένου ξύλου επιτρέπει τον προσδιορισμό των επιπέδων υποβάθρου για δείγματα με εκπομπές από ξύλο χωρίς το συντηρητικό που χρησιμοποιείται.

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Ακρίβεια

12. Η ακρίβεια (accuracy) της μεθόδου δοκιμών όσον αφορά την αξιολόγηση των εκπομπών εξαρτάται από το εάν τα δείγματα της δοκιμής είναι αντιπροσωπευτικά του εμπορικά κατεργασμένου ξύλου, κατά πόσο το νερό είναι αντιπροσωπευτικό του πραγματικού νερού και κατά πόσο το πρόγραμμα έκθεσης είναι αντιπροσωπευτικό των φυσικών συνθηκών.

13. Η ακρίβεια (accuracy), η πιστότητα (precision) και η επαναληψιμότητα της αναλυτικής μεθόδου θα πρέπει να προσδιορίζονται πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμής.

Αναπαραγωγιμότητα

14. Τρία δείγματα νερού συλλέγονται και αναλύονται και ως τιμή εκπομπών εκλαμβάνεται η μέση τιμή. Η αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων εντός ενός εργαστηρίου και μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων εξαρτάται από το πρόγραμμα εμβάπτισης και το ξύλο που χρησιμοποιείται για τα δείγματα της δοκιμής.

Αποδεκτό εύρος αποτελεσμάτων

15. Σε αυτήν τη δοκιμή ένα εύρος αποτελεσμάτων όπου οι ανώτερες και κατώτερες τιμές διαφέρουν κατά λιγότερο από μία τάξη μεγέθους είναι αποδεκτό.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Νερό

16. Σενάρια απόπλυσης με γλυκό νερό: Όταν πρόκειται να αξιολογηθεί ξύλο που εκτίθεται σε γλυκό νερό, συνιστάται η χρήση απιονισμένου νερού (π.χ. ASTM D 1193 τύπου II) στη δοκιμή απόπλυσης. Η θερμοκρασία του νερού θα είναι 20 °C +/- 2 °C και στην έκθεση της δοκιμής συμπεριλαμβάνεται το pH και η θερμοκρασία νερού που μετρήθηκαν. Η ανάλυση των δειγμάτων του χρησιμοποιούμενου νερού, τα οποία λαμβάνονται πριν από την εμβάπτιση των κατεργασμένων δειγμάτων, επιτρέπει την εκτίμηση των χημικών ουσιών που αναλύονται στο νερό. Αυτό αποτελεί έναν μάρτυρα για τον προσδιορισμό των επιπέδων υποβάθρου χημικών ουσιών, οι οποίες στη συνέχεια υποβάλλονται σε χημική ανάλυση.

▼M6

17. Σενάρια απόπλυσης με θαλάσσιο νερό: Όταν πρόκειται να αξιολογηθεί ξύλο που εκτίθεται σε θαλάσσιο νερό, συνιστάται η χρήση συνθετικού θαλάσσιου νερού (π.χ. υποκατάστατο ωκεάνιου νερού ASTM D 1141, δίχως βαρέα μέταλλα). Η θερμοκρασία του νερού θα είναι 20 °C +/- 2 °C και στην έκθεση της δοκιμής συμπεριλαμβάνεται το pH και η θερμοκρασία νερού που μετρήθηκαν. Η ανάλυση των δειγμάτων του χρησιμοποιούμενου νερού, τα οποία λαμβάνονται πριν από την εμβάπτιση των κατεργασμένων δειγμάτων, επιτρέπει την εκτίμηση των χημικών ουσιών που αναλύονται στο νερό. Αυτό αποτελεί έναν μάρτυρα για την ανάλυση των επιπέδων υποβάθρου σημαντικών χημικών ουσιών.

Δείγματα ξύλου της δοκιμής

18. Για τη δοκιμή αποτελεσματικότητας των συντηρητικών ξύλου, τα είδη ξύλου θα πρέπει να είναι τυπικά των χρησιμοποιούμενων ειδών. Τα συνιστώμενα είδη είναι το *Pinus sylvestris L.* (Σκωτσέζικο πεύκο), το *Pinus resinosa Ait.* (κόκκινο πεύκο) ή το *Pinus spp* (νότιο πεύκο). Μπορούν να διεξαχθούν επιπλέον δοκιμές με χρήση άλλων ειδών.

19. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται ξύλο με ευθύγραμμες βέννες («νερά») και χωρίς ρόζους. Θα πρέπει να αποφεύγεται υλικό με ρητινώδη εμφάνιση. Το ξύλο θα πρέπει να είναι τυπικό ενός εμπορικά διαθέσιμου ξύλου. Η πηγή, η πυκνότητα και ο αριθμός των ετήσιων δακτυλίων ανά 10 mm θα πρέπει να καταγράφονται.

20. Συνιστάται τα δείγματα ξύλου της δοκιμής να είναι σε ομάδες των πέντε σύμφωνα με τα μπλοκ μεγέθους EN 113 (διαστάσεις 25 mm × 50 mm × 15 mm) με τις διαμήκεις προσόψεις παράλληλες προς την ίνα του ξύλου. Ωστόσο μπορούν να χρησιμοποιούνται και άλλες διαστάσεις, όπως 50 mm, επί 150 mm, επί 10 mm. Το δείγμα δοκιμής θα πρέπει να εμβαπτίζεται πλήρως στο νερό. Τα δείγματα της δοκιμής θα αποτελούνται από 100 % σομφό ξύλο. Κάθε δείγμα επισημαίνεται με μοναδικό τρόπο για να είναι δυνατή η ταυτοποίησή του καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής.

21. Όλα τα δείγματα της δοκιμής θα πρέπει να ροκανίζονται ή να κόβονται με πλάνη, ενώ οι επιφάνειες δεν θα πρέπει να λειαίνονται.

22. Ο αριθμός των ομάδων των δειγμάτων ξύλου της δοκιμής που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση είναι τουλάχιστον πέντε: οι τρεις ομάδες δειγμάτων υφίστανται κατεργασία με συντηρητικό, η μία ομάδα δειγμάτων δεν υφίσταται κατεργασία και η μία ομάδα δειγμάτων χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της ξηράς εκ κλιβάνου περιεκτικότητας σε υγρασία των δειγμάτων δοκιμής πριν από την κατεργασία. Προετοιμάζονται επαρκή δείγματα δοκιμής για να είναι δυνατή η επιλογή τριών ομάδων δειγμάτων τα οποία βρίσκονται εντός του 5 % της μέσης τιμής παραμονής του συντηρητικού των συνενωμένων δειγμάτων δοκιμής.

23. Όλα τα δείγματα της δοκιμής υφίστανται σφράγιση άκρων με μια χημική ουσία που αποτρέπει τη διείσδυση του συντηρητικού μέσα στο ξύλο από το σόκορο (end grain) ή αποτρέπει την απόπλυση των δειγμάτων μέσω του ξύλου από το σόκορο. Για την εφαρμογή του σφραγιστικού υλικού άκρων είναι απαραίτητο να γίνεται διάκριση μεταξύ των δειγμάτων που χρησιμοποιούνται για επιφανειακή εφαρμογή και για διαδικασίες διείσδυσης. Η εφαρμογή του σφραγιστικού υλικού άκρων πρέπει να πραγματοποιείται πριν από την κατεργασία μόνο στην περίπτωση της επιφανειακής εφαρμογής.

24. Το σόκορο πρέπει να είναι ανοικτό για κατεργασίες μέσω διαδικασιών διείσδυσης. Επομένως, τα δείγματα πρέπει να υφίστανται σφράγιση άκρων στο τέλος της περιόδου εγκλιματισμού. Η εκπομπή πρέπει να υπολογίζεται μόνο για τη διαμήκη έκταση της επιφάνειας. Τα σφραγιστικά υλικά θα πρέπει να επιθεωρούνται και να εφαρμόζονται εκ νέου, εάν απαιτείται, πριν από την έναρξη της απόπλυσης και δεν θα πρέπει να εφαρμόζονται εκ νέου μετά την έναρξη της απόπλυσης.

▼M6

Περιέκτης εμβάπτισης

25. Ο περιέκτης είναι κατασκευασμένος από αδρανές υλικό και είναι αρκετά μεγάλος ώστε να συγκρατεί 5 δείγματα ξύλου σύμφωνα με το πρότυπο EN113 σε 500 ml νερού, με αποτέλεσμα η αναλογία της έκτασης επιφάνειας προς τον όγκο του νερού να είναι 0,4 cm^2/ml.

Διάταξη δοκιμής δείγματος

26. Τα δείγματα της δοκιμής στηρίζονται σε μια διάταξη που επιτρέπει σε όλες τις εκτεθειμένες επιφάνειες του δείγματος να έρχονται σε επαφή με το νερό.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΣΥΝΤΗΡΗΤΙΚΟ

Προετοιμασία των κατεργασμένων δειγμάτων της δοκιμής

27. Το δείγμα ξύλου της δοκιμής που θα υποστεί κατεργασία με το υπό δοκιμή συντηρητικό υφίσταται κατεργασία με τη μέθοδο που ορίζεται για το συντηρητικό, η οποία μπορεί να είναι μια διαδικασία διεισδυτικής κατεργασίας ή μια διαδικασία επιφανειακής εφαρμογής, που ενδέχεται να διεξάγεται με εμβάπτιση, ψεκασμό ή επικάλυψη.

Συντηρητικά προς εφαρμογή μέσω διαδικασίας διεισδυτικής κατεργασίας

28. Θα πρέπει να παρασκευάζεται ένα διάλυμα του συντηρητικού που θα επιτυγχάνει την καθορισμένη πρόσληψη ή παραμονή κατά την εφαρμογή με τη διαδικασία διεισδυτικής κατεργασίας. Το δείγμα ξύλου της δοκιμής ζυγίζεται και μετρώνται οι διαστάσεις του. Η διαδικασία διεισδυτικής κατεργασίας θα πρέπει να είναι σύμφωνη με όσα ορίζονται για την εφαρμογή του συντηρητικού στο ξύλο για χρήση στην κατηγορία χρήσης 4 ή 5. Το δείγμα ζυγίζεται ξανά μετά την κατεργασία και υπολογίζεται η παραμονή του συντηρητικού (kg/m^3) από την παρακάτω εξίσωση:

$$\frac{\text{Μάζα μετά την κατεργασία (kg)} - \text{Μάζα πριν από την κατεργασία (kg)}}{\text{Όγκος δείγματος της δοκιμής } (m^3)} \times \frac{\text{Συγκέντρωση διαλύματος(\% μάζας/μάζα)}}{100}$$

29. Πρέπει να σημειωθεί ότι σε αυτήν τη δοκιμή μπορεί να χρησιμοποιείται ξυλεία που υφίσταται κατεργασία σε μια βιομηχανική εγκατάσταση κατεργασίας (π.χ. μέσω εμποτισμού σε πίεση κενού). Οι χρησιμοποιούμενες διαδικασίες θα πρέπει να καταγράφονται και η παραμονή του υλικού που υφίσταται κατεργασία με αυτόν τον τρόπο πρέπει να αναλύεται και να καταγράφεται.

Συντηρητικά προς εφαρμογή μέσω διαδικασιών επιφανειακής εφαρμογής

30. Η διαδικασία επιφανειακής εφαρμογής περιλαμβάνει την εμβάπτιση, τον ψεκασμό ή την επάλειψη των δειγμάτων ξύλου της δοκιμής. Η διαδικασία και ο ρυθμός εφαρμογής (π.χ. λίτρα/m^2) θα πρέπει να είναι σύμφωνα με όσα ορίζονται για την επιφανειακή εφαρμογή του συντηρητικού.

31. Σημειώνεται επίσης ότι σε αυτήν την περίπτωση μπορεί να χρησιμοποιείται ξυλεία που έχει υποστεί κατεργασία σε βιομηχανική εγκατάσταση κατεργασίας. Οι χρησιμοποιούμενες διαδικασίες θα πρέπει να καταγράφονται και η παραμονή του υλικού που υφίσταται κατεργασία με αυτόν τον τρόπο πρέπει να αναλύεται και να καταγράφεται.

Εγκλιματισμός των δειγμάτων της δοκιμής μετά την κατεργασία

32. Μετά την κατεργασία, τα κατεργασμένα δείγματα της δοκιμής θα πρέπει να υποβάλλονται σε εγκλιματισμό σύμφωνα με τις συστάσεις του προμηθευτή του υπό δοκιμή συντηρητικού βάσει των απαιτήσεων της ετικέτας του συντηρητικού ή σύμφωνα με τις εμπορικές πρακτικές κατεργασίας ή με το πρότυπο EN 252.

▼M6

Προετοιμασία και επιλογή δειγμάτων δοκιμής

33. Μετά τον εγκλιματισμό που ακολουθεί την κατεργασία, υπολογίζεται η μέση παραμονή της ομάδας των δειγμάτων δοκιμής και επιλέγονται τυχαία για τις μετρήσεις απόπλυσης τρεις αντιπροσωπευτικές ομάδες δειγμάτων με παραμονή εντός του 5 % της μέσης τιμής για την ομάδα.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΕΚΠΟΜΠΩΝ ΤΟΥ ΣΥΝΤΗΡΗΤΙΚΟΥ

Μέθοδος εμβάπτισης

34. Τα δείγματα δοκιμής ζυγίζονται και, στη συνέχεια, εμβαπτίζονται πλήρως στο νερό, ενώ καταγράφεται η ημερομηνία και η ώρα. Ο περιέκτης καλύπτεται για τη μείωση της εξάτμισης.

35. Το νερό αντικαθίσταται στα ακόλουθα χρονικά διαστήματα: 6 ώρες, 1 ημέρα, 2 ημέρες, 4 ημέρες, 8 ημέρες, 15 ημέρες, 22 ημέρες, 29 ημέρες (σημείωση: αυτοί είναι συνολικοί χρόνοι και όχι χρονικά διαστήματα). Η ώρα και η ημερομηνία της αλλαγής του νερού, καθώς και η μάζα του νερού που ανακτάται από τον περιέκτη, θα πρέπει να καταγράφονται.

36. Μετά από κάθε αλλαγή νερού, διατηρείται ένα δείγμα νερού στο οποίο έχει εμβαπτιστεί η ομάδα των δειγμάτων δοκιμής για επακόλουθη χημική ανάλυση.

37. Η διαδικασία δειγματοληψίας επιτρέπει τον υπολογισμό του προφίλ της ποσότητας εκπομπών έναντι του χρόνου. Τα δείγματα θα πρέπει να φυλάσσονται υπό συνθήκες στις οποίες διατηρείται η προσδιοριζόμενη ουσία π.χ. σε ψυγείο, στο σκοτάδι, για τη μείωση της μικροβιακής ανάπτυξης στο δείγμα πριν από την ανάλυση.

ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΕΚΠΟΜΠΩΝ

Κατεργασμένα δείγματα

38. Το συλλεγμένο νερό υποβάλλεται σε χημική ανάλυση για την ανίχνευση της δραστικής ουσίας ή/και των σχετικών προϊόντων αποικοδόμησης/μετατροπής, κατά περίπτωση.

Μη κατεργασμένα δείγματα

39. Η συλλογή νερού (δείγμα με εκπομπές -emissate) σε αυτό το σύστημα και η επακόλουθη ανάλυση για την ανίχνευση χημικών ουσιών που αποπλύθηκαν από τα μη κατεργασμένα δείγματα ξύλου επιτρέπουν την εκτίμηση του πιθανού ρυθμού εκπομπής του συντηρητικού από μη κατεργασμένο ξύλο. Η συλλογή και ανάλυση του δείγματος με εκπομπές (emissate) μετά από αυξανόμενες χρονικές περιόδους έκθεσης επιτρέπουν την εκτίμηση του ρυθμού με τον οποίο αλλάζει ο ρυθμός εκπομπής συναρτήσει του χρόνου. Η ανάλυση αυτή είναι μια διαδικασία ελέγχου για τον προσδιορισμό των επιπέδων υποβάθρου της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε μη κατεργασμένο ξύλο, προκειμένου να επιβεβαιώνεται ότι το ξύλο που χρησιμοποιείται ως πηγή δειγμάτων δεν έχει προηγουμένως υποστεί κατεργασία με το συντηρητικό.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Χημικές αναλύσεις

40. Το συλλεγμένο νερό υποβάλλεται σε χημική ανάλυση και το αποτέλεσμα της ανάλυσης του νερού εκφράζεται στις κατάλληλες μονάδες, π.χ. μg/l.

Αναφορά των δεδομένων

41. Όλα τα αποτελέσματα καταγράφονται. Στο προσάρτημα παρουσιάζεται ένα παράδειγμα ενός προτεινόμενου εντύπου καταγραφής για μία ομάδα κατεργασμένων δειγμάτων δοκιμής και ο συνοπτικός πίνακας για τον υπολογισμό των μέσων τιμών εκπομπών σε κάθε διάστημα δειγματοληψίας.

42. Η ημερήσια ροή εκπομπών σε mg/m^2/ημέρα υπολογίζεται με λήψη της μέσης τιμής των τριών μετρήσεων από τις τρεις επαναλήψεις και διαίρεσή της με τον αριθμό των ημερών εμβάπτισης.

▼M6

Έκθεση δοκιμής

43. Η έκθεση της δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον τις ακόλουθες πληροφορίες:

— Όνομα του προμηθευτή του υπό δοκιμή συντηρητικού,

— Ειδική και μοναδική ονομασία ή κωδικός του υπό δοκιμή συντηρητικού,

— Εμπορική ή κοινή ονομασία των δραστικών συστατικών με μια γενική περιγραφή των βοηθητικών ουσιών (π.χ. συνδιαλύτης, ρητίνη) και της περιεκτικότητας σε % m/m των συστατικών,

— Σχετική παραμονή ή πλήρωση (σε kg/m^3 ή l/m^2, αντίστοιχα) που ορίζεται για ξύλο που χρησιμοποιείται σε επαφή με νερό,

— Είδος του χρησιμοποιούμενου ξύλου, πυκνότητα και ρυθμός ανάπτυξής του σε δακτυλίους ανά 10 mm,

— Πλήρωση ή παραμονή του υπό δοκιμή συντηρητικού και τύπος που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της παραμονής, εκφρασμένα ως l/m^2 ή kg/m^3,

— Μέθοδος εφαρμογής του συντηρητικού, με προσδιορισμό του προγράμματος κατεργασίας που χρησιμοποιείται για τη διεισδυτική διαδικασία και της μεθόδου εφαρμογής εάν χρησιμοποιείται επιφανειακή κατεργασία,

— Ημερομηνία εφαρμογής του συντηρητικού και εκτίμηση της περιεκτικότητας σε υγρασία των δειγμάτων της δοκιμής, εκφραζόμενη ως ποσοστό,

— Διαδικασίες εγκλιματισμού που χρησιμοποιούνται, με προσδιορισμό του τύπου, των συνθηκών και της διάρκειας,

— Προσδιορισμός του σφραγιστικού υλικού άκρων που χρησιμοποιείται και του αριθμού των εφαρμογών,

— Προσδιορισμός κάθε επακόλουθης κατεργασίας του ξύλου, π.χ. προσδιορισμός του προμηθευτή, του τύπου, των χαρακτηριστικών και της προσθήκης μιας βαφής,

— Ώρα και ημερομηνία κάθε συμβάντος εμβάπτισης, ποσότητα νερού που χρησιμοποιείται για την εμβάπτιση των δειγμάτων δοκιμής σε κάθε συμβάν και ποσότητα του νερού που προσροφάται από το ξύλο κατά τη διάρκεια της εμβάπτισης,

— Οποιαδήποτε παραλλαγή της περιγραφόμενης μεθόδου και τυχόν παράγοντες που ενδέχεται να έχουν επηρεάσει τα αποτελέσματα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Ευρωπαϊκό πρότυπο, EN 84 — 1997. Wood preservatives. Accelerated ageing of treated wood prior to biological testing. Leaching procedure.

(2) Ευρωπαϊκό πρότυπο, EN 113/A1 — 2004. Wood preservatives. Test method for determining the protective effectiveness against wood destroying basidiomycetes. Determination of the toxic values.

(3) Ευρωπαϊκό πρότυπο, EN 252 — 1989. Field test method for testing the relative protective effectiveness of a wood preservative in ground contact.

(4) Ευρωπαϊκό πρότυπο, EN 335 — Part 1: 2006. Durability of wood and wood-based products — Definition of use classes — Part1: General.

(5) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1141 — 1998. Standard Practice for the Preparation of Substitute Ocean Water, Without Heavy Metals. *Annual Book of ASTM Standards*, Τόμος 11.02.

(6) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1193-77 Type II — 1983. Specifications for Reagent Water. *Annual Book of ASTM Standards*, Τόμος 11.01.

▼**M6**

Προσάρτημα 1

Έντυπο καταγραφής για τη μέθοδο δοκίμων

Εκτίμηση εκπομπών από ξύλο κατεργασμένο με συντηρητικά στο περιβάλλον: Εργαστηριακή μέθοδος για ξύλινα αντικείμενα που δεν είναι καλυμμένα και έρχονται σε επαφή με γλυκό νερό ή θαλάσσιο νερό

Οίκος δοκιμών	

Συντηρητικό ξύλου

Προμηθευτής του συντηρητικού	
Ειδική και μοναδική ονομασία ή κωδικός του συντηρητικού	
Εμπορική ή κοινή ονομασία του συντηρητικού	
Βοηθητικές ουσίες	
Σχετική παραμονή για ξύλο που χρησιμοποιείται σε επαφή με νερό	

Εφαρμογή

Τρόπος εφαρμογής	
Ημερομηνία εφαρμογής	
Τύπος που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της παραμονής:	
Διαδικασία εγκλιματισμού	
Διάρκεια εγκλιματισμού	
Σφραγιστικό υλικό άκρων / αριθμός εφαρμογών	
Επακόλουθη κατεργασία	εάν ισχύει

Δείγματα της δοκιμής

Είδος ξύλου	
Πυκνότητα του ξύλου	(ελάχιστη … μέση τιμή … μέγιστη)
Ρυθμός ανάπτυξης (δακτύλιοι ανά 10 mm)	(ελάχιστη … μέση τιμή … μέγιστη)
Περιεκτικότητα σε υγρασία	

▼**M6**

Διατάξεις δοκιμής (*)	**Παραμονή (π.χ. kg/m^3)**
Κατεργασμένο «x»	Μέση τιμή και τυπική απόκλιση ή εύρος για 5 δείγματα
Κατεργασμένο «y»	Μέση τιμή και τυπική απόκλιση ή εύρος για 5 δείγματα
Κατεργασμένο «z»	Μέση τιμή και τυπική απόκλιση ή εύρος για 5 δείγματα
Μη κατεργασμένο	
Παραλλαγή των παραμέτρων της μεθόδου δοκιμών	π.χ. ποιότητα νερού, διαστάσεις των δειγμάτων δοκιμής κ.λπ.

(*) Τα x, y, z αντιπροσωπεύουν τα τρία δείγματα επανάληψης

▼M6

Χρόνος	Αλλαγή νερού	Μάζα δείγματος		Πρόσληψη νερού		Δείγμα νερού				
		Κατεργασμένο (μέση τιμή)	Μη κατεργα-σμένο	Κατεργασμένο (μέση τιμή)	Μη κατεργασμένο		Νερό δοκιμής	x	y	z
	Ημερομηνία	g	g	g	g	αρ.	pH	pH	pH	pH
έναρξη										
6 ώρες						1				
24 ώρες						2				
2 ημέρες						3				
4 ημέρες						4				
8 ημέρες						5				
15 ημέρες						6				
22 ημέρες						7				
29 ημέρες						8				

▼M6

Προετοιμάζονται ξεχωριστοί πίνακες για κάθε δραστικό συστατικό

Χρόνος	Αλλαγή νερού	Αναλυτικά αποτελέσματα															
		Μη κατεργασμένα δείγματα			Κατεργασμένα δείγματα												
		Συγκέντρωση δραστικού συστατικού στο νερό mg/l	Εκπεμπόμενη ποσότητα mg/m^2	Ρυθμός εκπομπής mg/m^2/ημέρα	Συγκέντρωση δραστικού συστατικού στο νερό				Εκπεμπόμενη ποσότητα				Ρυθμός εκπομπής			
					x	y	z	Μέση τιμή	x	y	z	Μέση τιμή	x	y	z	Μέση τιμή
	Ημερομηνία				mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2/ημέρα	mg/m^2/ημέρα	mg/m^2/ημέρα	mg/m^2/ημέρα
6 ώρες																
24 ώρες																
2 ημέρες																
4 ημέρες																
8 ημέρες																
15 ημέρες																
22 ημέρες																
29 ημέρες																

Σημείωση: Επειδή ενδέχεται να πρέπει να χρησιμοποιηθούν αποτελέσματα από μη κατεργασμένα δείγματα για τη διόρθωση των ρυθμών εκπομπής από κατεργασμένα δείγματα, τα αποτελέσματα των μη κατεργασμένων δειγμάτων θα πρέπει να προηγούνται και όλες οι τιμές για τα κατεργασμένα δείγματα θα είναι «διορθωμένες τιμές». Μπορεί επίσης να γίνει διόρθωση για την αρχική ανάλυση νερού.

▼**M6**

Προσάρτημα 2

Ορισμοί

Χημική ουσία: Μια ουσία ή ένα μείγμα.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

▼M6

Γ.46. ΒΙΟΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΣΕ ΒΕΝΘΙΚΟΥΣ ΟΛΙΓΟΧΑΙΤΟΥΣ ΠΟΥ ΔΙΑΒΙΟΥΝ ΣΕ ΙΖΗΜΑΤΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 315 του ΟΟΣΑ (2008). Οι ενδοβενθικοί οργανισμοί που καταναλώνουν ιζήματα ενδέχεται να εκτίθενται σε δεσμευμένες σε ιζήματα ουσίες (1). Μεταξύ αυτών των καταναλωτών ιζημάτων, οι υδρόβιοι ολιγόχαιτοι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον πυθμένα των υδατικών συστημάτων. Διαβιούν στα ιζήματα και είναι συχνά ένα από τα είδη με τη μεγαλύτερη αφθονία ιδιαίτερα σε οικοσυστήματα όπου επικρατούν περιβαλλοντικές συνθήκες δυσμενείς προς άλλους οργανισμούς. Με τη βιοανάδευση (bioturbation) του ιζήματος και λειτουργώντας ως λείες, τα ζώα αυτά μπορούν να ασκούν ισχυρή επίδραση στη βιοδιαθεσιμότητα των εν λόγω ουσιών για άλλους οργανισμούς, π.χ. βενθοφάγα ψάρια. Σε αντίθεση με τους επιβενθικούς οργανισμούς, οι ενδοβενθικοί υδρόβιοι ολιγόχαιτοι φωλιάζουν εντός του ιζήματος και καταναλώνουν σωματίδια ιζήματος που βρίσκονται κάτω από την επιφάνεια του ιζήματος. Για τον λόγο αυτό, οι εν λόγω οργανισμοί εκτίθενται σε ουσίες μέσω πολλών οδών πρόσληψης, περιλαμβανομένης της άμεσης επαφής, της κατάποσης μολυσμένων σωματιδίων ιζήματος, του ενδοπορικού νερού και του υπερκείμενου νερού. Ορισμένα είδη βενθικών ολιγοχαιτών που χρησιμοποιούνται επί του παρόντος σε οικοτοξικολογικές δοκιμές περιγράφονται στο προσάρτημα 6.

2. Οι παράμετροι που χαρακτηρίζουν τη βιοσυσσώρευση μιας ουσίας περιλαμβάνουν, καταρχάς, τον συντελεστή βιοσυσσώρευσης (BAF), τη σταθερά ταχύτητας πρόσληψης ιζήματος (k_s) και τη σταθερά ταχύτητας αποβολής (k_e). Οι λεπτομερείς ορισμοί αυτών των παραμέτρων παρέχονται στο προσάρτημα 1.

3. Για να εκτιμηθεί γενικά το δυναμικό βιοσυσσώρευσης ουσιών και να διερευνηθεί η βιοσυσσώρευση ουσιών που τείνουν να κατανέμονται μέσα ή επάνω σε ιζήματα, απαιτείται μια ειδική για το διαμέρισμα μέθοδος δοκιμών (1)(2)(3)(4).

4. Σκοπός της παρούσας μεθόδου δοκιμών είναι η εκτίμηση της βιοσυσσώρευσης ουσιών που σχετίζονται με ιζήματα σε ενδοβενθικούς ολιγόχαιτους σκώληκες. Η υπό δοκιμή ουσία εμβολιάζεται στο ίζημα. Η χρήση εμβολιασμένου ιζήματος σκοπό έχει να προσομοιώσει μολυσμένο ίζημα.

5. Αυτή η μέθοδος βασίζεται σε υφιστάμενες μεθόδους δοκιμών τοξικότητας και βιοσυσσώρευσης ιζήματος (1)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Άλλα χρήσιμα έγγραφα είναι οι συζητήσεις και τα αποτελέσματα μιας διεθνούς συνάντησης εργασίας (11) και το αποτέλεσμα μιας διεθνούς κυκλικής δοκιμής (12).

6. Η παρούσα δοκιμή εφαρμόζεται σε σταθερές, ουδέτερες οργανικές ουσίες, που τείνουν να συσχετίζονται με ιζήματα. Με τη μέθοδο αυτή μπορεί επίσης να μετρηθεί η βιοσυσσώρευση σταθερών οργανο-μεταλλικών ενώσεων που σχετίζονται με ιζήματα (12). Δεν εφαρμόζεται σε μέταλλα και άλλα ιχνοστοιχεία (11) χωρίς τροποποίηση του σχεδιασμού δοκιμής όσον αφορά τους όγκους υποστρώματος και νερού, και πιθανώς το μέγεθος δείγματος ιστού.

ΠΡΟΫΠΟΘΕΣΗ ΚΑΙ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ

7. Επί του παρόντος υπάρχουν διαθέσιμες μόνο λίγες καλά καθιερωμένες ποσοτικές σχέσεις δομής-δραστικότητας (Quantitative Structure-Activity Relationships, QSAR) που αφορούν τις διαδικασίες βιοσυσσώρευσης (14). Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη σχέση είναι η συσχέτιση μεταξύ της βιοσυσσώρευσης και της βιοσυγκέντρωσης σταθερών οργανικών ενώσεων και της λιποφιλίας τους (εκφραζόμενη ως λογάριθμος του συντελεστή κατανομής οκτανόλης-νερού (log K_{ow}), για τον ορισμό βλ. προσάρτημα 1), αντίστοιχα, η οποία έχει αναπτυχθεί για την περιγραφή της κατανομής μιας ουσίας μεταξύ του νερού και των ψαριών. Έχουν επίσης καθιερωθεί

▼M6

συσχετίσεις για το διαμέρισμα ιζήματος με χρήση αυτής της σχέσης (15)(16)(17)(18). Η συσχέτιση log K_{ow}-log BCF ως βασική σχέση QSAR μπορεί να είναι χρήσιμη για μια πρώτη προκαταρκτική εκτίμηση του δυναμικού βιοσυσσώρευσης ουσιών που σχετίζονται με ιζήματα. Ωστόσο, ο BAF ενδέχεται να επηρεάζεται από το λιπιδικό περιεχόμενο του οργανισμού δοκιμής και την περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα του ιζήματος. Επομένως, ο συντελεστής κατανομής οργανικού άνθρακα-νερού (K_{oc}) μπορεί επίσης να χρησιμοποιείται ως βασικός καθοριστικός παράγοντας της βιοσυσσώρευσης οργανικών ουσιών που σχετίζονται με ιζήματα.

8. Η δοκιμή αυτή εφαρμόζεται σε:

— σταθερές, οργανικές ουσίες με τιμές log K_{ow} που κυμαίνονται μεταξύ 3,0 και 6,0 (5)(19) και υπερλιπόφιλες ουσίες που εμφανίζουν log K_{ow} μεγαλύτερο από 6,0 (5),

— ουσίες που ανήκουν στην κατηγορία των οργανικών ουσιών που είναι γνωστές για το δυναμικό βιοσυσσώρευσής τους σε ζωντανούς οργανισμούς, π.χ. επιφανειοδραστικές ή εξαιρετικά προσροφητικές ουσίες (π.χ. υψηλό K_{oc}).

9. Πριν από την έναρξη της μελέτης θα πρέπει να λαμβάνονται πληροφορίες σχετικά με την υπό δοκιμή ουσία, όπως οι προφυλάξεις ασφαλείας, οι κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης και η σταθερότητα, καθώς και οι μέθοδοι ανάλυσης. Καθοδήγηση για τις δοκιμές ουσιών με φυσικοχημικές ιδιότητες που δυσχεραίνουν τη διεξαγωγή της δοκιμής παρέχεται στα σημεία (20) και (21). Πριν από τη διεξαγωγή δοκιμής για τη βιοσυσσώρευση με υδρόβιους ολιγόχαιτους, θα πρέπει να είναι γνωστές οι ακόλουθες πληροφορίες σχετικά με την υπό δοκιμή ουσία:

— κοινή ονομασία, χημική ονομασία (κατά προτίμηση κατά IUPAC), συντακτικός τύπος, αριθμός CAS, καθαρότητα,

— υδατοδιαλυτότητα [μέθοδος δοκιμών Α.6 (22)],

— συντελεστής κατανομής οκτανόλης-νερού, K_{ow} [μέθοδοι δοκιμών Α.8, Α.24 (22)],

— συντελεστής κατανομής ιζήματος-νερού, εκφρασμένος ως K_d ή K_{oc} [μέθοδος δοκιμών Γ.19 (22)],

— υδρόλυση [μέθοδος δοκιμών Γ.7 (22)],

— φωτομετατροπή στο νερό (23),

— τάση ατμών [μέθοδος δοκιμών Α.4] (22),

— άμεση βιοαποικοδομησιμότητα [μέθοδοι δοκιμών Γ.4 και Γ.29 (22)],

— επιφανειακή τάση [μέθοδος δοκιμών Α.5 (22)],

— κρίσιμη συγκέντρωση μικυλλίων (24).

Επιπλέον σχετικές θεωρούνται οι ακόλουθες πληροφορίες -όταν διατίθενται:

— βιοαποικοδόμηση στο υδατικό περιβάλλον [μέθοδοι δοκιμών Γ.24 και Γ.25 (22)],

— σταθερά του Νόμου του Henry.

10. Οι ραδιοσημασμένες υπό δοκιμή ουσίες μπορούν να διευκολύνουν την ανάλυση του νερού, του ιζήματος και των βιολογικών δειγμάτων και μπορούν να χρησιμοποιούνται για να προσδιορίζεται εάν θα πρέπει να πραγματοποιηθεί ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός των προϊόντων αποικοδόμησης. Η μέθοδος που περιγράφεται στο παρόν επικυρώθηκε από μια διεθνή κυκλική δοκιμή (12) για ουσίες επισημασμένες με ^{14}C. Εάν μετρώνται τα ολικά ραδιενεργά κατάλοιπα, ο συντελεστής βιοσυσσώρευσης (BAF) βασίζεται στη μητρική ουσία, συμπεριλαμβανομένων τυχόν προϊόντων αποικοδόμησης που διατηρούνται. Είναι επίσης δυνατός ο συνδυασμός μιας μελέτης μεταβολισμού με μια μελέτη βιοσυσσώρευσης με ανάλυση και

▼M6

ποσοτικό προσδιορισμό του ποσοστού της μητρικής ουσίας και των προϊόντων αποικοδόμησής της σε δείγματα που λαμβάνονται στο τέλος της φάσης πρόσληψης ή στο επίπεδο αιχμής της βιοσυσσώρευσης. Σε κάθε περίπτωση, συνιστάται ο υπολογισμός του BAF να βασίζεται στη συγκέντρωση της μητρικής ουσίας στους οργανισμούς και όχι μόνο στα ολικά ραδιενεργά κατάλοιπα.

11. Εκτός από τις ιδιότητες της υπό δοκιμή ουσίας, άλλες πληροφορίες που απαιτούνται είναι η τοξικότητα στα είδη ολιγοχαιτών που θα χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή, όπως η διάμεση θανατηφόρος συγκέντρωση (LC_{50}) για το απαιτούμενο χρονικό διάστημα της φάσης πρόσληψης, προκειμένου να διασφαλίζεται ότι οι επιλεγμένες συγκεντρώσεις έκθεσης είναι πολύ χαμηλότερες από τα τοξικά επίπεδα. Θα πρέπει να προτιμώνται, εάν υπάρχουν, οι τιμές τοξικότητας που προέρχονται από μακροχρόνιες μελέτες με υποθανατηφόρα τελικά σημεία (EC_{50}). Εάν δεν είναι διαθέσιμα τέτοια στοιχεία, χρήσιμες πληροφορίες μπορούν να προκύψουν από μια δοκιμή οξείας τοξικότητας υπό συνθήκες πανομοιότυπες με τις συνθήκες της δοκιμής βιοσυσσώρευσης ή από δεδομένα τοξικότητας για άλλα βοηθητικά είδη.

12. Πρέπει να υπάρχει διαθέσιμη κατάλληλη αναλυτική μέθοδος, γνωστής ακρίβειας (accuracy), πιστότητας (precision) και ευαισθησίας, για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ουσίας στα διαλύματα δοκιμής, στο ίζημα και στο βιολογικό υλικό, καθώς και λεπτομερείς πληροφορίες για την παρασκευή και την αποθήκευση του δείγματος, αλλά και φύλλα δεδομένων ασφάλειας υλικών. Θα πρέπει επίσης να είναι γνωστά τα αναλυτικά όρια ανίχνευσης της υπό δοκιμή ουσίας στο νερό, στο ίζημα και στους ιστούς των σκωλήκων. Εάν χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένη υπό δοκιμή ουσία, πρέπει επίσης να είναι γνωστά η ειδική ραδιενέργεια (δηλαδή Bq mol^{-1}), η θέση του ραδιοσημασμένου ατόμου και το ποσοστό της ραδιενέργειας που συνδέεται με ξένες προσμείξεις. Η ειδική ραδιενέργεια της υπό δοκιμή ουσίας θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν υψηλότερη προκειμένου να ανιχνεύονται συγκεντρώσεις δοκιμής όσο το δυνατό χαμηλότερες (11).

13. Θα πρέπει να είναι διαθέσιμες πληροφορίες για τα χαρακτηριστικά του ιζήματος που θα χρησιμοποιηθεί (π.χ. προέλευση του ιζήματος ή των συστατικών του, pH και συγκέντρωση αμμωνίας του ενδοπορικού νερού (ιζήματα υπαίθρου), περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (TOC), κατανομή μεγέθους σωματιδίων (ποσοστό άμμου, ιλύος και αργίλου) και ποσοστό επί του ξηρού βάρους) (6).

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

14. Η δοκιμή αποτελείται από δύο φάσεις: τη φάση πρόσληψης (έκθεση) και τη φάση αποβολής (μετά την έκθεση). Κατά τη φάση πρόσληψης, πραγματοποιείται έκθεση των σκωλήκων σε ίζημα εμβολιασμένο με την υπό δοκιμή ουσία, συμπλήρωση με ανασυσταθέν νερό και εξισορρόπηση, κατά περίπτωση (11). Ομάδες σκωλήκων διατηρούνται ως μάρτυρες υπό πανομοιότυπες συνθήκες, χωρίς την υπό δοκιμή ουσία.

15. Για τη φάση αποβολής, οι σκώληκες μεταφέρονται σε σύστημα ιζήματος-νερού που δεν περιέχει την υπό δοκιμή ουσία. Η φάση αποβολής είναι απαραίτητη για τη λήψη πληροφοριών σχετικά με την ταχύτητα με την οποία η υπό δοκιμή ουσία απεκκρίνεται από τους οργανισμούς δοκιμής (19)(25). Η φάση αποβολής είναι πάντα υποχρεωτική, εκτός εάν η πρόσληψη της υπό δοκιμή ουσίας κατά τη διάρκεια της φάσης έκθεσης είναι ασήμαντη (π.χ. εάν δεν εντοπίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στους σκώληκες δοκιμής και στους σκώληκες-μάρτυρες). Εάν κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης δεν επιτευχθεί σταθερή κατάσταση, ο προσδιορισμός της κινητικής -BAF_k, σταθερές ταχύτητας πρόσληψης και αποβολής- μπορεί να γίνει με τα αποτελέσματα της φάσης αποβολής. Η αλλαγή της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στη μάζα ή στην επιφάνεια των σκωλήκων παρακολουθείται καθ' όλη τη διάρκεια και των δύο φάσεων της δοκιμής.

16. Κατά τη φάση πρόσληψης, εκτελούνται μετρήσεις μέχρι ο BAF να φθάσει σε φάση οριζοντίωσης ή σταθερή κατάσταση. Ως προεπιλογή, η διάρκεια της φάσης πρόσληψης αναμένεται να είναι 28 ημέρες. Η πρακτική εμπειρία δείχνει ότι μια φάση πρόσληψης12 έως 14 ημερών επαρκεί για να φτάσουν σε σταθερή κατάσταση αρκετές σταθερές, ουδέτερες οργανικές ενώσεις (6)(8)(9).

▼M6

17. Ωστόσο, εάν δεν επιτυγχάνεται σταθερή κατάσταση εντός 28 ημερών, η φάση αποβολής εκκινείται με τη μεταφορά εκτεθειμένων ολιγοχαιτών σε δοχεία που περιέχουν το ίδιο μέσο χωρίς την υπό δοκιμή ουσία. Η φάση αποβολής τερματίζεται όταν επιτυγχάνεται επίπεδο ίσο με το 10 % της συγκέντρωσης που μετριέται στους σκώληκες την ημέρα 28 της φάσης πρόσληψης ή μετά από μέγιστη διάρκεια 10 ημερών. Το επίπεδο υπολειμμάτων στους σκώληκες στο τέλος της φάσης αποβολής αναφέρεται ως πρόσθετο τελικό σημείο, π.χ. ως μη αποβληθέντα υπολείμματα (NER). Ο συντελεστής βιοσυσσώρευσης (BAF_{ss}) υπολογίζεται, κατά προτίμηση, τόσο ως η αναλογία της συγκέντρωσης στους σκώληκες (C_a) και στο ίζημα (C_s) σε εμφανώς σταθερή κατάσταση, όσο και ως συντελεστής κινητικής βιοσυσσώρευσης, BAF_K εκφραζόμενος ως η αναλογία της σταθεράς ταχύτητας πρόσληψης από το ίζημα (k_s) προς τη σταθερά ταχύτητας αποβολής (k_e) με την παραδοχή ότι η κινητική είναι πρώτης τάξης. Εάν δεν επιτυγχάνεται σταθερή κατάσταση εντός 28 ημερών, ο BAF_K υπολογίζεται από τις σταθερές της ταχύτητας πρόσληψης και της ταχύτητας αποβολής. Για τον υπολογισμό, βλ. προσάρτημα 2. Εάν δεν εφαρμόζεται κινητική πρώτης τάξης, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πιο περίπλοκα μοντέλα (προσάρτημα 2 και παραπομπή (25)).

18. Εάν δεν επιτυγχάνεται σταθερή κατάσταση εντός 28 ημερών, η φάση πρόσληψης μπορεί προαιρετικά να παραταθεί και ομάδες εκτεθειμένων σκωλήκων να υποβληθούν -εφόσον διατίθενται- σε περαιτέρω μετρήσεις μέχρι την επίτευξη σταθερής κατάστασης. Παράλληλα, ωστόσο, η φάση αποβολής θα πρέπει να ξεκινάει την ημέρα 28 της φάσης πρόσληψης.

19. Η σταθερά ταχύτητας πρόσληψης, η σταθερά ταχύτητας αποβολής (ή οι σταθερές, όταν υπεισέρχονται πιο πολύπλοκα μοντέλα), ο συντελεστής κινητικής βιοσυσσώρευσης (BAF_K) και, όπου είναι δυνατόν, τα όρια εμπιστοσύνης καθεμίας από τις παραμέτρους αυτές υπολογίζονται με μοντέλα εξισώσεων μέσω υπολογιστή (για τα μοντέλα, βλ. προσάρτημα 2). Η ποιότητα της προσαρμογής κάθε μοντέλου μπορεί να διαπιστώνεται από τον συντελεστή συσχέτισης ή τον συντελεστή προσδιορισμού (συντελεστές που προσεγγίζουν τη μονάδα δηλώνουν καλή προσαρμογή).

20. Για να μειωθεί η μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων των δοκιμών στην περίπτωση οργανικών ουσιών με υψηλή λιποφιλία, θα πρέπει να εκφράζονται επιπλέον οι συντελεστές βιοσυσσώρευσης σε σχέση με το λιπιδικό περιεχόμενο των οργανισμών δοκιμής και την περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (TOC) στο ίζημα (συντελεστής βιοσυσσώρευσης σε βιόκοσμοίζημα ή BSAF σε kg TOC ιζήματος kg^{-1} λιπιδικού περιεχομένου του σκώληκα). Η προσέγγιση αυτή βασίζεται σε εμπειρίες και θεωρητικές συσχετίσεις για το υδατικό διαμέρισμα, όπου -για μερικές χημικές τάξεις- υπάρχει σαφής σχέση μεταξύ του δυναμικού μιας ουσίας να βιοσυσσωρεύεται και της λιποφιλίας της, το οποίο είναι μια καθιερωμένη μέθοδος με τα ψάρια ως πρότυπους οργανισμούς (14)(25)(27). Υπάρχει επίσης μια σχέση μεταξύ του λιπιδικού περιεχομένου των ψαριών δοκιμής και της παρατηρηθείσας βιοσυσσώρευσης των εν λόγω ουσιών. Για τους βενθικούς οργανισμούς, έχουν διαπιστωθεί παρόμοιες συσχετίσεις (15)(16)(17)(18). Εάν είναι διαθέσιμος επαρκής ιστός σκωλήκων, το λιπιδικό περιεχόμενο των ζώων δοκιμής μπορεί να προσδιορίζεται στο ίδιο βιολογικό υλικό με αυτό που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας. Ωστόσο, είναι πρακτικό να χρησιμοποιούνται εγκλιματισμένα ζώα-μάρτυρες, τουλάχιστον στην αρχή ή -κατά προτίμηση- στο τέλος της φάσης πρόσληψης για τη μέτρηση του λιπιδικού περιεχομένου, το οποίο μπορεί στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί για την κανονικοποίηση των τιμών BAF.

ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

21. Προϋποθέσεις εγκυρότητας της δοκιμής είναι οι ακόλουθες:

— Η συνολική θνησιμότητα των σκωλήκων (μάρτυρες και ομάδες αγωγής) έως το τέλος της δοκιμής δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 20 % του αρχικού αριθμού.

— Επιπλέον, θα πρέπει να αποδεικνύεται ότι οι σκώληκες φωλιάζουν στο ίζημα για να είναι δυνατή η μέγιστη έκθεση. Για λεπτομέρειες, βλ. παράγραφο 28.

▼M6

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Είδη δοκιμής

22. Για τη δοκιμή μπορούν να χρησιμοποιούνται διάφορα είδη υδρόβιων ολιγοχαιτών. Τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα είδη παρατίθενται στο προσάρτημα 6.

23. Θα πρέπει να διεξάγονται δοκιμές τοξικότητας (96 ώρες, μόνο σε νερό) ανά τακτά διαστήματα (π.χ. κάθε μήνα) με τοξική ουσία αναφοράς, όπως το χλωριούχο κάλιο (KCl) ή ο θειικός χαλκός ($CuSO_4$) (1), για να καταδεικνύεται η κατάσταση υγείας των ζώων δοκιμής (1)(6). Εάν δεν διεξάγονται δοκιμές τοξικότητας αναφοράς ανά τακτά διαστήματα, η παρτίδα οργανισμών που θα χρησιμοποιηθεί σε μια δοκιμή βιοσυσσώρευσης ιζήματος θα πρέπει να ελέγχεται με τη χρήση μιας τοξικής ουσίας αναφοράς. Χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την κατάσταση των ζώων μπορούν να προκύψουν επίσης από τη μέτρηση του λιπιδικού περιεχομένου.

Καλλιέργεια των οργανισμών δοκιμής

24. Προκειμένου ο αριθμός των σκωλήκων να επαρκεί για τη διεξαγωγή δοκιμών βιοσυσσώρευσης, οι σκώληκες μπορεί να πρέπει να διατηρούνται σε μόνιμη εργαστηριακή καλλιέργεια ενός είδους. Μέθοδοι εργαστηριακής καλλιέργειας για τα επιλεγμένα είδη δοκιμής συνοψίζονται στο προσάρτημα 6. Για λεπτομέρειες, βλ. παραπομπές (8)(9)(10)(18)(28)(29)(30)(31)(32).

Συσκευές

25. Θα πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια ώστε να μην χρησιμοποιούνται, σε οποιοδήποτε τμήμα του εξοπλισμού, υλικά που μπορούν να διαλύουν ή να προσροφούν τις υπό δοκιμή ουσίες ή να αποπλένουν άλλες ουσίες και να έχουν δυσμενή επίδραση στα ζώα δοκιμής. Μπορούν να χρησιμοποιούνται συνήθεις ορθογώνιοι ή κυλινδρικοί θάλαμοι, κατασκευασμένοι από χημικώς αδρανές υλικό και με κατάλληλη χωρητικότητα ανάλογα με τον ρυθμό πλήρωσης, δηλαδή τον αριθμό των σκωλήκων δοκιμής. Θα πρέπει να αποφεύγεται η χρήση μαλακών πλαστικών σωληνώσεων για τη χορήγηση νερού ή αέρα. Για τον εξοπλισμό που έρχεται σε επαφή με τα μέσα της δοκιμής θα πρέπει να χρησιμοποιείται πολυτετραφθοροαιθυλένιο, ανοξείδωτος χάλυβας ή/και γυαλί. Για ουσίες με υψηλούς συντελεστές προσρόφησης, όπως τα συνθετικά πυρεθροειδή, μπορεί να απαιτείται η χρήση σιλανιωμένου γυαλιού. Στις περιπτώσεις αυτές, ο εξοπλισμός πρέπει να απορρίπτεται μετά τη χρήση (5). Για ραδιοσημασμένες υπό δοκιμή ουσίες και για πτητικές ουσίες, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγεται η αφαίρεση και η διαφυγή υπό δοκιμή ουσίας που έχει αφαιρεθεί. Για τη συγκράτηση τυχόν υπολειμμάτων που εξατμίζονται από τους θαλάμους δοκιμής, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται παγίδες (π.χ. γυάλινες φιάλες πλύσης αερίου) που περιέχουν κατάλληλα απορροφητικά υλικά (11).

Νερό

26. Το υπερκείμενο νερό πρέπει να είναι τέτοιας ποιότητας ώστε το είδος δοκιμής να μπορεί να επιβιώνει καθ' όλη τη διάρκεια του εγκλιματισμού και της δοκιμής χωρίς να παρουσιάζει οποιαδήποτε μη φυσιολογική εμφάνιση ή συμπεριφορά. Ως υπερκείμενο νερό στις δοκιμές καθώς και στις εργαστηριακές καλλιέργειες των σκωλήκων συνιστάται η χρήση ανασυσταθέντος νερού σύμφωνα με τη μέθοδο δοκιμών Γ.1 (25). Έχει καταδειχθεί ότι διάφορα είδη δοκιμής μπορούν να επιβιώνουν, να αναπτύσσονται και να αναπαράγονται σε αυτό το νερό (8), ενώ εξασφαλίζεται μέγιστη τυποποίηση της δοκιμής καθώς και των συνθηκών καλλιέργειας. Το νερό θα πρέπει να χαρακτηρίζεται τουλάχιστον βάσει του pH, της αγωγιμότητας και της σκληρότητας. Η ανάλυση του νερού για παρουσία μικρορύπων πριν από τη χρήση μπορεί να παρέχει χρήσιμες πληροφορίες (προσάρτημα 4).

27. Κατά τη διάρκεια μιας δοκιμής, το νερό θα πρέπει να είναι σταθερής ποιότητας. Το pH του υπερκείμενου νερού θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 6 και 9. Η συνολική σκληρότητα θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 90 και 400 mg $CaCO_3$ ανά λίτρο κατά την έναρξη της δοκιμής (7). Τα εύρη για το pH και τη σκληρότητα για το αναφερόμενο ανασυσταθέν νερό παρέχονται στη

▼M6

μέθοδο δοκιμών Γ.1 (25). Εάν υπάρχουν υπόνοιες για αλληλεπίδραση μεταξύ ιόντων σκληρότητας και της υπό δοκιμή ουσίας, θα πρέπει να χρησιμοποιείται νερό χαμηλότερης σκληρότητας. Πρόσθετα κριτήρια ενός αποδεκτού νερού αραίωσης σύμφωνα με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 210 του ΟΟΣΑ παρέχονται στο προσάρτημα 4 (34).

Ίζημα

28. Το ίζημα πρέπει να είναι τέτοιας ποιότητας ώστε οι οργανισμοί δοκιμής να μπορούν να επιβιώνουν και, κατά προτίμηση, να αναπαράγονται καθ' όλη τη διάρκεια του εγκλιματισμού και της δοκιμής, χωρίς να παρουσιάζουν μη φυσιολογική εμφάνιση ή συμπεριφορά. Οι σκώληκες θα πρέπει να φωλιάζουν μέσα στο ίζημα. Η συμπεριφορά όσον αφορά το φώλιασμα μπορεί να επιδρά στην έκθεση και κατά συνέπεια στον BAF. Επομένως, η αποφυγή του ιζήματος ή η συμπεριφορά όσον αφορά το φώλιασμα των οργανισμών δοκιμής θα πρέπει να καταγράφονται, όταν η θολερότητα του υπερκείμενου νερού επιτρέπει τις εν λόγω παρατηρήσεις. Οι σκώληκες (μάρτυρες και ομάδες αγωγής) θα πρέπει να φωλιάζουν στο ίζημα εντός 24 ωρών μετά την προσθήκη στα δοχεία δοκιμής. Εάν παρατηρηθεί μόνιμη αποτυχία των σκωλήκων να φωλιάσουν ή αποφυγή του ιζήματος (π.χ. ποσοστό άνω του 20 % αφού παρέλθει περισσότερο από το ήμισυ της φάσης πρόσληψης), αυτό δηλώνει ότι οι συνθήκες δοκιμής δεν είναι κατάλληλες, οι οργανισμοί δοκιμής δεν είναι υγιείς ή η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας προκαλεί αυτήν τη συμπεριφορά. Σε μια τέτοια περίπτωση, η δοκιμή θα πρέπει να διακόπτεται και να επαναλαμβάνεται κάτω από βελτιωμένες συνθήκες. Πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με την κατανάλωση ιζήματος μπορούν να λαμβάνονται με τη χρήση των μεθόδων που περιγράφονται στα σημεία (35)(36), οι οποίες προσδιορίζουν την κατανάλωση ιζήματος ή την επιλογή σωματιδίων στους οργανισμούς δοκιμής. Εάν μπορεί να γίνει παρατήρηση, θα πρέπει να καταγράφεται τουλάχιστον η παρουσία ή απουσία σφαιριδίων κοπράνων στην επιφάνεια του ιζήματος, η οποία υποδεικνύει την κατανάλωση ιζήματος από τους σκώληκες, και να λαμβάνεται υπόψη κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμής όσον αφορά τις οδούς έκθεσης.

29. Στις δοκιμές και στις εργαστηριακές καλλιέργειες των σκωλήκων συνιστάται η χρήση ενός τεχνητού ιζήματος που βασίζεται στο τεχνητό έδαφος το οποίο περιγράφεται στη μέθοδο δοκιμών Γ.8 (40) (προσάρτημα 5), επειδή φυσικά ιζήματα κατάλληλης ποιότητας ενδέχεται να μην είναι διαθέσιμα καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Επιπλέον, οι αυτόχθονες οργανισμοί, καθώς και η πιθανή παρουσία μικρορύπων στα φυσικά ιζήματα, μπορούν να επηρεάσουν τη δοκιμή. Διάφορα είδη δοκιμής μπορούν να επιβιώνουν, να αναπτύσσονται και να αναπαράγονται στο τεχνητό ίζημα (8).

30. Το τεχνητό ίζημα θα πρέπει να χαρακτηρίζεται τουλάχιστον από την προέλευση των συστατικών, την κατανομή μεγέθους κόκκων (ποσοστό άμμου, ιλύος και αργίλου), την περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (TOC), την περιεκτικότητα σε νερό και το pH. Η μέτρηση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού είναι προαιρετική. Ωστόσο, φυσικά ιζήματα που προέρχονται από μη ρυπασμένες τοποθεσίες μπορούν να χρησιμεύουν ως ίζημα δοκιμής ή/και καλλιέργειας (1). Τα φυσικά ιζήματα θα πρέπει να χαρακτηρίζονται τουλάχιστον από την προέλευση (τόπος συλλογής), το pH και τη συγκέντρωση αμμωνίας του ενδοπορικού νερού, την περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (TOC), την κατανομή μεγέθους σωματιδίων (ποσοστό άμμου, ιλύος και αργίλου) και το ποσοστό υγρασίας (6). Εάν αναμένεται παραγωγή αμμωνίας, πριν από τον εμβολιασμό του φυσικού ιζήματος με την υπό δοκιμή ουσία, συνιστάται ο εγκλιματισμός του φυσικού ιζήματος για επτά ημέρες υπό τις συνθήκες που θα επικρατούν στην επακόλουθη δοκιμή. Στο τέλος αυτής της περιόδου εγκλιματισμού, το υπερκείμενο νερό θα πρέπει απομακρύνεται και να απορρίπτεται. Η ανάλυση του ιζήματος ή των συστατικών του για παρουσία μικρορύπων πριν από τη χρήση μπορεί να παρέχει χρήσιμες πληροφορίες.

Παρασκευή

31. Ο χειρισμός των φυσικών ιζημάτων πριν από τη χρήση τους στο εργαστήριο περιγράφεται στα σημεία (1)(6)(44). Στο προσάρτημα 5, περιγράφεται ο τρόπος παρασκευής του τεχνητού ιζήματος.

▼M6

Αποθήκευση

32. Ο χρόνος αποθήκευσης των φυσικών ιζημάτων στο εργαστήριο θα πρέπει να είναι ο ελάχιστος δυνατός. Η Υπηρεσία προστασίας περιβάλλοντος των Η.Π.Α. (U.S. EPA) (6) συνιστά μέγιστη περίοδο αποθήκευσης 8 εβδομάδων στους 4 ± 2 °C στο σκοτάδι. Δεν θα πρέπει να υπάρχει υπερκείμενος χώρος επάνω από το ίζημα στους περιέκτες αποθήκευσης. Συστάσεις για την αποθήκευση του τεχνητού ιζήματος παρέχονται στο προσάρτημα 5.

Εφαρμογή της υπό δοκιμή ουσίας

33. Το ίζημα εμβολιάζεται με την υπό δοκιμή ουσία. Η διαδικασία εμβολιασμού περιλαμβάνει την επίστρωση ενός ή περισσότερων από τα συστατικά του ιζήματος με την υπό δοκιμή ουσία. Για παράδειγμα, η χαλαζιακή άμμος ή τμήμα της (π.χ. 10 g χαλαζιακής άμμου ανά δοχείο δοκιμής) μπορεί να εμποτιστεί με διάλυμα της υπό δοκιμή ουσίας σε κατάλληλο διαλύτη, ο οποίος στη συνέχεια εξατμίζεται αργά μέχρι ξηρού. Το επιστρωμένο κλάσμα μπορεί στη συνέχεια να αναμειχθεί με το υγρό ίζημα. Κατά την παρασκευή του ιζήματος, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η ποσότητα της άμμου που παρέχεται από το μείγμα υπό δοκιμή ουσίας και άμμου, δηλαδή το ίζημα θα πρέπει επομένως να παρασκευάζεται με λιγότερη άμμο (6).

34. Όταν χρησιμοποιείται φυσικό ίζημα, η υπό δοκιμή ουσία μπορεί να προστίθεται με εμβολιασμό ενός ξηρού τμήματος του ιζήματος, όπως περιγράφεται ανωτέρω για το τεχνητό ίζημα, ή με ανάδευση της υπό δοκιμή ουσίας μέσα στο υγρό ίζημα, με επακόλουθη εξάτμιση τυχόν χρησιμοποιούμενου παράγοντα διαλυτοποίησης. Οι διαλύτες που μπορούν να χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό υγρού ιζήματος είναι η αιθανόλη, η μεθανόλη, ο μονομεθυλαιθέρας της αιθυλενογλυκόλης, ο διμεθυλαιθέρας της αιθυλενογλυκόλης, το διμεθυλοφορμαμίδιο και η τριαιθυλενογλυκόλη (5)(34). Τα βασικά κριτήρια για την επιλογή κατάλληλου μέσου διαλυτοποίησης θα πρέπει να είναι η τοξικότητα και η πτητικότητα του διαλύτη, καθώς και η διαλυτότητα της υπό δοκιμή ουσίας στον επιλεγμένο διαλύτη. Πρόσθετη καθοδήγηση σχετικά με τις διαδικασίες εμβολιασμού παρέχεται στο έγγραφο Environment Canada (1995)(41). Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να εξασφαλίζεται ότι η υπό δοκιμή ουσία που προστίθεται στο ίζημα είναι πλήρως και ομοιογενώς κατανεμημένη μέσα στο ίζημα. Οι επαναλήψεις των επιμέρους δειγμάτων του εμβολιασμένου ιζήματος θα πρέπει να αναλύονται για να ελέγχονται οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας στο ίζημα και να προσδιορίζεται ο βαθμός ομοιογένειας της κατανομής της υπό δοκιμή ουσίας.

35. Μετά την ετοιμασία του εμβολιασμένου ιζήματος με το υπερκείμενο νερό, είναι σκόπιμο να παρέχεται ένα χρονικό περιθώριο για την κατανομή της υπό δοκιμή ουσίας μεταξύ του ιζήματος και της υδατικής φάσης. Αυτό θα πρέπει να γίνεται κατά προτίμηση υπό τις συνθήκες θερμοκρασίας και αερισμού που εφαρμόζονται στη δοκιμή. Ο κατάλληλος χρόνος εξισορρόπησης είναι ειδικός για τα ιζήματα και τις ουσίες και μπορεί να κυμαίνεται από ώρες έως ημέρες και, σε σπάνιες περιπτώσεις, έως αρκετές εβδομάδες (4-5 εβδομάδες) (28)(42). Σε αυτήν τη δοκιμή, δεν αναμένεται η επίτευξη ισορροπίας, αλλά συνιστάται περίοδος εξισορρόπησης από 48 ώρες έως 7 ημέρες. Ανάλογα με τον σκοπό της μελέτης, για παράδειγμα όταν πρέπει να προσομοιώνονται περιβαλλοντικές συνθήκες, το εμβολιασμένο ίζημα μπορεί να υποστεί εξισορρόπηση ή παλαίωση για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (11).

ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Προκαταρκτική δοκιμή

36. Για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών της οριστικής δοκιμής, μπορεί να είναι χρήσιμο να γίνει ένα προκαταρκτικό πείραμα, π.χ. επιλογή της ή των συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή ουσίας, καθώς και της διάρκειας των φάσεων πρόσληψης και αποβολής. Η συμπεριφορά των σκωλήκων θα πρέπει να παρατηρείται και να καταγράφεται κατά τη διάρκεια μιας προκαταρκτικής δοκιμής, για παράδειγμα η αποφυγή του ιζήματος, δηλ. οι σκώληκες διαφεύγουν από το ίζημα το οποίο μπορεί να οφείλεται στην υπό

▼M6

δοκιμή ουσία ή/και στο ίδιο το ίζημα. Η αποφυγή του ιζήματος μπορεί επίσης να χρησιμοποιείται ως υποθανατηφόρος παράμετρος σε μια προκαταρκτική δοκιμή για την εκτίμηση της συγκέντρωσης ή των συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή ουσίας προς χρήση σε μια δοκιμή βιοσυσσώρευσης.

Συνθήκες έκθεσης

Διάρκεια της φάσης πρόσληψης

37. Οι οργανισμοί δοκιμής εκτίθενται στην υπό δοκιμή ουσία κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης. Το πρώτο δείγμα θα πρέπει να λαμβάνεται μεταξύ 4 και 24 ωρών από την έναρξη της φάσης πρόσληψης. Η φάση πρόσληψης θα πρέπει να διαρκεί έως 28 ημέρες (1)(6)(11) εκτός κι αν αποδεδειγμένα επιτευχθεί νωρίτερα η ισορροπία. Σταθερή κατάσταση επικρατεί όταν: (i) η γραφική παράσταση των συντελεστών βιοσυσσώρευσης σε κάθε περίοδο δειγματοληψίας συναρτήσει του χρόνου είναι παράλληλη προς τον άξονα του χρόνου, (ii) τρεις διαδοχικές αναλύσεις του BAF σε δείγματα που λαμβάνονται κατά διαστήματα τουλάχιστον δύο ημερών δεν διαφέρουν μεταξύ τους κατά περισσότερο από ± 20 % και (iii) δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών περιόδων δειγματοληψίας (με βάση στατιστικές συγκρίσεις, π.χ. ανάλυση μεταβλητότητας και ανάλυση παλινδρόμησης). Εάν δεν έχει επιτευχθεί σταθερή κατάσταση σε 28 ημέρες, η φάση πρόσληψης μπορεί να διακοπεί με την έναρξη της φάσης αποβολής και ο BAF_K μπορεί να υπολογιστεί από τις σταθερές ταχύτητας πρόσληψης και αποβολής (βλ. επίσης παραγράφους 16 έως 18).

Διάρκεια της φάσης αποβολής

38. Το πρώτο δείγμα θα πρέπει να λαμβάνεται μεταξύ 4 και 24 ωρών από την έναρξη της φάσης αποβολής, επειδή κατά τη διάρκεια της αρχικής περιόδου ενδέχεται να προκύψουν ταχείες αλλαγές στα υπολείμματα ιστού. Συνιστάται να τερματίζεται η φάση αποβολής όταν η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας είναι μικρότερη από το 10 % της συγκέντρωσης σταθερής κατάστασης ή μετά από μια μέγιστη χρονική περίοδο 10 ημερών. Το επίπεδο υπολειμμάτων στους σκώληκες στο τέλος της φάσης αποβολής αναφέρεται ως δευτερεύον τελικό σημείο. Η περίοδος μπορεί, εντούτοις, να εξαρτάται από την περίοδο κατά την οποία η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στους σκώληκες παραμένει πάνω από το αναλυτικό όριο ανίχνευσης.

Οργανισμοί δοκιμής

Αριθμοί σκωλήκων δοκιμής

39. Ο αριθμός των σκωλήκων ανά δείγμα πρέπει να παρέχει μάζα ιστού σκωλήκων τέτοια ώστε η μάζα της υπό δοκιμή ουσίας ανά δείγμα στην αρχή της φάσης πρόσληψης και στο τέλος της φάσης αποβολής, αντίστοιχα, να είναι σημαντικά υψηλότερη από το όριο ανίχνευσης για την υπό δοκιμή ουσία στο βιολογικό υλικό. Στα αναφερόμενα στάδια πρόσληψης και αποβολής, η συγκέντρωση στα ζώα δοκιμής συνήθως είναι σχετικά χαμηλή (6)(8)(18). Επειδή το βάρος σώματος ανά άτομο σε πολλά είδη υδρόβιων ολιγοχαιτών είναι πολύ χαμηλό (5-10 mg υγρό βάρος ανά άτομο για το *Lumbriculus variegatus* και το *Tubifex tubifex*), οι σκώληκες ενός συγκεκριμένου θαλάμου δοκιμής επανάληψης μπορεί να συνενωθούν για τη μέτρηση του βάρους και την ανάλυση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Για τα είδη δοκιμής με μεγαλύτερο βάρος σώματος (π.χ. *Branchiura sowerbyi*) μπορούν να χρησιμοποιούνται επαναλήψεις οι οποίες περιέχουν ένα άτομο, αλλά σε αυτές τις περιπτώσεις ο αριθμός των επαναλήψεων θα πρέπει να αυξάνεται σε πέντε ανά σημείο δειγματοληψίας (11). Θα πρέπει, ωστόσο, να σημειωθεί ότι το *B. sowerbyi* δεν έχει συμπεριληφθεί στην κυκλική δοκιμή (12) και, επομένως, δεν συνιστάται ως προτιμώμενο είδος στη μέθοδο.

40. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σκώληκες παρόμοιου μεγέθους (για το *L. variegatus*, βλ. προσάρτημα 6). Θα πρέπει να προέρχονται από την ίδια πηγή και να είναι ενήλικα ή μεγάλα ζώα της ίδιας ηλικιακής κατηγορίας (βλ. προσάρτημα 6). Το βάρος και η ηλικία ενός ζώου μπορεί να έχουν σημαντική επίδραση στις τιμές BAF (π.χ. λόγω διαφορετικού λιπιδικού περιεχομένου ή/και της παρουσίας αυγών) και αυτές οι παράμετροι θα πρέπει να καταγράφονται με ακρίβεια. Για τη μέτρηση του μέσου υγρού και ξηρού βάρους, ένα επιμέρους δείγμα των σκωλήκων θα πρέπει να ζυγίζεται πριν από την έναρξη της δοκιμής.

▼M6

41. Με τα είδη *Tubifex tubifex* και *Lumbriculus variegatus*, αναμένεται αναπαραγωγή κατά τη διάρκεια της περιόδου δοκιμής. Η απουσία αναπαραγωγής σε δοκιμή βιοσυσσώρευσης θα πρέπει να καταγράφεται και να λαμβάνεται υπόψη κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμής.

Πλήρωση

42. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υψηλές αναλογίες ιζήματος προς σκώληκες και νερού προς σκώληκες, προκειμένου να ελαχιστοποιείται η μείωση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στο ίζημα κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης και να αποφεύγονται μειώσεις στη συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου. Επίσης, ο επιλεγμένος ρυθμός πλήρωσης θα πρέπει να αντιστοιχεί στις φυσικές πυκνότητες πληθυσμών των επιλεγμένων ειδών (43). Για παράδειγμα, για το *Tubifex tubifex* συνιστάται ρυθμός πλήρωσης της τάξεως του 1-4 mg ιστού σκώληκα (υγρό βάρος) ανά γραμμάριο υγρού ιζήματος (8)(11). Στις παραπομπές (1) και (6) συνιστάται ρυθμός πλήρωσης ≤ 1 g ξηρού βάρους ιστού σκώληκα ανά 50 g οργανικού άνθρακα ιζήματος για το *L. variegatus*.

43. Οι σκώληκες που θα χρησιμοποιηθούν σε μια δοκιμή απομακρύνονται από την καλλιέργεια με κοσκίνισμα του ιζήματος της καλλιέργειας. Τα ζώα (ενήλικες ή μεγάλοι σκώληκες χωρίς σημάδια πρόσφατης κατάτμησης) μεταφέρονται σε γυάλινα τρυβλία (π.χ. τρυβλία Petri) που περιέχουν καθαρό νερό. Εάν οι συνθήκες δοκιμής διαφέρουν από τις συνθήκες καλλιέργειας, μια φάση εγκλιματισμού διάρκειας 24 ωρών θα πρέπει να είναι επαρκής. Πριν από τη ζύγιση, θα πρέπει να απομακρύνεται η περίσσεια νερού από τους σκώληκες με απαλή τοποθέτηση των σκωλήκων σε χαρτί που έχει προηγουμένως υγρανθεί. Δεν συνιστάται η χρήση απορροφητικού χαρτιού για να στεγνωθούν οι σκώληκες, καθώς αυτό μπορεί να προκαλέσει πίεση ή ζημιά στους σκώληκες. Οι Brunson κ.α. (1998) συνιστούν τη χρήση σκωλήκων που δεν έχουν στεγνωθεί με απορροφητικό χαρτί με βιομάζα μεγαλύτερη κατά περίπου 1,33 φορές από τη βιομάζα-στόχο. Αυτό το επιπλέον 33 % αντιστοιχεί στη διαφορά μεταξύ των σκωλήκων που έχουν στεγνωθεί με απορροφητικό χαρτί και των σκωλήκων που δεν έχουν στεγνωθεί με απορροφητικό χαρτί (28).

44. Κατά την έναρξη της φάσης πρόσληψης (ημέρα 0 της δοκιμής), οι οργανισμοί δοκιμής απομακρύνονται από τον θάλαμο εγκλιματισμού και κατανέμονται τυχαία σε δοχεία (π.χ. τρυβλία Petri) που περιέχουν ανασυσταθέν νερό με την προσθήκη ομάδων δύο σκωλήκων σε κάθε δοχείο, μέχρι κάθε δοχείο να περιέχει δέκα σκώληκες. Στη συνέχεια, κάθε μία από αυτές τις ομάδες σκωλήκων μεταφέρεται τυχαία σε ξεχωριστά δοχεία δοκιμής, π.χ. με χρήση μαλακής χαλύβδινης λαβίδας. Τα δοχεία δοκιμής, κατόπιν, επωάζονται υπό τις συνθήκες της δοκιμής.

Σίτιση

45. Εξαιτίας της χαμηλής περιεκτικότητας σε θρεπτικά συστατικά του τεχνητού ιζήματος, το ίζημα θα πρέπει να τροποποιείται με μια πηγή τροφής. Προκειμένου να μην υποεκτιμάται η έκθεση των οργανισμών δοκιμής, π.χ. με την επιλεκτική σίτιση μη μολυσμένων τροφών, η τροφή που απαιτείται για την αναπαραγωγή και ανάπτυξη των οργανισμών δοκιμής θα πρέπει να προστίθεται στο ίζημα μία φορά πριν ή κατά τη διάρκεια της χορήγησης της υπό δοκιμή ουσίας (βλ. προσάρτημα 5).

Αναλογία ιζήματος-νερού

46. Η συνιστώμενη αναλογία ιζήματος-νερού είναι 1:4 (45). Η αναλογία αυτή θεωρείται κατάλληλη για τη διατήρηση των συγκεντρώσεων οξυγόνου σε κατάλληλα επίπεδα και την αποφυγή συσσώρευσης αμμωνίας στο υπερκείμενο νερό. Η περιεκτικότητα σε οξυγόνο του υπερκείμενου νερού θα πρέπει να διατηρείται σε τιμή ≥ 40 % της τιμής κορεσμού. Το υπερκείμενο νερό των δοχείων δοκιμής θα πρέπει να αερίζεται ήπια (π.χ. 2-4 φυσαλίδες το δευτερόλεπτο) μέσω σιφωνίου Pasteur, το οποίο τοποθετείται περίπου 2 cm πάνω από την επιφάνεια του ιζήματος για την ελαχιστοποίηση της διαταραχής του ιζήματος

▼M6

Φως και θερμοκρασία

47. Η φωτοπερίοδος στην καλλιέργεια και στη δοκιμή είναι 16 ώρες (1)(6). Η ένταση φωτός στην περιοχή δοκιμής θα πρέπει να διατηρείται στα 500-1 000 lx περίπου. Η θερμοκρασία θα πρέπει να είναι 20 ± 2 °C καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής.

Συγκεντρώσεις δοκιμής

48. Για τον προσδιορισμό της κινητικής πρόσληψης, χρησιμοποιείται μία συγκέντρωση δοκιμής (όσο το δυνατόν χαμηλότερη), ωστόσο μπορεί να χρησιμοποιηθεί και μια δεύτερη (υψηλότερη) συγκέντρωση (π.χ. (46)). Σε αυτήν την περίπτωση, λαμβάνονται δείγματα τα οποία αναλύονται σε σταθερή κατάσταση ή μετά από 28 ημέρες για να επιβεβαιωθεί ο BAF που μετρήθηκε στη χαμηλότερη συγκέντρωση (11). Η υψηλότερη συγκέντρωση θα πρέπει να επιλέγεται προκειμένου να αποκλείονται οι δυσμενείς επιδράσεις (π.χ. με επιλογή του 1 % περίπου της χαμηλότερης γνωστής χρόνιας συγκέντρωσης επίδρασης EC_x όπως προκύπτει από τις σχετικές μελέτες χρόνιας τοξικότητας). Η χαμηλότερη συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να είναι σημαντικά υψηλότερη από το όριο ανίχνευσης στο ίζημα και στα βιολογικά δείγματα με τη χρησιμοποιούμενη αναλυτική μέθοδο. Εάν η συγκέντρωση επίδρασης της υπό δοκιμή ουσίας προσεγγίζει το αναλυτικό όριο ανίχνευσης, συνιστάται η χρήση ραδιοσημασμένης υπό δοκιμή ουσίας με υψηλή ειδική ραδιενέργεια.

Επαναλήψεις της αγωγής και του μάρτυρα

49. Ο ελάχιστος αριθμός των επαναλήψεων της αγωγής για τις μετρήσεις κινητικής θα πρέπει να είναι τρεις ανά σημείο δειγματοληψίας (11) καθ' όλη τη φάση πρόσληψης και αποβολής. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσθετες επαναλήψεις, π.χ. για προαιρετικές πρόσθετες ημερομηνίες δειγματοληψίας. Για τη φάση αποβολής, προετοιμάζεται αντίστοιχος αριθμός επαναλήψεων με μη εμβολιασμένο ίζημα και υπερκείμενο νερό, για να είναι δυνατή η μεταφορά των σκωλήκων που έχουν υποβληθεί σε αγωγή από τα καθορισμένα δοχεία αγωγής στα δοχεία χωρίς αγωγή στο τέλος της φάσης πρόσληψης. Ο συνολικός αριθμός των επαναλήψεων της αγωγής θα πρέπει να είναι επαρκής για τη φάση πρόσληψης και τη φάση αποβολής.

50. Εναλλακτικά, οι σκώληκες που προορίζονται για δειγματοληψία κατά τη φάση αποβολής μπορούν να υποβάλλονται σε έκθεση μέσα σε έναν μεγάλο περιέκτη που περιέχει εμβολιασμένο ίζημα της ίδιας παρτίδας με αυτήν που χρησιμοποιείται για την κινητική πρόσληψης. Θα πρέπει να αποδεικνύεται ότι οι συνθήκες δοκιμής (π.χ. βάθος ιζήματος, αναλογία ιζήματος-νερού, πλήρωση, θερμοκρασία, ποιότητα νερού) είναι συγκρίσιμες με τις επαναλήψεις που προορίζονται για τη φάση πρόσληψης. Στο τέλος της φάσης πρόσληψης, θα πρέπει να λαμβάνονται από αυτόν τον περιέκτη δείγματα νερού, ιζήματος και σκωλήκων για ανάλυση, και ένας επαρκής αριθμός μεγάλων σκωλήκων που δεν εμφανίζουν σημάδια πρόσφατης κατάτμησης θα πρέπει να απομακρύνεται προσεκτικά και να μεταφέρεται στα δοχεία επανάληψης που έχουν προετοιμαστεί για τη φάση αποβολής (π.χ. δέκα οργανισμοί ανά δοχείο επανάληψης).

51. Εάν δεν χρησιμοποιείται άλλος διαλύτης πλην του νερού, θα πρέπει να προβλέπονται τουλάχιστον 9 δοχεία επανάληψης αρνητικού μάρτυρα (δειγματοληψία από τουλάχιστον 3 από τα δοχεία αυτά κατά την έναρξη της δοκιμής, από 3 στο τέλος της φάσης πρόσληψης και από 3 στο τέλος της φάσης αποβολής) για βιολογική ανάλυση και ανάλυση υποβάθρου. Εάν χρησιμοποιείται μέσο διαλυτοποίησης για την εφαρμογή της υπό δοκιμή ουσίας, θα πρέπει να εκτελούνται μετρήσεις σε μάρτυρα με διαλύτη (θα πρέπει να λαμβάνονται δείγματα από τουλάχιστον 3 δοχεία επανάληψης κατά την έναρξη της δοκιμής, από 3 στο τέλος της φάσης πρόσληψης και από 3 κατά το τέλος της φάσης αποβολής). Στην περίπτωση αυτή, θα πρέπει να προβλέπονται τουλάχιστον 4 δοχεία επανάληψης ενός αρνητικού μάρτυρα (χωρίς διαλύτη) για δειγματοληψία στο τέλος της φάσης πρόσληψης. Οι εν λόγω επαναλήψεις μπορούν να συγκρίνονται από βιολογικής πλευράς με τον μάρτυρα με διαλύτη ώστε να συγκεντρώνονται πληροφορίες σχετικά με την ενδεχόμενη επίδραση του διαλύτη στους οργανισμούς δοκιμής. Λεπτομέρειες δίδονται στο προσάρτημα 3.

▼M6

Συχνότητα λήψης μετρήσεων της ποιότητας του νερού

52. Θα πρέπει να μετρώνται τουλάχιστον οι ακόλουθες παράμετροι ποιότητας νερού στο υπερκείμενο νερό κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης και αποβολής:

Θερμοκρασία	σε ένα δοχείο κάθε επιπέδου αγωγής ανά ημερομηνία δειγματοληψίας και σε ένα δοχείο μάρτυρα μία φορά την εβδομάδα στην αρχή και στο τέλος της περιόδου πρόσληψης και αποβολής. Μπορεί επίσης να καταγράφεται η θερμοκρασία στο περιβάλλον μέσο (αέρας περιβάλλοντος ή υδατόλουτρο) ή σε ένα αντιπροσωπευτικό δοχείο δοκιμής π.χ. σε συνεχή βάση ή σε ωριαία διαστήματα,
Περιεκτικότητα σε διαλυμένο οξυγόνο	σε ένα δοχείο κάθε επιπέδου αγωγής και σε ένα δοχείο μάρτυρα ανά ημερομηνία δειγματοληψίας, εκφραζόμενη ως mg/L και % ASV (τιμή κορεσμού με αέρα),
Παροχή αέρα	ελέγχεται τουλάχιστον μία φορά την ημέρα (εργάσιμες ημέρες) και ρυθμίζεται, εάν απαιτείται,
pH	σε ένα δοχείο αγωγής κάθε επιπέδου αγωγής ανά ημερομηνία δειγματοληψίας και σε ένα δοχείο μάρτυρα μία φορά την εβδομάδα και στην αρχή και στο τέλος της περιόδου πρόσληψης και αποβολής,
Συνολική σκληρότητα νερού	τουλάχιστον σε ένα δοχείο αγωγής και σε ένα δοχείο δοκιμής μάρτυρα στην αρχή και στο τέλος της περιόδου πρόσληψης και αποβολής, εκφραζόμενη ως mg/l $CaCO_3$,
Συνολική περιεκτικότητα σε αμμωνία	τουλάχιστον σε ένα δοχείο αγωγής και σε ένα δοχείο δοκιμής μάρτυρα στην αρχή και στο τέλος της περιόδου πρόσληψης και αποβολής, εκφραζόμενη ως mg/l NH_4^+ ή NH_3 ή συνολικό αμμωνιακό N.

Δειγματοληψία και ανάλυση σκωλήκων, ιζήματος και νερού

Πρόγραμμα δειγματοληψίας

53. Παραδείγματα προγραμμάτων δειγματοληψίας για μια 28ήμερη φάση πρόσληψης και μια 10ήμερη φάση αποβολής παρατίθενται στο προσάρτημα 3.

54. Από τους θαλάμους δοκιμής λαμβάνονται δείγματα νερού και ιζήματος για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας, πριν από την εισαγωγή των σκωλήκων, καθώς και κατά τη διάρκεια των φάσεων πρόσληψης και αποβολής. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας στους σκώληκες, στο ίζημα και στο νερό για την παρακολούθηση της κατανομής της υπό δοκιμή ουσίας στα διαμερίσματα του συστήματος δοκιμής.

55. Από τους σκώληκες, το ίζημα και το νερό λαμβάνονται δείγματα τουλάχιστον έξι φορές κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης, καθώς και της φάσης αποβολής.

56. Η δειγματοληψία συνεχίζεται μέχρι την επίτευξη φάσης οριζοντίωσης (σταθερή κατάσταση) (βλ. προσάρτημα 1) ή για 28 ημέρες. Εάν δεν έχει επιτευχθεί οριζοντίωση εντός 28 ημερών, ξεκινάει η φάση αποβολής. Κατά την έναρξη της φάσης αποβολής, οι καθορισμένοι σκώληκες μεταφέρονται σε θαλάμους επανάληψης που περιέχουν ίζημα χωρίς αγωγή καθώς και νερό (βλ. επίσης παραγράφους 17 και 18).

Δειγματοληψία και παρασκευή δείγματος

57. Λαμβάνονται δείγματα νερού με μετάγγιση, σιφωνισμό ή με λήψη μέσω σιφωνίου ενός όγκου που επαρκεί για τη μέτρηση της ποιότητας της υπό δοκιμή ουσίας στο δείγμα.

58. Το εναπομένον υπερκείμενο νερό μεταφέρεται προσεκτικά με μετάγγιση ή σιφωνισμό από τους θαλάμους δοκιμής. Τα δείγματα ιζήματος θα πρέπει να λαμβάνονται προσεκτικά, ώστε να προκαλείται ελάχιστη διαταραχή των σκωλήκων.

▼M6

59. Όλοι οι σκώληκες απομακρύνονται από το δοχείο επανάληψης της δοκιμής στο χρόνο δειγματοληψίας, π.χ. σχηματίζοντας εναιώρημα του ιζήματος με υπερκείμενο νερό, απλώνοντας τα περιεχόμενα κάθε δοχείου επανάληψης σε έναν ρηχό δίσκο και συλλέγοντας τους σκώληκες με τη βοήθεια μαλακής χαλύβδινης λαβίδας. Εκπλένονται γρήγορα με νερό σε ρηχό γυάλινο ή χαλύβδινο δίσκο. Απομακρύνεται η περίσσεια νερού. Οι σκώληκες μεταφέρονται με προσοχή σε προζυγισμένο δοχείο και ζυγίζονται. Οι σκώληκες θανατώνονται με κατάψυξη (π.χ. ≤ – 18 °C). Θα πρέπει να καταγράφεται η παρουσία και ο αριθμός κουκουλιών ή/και νεαρών ατόμων.

60. Σε γενικές γραμμές, οι σκώληκες θα πρέπει να ζυγίζονται και να θανατώνονται αμέσως μετά τη δειγματοληψία χωρίς φάση κένωσης του εντέρου για τη λήψη ενός συντηρητικού BAF που περιλαμβάνει το μολυσμένο περιεχόμενο του εντέρου και για την αποφυγή κάθε απώλειας σωματικών υπολειμμάτων κατά τη διάρκεια οποιασδήποτε περιόδου κένωσης του εντέρου μόνο σε νερό (8). Ουσίες με log K_{ow} μεγαλύτερο από 5 δεν αναμένεται να αποβάλλονται σημαντικά κατά τη διάρκεια οποιασδήποτε περιόδου κένωσης του εντέρου μόνο σε νερό, ενώ οι ουσίες με log Kow μικρότερο από 4 μπορεί να χάνονται σε σημαντικές ποσότητες (47).

61. Κατά τη φάση αποβολής, οι σκώληκες κενώνουν το έντερό τους σε καθαρό ίζημα. Αυτό συνεπάγεται ότι οι μετρήσεις αμέσως πριν από τη φάση αποβολής περιλαμβάνουν το μολυσμένο ίζημα από το έντερο, ενώ μετά τις πρώτες 4 έως 24 ώρες της φάσης αποβολής, θεωρείται ότι το μεγαλύτερο μέρος του μολυσμένου περιεχομένου του εντέρου έχει αντικατασταθεί από καθαρό ίζημα (11)(47). Η συγκέντρωση των σκωλήκων σε αυτό το δείγμα μπορεί τότε να θεωρείται ως η συγκέντρωση στον ιστό μετά την κένωση του εντέρου. Για να λαμβάνεται υπόψη η αραίωση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας από μη μολυσμένο ίζημα κατά τη φάση αποβολής, το βάρος του περιεχομένου του εντέρου μπορεί να υπολογίζεται από τον λόγο υγρού βάρους/βάρος της τέφρας του σκώληκα ή από τον λόγο ξηρού βάρους/βάρος της τέφρας του σκώληκα.

62. Εάν ο σκοπός μιας συγκεκριμένης μελέτης είναι η μέτρηση της βιοδιαθεσιμότητας και των πραγματικών υπολειμμάτων ιστού στους οργανισμούς δοκιμής, τουλάχιστον ένα επιμέρους δείγμα των ζώων που έχουν υποβληθεί σε αγωγή (π.χ. από τρία επιπλέον δοχεία επανάληψης), το οποίο λαμβάνεται κατά προτίμηση σε σταθερή κατάσταση, θα πρέπει να ζυγίζεται, να κενώνεται σε καθαρό νερό για περίοδο 6 ωρών (47) και να ζυγίζεται ξανά πριν από την ανάλυση. Στη συνέχεια, τα δεδομένα που αφορούν το βάρος και τη συγκέντρωση στο σώμα των σκωλήκων από αυτό το επιμέρους δείγμα μπορούν να συγκρίνονται με τις τιμές που λαμβάνονται από σκώληκες που δεν έχουν υποβληθεί σε κένωση. Δεν θα πρέπει να γίνεται κένωση στους σκώληκες που προορίζονται για τη μέτρηση της αποβολής προτού μεταφερθούν σε καθαρό ίζημα για την ελαχιστοποίηση πρόσθετης πίεσης για τα ζώα.

63. Τα δείγματα νερού, ιζήματος και σκωλήκων πρέπει να αναλύονται κατά προτίμηση αμέσως (δηλ. εντός 1-2 ημερών) μετά την αφαίρεση, προκειμένου να αποφεύγονται η αποικοδόμηση ή άλλες απώλειες και για τον υπολογισμό των κατά προσέγγιση ταχυτήτων πρόσληψης και αποβολής κατά την πορεία της δοκιμής. Με την άμεση ανάλυση αποφεύγονται επίσης καθυστερήσεις στον προσδιορισμό του χρόνου επίτευξης οριζοντίωσης.

64. Εάν δεν είναι δυνατή η άμεση ανάλυση, τα δείγματα θα πρέπει να φυλάσσονται υπό κατάλληλες συνθήκες. Πρέπει να λαμβάνονται πληροφορίες για τη σταθερότητα και τις κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης για τη συγκεκριμένη υπό δοκιμή ουσία πριν από την έναρξη της δοκιμής (π.χ. διάρκεια και θερμοκρασία αποθήκευσης, διαδικασίες εκχύλισης κ.λπ.). Εάν οι εν λόγω πληροφορίες δεν είναι διαθέσιμες και κρίνεται ότι είναι απαραίτητες, μπορούν να αναλύονται ταυτόχρονα εμβολιασμένοι ιστοί-μάρτυρες για να προσδιορίζεται η σταθερότητα της αποθήκευσης.

Ποιότητα της αναλυτικής μεθόδου

65. Επειδή η όλη διαδικασία εξαρτάται βασικά από την ακρίβεια (accuracy), την πιστότητα (precision) και την ευαισθησία της αναλυτικής μεθόδου που χρησιμοποιείται για την υπό δοκιμή ουσία, πρέπει να ελέγχεται πειραματικά αν η ακρίβεια και η αναπαραγωγιμότητα της χημικής ανάλυσης, καθώς επίσης

▼M6

και η ανάκτηση της υπό δοκιμή ουσίας από τα δείγματα νερού, ιζήματος και σκωλήκων είναι ικανοποιητικές για τη συγκεκριμένη μέθοδο. Ομοίως, πρέπει να εξακριβώνεται ότι η υπό δοκιμή ουσία δεν είναι ανιχνεύσιμη στους θαλάμους-μάρτυρες σε συγκεντρώσεις που υπερβαίνουν τη συγκέντρωση υποβάθρου. Εάν απαιτείται, διορθώνονται οι τιμές C_w, C_s και C_a για τις ανακτήσεις και τις τιμές υποβάθρου των μαρτύρων. Ο χειρισμός όλων των δειγμάτων καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής γίνεται με τρόπο ώστε να ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος μόλυνσης και απωλειών (π.χ. λόγω προσρόφησης της υπό δοκιμή ουσίας στη συσκευή δειγματοληψίας).

66. Θα πρέπει να καταγράφονται και να αναφέρονται η συνολική ανάκτηση και η ανάκτηση της υπό δοκιμή ουσίας στους σκώληκες, το ίζημα και το νερό και, εφόσον έχουν χρησιμοποιηθεί, στις παγίδες που περιέχουν απορροφητικά υλικά για τη συγκράτηση υπό δοκιμή ουσιών οι οποίες εξατμίζονται.

67. Επειδή συνιστάται η χρήση ραδιοσημασμένων ουσιών, είναι δυνατή η ανάλυση για τη συνολική ραδιενέργεια (δηλ. μητρική ουσία και προϊόντα αποικοδόμησης). Ωστόσο, εάν είναι εφικτό από αναλυτικής απόψεως, ο ποσοτικός προσδιορισμός της μητρικής ουσίας και των προϊόντων αποικοδόμησης σε σταθερή κατάσταση ή στο τέλος της φάσης πρόσληψης μπορεί να παρέχει σημαντικές πληροφορίες. Εάν πρόκειται να πραγματοποιηθούν οι εν λόγω μετρήσεις, τα δείγματα θα πρέπει στη συνέχεια να υποβάλλονται σε κατάλληλες διαδικασίες εκχύλισης για τον ξεχωριστό ποσοτικό προσδιορισμό της μητρικής ουσίας. Όταν ένα προϊόν αποικοδόμησης που ανιχνεύεται αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό ποσοστό (π.χ. >10 %) της μετρηθείσας ραδιενέργειας στους οργανισμούς δοκιμής σε σταθερή κατάσταση ή στο τέλος της φάσης πρόσληψης, συνιστάται η αναγνώριση των εν λόγω προϊόντων αποικοδόμησης (5).

68. Λόγω της χαμηλής ατομικής βιομάζας, συχνά δεν είναι δυνατός ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας σε κάθε ξεχωριστό σκώληκα, εκτός εάν το είδος δοκιμής που χρησιμοποιείται είναι το Branchiura sowerbyi (40-50 mg υγρό βάρος ανά σκώληκα) (11). Επομένως, η συνένωση των ατόμων που λαμβάνονται ως δείγματα από ένα συγκεκριμένο δοχείο δοκιμής είναι αποδεκτή, αλλά περιορίζει τις στατιστικές διαδικασίες που μπορούν να εφαρμοστούν στα δεδομένα. Εάν μια συγκεκριμένη στατιστική διαδικασία και ισχύς αποτελούν σημαντικούς παράγοντες, θα πρέπει να χρησιμοποιείται στη δοκιμή ο κατάλληλος αριθμός ζώων δοκιμής ή/και θαλάμων δοκιμής επανάληψης που συνάδει με την επιθυμητή συνένωση, διαδικασία και ισχύ.

69. Συνιστάται να εκφράζεται ο BAF ως συνάρτηση του συνολικού υγρού βάρους, του συνολικού ξηρού βάρους και, όταν απαιτείται (π.χ. για εξαιρετικά λιπόφιλες ουσίες), ως συνάρτηση του λιπιδικού περιεχομένου και της TOC του ιζήματος. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες μέθοδοι για τον προσδιορισμό του λιπιδικού περιεχομένου (48)(49). Η τεχνική της εκχύλισης με χλωροφόρμιο/μεθανόλη (50) μπορεί να χρησιμοποιείται ως πρότυπη μέθοδος (48). Ωστόσο, για να αποφεύγεται η χρήση χλωριωμένων διαλυτών, μπορεί να χρησιμοποιείται μια υποβληθείσα σε κυκλική δοκιμή τροποποίηση της μεθόδου Bligh και Dyer (50) όπως περιγράφεται στο σημείο (51). Δεδομένου ότι οι διάφορες μέθοδοι δεν αποδίδουν ταυτόσημα αποτελέσματα (48), έχει σημασία να αναφέρονται λεπτομερή στοιχεία για τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο. Όταν είναι δυνατόν, δηλαδή εάν είναι διαθέσιμος επαρκής ιστός σκωλήκων, το λιπιδικό περιεχόμενο μετράται στο ίδιο δείγμα ή εκχύλισμα με εκείνο που χρησιμοποιείται για την ανάλυση της υπό δοκιμή ουσίας, δεδομένου ότι τα λιπίδια πρέπει συχνά να απομακρύνονται από το εκχύλισμα ώστε να είναι δυνατή η χρωματογραφική ανάλυσή του (5). Ωστόσο, είναι πρακτικό να χρησιμοποιούνται εγκλιματισμένα ζώα-μάρτυρες, τουλάχιστον στην αρχή ή -κατά προτίμηση- στο τέλος της φάσης πρόσληψης για τη μέτρηση του λιπιδικού περιεχομένου, π.χ. σε τρία δείγματα.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

70. Η καμπύλη πρόσληψης της υπό δοκιμή ουσίας λαμβάνεται με γραφική παράσταση, σε αριθμητική κλίμακα, της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια των σκωλήκων κατά τη διάρκεια της

▼M6

φάσης πρόσληψης συναρτήσει του χρόνου. Εάν η καμπύλη εμφανίζει οριζοντίωση, υπολογίζεται η σταθερή κατάσταση BAF_{ss}:

$$\frac{C_a \text{σε σταθερή κατάσταση ή την ημέρα 28 (μέση τιμή)}}{C_S \text{σε σταθερή κατάσταση ή την ημέρα 28 (μέση τιμή)}}$$

71. Προσδιορίζεται ο συντελεστής κινητικής βιοσυσσώρευσης (BAFK) ως λόγος ks/ke. Η σταθερά αποβολής (ke) προσδιορίζεται συνήθως από την καμπύλη αποβολής (δηλαδή τη γραφική παράσταση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στους σκώληκες κατά τη φάση αποβολής). Στη συνέχεια, υπολογίζεται η σταθερά ταχύτητας πρόσληψης ks από την κινητική της καμπύλης πρόσληψης. Η μέθοδος που προτιμάται για τη λήψη του BAFK και των σταθερών ταχύτητας ks και ke είναι η χρήση μεθόδων εκτίμησης μη γραμμικών παραμέτρων σε υπολογιστή (βλ. προσάρτημα 2). Εάν είναι προφανές ότι η αποβολή δεν είναι πρώτης τάξης, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πιο περίπλοκα μοντέλα (25)(27)(52).

72. Ο συντελεστής συσσώρευσης σε βιόκοσμο-ίζημα (BSAF) προσδιορίζεται με την κανονικοποίηση του BAFK για το λιπιδικό περιεχόμενο των σκωλήκων και την περιεκτικότητα σε ολικό οργανικό άνθρακα του ιζήματος.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

73. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή αν οι μετρούμενες συγκεντρώσεις των συγκεντρώσεων δοκιμής βρίσκονται σε επίπεδα κοντά στο όριο ανίχνευσης της χρησιμοποιούμενης αναλυτικής μεθόδου.

74. Εάν οι καμπύλες πρόσληψης και αποβολής είναι σαφώς οριοθετημένες, αυτό αποτελεί ένδειξη δεδομένων βιοσυσσώρευσης καλής ποιότητας. Σε γενικές γραμμές, τα όρια εμπιστοσύνης για τις τιμές BAF από καλά σχεδιασμένες μελέτες δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν το 25 % (5).

Έκθεση δοκιμής

75. Η έκθεση της δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Υπό δοκιμή ουσία

— φυσική κατάσταση και φυσικοχημικές ιδιότητες, π.χ. log K_{ow}, υδατοδιαλυτότητα,

— στοιχεία ταυτότητας της χημικής ουσίας, πηγή της υπό δοκιμή ουσίας, ταυτότητα και συγκέντρωση του διαλύτη που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκε,

— εάν είναι ραδιοεπισημασμένη, ακριβής θέση των σημασμένων ατόμων, ειδική ραδιενέργεια και ποσοστό της ραδιενέργειας που συνδέεται με ξένες προσμείξεις.

Είδη δοκιμής

— επιστημονική ονομασία, στέλεχος, πηγή, τυχόν προηγηθείσα αγωγή, εγκλιματισμός, ηλικία, εύρος μεγεθών κ.λπ.

Συνθήκες δοκιμής

— εφαρμοζόμενη διαδικασία δοκιμής (π.χ. στατική, ημιστατική ή συνεχούς ροής νερού),

— τύπος και χαρακτηριστικά του χρησιμοποιηθέντος φωτισμού και φωτοπερίοδος(-οι),

— σχεδιασμός δοκιμής (π.χ. αριθμός, υλικό και μέγεθος θαλάμων δοκιμής, όγκος νερού, μάζα και όγκος ιζήματος, ρυθμός αντικατάστασης του όγκου νερού (για διαδικασίες συνεχούς ροής νερού ή ημιστατικές διαδικασίες), κάθε αερισμός που χρησιμοποιείται πριν και κατά τη διάρκεια της δοκιμής, αριθμός των επαναλήψεων, αριθμός των σκωλήκων ανά επανάληψη, αριθμός των συγκεντρώσεων δοκιμής, διάρκεια φάσεων πρόσληψης και αποβολής, συχνότητα δειγματοληψίας),

▼M6

— μέθοδος παρασκευής και εφαρμογής της υπό δοκιμή ουσίας, καθώς και αιτιολόγηση της επιλογής μιας συγκεκριμένης μεθόδου,

— ονομαστικές συγκεντρώσεις δοκιμής,

— πηγή των συστατικών του τεχνητού νερού και ιζήματος ή -εάν χρησιμοποιούνται φυσικά μέσα- προέλευση του νερού και του ιζήματος, περιγραφή τυχόν προηγηθείσας αγωγής, αποτελέσματα οποιασδήποτε αποδεικτικής διαδικασίας της ικανότητας των ζώων δοκιμής να ζουν ή/και να αναπαράγονται στο χρησιμοποιούμενο μέσο, χαρακτηριστικά ιζήματος (pH και αμμωνία του ενδοπορικού νερού (φυσικά ιζήματα), περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (TOC), κατανομή μεγέθους σωματιδίων (ποσοστό άμμου, ιλύος και αργίλου), ποσοστό υγρασίας και οποιεσδήποτε άλλες πραγματοποιηθείσες μετρήσεις) και χαρακτηριστικά νερού (pH, σκληρότητα, αγωγιμότητα, θερμοκρασία, συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου, επίπεδα υπολειμμάτων χλωρίου (εφόσον μετρώνται) και οποιεσδήποτε άλλες πραγματοποιηθείσες μετρήσεις),

— ονομαστικό και μετρηθέν ξηρό βάρος σε % του υγρού βάρους (ή αναλογία ξηρού προς υγρό βάρος) του τεχνητού ιζήματος, μετρηθέν ξηρό βάρος σε % του υγρού βάρους (ή αναλογία ξηρού προς υγρό βάρος) για ιζήματα υπαίθρου,

— ποιότητα νερού εντός των θαλάμων δοκιμής όπως χαρακτηρίζεται από τη θερμοκρασία, το pH, το αμμώνιο, τη συνολική σκληρότητα και τη συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου,

— λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με την κατεργασία των δειγμάτων νερού, ιζήματος και σκωλήκων, μεταξύ των οποίων λεπτομέρειες για την παρασκευή, την αποθήκευση, τις διαδικασίες εμβολιασμού, την εκχύλιση και τις αναλυτικές διαδικασίες (και ακρίβεια) για την υπό δοκιμή ουσία, καθώς και λιπιδικό περιεχόμενο και ανακτήσεις της υπό δοκιμή ουσίας.

Αποτελέσματα

— θνησιμότητα των σκωλήκων-μαρτύρων και των σκωλήκων σε κάθε θάλαμο δοκιμής και τυχόν παρατηρηθείσα υποθανατηφόρος επίδραση περιλαμβανομένης της μη φυσιολογικής συμπεριφοράς (π.χ. αποφυγή του ιζήματος, παρουσία ή απουσία σφαιριδίων κοπράνων, απουσία αναπαραγωγής),

— μετρηθέν ξηρό βάρος σε % του υγρού βάρους (ή αναλογία ξηρού προς υγρό βάρος) του ιζήματος και των οργανισμών δοκιμής (χρήσιμο για κανονικοποίηση),

— λιπιδικό περιεχόμενο των σκωλήκων,

— καμπύλες στις οποίες εμφανίζεται η κινητική πρόσληψης και αποβολής της υπό δοκιμή ουσίας στους σκώληκες, καθώς και χρόνος μέχρι τη σταθερή κατάσταση,

— τιμές C_a, C_s και C_w (με τυπική απόκλιση και εύρος, κατά περίπτωση) για όλους τους χρόνους δειγματοληψίας (η C_a εκφράζεται σε g kg^{-1} υγρού και ξηρού βάρους ολόκληρου του σώματος, ενώ η C_s εκφράζεται σε g kg^{-1} υγρού και ξηρού βάρους ιζήματος και η C_w σε mg l^{-1}). Εάν απαιτείται ο συντελεστής συσσώρευσης σε βιόκοσμο-ίζημα (BSAF, για τον ορισμό, βλ. προσάρτημα 1) (π.χ. για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων δύο ή περισσότερων δοκιμών που έχουν διεξαχθεί σε ζώα με διαφορετικό λιπιδικό περιεχόμενο), η C_a θα πρέπει επιπλέον να εκφράζεται σε g kg^{-1} λιπιδικού περιεχομένου του οργανισμού και η C_s σε g kg^{-1} οργανικού άνθρακα (OC) του ιζήματος,

— BAF (εκφραζόμενος σε kg υγρού ιζήματος kg^{-1} υγρού σκώληκα), σταθερά ταχύτητας πρόσληψης ιζήματος k_s (εκφραζόμενη σε g υγρού ιζήματος kg^{-1} υγρού σκώληκα ημέρα^{-1}) και σταθερά ταχύτητας αποβολής k_e (εκφραζόμενη σε ημέρα^{-1}). Επιπροσθέτως, μπορεί να αναφέρεται ο BSAF (εκφραζόμενος σε kg ιζήματος OC kg^{-1} λιπιδική περιεκτικότητα σκώληκα),

▼**M6**

— μη αποβληθέντα υπολείμματα (NER) στο τέλος της φάσης αποβολής,

— εφόσον μετρώνται: εκατοστιαίες αναλογίες της μητρικής ουσίας, των προϊόντων αποικοδόμησης και των δεσμευμένων υπολειμμάτων (δηλ. το ποσοστό της υπό δοκιμή ουσίας που δεν είναι δυνατόν να εκχυλιστεί με τις κοινές μεθόδους εκχύλισης) που ανιχνεύονται στα ζώα δοκιμής,

— μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τις στατιστικές αναλύσεις των δεδομένων.

Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

— συμμόρφωση των αποτελεσμάτων με τα κριτήρια εγκυρότητας που αναφέρονται στην παράγραφο 21,

— μη αναμενόμενα ή ασυνήθη αποτελέσματα, π.χ. ατελής αποβολή της υπό δοκιμή ουσίας από τα ζώα δοκιμής. Σε αυτές τις περιπτώσεις, χρήσιμες πληροφορίες μπορούν να προκύψουν από τα αποτελέσματα οποιασδήποτε προκαταρκτικής μελέτης.

▼M6

Προσάρτημα 1

Ορισμοί και μονάδες

Η **αποβολή** μιας υπό δοκιμή ουσίας είναι η απώλεια της ουσίας αυτής από τον ιστό του οργανισμού δοκιμής μέσω ενεργών ή παθητικών διαδικασιών που συντελούνται ανεξάρτητα από την παρουσία ή απουσία της υπό δοκιμή ουσίας στο περιβάλλον μέσο.

Βιομεγέθυνση είναι η αύξηση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια ενός οργανισμού, η οποία οφείλεται κυρίως στην πρόσληψη από μολυσμένη τροφή ή λεία, σε σχέση με τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στην τροφή ή τη λεία. Η βιομεγέθυνση μπορεί να οδηγήσει σε μεταφορά ή συσσώρευση της υπό δοκιμή ουσίας στις τροφικές αλυσίδες.

Βιοσυγκέντρωση είναι η αύξηση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια ενός οργανισμού, η οποία οφείλεται αποκλειστικά στην πρόσληψη μέσω της επιφάνειας του σώματος, σε σχέση με τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο περιβάλλον μέσο.

Βιοσυσσώρευση είναι η αύξηση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια ενός οργανισμού σε σχέση με τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο περιβάλλον μέσο. Η βιοσυσσώρευση οφείλεται σε διεργασίες βιοσυγκέντρωσης και βιομεγέθυνσης (βλ. παρακάτω).

Εμβολιασμένο ίζημα είναι το ίζημα στο οποίο έχει προστεθεί η υπό δοκιμή ουσία.

Ενδοπορικό νερό ή διάμεσο νερό είναι το νερό που καταλαμβάνει τον χώρο μεταξύ των σωματιδίων του ιζήματος ή του εδάφους.

Η **οριζοντίωση** ή **σταθερή κατάσταση** ορίζεται ως η ισορροπία μεταξύ των διαδικασιών πρόσληψης και αποβολής που συντελούνται ταυτόχρονα κατά τη φάση έκθεσης. Η σταθερή κατάσταση στη γραφική παράσταση του BAF σε κάθε περίοδο δειγματοληψίας συναρτήσει του χρόνου επιτυγχάνεται όταν η καμπύλη καθίσταται παράλληλη προς τον άξονα του χρόνου και τρεις διαδοχικές αναλύσεις του BAF σε δείγματα που έχουν ληφθεί ανά διαστήματα τουλάχιστον δύο ημερών δεν διαφέρουν μεταξύ τους σε ποσοστό μεγαλύτερο από 20 %, χωρίς να υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών περιόδων δειγματοληψίας. Στην περίπτωση υπό δοκιμή ουσιών που προσλαμβάνονται με αργό ρυθμό, ενδείκνυνται περισσότερο διαστήματα επτά ημερών (5).

Η **περίοδος εγκλιματισμού** χρησιμοποιείται για τη σταθεροποίηση του μικροβιακού συστατικού του ιζήματος και για την αφαίρεση π.χ. της αμμωνίας που προέρχεται από τα συστατικά του ιζήματος. Συντελείται πριν από τον εμβολιασμό του ιζήματος με την υπό δοκιμή ουσία. Συνήθως, το υπερκείμενο νερό απορρίπτεται μετά τον εγκλιματισμό.

Η **περίοδος εξισορρόπησης** χρησιμοποιείται ώστε να παρέχεται το χρονικό περιθώριο για να κατανεμηθεί η υπό δοκιμή ουσία μεταξύ της σταθερής φάσης, του ενδοπορικού νερού και του υπερκείμενου νερού. Λαμβάνει χώρα μετά τον εμβολιασμό του ιζήματος με την υπό δοκιμή ουσία και πριν από την προσθήκη των οργανισμών δοκιμής.

Σταθερά ταχύτητας αποβολής (k_e) είναι η αριθμητική τιμή που ορίζει τον ρυθμό μείωσης της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια του οργανισμού δοκιμής, μετά τη μεταφορά των οργανισμών δοκιμής από το μέσο που περιέχει την υπό δοκιμή ουσία σε μέσο που δεν περιέχει την υπό δοκιμή χημική ουσία. Η k_e εκφράζεται σε ημέρα^{-1}.

Σταθερά ταχύτητας πρόσληψης ιζήματος (k_s) είναι η αριθμητική τιμή που ορίζει την ταχύτητα αύξησης της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια του οργανισμού δοκιμής, η οποία οφείλεται στην πρόσληψη από τη φάση ιζήματος. Η k_s εκφράζεται σε g ιζήματος kg^{-1} σκώληκα ημέρα^{-1}.

▼**M6**

Ο **συντελεστής βιοσυσσώρευσης** (BAF) οποιαδήποτε στιγμή κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης αυτής της δοκιμής βιοσυσσώρευσης είναι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια του οργανισμού δοκιμής (C_a σε g kg^{-1} υγρού ή ξηρού βάρους) διαιρεμένη με τη συγκέντρωση της ουσίας στο περιβάλλον μέσο (C_s ως g kg^{-1} υγρού ή ξηρού βάρους του ιζήματος). Για να γίνει αναφορά στις μονάδες C_a και C_s, οι μονάδες του BAF είναι kg ιζήματος kg^{-1} σκωλήκων (15).

Οι **συντελεστές βιοσυσσώρευσης** που υπολογίζονται απευθείας από την αναλογία της σταθεράς ταχύτητας πρόσληψης ιζήματος προς τη σταθερά ταχύτητας αποβολής και τη σταθερά ρυθμού κινητικής (k_s και k_e, αντίστοιχα -βλ. παρακάτω) χαρακτηρίζονται ως συντελεστής κινητικής βιοσυσσώρευσης (BAF_K).

Συντελεστής βιοσυσσώρευσης σε σταθερή κατάσταση (BAF_{ss}) είναι ο BAF σε σταθερή κατάσταση και δεν μεταβάλλεται σημαντικά κατά τη διάρκεια παρατεταμένης χρονικής περιόδου, δεδομένου ότι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο περιβάλλον μέσο (C_s σε g kg^{-1} υγρού ή ξηρού βάρους του ιζήματος) είναι σταθερή κατά τη διάρκεια της εν λόγω χρονικής περιόδου.

Συντελεστής κατανομής οκτανόλης-νερού (K_{ow}) είναι ο λόγος της διαλυτότητας μιας ουσίας σε n-οκτανόλη και νερό σε κατάσταση ισορροπίας, συμβολιζόμενος επίσης και ως P_{ow}. Ο λογάριθμος του K_{ow} (log K_{ow}) χρησιμοποιείται ως ένδειξη του δυναμικού βιοσυσσώρευσης μιας ουσίας από τους υδρόβιους οργανισμούς.

Συντελεστής κατανομής οργανικού άνθρακα-νερού (K_{oc}) είναι ο λόγος της συγκέντρωσης μιας ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια του κλάσματος οργανικού άνθρακα ενός ιζήματος προς τη συγκέντρωση της ουσίας στο νερό σε κατάσταση ισορροπίας.

Ο **συντελεστής συσσώρευσης σε βιόκοσμο-ίζημα** (BSAF) είναι το πηλίκο της κανονικοποιημένης ως προς τα λιπίδια συγκέντρωσης σε σταθερή κατάσταση της υπό δοκιμή ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια του οργανισμού δοκιμής δια της κανονικοποιημένης ως προς τον οργανικό άνθρακα συγκέντρωσης της ουσίας στο ίζημα, σε σταθερή κατάσταση. Στην περίπτωση αυτή, η C_a εκφράζεται σε g kg^{-1} λιπιδικού περιεχομένου του οργανισμού και η C_s σε g kg^{-1} περιεκτικότητας του ιζήματος σε οργανικό άνθρακα.

Τεχνητό ίζημα ή μορφοποιημένο, ανασυσταθέν ή συνθετικό ίζημα είναι ένα μείγμα υλικών που χρησιμοποιείται για να απομιμείται τα φυσικά συστατικά ενός φυσικού ιζήματος.

Υπερκείμενο νερό είναι το νερό που βρίσκεται πάνω από το ίζημα στο δοχείο δοκιμής.

Φάση αποβολής είναι το χρονικό διάστημα κατά το οποίο μελετάται η αποβολή (ή η καθαρή απώλεια) της ουσίας από τους οργανισμούς δοκιμής, μετά τη μεταφορά των οργανισμών δοκιμής από μολυσμένο μέσο σε μέσο που δεν περιέχει την υπό δοκιμή ουσία.

Φάση πρόσληψης ή έκθεσης είναι το χρονικό διάστημα κατά το οποίο οι οργανισμοί δοκιμής εκτίθενται στην υπό δοκιμή ουσία.

▼M6

Προσάρτημα 2

Υπολογισμός των παραμέτρων πρόσληψής και αποβολής

Το κύριο τελικό σημείο μιας δοκιμής βιοσυσσώρευσης είναι ο συντελεστής βιοσυσσώρευσης, BAF. Ο μετρούμενος BAF μπορεί να υπολογίζεται με διαίρεση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στον οργανισμό δοκιμής, C_a, δια της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στο ίζημα, C_s, σε σταθερή κατάσταση. Εάν δεν επιτυγχάνεται σταθερή κατάσταση κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης, υπολογίζεται ο BAF με τον ίδιο τρόπο για την ημέρα 28. Ωστόσο, θα πρέπει να επισημαίνεται αν ο BAF βασίζεται σε συγκεντρώσεις σταθερής κατάστασης ή όχι.

Ο προτιμώμενος τρόπος λήψης του συντελεστή κινητικής βιοσυσσώρευσης (BAF_K), της σταθεράς ταχύτητας πρόσληψης ιζήματος (k_s) και της σταθεράς ταχύτητας αποβολής (k_e) είναι η χρήση μεθόδων εκτίμησης μη γραμμικών παραμέτρων σε υπολογιστή. Δεδομένης της χρονολογικής σειράς των μέσων συντελεστών συσσώρευσης (C_a, μέσες τιμές κάθε ημερομηνίας δειγματοληψίας/C_s, μέσες τιμές κάθε ημερομηνίας δειγματοληψίας = AF) της φάσης πρόσληψης με βάση το υγρό βάρος σκωλήκων και ιζήματος, και της εξίσωσης μοντέλου

$$AF(t) = BAF \times (1 - e^{ke \times t}) \qquad \text{[εξίσωση 1]}$$

όπου AF(t) είναι η αναλογία της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στους σκώληκες προς τη συγκέντρωσή της στο ίζημα οποιαδήποτε δεδομένη στιγμή (t) της φάσης πρόσληψης, τα εν λόγω προγράμματα ηλεκτρονικών υπολογιστών υπολογίζουν τις τιμές για τα BAF_K, k_s και k_e.

Όταν η σταθερή κατάσταση επιτυγχάνεται κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης (δηλ. $t = \infty$), η εξίσωση 1 μπορεί να απλοποιηθεί σε:

$$BAF_K = \frac{k_s}{k_e} \qquad \text{[εξίσωση 2]}$$

όπου

k_s = σταθερά ταχύτητας πρόσληψης στους ιστούς [g ιζήματος kg^{-1} του σκώληκα $ημέρα^{-1}$]

ke = σταθερά ταχύτητας αποβολής [$ημέρα^{-1}$]

Στη συνέχεια, η σχέση $k_s/k_e \times C_s$ είναι μια προσέγγιση για τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στον ιστό του σκώληκα σε σταθερή κατάσταση ($C_{a,ss}$).

Ο συντελεστής συσσώρευσης σε βιόκοσμο-ίζημα (BSAF) θα πρέπει να υπολογίζεται ως εξής:

$$BSAF = BAF_K \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

όπου foc είναι το κλάσμα του οργανικού άνθρακα του ιζήματος με βάση το ξηρό βάρος και flip το κλάσμα των λιπιδίων του σκώληκα, με βάση και για τα δύο είτε το ξηρό είτε το υγρό βάρος.

Δεδομένης μιας χρονικής σειράς των τιμών συγκέντρωσης, η κινητική αποβολής μπορεί να μοντελοποιείται με τη χρήση των ακόλουθων εξισώσεων μοντέλου και μιας μεθόδου εκτίμησης μη γραμμικών παραμέτρων σε υπολογιστή.

Τα μέσα μετρηθέντα σωματικά υπολείμματα στο τέλος της φάσης πρόσληψης συνιστώνται ως προεπιλεγμένο σημείο έναρξης. Η χρήση της τιμής που μοντελοποιείται/εκτιμάται από τη φάση πρόσληψης θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο π.χ. εάν η μετρηθείσα τιμή παρεκκλίνει σημαντικά από το μοντελοποιημένο σωματικό υπόλειμμα. Βλ. επίσης παράγραφο 50 για εναλλακτική προέκθεση σκωλήκων που προορίζονται για αποβολή. Με αυτήν την προσέγγιση, τα δείγματα των σκωλήκων που έχουν υποβληθεί σε προέκθεση την ημέρα 0 της φάσης αποβολής θεωρείται ότι παρέχουν ρεαλιστικό σωματικό υπόλειμμα για την εκκίνηση της κινητικής αποβολής.

▼M6

Εάν η γραφική παράσταση των σημείων δεδομένων συναρτήσει του χρόνου δηλώνει σταθερή εκθετική μείωση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στα ζώα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μονοδιαμερισματικό μοντέλο (εξίσωση 4) για την περιγραφή της χρονικής εξέλιξης της αποβολής.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \qquad \text{[εξίσωση 3]}$$

Μερικές φορές, οι διεργασίες αποβολής φαίνεται να είναι διφασικές, εμφανίζοντας ταχεία μείωση της C_a κατά τα πρώτα στάδια, και να μεταλλάσσονται σε βραδύτερη απώλεια των υπό δοκιμή ουσιών κατά τα επόμενα στάδια της αποβολής (8)(19)(25). Οι δύο φάσεις μπορούν να ερμηνευθούν με την παραδοχή ότι υπάρχουν δύο διαφορετικά διαμερίσματα στον οργανισμό, από τα οποία η υπό δοκιμή ουσία απομακρύνεται με διαφορετικές ταχύτητες. Στις περιπτώσεις αυτές, θα πρέπει να μελετάται η ειδική βιβλιογραφία (15)(16)(17)(25).

Η αποβολή δύο διαμερισμάτων περιγράφεται π.χ. από την ακόλουθη εξίσωση (25):

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{k_b \times t} \qquad \text{[εξίσωση 4]}$$

Τα A και B αντιπροσωπεύουν το μέγεθος των διαμερισμάτων (σε ποσοστό συνολικού υπολείμματος ιστού), όπου A είναι το διαμέρισμα με ταχεία απομάκρυνση της ουσίας και B το διαμέρισμα με αργή απομάκρυνση της υπό δοκιμή ουσίας. Το άθροισμα των A και B ισούται με το 100 % του όγκου διαμερίσματος ολόκληρου του ζώου σε σταθερή κατάσταση. Τα k_a και k_b αντιπροσωπεύουν τις αντίστοιχες σταθερές αποβολής [ημέρα^{-1}]. Εάν το μοντέλο δύο διαμερισμάτων προσαρμόζεται στα δεδομένα αποβολής, η σταθερά ταχύτητας πρόσληψης k_s μπορεί να προσδιορίζεται ως εξής (53)(54):

$$k_s = \frac{(A \times k_a + B \times k_b) \times BAF}{A + B} \qquad \text{[εξίσωση 5]}$$

Παρόλα αυτά, οι ανωτέρω εξισώσεις μοντέλου θα πρέπει να χρησιμοποιούνται με επιφύλαξη, ιδίως όταν μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της δοκιμής η βιοδιαθεσιμότητα της υπό δοκιμή ουσίας (42).

Εναλλακτικά των εξισώσεων μοντέλου που περιγράφονται ανωτέρω, η κινητική (k_s και k_e) μπορεί επίσης να υπολογίζεται με μία μόνο διαδικασία μέτρησης, μέσω της εφαρμογής του μοντέλου κινητικής πρώτης τάξης σε όλα τα δεδομένα που προκύπτουν τόσο από τη φάση πρόσληψης, όσο και από τη φάση αποβολής. Για την περιγραφή μιας μεθόδου που επιτρέπει ενδεχομένως έναν τέτοιο συνδυασμένο υπολογισμό των σταθερών ταχύτητας πρόσληψης και αποβολής, βλ. παραπομπές (55), (56) και (57).

Τα μη αποβληθέντα υπολείμματα (NER) θα πρέπει να υπολογίζονται ως δευτερεύον τελικό σημείο, με πολλαπλασιασμό της αναλογίας της μέσης συγκέντρωσης των σκωλήκων (C_a) την ημέρα 10 της φάσης αποβολής και της μέσης συγκέντρωσης των σκωλήκων (C_a) σε σταθερή κατάσταση (ημέρα 28 της φάσης πρόσληψης) με το 100:

$$\boldsymbol{NER_{10d}[\%] = \frac{C_a \textit{at the end of elimination}(\textit{average}) \times 100}{C_a \textit{at steady state}(\textit{average})}}$$

▼**M6**

Προσάρτημα 3

Παράδειγμά προγράμματος δειγματοληψίας για δοκιμή βιοσυσσωρευσης 28 ήμερων

α) **Φάση πρόσληψης (συμπεριλαμβανομένης φάσης εξισορρόπησης 4 ημερών)**

Ημέρα	Δραστηριότητες
– 6	Παρασκευή εναιωρήματος τύρφης για το ίζημα, εγκλιματισμός του εναιωρήματος για 48 ώρες,
– 4	Εμβολιασμός του ιζήματος ή του κλάσματος ιζήματος, ανάμειξη όλων των συστατικών του ιζήματος, λήψη δειγμάτων ιζήματος από το ίζημα αγωγής και το ίζημα-μάρτυρα με διαλύτη για προσδιορισμό της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας, προσθήκη υπερκείμενου νερού, επώαση σε συνθήκες δοκιμής (φάση εξισορρόπησης),
– 3/-2	Διαχωρισμός των οργανισμών δοκιμής από την καλλιέργεια για εγκλιματισμό,
0	Μέτρηση της ποιότητας νερού (βλ. παράγραφο 52), απομάκρυνση δοχείων επανάληψης για τη λήψη δειγμάτων νερού και ιζήματος για προσδιορισμό της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας, τυχαία κατανομή των σκωλήκων στους θαλάμους δοκιμής, κράτηση επαρκών επιμέρους δειγμάτων σκωλήκων για προσδιορισμό των αναλυτικών τιμών υποβάθρου, έλεγχος της παροχής αέρα εάν χρησιμοποιείται κλειστό σύστημα δοκιμών,
1	Απομάκρυνση δοχείων επανάληψης για δειγματοληψία, έλεγχος παροχής αέρα, συμπεριφοράς σκωλήκων, ποιότητας νερού (βλ. παράγραφο 56), λήψη δείγματος νερού, ιζήματος και σκωλήκων για προσδιορισμό της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας,
2	Έλεγχος της παροχής αέρα, της συμπεριφοράς των σκωλήκων και της θερμοκρασίας,
3	Ομοίως με την 1η ημέρα,
4-6	Ομοίως με τη 2η ημέρα,
7	Ομοίως με την 1η ημέρα, αναπλήρωση του εξατμισθέντος νερού, εάν απαιτείται,
8-13	Ομοίως με τη 2η ημέρα,
14	Ομοίως με την 1η ημέρα, αναπλήρωση του εξατμισθέντος νερού, εάν απαιτείται,
15-20	Ομοίως με τη 2η ημέρα,
21	Ομοίως με την 1η ημέρα, αναπλήρωση του εξατμισθέντος νερού, εάν απαιτείται,
22-27	Ομοίως με τη 2η ημέρα,
28	Ομοίως με την 1η ημέρα, μέτρηση της ποιότητας νερού (βλ. παράγραφο 52), τέλος της φάσης πρόσληψης, κράτηση επαρκών επιμέρους δειγμάτων σκωλήκων για προσδιορισμό των αναλυτικών τιμών υποβάθρου, του υγρού και ξηρού βάρους και του λιπιδικού περιεχομένου, μεταφορά των σκωλήκων από τα υπόλοιπα εκτεθέντα δοχεία επανάληψης σε δοχεία που περιέχουν καθαρό ίζημα για τη φάση αποβολής (χωρίς κένωση εντέρου), δειγματοληψία νερού, ιζήματος και σκωλήκων από τους μάρτυρες με διαλύτη, δειγματοληψία διαλυμάτων παγίδευσης εάν υπάρχουν.
	Οι δραστηριότητες πριν από την έκθεση (φάση εξισορρόπησης) θα πρέπει να προγραμματίζονται με γνώμονα τις ιδιότητες της υπό δοκιμή ουσίας. Εάν απαιτείται, το παρασκευασμένο ίζημα υποβάλλεται σε εγκλιματισμό κάτω από υπερκείμενο νερό στους 20 ± 2 °C για 7 ημέρες. Σε αυτήν την περίπτωση, το ίζημα παρασκευάζεται νωρίτερα!
	Οι δραστηριότητες που περιγράφονται για τη 2η ημέρα θα πρέπει να διεξάγονται καθημερινά (τουλάχιστον κατά τις εργάσιμες ημέρες).

▼**M6**

β) **Φάση αποβολής**

Ημέρα	Δραστηριότητες
– 6	Παρασκευή εναιωρήματος τύρφης για το ίζημα, εγκλιματισμός του εναιωρήματος για 48 ώρες,
– 4	Ανάμειξη όλων των συστατικών του ιζήματος, λήψη δειγμάτων ιζήματος από το ίζημα αγωγής και το ίζημα-μάρτυρα με διαλύτη για προσδιορισμό της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας, προσθήκη υπερκείμενου νερού, επώαση σε συνθήκες δοκιμής,
0 (ημέρα 28 της φάσης πρόσληψης)	Μέτρηση της ποιότητας νερού (βλ. παράγραφο 52), μεταφορά των σκωλήκων από τα υπόλοιπα εκτεθέντα δοχεία επανάληψης σε δοχεία που περιέχουν καθαρό ίζημα, μετά από **4-6 ώρες** απομάκρυνση των δοχείων επανάληψης για τη λήψη δειγμάτων νερού, ιζήματος και σκωλήκων για προσδιορισμό της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας, τυχαία κατανομή των σκωλήκων στους θαλάμους δοκιμής,
1	Απομάκρυνση δοχείων επανάληψης για δειγματοληψία, έλεγχος παροχής αέρα, συμπεριφοράς σκωλήκων, ποιότητας νερού (βλ. παράγραφο 52), λήψη δείγματος νερού, ιζήματος και σκωλήκων για προσδιορισμό της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας,
2	Έλεγχος της παροχής αέρα, της συμπεριφοράς των σκωλήκων και της θερμοκρασίας,
3	Ομοίως με την 1η ημέρα,
4	Ομοίως με τη 2η ημέρα,
5	Ομοίως με την 1η ημέρα,
6	Ομοίως με τη 2η ημέρα,
7	Ομοίως με την 1η ημέρα, αναπλήρωση του εξατμισθέντος νερού, εάν απαιτείται,
8-9	Ομοίως με τη 2η ημέρα,
10	Ομοίως με την 1η ημέρα, τέλος της φάσης αποβολής, μέτρηση της ποιότητας νερού (βλ. παράγραφο 52), δειγματοληψία νερού, ιζήματος και σκωλήκων από τους μάρτυρες με διαλύτη, δειγματοληψία διαλυμάτων παγίδευσης εάν υπάρχουν.
	Η προετοιμασία του ιζήματος πριν από την έναρξη της φάσης αποβολής θα πρέπει να γίνεται με τον ίδιο τρόπο όπως πριν από τη φάση πρόσληψης.
	Οι δραστηριότητες που περιγράφονται για τη 2η ημέρα θα πρέπει να διεξάγονται καθημερινά (τουλάχιστον κατά τις εργάσιμες ημέρες).

▼**M6**

Προσάρτημα 4

Ορισμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ενόσω αποδεκτού νερού αραίωσης

ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ
Σωματίδια	< 20 mg/l
Ολικός οργανικός άνθρακας	< 2μg/l
Μη ιονισμένη αμμωνία	< 1 μg/l
Υπολείμματα χλωρίου	< 10 μg/l
Σύνολο οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων	< 50 ng/l
Ολικά οργανοχλωριούχα φυτοφάρμακα μαζί με πολυχλωριωμένα διφαινύλια	< 50 ng/l
Ολικό οργανικό χλώριο	< 25 ng/l

ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΣΥΝΙΣΤΩΜΕΝΟΥ ΑΝΑΣΥΣΤΑΘΕΝΤΟΣ ΝΕΡΟΥ

(α) Διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου

Διαλύονται 11,76 g $CaCl_2 \times 2\ H_2O$ σε απιονισμένο νερό, συμπληρώνονται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό

(β) Διάλυμα θειικού μαγνησίου

Διαλύονται 4,93 g $MgSO_4 \times 7\ H_2O$ σε απιονισμένο νερό, συμπληρώνονται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό

(γ) Διάλυμα διττανθρακικού νατρίου

Διαλύονται 2,59 g $NaHCO_3$ σε απιονισμένο νερό, συμπληρώνονται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό

(δ) Διάλυμα χλωριούχου καλίου

Διαλύονται 0,23 g KCl σε απιονισμένο νερό, συμπληρώνονται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό

Όλες οι χημικές ουσίες πρέπει να είναι αναλυτικής καθαρότητας.

Η αγωγιμότητα του απεσταγμένου ή απιονισμένου νερού δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 10 μScm^{-1}.

Αναμιγνύονται 25 ml κάθε διαλύματος (α) έως (δ) και ο συνολικός όγκος συμπληρώνεται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό. Το άθροισμα των ιόντων ασβεστίου και μαγνησίου σε αυτά τα διαλύματα είναι 2,5 mmol/l.

Η αναλογία των ιόντων Ca:Mg είναι 4:1 και των ιόντων Na:K είναι 10:1. Η ικανότητα οξέος $K_{S4.3}$ αυτού του διαλύματος είναι 0,8 mmol/l.

Το νερό αραίωσης αερίζεται μέχρι την επίτευξη κορεσμού οξυγόνου και, στη συνέχεια, αποθηκεύεται για περίπου δύο ημέρες χωρίς περαιτέρω αερισμό πριν από τη χρήση.

Το pH ενός αποδεκτού νερού αραίωσης θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 6 και 9.

▼**M6**

Προσάρτημα 5

Τεχνητό ίζημα — συστάσεις Παρασκευής και αποθήκευσής

Σε αντίθεση με τις απαιτήσεις της μεθόδου δοκιμών Γ.8 (40), συνιστάται περιεκτικότητα σε τύρφη του τεχνητού ιζήματος ίση με 2 % αντί για 10 % του ξηρού βάρους, προκειμένου να ανταποκρίνεται στη χαμηλή έως μέτρια περιεκτικότητα σε οργανική ύλη των φυσικών ιζημάτων (58).

Ποσοστό ξηρών συστατικών του τεχνητού ιζήματος:

Συστατικό	Χαρακτηριστικά	% ξηρού ιζήματος
Τύρφη	Τύρφη σφάγνων, βαθμός αποικοδόμησης: «μέτρια», αερόξηρη, χωρίς ορατά υπολείμματα φυτών, λεπτοαλεσμένη (μέγεθος σωματιδίων ≤ 0,5 mm)	2 ± 0,5
Χαλαζιακή άμμος	Μέγεθος κόκκων: ≤ 2 mm, αλλά > 50 % των σωματιδίων θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 50-200 m	76
Καολινιτική άργιλος	Περιεκτικότητα σε καολινίτη ≥ 30 %	22 ± 1
Πηγή τροφής	*Folia urticae*, φύλλα *Urtica sp.* (τσουκνίδα) σε σκόνη, λεπτοαλεσμένα (μέγεθος σωματιδίων ≤ 0,5 mm) ή μείγμα φύλλων *Urtica sp.* σε σκόνη με άλφα-κυτταρίνη (1: 1), σύμφωνα με φαρμακευτικά πρότυπα, για ανθρώπινη κατανάλωση, επιπλέον του ξηρού ιζήματος	0,4-0,5 %
Ανθρακικό ασβέστιο	$CaCO_3$, κονιοποιημένο, χημικά καθαρό, επιπλέον του ξηρού ιζήματος	0,05-1
Απιονισμένο νερό	Αγωγιμότητα ≤ 10 μS/cm, επιπλέον του ξηρού ιζήματος	30-50

Εάν αναμένεται αυξημένη συγκέντρωση αμμωνίας, π.χ. εάν η υπό δοκιμή ουσία είναι γνωστό ότι αναστέλλει τη νιτροποίηση, μπορεί να είναι χρήσιμο να αντικατασταθεί το 50 % της πλούσιας σε άζωτο σκόνης Urtica με κυτταρίνη (π.χ. σκόνη α-κυτταρίνης, χημικά καθαρή, μέγεθος σωματιδίων ≤ 0,5 mm).

Παρασκευή

Η τύρφη ξηραίνεται σε αέρα και αλέθεται σε λεπτή σκόνη (μέγεθος κόκκων ≤ 0,5 mm, χωρίς ορατά υπολείμματα φυτών). Παρασκευάζεται εναιώρημα της απαιτούμενης ποσότητας σκόνης τύρφης με χρήση μιας ποσότητας του απιονισμένου νερού που θα προστεθεί στο ξηρό ίζημα (όγκος νερού 11,5 x ξηρό βάρος τύρφης έχει αποδειχθεί χρήσιμος για την παρασκευή ενός αναδεύσιμου πολτού τύρφης (8)) με τη βοήθεια ομοιογενοποιητή υψηλής απόδοσης.

Το pH του εν λόγω εναιωρήματος ρυθμίζεται στο 5,5 ± 0,5 με $CaCO_3$. Το εναιώρημα εγκλιματίζεται για τουλάχιστον δύο ημέρες με ήπια ανάδευση στους 20 ± 2 °C, για τη σταθεροποίηση του pH και τη δημιουργία σταθερού μικροβιακού συστατικού. Το pH μετράται πάλι και ρυθμίζεται σε 6,0 ± 0,5 με $CaCO_3$, εάν είναι απαραίτητο. Στη συνέχεια, ολόκληρο το εναιώρημα αναμειγνύεται με τα άλλα ξηρά συστατικά, λαμβανομένης υπόψη τυχόν ποσότητας που χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό. Προστίθεται το υπόλοιπο απιονισμένο νερό για την επίτευξη ομοιογενούς ιζήματος. Το pH μετράται πάλι και ρυθμίζεται σε 6,5 έως 7,5 με $CaCO_3$, εάν είναι απαραίτητο. Ωστόσο, εάν αναμένεται παραγωγή αμμωνίας, μπορεί να είναι χρήσιμο να διατηρηθεί το pH του ιζήματος κάτω από 7,0 (π.χ. μεταξύ 6,0 και 6,5). Λαμβάνονται δείγματα του ιζήματος για τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους και της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα. Εάν αναμένεται παραγωγή αμμωνίας, το τεχνητό ίζημα μπορεί να εγκλιματιστεί για επτά ημέρες υπό τις ίδιες συνθήκες με εκείνες που θα επικρατούν στην επακόλουθη δοκιμή (π.χ. αναλογία ιζήματος-νερού 1: 4, ύψος στρώματος ιζήματος όπως και στα δοχεία δοκιμής) πριν από τον εμβολιασμό με την υπό δοκιμή ουσία, δηλ. θα πρέπει να συμπληρωθεί με νερό, το οποίο θα πρέπει να έχει υποβληθεί σε αερισμό. Στο τέλος αυτής της περιόδου εγκλιματισμού, το υπερκείμενο νερό θα πρέπει να απομακρύνεται και να απορρίπτεται. Λαμβάνονται δείγματα του ιζήματος για τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους και της περιεκτικότητας σε ολικό οργανικό άνθρακα (π.χ. 3 δείγματα).

▼M6

Στη συνέχεια, η εμβολιασμένη χαλαζιακή άμμος αναμειγνύεται με το ίζημα για κάθε επίπεδο αγωγής, το ίζημα κατανέμεται στα δοχεία δοκιμής επανάληψης και συμπληρώνεται με νερό δοκιμής (π.χ. αναλογία ιζήματος-νερού 1: 4, ύψος στρώματος ιζήματος όπως και στα δοχεία δοκιμής). Στη συνέχεια, τα δοχεία επωάζονται υπό τις ίδιες συνθήκες με εκείνες που θα επικρατούν στην επακόλουθη δοκιμή. Στο σημείο αυτό ξεκινάει η περίοδος εξισορρόπησης. Το υπερκείμενο νερό θα πρέπει να αερίζεται.

Η επιλεγμένη πηγή τροφής θα πρέπει να προστίθεται πριν ή κατά τη διάρκεια του εμβολιασμού του ιζήματος με την υπό δοκιμή ουσία. Μπορεί να αναμειχθεί αρχικά με το εναιώρημα τύρφης (βλ. ανωτέρω). Ωστόσο, είναι δυνατό να αποφεύγεται η υπερβολική αποικοδόμηση της πηγής τροφής πριν από την προσθήκη των οργανισμών δοκιμής -π.χ. στην περίπτωση μεγάλης χρονικής περιόδου εξισορρόπησης- με διατήρηση της χρονικής περιόδου μεταξύ της προσθήκης τροφής και της έναρξης της έκθεσης όσο το δυνατό πιο σύντομης. Για να διασφαλίζεται επαρκής επαφή της τροφής με την υπό δοκιμή ουσία, η πηγή τροφής θα πρέπει να αναμειγνύεται με το ίζημα το αργότερο μέχρι την ημέρα εμβολιασμού της υπό δοκιμή ουσίας στο ίζημα. Εξαιρέσεις επιτρέπονται όταν η διάρκεια της περιόδου εξισορρόπησης οδηγεί σε υπερβολική μικροβιακή αποικοδόμηση της τροφής πριν από την προσθήκη των οργανισμών δοκιμής. Λαμβάνονται δείγματα του ιζήματος για τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους και της περιεκτικότητας σε ολικό οργανικό άνθρακα (π.χ. 3 δείγματα εμβολιασμένου ιζήματος ή ιζήματος-μάρτυρα).

Το ξηρό βάρος των συστατικών (τύρφη, άμμος, καολίνη) θα πρέπει να αναφέρεται σε g και σε % επί του συνολικού ξηρού βάρους.

Θα πρέπει επίσης να αναφέρεται ο όγκος του νερού που θα προστεθεί στα ξηρά συστατικά κατά την προετοιμασία του ιζήματος σε % επί του συνολικού ξηρού βάρους (π.χ. 100 % ξηρού βάρους + 46 % νερό σημαίνει ότι στα 1 000 g ξηρού βάρους προστίθενται συνολικά 460 ml νερό, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα 1 460 g υγρού ιζήματος).

Αποθήκευση

Τα ξηρά συστατικά του τεχνητού ιζήματος μπορούν να φυλάσσονται σε ξηρό και δροσερό χώρο, σε θερμοκρασία δωματίου. Το παρασκευασμένο, υγρό ίζημα μπορεί να φυλάσσεται (για μετέπειτα χρήση στην καλλιέργεια μόνο) στους 4 ± 2 °C στο σκοτάδι για χρονική περίοδο 2 έως 4 εβδομάδων από την ημέρα της παρασκευής (8).

Το ίζημα που έχει εμβολιαστεί με την υπό δοκιμή ουσία θα πρέπει να χρησιμοποιείται αμέσως, εκτός εάν υπάρχουν πληροφορίες σύμφωνα με τις οποίες το συγκεκριμένο ίζημα μπορεί να αποθηκεύεται χωρίς να επηρεάζονται η τοξικότητα και η βιοδιαθεσιμότητα της υπό δοκιμή ουσίας. Τα δείγματα του εμβολιασμένου ιζήματος μπορούν να φυλάσσονται στις συνθήκες που συνιστώνται για τη συγκεκριμένη υπό δοκιμή ουσία, μέχρι την ανάλυση.

▼M6

Προσάρτημα 6

Είδη ολιγοδίαιτων που συνιστώνται για τη δοκιμή βιοσυσσωρευσης

***Tubifex tubifex* (MÜLLER), Tubificidae, Oligochaeta**

Το είδος *Tubifex tubifex* των ολιγοχαιτών (Tubificidae, Oligochaeta) (Müller) ζει σε ιζήματα γλυκών νερών σε σωλήνες που φέρουν επένδυση από βλέννα. Σε αυτούς τους σωλήνες, οι σκώληκες διαβιούν με το κεφάλι προς τα κάτω, καταναλώνοντας σωματίδια ιζήματος μέσω των σχετιζόμενων μικροοργανισμών και οργανικών υπολειμμάτων. Το οπίσθιο τμήμα συνήθως κυματίζει στο υπερκείμενο νερό για σκοπούς αναπνοής. Παρότι το *Tubifex tubifex* απαντάται σε ένα ευρύ φάσμα τύπων ιζήματος σε ολόκληρο το βόρειο ημισφαίριο, το είδος αυτό προτιμά κόκκους σχετικά λεπτού μεγέθους (59). Η καταλληλότητα αυτού του είδους για οικοτοξικολογικές δοκιμές περιγράφεται, για παράδειγμα, στα σημεία (8)(29)(31)(39)(60)(62)(63).

Μέθοδοι καλλιέργειας

Προκειμένου ο αριθμός των σκωλήκων *Tubifex tubifex* να επαρκεί για τη διεξαγωγή δοκιμών βιοσυσσώρευσης, οι σκώληκες πρέπει να διατηρούνται σε μόνιμη εργαστηριακή καλλιέργεια. Για την καλλιέργεια του *T. tubifex* συνιστάται ένα σύστημα αποτελούμενο από τεχνητό ίζημα που βασίζεται σε τεχνητό έδαφος σύμφωνα με τη μέθοδο δοκιμών Γ.8 (40) και ανασυσταθέν νερό σύμφωνα με τη μέθοδο δοκιμών Γ.1 (8).

Ως δοχεία καλλιέργειας μπορούν να χρησιμοποιούνται γυάλινοι περιέκτες ή περιέκτες από ανοξείδωτο χάλυβα ύψους 12 έως 20 cm. Κάθε περιέκτης καλλιέργειας πληρώνεται με ένα στρώμα υγρού τεχνητού ιζήματος που παρασκευάζεται όπως περιγράφεται στο προσάρτημα 5. Το βάθος του στρώματος ιζήματος θα πρέπει να επιτρέπει τη φυσική συμπεριφορά όσον αφορά το φώλιασμα των σκωλήκων (ελάχιστο βάθος 2 cm για το *T. tubifex*). Προστίθεται ανασυσταθέν νερό στο σύστημα. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για την ελαχιστοποίηση της διαταραχής του ιζήματος. Η υδάτινη μάζα υποβάλλεται σε ήπιο αερισμό (π.χ. 2 φυσαλίδες το δευτερόλεπτο με αέρα μέσω φίλτρου 0,45 μm) μέσω σιφωνίου Pasteur, το οποίο τοποθετείται 2 cm πάνω από την επιφάνεια του ιζήματος. Η συνιστώμενη θερμοκρασία της καλλιέργειας είναι 20 ± 2 °C.

Οι σκώληκες προστίθενται στο σύστημα καλλιέργειας με μέγιστο ρυθμό πλήρωσης 20 000 ατόμων/m^2 επιφάνειας ιζήματος. Υψηλότερος ρυθμός πλήρωσης ενδέχεται να προκαλέσει μείωση των ρυθμών ανάπτυξης και αναπαραγωγής (43).

Σε καλλιέργειες τεχνητού ιζήματος, πρέπει να παρέχεται τροφή στους σκώληκες. Μια διατροφή αποτελούμενη από λεπτοαλεσμένη τροφή για ψάρια, π.χ. Tetra-Min®, μπορεί να χρησιμεύσει ως επιπλέον θρεπτική πηγή (8), Klerks 1994, προσωπική επικοινωνία. Οι ρυθμοί σίτισης θα πρέπει να επιτρέπουν την επαρκή ανάπτυξη και αναπαραγωγή, καθώς και να διατηρούν τη συσσώρευση αμμωνίας και την ανάπτυξη μυκήτων στην καλλιέργεια σε ελάχιστα επίπεδα. Η τροφή μπορεί να χορηγείται δύο φορές την εβδομάδα (π.χ. 0,6-0,8 mg ανά cm^2 της επιφάνειας ιζήματος). Η πρακτική εμπειρία δείχνει ότι η χορήγηση τροφής εναιωρημένης και ομογενοποιημένης σε απιονισμένο νερό ενδέχεται να διευκολύνει την ομοιόμορφη κατανομή της τροφής στην επιφάνεια του ιζήματος στους περιέκτες καλλιέργειας.

Για την αποφυγή συσσώρευσης αμμωνίας, το υπερκείμενο νερό θα πρέπει να αλλάζεται με χρήση συστήματος συνεχούς ροής νερού, ή χειροκίνητα τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα. Το ίζημα θα πρέπει να αλλάζεται κάθε τρεις μήνες στις καλλιέργειες παρακαταθήκης.

Η δειγματοληψία των σκωλήκων από την καλλιέργεια μπορεί να γίνεται με κοσκίνισμα του ιζήματος της καλλιέργειας μέσω κόσκινου 1 mm εάν απαιτούνται μόνο ενήλικα άτομα. Για τη διατήρηση των κουκουλιών είναι κατάλληλο ένα πλέγμα των 0,5 mm και για τη διατήρηση των νεαρών σκωλήκων ένα κόσκινο των 0,25 mm. Τα κόσκινα μπορούν να τοποθετούνται σε ανασυσταθέν νερό μετά τη διέλευση του ιζήματος. Οι σκώληκες απομακρύνονται από το πλέγμα και στη συνέχεια συλλέγονται από το νερό με τη χρήση μαλακής χαλύβδινης λαβίδας ή ενός σιφωνίου του οποίου τα άκρα έχουν υποστεί γυάλισμα με φλόγα.

▼M6

Μόνο άθικτα και σαφώς ταυτοποιημένα δείγματα *Tubifex tubifex* (π.χ. (64)) χρησιμοποιούνται για την έναρξη μιας δοκιμής ή νέων καλλιεργειών. Οι άρρωστοι ή τραυματισμένοι σκώληκες, καθώς και τα κουκούλια που έχουν προσβληθεί από υφές νηματοειδών μυκήτων πρέπει να απορρίπτονται.

Μια συγχρονισμένη καλλιέργεια μπορεί να παράσχει σκώληκες μιας συγκεκριμένης ηλικίας σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα, όταν απαιτείται. Νέα δοχεία καλλιέργειας ετοιμάζονται στα επιλεγμένα χρονικά διαστήματα (π.χ. κάθε δύο εβδομάδες), ξεκινώντας με ζώα καθορισμένης ηλικίας (π.χ. κουκούλια). Στις συνθήκες καλλιέργειας που περιγράφονται στο παρόν, οι σκώληκες είναι ενήλικες μετά από 8-10 εβδομάδες. Οι καλλιέργειες μπορούν να συλλέγονται όταν οι σκώληκες έχουν γεννήσει νέα κουκούλια, π.χ. μετά από δέκα εβδομάδες. Τα δείγματα των ενήλικων ατόμων μπορούν να χρησιμοποιούνται για δοκιμές και τα κουκούλια μπορούν να χρησιμοποιούνται για την έναρξη νέων καλλιεργειών.

***Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), Lumbriculidae, Oligochaeta**

Το είδος *Lumbriculus variegatus* (Lumbriculidae, Oligochaeta) επίσης ζει σε ιζήματα γλυκών νερών σε ολόκληρο τον κόσμο και χρησιμοποιείται ευρέως σε οικοτοξικολογικές δοκιμές. Πληροφορίες για τη βιολογία, τις συνθήκες καλλιέργειας και την ευαισθησία του είδους μπορούν να λαμβάνονται από τα σημεία (1)(6)(9)(36). Το είδος *Lumbriculus variegatus* μπορεί επίσης να καλλιεργηθεί στο τεχνητό ίζημα που συνιστάται για το *T. tubifex*, σύμφωνα με το σημείο (8) με κάποιους περιορισμούς. Επειδή στη φύση το *L. variegatus* προτιμά πιο χονδρόκοκκα ιζήματα σε σχέση με το *T. tubifex (59)*, οι εργαστηριακές καλλιέργειες με το τεχνητό ίζημα που χρησιμοποιείται για το *T. tubifex* μπορεί να διακοπούν μετά από 4 έως 6 μήνες. Η πρακτική εμπειρία δείχνει ότι το *L. variegatus* μπορεί να διατηρείται σε αμμώδες υπόστρωμα (π.χ. χαλαζιακή άμμος, λεπτό χαλίκι) σε σύστημα συνεχούς ροής νερού με χρήση τροφής για ψάρια ως θρεπτικής πηγής για αρκετά χρόνια χωρίς ανανέωση του υποστρώματος. Ένα μεγάλο πλεονέκτημα του *L. variegatus* σε σχέση με άλλα είδη υδρόβιων ολιγοχαιτών είναι η ταχεία αναπαραγωγή, που έχει ως αποτέλεσμα ταχέως αυξανόμενη βιομάζα σε πληθυσμούς εργαστηριακής καλλιέργειας (1)(6)(9)(10).

Μέθοδοι καλλιέργειας

Οι συνθήκες καλλιέργειας για το *Lumbriculus variegatus* περιγράφονται λεπτομερώς στα έγγραφα Phipps κ.α. (1993) (10), Brunson κ.α. (1998) (28), ASTM (2000) (1), U.S. EPA (2000) (6). Μια σύντομη σύνοψη αυτών των συνθηκών παρέχεται παρακάτω.

Οι σκώληκες μπορούν να καλλιεργούνται σε μεγάλα ενυδρεία (57-80 l) στους 23 °C με φωτοπερίοδο 16Φ:8Σ (100-1 000 lux) με τη χρήση φυσικού νερού που ανανεώνεται ημερησίως (45-50 l ανά ενυδρείο). Το υπόστρωμα παρασκευάζεται με κοπή αλεύκαστων καφέ χαρτιών σε λωρίδες, οι οποίες στη συνέχεια αναμειγνύονται με νερό καλλιέργειας για λίγα δευτερόλεπτα με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός υποστρώματος αποτελούμενου από μικρά κομμάτια χαρτιού. Το υπόστρωμα αυτό μπορεί κατόπιν να χρησιμοποιηθεί άμεσα στα ενυδρεία της καλλιέργειας *Lumbriculus*, καλύπτοντας το κάτω μέρος της δεξαμενής ή μπορεί να αποθηκευτεί κατεψυγμένο σε απιονισμένο νερό για μετέπειτα χρήση. Το νέο υπόστρωμα στη δεξαμενή γενικά διαρκεί για περίπου δύο μήνες.

Κάθε καλλιέργεια σκωλήκων ξεκινάει με 500-1 000 σκώληκες, ενώ ως τροφή παρέχονται 10 ml εναιωρήματος που περιέχουν 6 g αρχικής τροφής για πέστροφες, 3 φορές την εβδομάδα κάτω από συνθήκες ανανέωσης νερού ή συνεχούς ροής νερού. Ο ρυθμός σίτισης στις στατικές ή ημιστατικές καλλιέργειες θα πρέπει να είναι χαμηλότερος για την αποφυγή ανάπτυξης βακτηρίων και μυκήτων. Η τροφή και το χάρτινο υπόστρωμα θα πρέπει να αναλύονται για την ανίχνευση ουσιών που θα χρησιμοποιηθούν στις δοκιμές βιοσυσσώρευσης.

Κάτω από αυτές τις συνθήκες, ο αριθμός των ατόμων στην καλλιέργεια γενικά διπλασιάζεται σε περίπου 10 έως 14 ημέρες.

Το *Lumbriculus variegatus* μπορεί να απομακρύνεται από τις καλλιέργειες, π.χ. με μεταφορά σε ένα ξεχωριστό ποτήρι ζέσεως υποστρώματος μέσω ενός δικτυού λεπτού πλέγματος ή οργανισμών μέσω γυάλινου σιφωνίου με ευρύ στόμιο (διάμετρος περίπου 5 mm) που έχει υποστεί γυάλισμα με φλόγα. Εάν οι σκώληκες μεταφερθούν στο ποτήρι ζέσεως μαζί με υπόστρωμα, το ποτήρι ζέσεως

▼M6

που περιέχει σκώληκες και υπόστρωμα παραμένει όλη τη νύχτα κάτω από συνθήκες συνεχούς ροής νερού, διαδικασία με την οποία απομακρύνεται το υπόστρωμα από το ποτήρι ζέσεως ενώ οι σκώληκες παραμένουν στο κάτω μέρος του δοχείου. Στη συνέχεια, μπορούν να τοποθετηθούν σε προσφάτως παρασκευασμένες δεξαμενές καλλιέργειας ή να υποστούν περαιτέρω κατεργασία για τη δοκιμή, όπως περιγράφεται στα σημεία (1) και (6). Θα πρέπει να αποφεύγονται οι τραυματισμοί ή η αυτοτομία των σκωλήκων, π.χ. με τη χρήση σιφωνίων με άκρα που έχουν υποστεί γυάλισμα με φλόγα ή βελονών από ανοξείδωτο χάλυβα για τον χειρισμό των σκωλήκων.

Ένα ζήτημα που πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη κατά τη χρήση του *L. variegatus* σε δοκιμές βιοσυσσώρευσης ιζήματος είναι ο τρόπος αναπαραγωγής του (αρχιτομία ακολουθούμενη από μορφάλλαξη). Αυτός ο ασεξουαλικός τρόπος αναπαραγωγής έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό δύο τμημάτων, τα οποία δεν τρέφονται για ορισμένη χρονική περίοδο μέχρι την αναγέννηση του μέρους του κεφαλιού ή της ουράς (π.χ. (36)(37)). Αυτό σημαίνει ότι στην περίπτωση του *L. variegatus* η πρόσληψη ιζήματος και προσμείξεων μέσω κατάποσης ενδέχεται να μην πραγματοποιείται σε συνεχή βάση όπως συμβαίνει με τα είδη της οικογένειας Tubificidae, τα οποία δεν αναπαράγονται με κατάτμηση.

Επομένως, θα πρέπει να πραγματοποιείται συγχρονισμός για την ελαχιστοποίηση της μη ελεγχόμενης αναπαραγωγής και αναγέννησης και, κατ' επέκταση, της υψηλής μεταβλητότητας στα αποτελέσματα δοκιμής. Η εν λόγω μεταβλητότητα μπορεί να προκύψει, όταν ορισμένα άτομα, τα οποία έχουν υποστεί κατάτμηση και επομένως δεν τρέφονται για ορισμένη χρονική περίοδο, είναι λιγότερο εκτεθειμένα στην υπό δοκιμή ουσία σε σχέση με άλλα άτομα, τα οποία δεν υφίστανται κατάτμηση κατά τη διάρκεια της δοκιμής, π.χ. (38). Οι σκώληκες θα πρέπει να υφίστανται τεχνητή κατάτμηση 10 έως 14 ημέρες πριν από την έναρξη της έκθεσης (συγχρονισμός) (65). Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μεγάλοι σκώληκες, οι οποίοι κατά προτίμηση δεν εμφανίζουν σημάδια πρόσφατης κατάτμησης. Αυτοί οι σκώληκες μπορούν να τοποθετούνται σε γυάλινες αντικειμενοφόρες πλάκες σε μια σταγόνα νερού καλλιέργειας και να διατέμνονται στην περιοχή του μέσου σώματος με ένα νυστέρι. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε τα οπίσθια άκρα να είναι παρόμοιου μεγέθους. Στη συνέχεια, τα οπίσθια άκρα θα πρέπει να παραμένουν για να αναγεννηθούν νέα κεφάλια μέσα σε ένα δοχείο καλλιέργειας που περιέχει το ίδιο υπόστρωμα με αυτό που χρησιμοποιείται στην καλλιέργεια και ανασυσταθέν νερό μέχρι την έναρξη της έκθεσης. Η αναγέννηση νέων κεφαλιών υποδεικνύεται από το φώλιασμα των συγχρονισμένων σκωλήκων μέσα στο υπόστρωμα (η παρουσία αναγεννημένων κεφαλιών μπορεί να επιβεβαιώνεται με επιθεώρηση ενός αντιπροσωπευτικού επιμέρους δείγματος με διοφθάλμιο μικροσκόπιο). Μετά τη διαδικασία αυτή, οι οργανισμοί δοκιμής αναμένεται ότι βρίσκονται σε παρόμοια φυσιολογική κατάσταση. Αυτό σημαίνει ότι όταν προκύψει αναγέννηση μέσω μορφάλλαξης σε συγχρονισμένους σκώληκες κατά τη διάρκεια της δοκιμής, αναμένεται ότι σχεδόν όλα τα ζώα θα είναι εκτεθειμένα εξίσου στο εμβολιασμένο ίζημα. Η σίτιση των συγχρονισμένων σκωλήκων θα πρέπει να πραγματοποιείται μία φορά μόλις οι σκώληκες αρχίσουν να φωλιάζουν στο υπόστρωμα ή 7 ημέρες μετά τη διατομή τους. Το καθεστώς σίτισης θα πρέπει να είναι συγκρίσιμο με αυτό των κανονικών καλλιεργειών, ωστόσο ίσως θα ήταν σκόπιμο να γίνεται σίτιση των συγχρονισμένων σκωλήκων με την ίδια πηγή τροφής με αυτήν που θα χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή. Οι σκώληκες θα πρέπει να διατηρούνται στη θερμοκρασία δοκιμής, στους 20 ± 2 °C. Μετά την αναγέννηση, για τη δοκιμή θα πρέπει να χρησιμοποιούνται άθικτοι ολόκληροι σκώληκες παρόμοιου μεγέθους, που κολυμπούν ή σέρνονται ενεργά μετά από ήπιο μηχανικό ερέθισμα. Θα πρέπει να αποφεύγονται οι τραυματισμοί ή η αυτοτομία των σκωλήκων, π.χ. με τη χρήση σιφωνίων με άκρα που έχουν υποστεί γυάλισμα με φλόγα ή βελονών από ανοξείδωτο χάλυβα για τον χειρισμό των σκωλήκων.

Όταν χρησιμοποιείται το είδος *Lumbriculus variegatus* στη δοκιμή, λόγω του ειδικού τρόπου αναπαραγωγής του, αναμένεται αύξηση στον αριθμό των σκωλήκων κατά τη διάρκεια της δοκιμής, εάν οι συνθήκες είναι κατάλληλες (6). Η απουσία αναπαραγωγής σε δοκιμή βιοσυσσώρευσης με το *L. variegatus* θα πρέπει να καταγράφεται και να λαμβάνεται υπόψη κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμής.

***Branchiura sowerbyi* (BEDDARD), Tubificidae, Oligochaeta (δεν έχει επιβεβαιωθεί σε κυκλική δοκιμή)**

Το είδος *Branchiura sowerbyi* απαντάται σε διάφορους τύπους ιζημάτων σε ταμιευτήρια, λίμνες και ποτάμια, αρχικά σε τροπικές περιοχές. Συναντάται επίσης σε θερμές υδάτινες μάζες του βορείου ημισφαιρίου. Ωστόσο, υπάρχει

▼M6

σε μεγαλύτερη αφθονία σε λασπώδη-αργιλώδη ιζήματα υψηλής περιεκτικότητας σε οργανική ύλη. Επιπλέον, οι σκώληκες διαβιούν στο στρώμα του ιζήματος. Ακόμη και το οπίσθιο άκρο των σκωλήκων είναι συνήθως φωλιασμένο. Το είδος αυτό αναγνωρίζεται εύκολα από τα βραγχιακά νημάτια στο οπίσθιο τμήμα του. Τα ενήλικα άτομα μπορούν να φτάσουν σε μήκος 9-11 cm και υγρό βάρος 40-50 mg. Οι σκώληκες έχουν υψηλό ρυθμό αναπαραγωγής και εμφανίζουν χρόνους διπλασιασμού του πληθυσμού μικρότερους από 2 εβδομάδες κάτω από τις συνθήκες θερμοκρασίας και σίτισης που περιγράφονται παρακάτω (Aston κ.α., 1982, (65)). Το είδος *B. sowerbyi* έχει χρησιμοποιηθεί σε μελέτες τοξικότητας και βιοσυσσώρευσης (Marchese και Brinkhurst 1996, (31) Roghair κ.α. 1996, (67) αντίστοιχα).

Μέθοδοι καλλιέργειας

Μια σύνοψη των συνθηκών καλλιέργειας για το *Branchiura sowerbyi* παρέχεται παρακάτω (παρέχεται από τους Mercedes R. Marchese, INALI, Αργεντινή και Carla J. Roghair, RIVM, Κάτω Χώρες).

Δεν απαιτείται μία μοναδική τεχνική για την καλλιέργεια των οργανισμών δοκιμής. Οι οργανισμοί μπορούν να καλλιεργούνται με τη χρήση μη μολυσμένου, φυσικού ιζήματος (31). Η πρακτική εμπειρία δείχνει ότι ένα μέσο που αποτελείται από φυσικό ίζημα και άμμο βελτιώνει την κατάσταση των σκωλήκων σε σύγκριση με καθαρό φυσικό ίζημα (32)(67). Για την καλλιέργεια μπορούν να χρησιμοποιούνται ποτήρια ζέσεως 3 L που περιέχουν 1 500 ml μέσο ιζήματος/νερού, το οποίο αποτελείται από 375 ml φυσικού μη μολυσμένου ιζήματος (περίπου 10 % ολικού οργανικού άνθρακα, περίπου 17 % σωματιδίων ≤ 63 μm), 375 ml καθαρής άμμου (M32) και 750 ml ανασυσταθέντος ή αποχλωριωμένου νερού βρύσης (31)(32)(67). Μπορούν να χρησιμοποιούνται και χαρτιά ως υπόστρωμα για την καλλιέργεια, αλλά η ανάπτυξη του πληθυσμού είναι χαμηλότερη σε σχέση με το φυσικό ίζημα. Σε ημιστατικά συστήματα, το στρώμα νερού στο ποτήρι ζέσεως αερίζεται αργά και το υπερκείμενο νερό θα πρέπει να ανανεώνεται εβδομαδιαίως.

Κάθε ποτήρι ζέσεως περιέχει 25 νεαρούς σκώληκες για αρχή. Μετά από δύο μήνες, επιλέγονται οι μεγάλοι σκώληκες από το ίζημα με λαβίδα και τοποθετούνται σε ένα νέο ποτήρι ζέσεως με προσφάτως παρασκευασμένο μέσο ιζήματος/νερού. Το παλιό ποτήρι ζέσεως περιέχει επίσης κουκούλια και νεαρούς σκώληκες. Με αυτόν τον τρόπο, μπορούν να συλλέγονται έως 400 νεαροί σκώληκες ανά ποτήρι ζέσεως. Οι ενήλικες σκώληκες μπορούν να χρησιμοποιούνται για αναπαραγωγή για τουλάχιστον έναν χρόνο.

Οι καλλιέργειες θα πρέπει να διατηρούνται σε θερμοκρασία από 21 έως 25 °C. Οι διακυμάνσεις στη θερμοκρασία θα πρέπει να διατηρούνται κάτω από τους ± 2 °C. Ο χρόνος που απαιτείται για την εμβρυϊκή ανάπτυξη από τη γέννηση ενός αυγού μέχρι τα νεαρά άτομα να βγουν από το κουκούλι είναι περίπου τρεις εβδομάδες στους 25 °C. Η παραγωγή αυγών που λαμβάνονται από κάθε επιζώντα σκώληκα στο είδος *B. sowerbyi* βρέθηκε ότι κυμαίνεται από 6,36 (31) έως 11,2 (30) σε λάσπη στους 25 °C. Ο αριθμός των αυγών ανά κουκούλι κυμαίνεται από 1,8 έως 2,8 (66)(69) ή έως 8 (68).

Το διαλυμένο οξυγόνο, η σκληρότητα του νερού, η θερμοκρασία και το pH θα πρέπει να μετρώνται εβδομαδιαίως. Μπορεί να προστίθεται τροφή για ψάρια (π.χ. TetraMin®) ως εναιώρημα δύο ή τρεις φορές την εβδομάδα, κατά βούληση. Οι σκώληκες μπορούν επίσης να σιτίζονται με αποψυγμένο μαρούλι, κατά βούληση.

Ένα μεγάλο πλεονέκτημα αυτού του είδους είναι η υψηλή ατομική βιομάζα (έως 40-50 mg υγρό βάρος ανά άτομο). Επομένως, αυτό το είδος μπορεί να χρησιμοποιείται για τη δοκιμή της βιοσυσσώρευσης μη ραδιοσημασμένων υπό δοκιμή ουσιών. Μπορεί να υποβάλλεται σε έκθεση στα συστήματα που χρησιμοποιούνται για το *T. tubifex* ή το *L. variegatus* με ένα μόνο άτομο ανά επανάληψη (11). Ωστόσο, θα πρέπει στη συνέχεια να αυξάνεται ο αριθμός των επαναλήψεων, εκτός εάν χρησιμοποιούνται μεγαλύτεροι θάλαμοι δοκιμής (11). Επίσης, το κριτήριο εγκυρότητας που σχετίζεται με τη συμπεριφορά φωλιάσματος πρέπει να προσαρμόζεται για αυτό το είδος.

▼**M6**

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Τόμος 11.05. Biological Effects and Environmental Fate, Biotechnology, Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(2) European Commission (EC) (2003). Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market, Μέρη I — IV. Υπηρεσία Επισήμων Εκδόσεων των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων (Ευρωπαϊκή Επιτροπή), Λουξεμβούργο.

(3) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs Αρ. 60. Οργανισμός Οικονομικής Συνεργασίας και Ανάπτυξης (ΟΟΣΑ), Παρίσι.

(4) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. και Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.

(5) Κεφάλαιο Γ.13 του παρόντος παραρτήματος, Δοκιμή βιοσυγκέντρωσης με σύστημα συνεχούς ροής νερού σε ψάρια.

(6) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Δεύτερη έκδοση. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, Μάρτιος 2000.

(7) Κεφάλαιο Γ.27 του παρόντος παραρτήματος, Δοκιμή τοξικότητας σε χειρονομίδες σε σύστημα ιζήματος-νερού με τη χρήση εμβολιασμένου ιζήματος

(8) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. και Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835-852.

(9) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty. J. και Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of nonionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, Lumbriculus variegatus. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872-885.

(10) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. και Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete Lumbriculus variegatus for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.

(11) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. και Studinger, G. (1999). Συνάντηση εργασίας με θέμα «Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes», 26.-27.04.1999, Hochheim/Main, Γερμανία. Αναφορά για το έργο R+D Αρ. 298 67 419, Umweltbundesamt, Βερολίνο.

(12) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. και Gilberg, D. (2006). Validation of a sediment bioaccumulation test with endobenthic aquatic oligochaetes by an international ring test. Αναφορά στην Ομοσπονδιακή Υπηρεσία Περιβάλλοντος (Umweltbundesamt Dessau), R&D Αρ.: 202 67 437.

(13) Kelly, J.R., Levine, S.N., Buttel, L.A., Kelly, A.C., Rudnick, D.T. και Morton, R.D. (1990). Effects of tributyltin within a Thalassia seagrass ecosystem. Estuaries 13, 301-310.

▼**M6**

(14) Nendza M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log Kow/log BCF correlations. Στο: R. Nagel και R. Loskill (εκδ.): Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the assessment. Proceedings of an international workshop, Βερολίνο 1990. VCH, Weinheim

(15) Landrum, P.F., Lee II, H., και Lydy, M.J. (1992). Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. Environ. Toxicol. Chem. 11, 1709-1725.

(16) Markwell, R.D., Connell, D.W. και Gabric, A.J. (1989). Bioaccumulation of lipophilic compounds from sediments by oligochaetes. Wat. Res. 23, 1443-1450.

(17) Gabric, A.J., Connell, D.W. και Bell, P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24, 1225-1231.

(18) Kukkonen, J. και Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to Lumbriculus variegatus (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.

(19) Franke, C., Studinger, G., Berger, G., Böhling, S., Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D. και Jöhncke, U. (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29, 1501-1514.

(20) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Αρ. 23.

(21) U.S. EPA (1996). Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1000. Δημόσιο προσχέδιο. EPA 712-C-96-113. U.S. Environmental Protection Agency.

(22) Τα ακόλουθα κεφάλαια του παρόντος παραρτήματος:

Κεφάλαιο Α.4, Τάση ατμών

Κεφάλαιο Α.5, Επιφανειακή τάση

Κεφάλαιο Α.6, Υδατοδιαλυτότητα

Κεφάλαιο Α.8, Συντελεστής κατανομής, μέθοδος ανακινούμενης φιάλης

Κεφάλαιο Α.24, Συντελεστής κατανομής, μέθοδος HPLC

Κεφάλαιο Γ.7, Αποικοδόμηση — Αβιοτική αποικοδόμηση: υδρόλυση συναρτήσει του pH

Κεφάλαιο Γ.4 Α-ΣΤ Προσδιορισμός άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας

Κεφάλαιο Γ.19, Υπολογισμός του συντελεστή προσρόφησης (Koc) του εδάφους και της λάσπης των υπονόμων με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).

Κεφάλαιο Γ.29, Άμεση βιοαποικοδομησιμότητα CO_2 σε σφραγισμένα δοχεία

(23) OECD (1996). Direct Phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals Αρ. 3. ΟΟΣΑ, Παρίσι.

(24) Antoine, M.D., Dewanathan, S. και Patonay, G. (1991). Determination of critical micelles concentration of surfactants using a near-infrared hydrophobicity probe. Microchem. J. 43, 165-172.

▼**M6**

(25) Beek, B., S. Boehling, U. Bruckmann, C. Franke, U. Joehncke και G. Studinger (2000). The assessment of bioaccumulation. Στο Hutzinger, O. (εκδότης), The Handbook of Environmental Chemistry, Τόμος 2 Μέρος K (Εκδότης τόμου: B. Beek): Bioaccumulation — New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.

(26) Spacie, A. και Hamelink, J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309-320.

(27) Hawker, D.W. και Connell, D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Wat. Res. 22, 701-707.

(28) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. και Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed Lumbriculus variegatus. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191-201.

(29) Reynoldson, T.B., Thompson, S.P. και Bamsey, J.L. (1991). A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm Tubifex tubifex. Environ. Toxicol. Chem. 10, 1061-1072.

(30) Aston, R.J. και Milner, A.G.P. (1981). Conditions for the culture of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta: Tubificidae) in activated sludge. Aquaculture 26, 155-160.

(31) Marchese, M.R. και Brinkhurst, R.O. (1996). A comparison of two tubificid species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. Hydrobiologia 334, 163-168.

(32) Roghair, C.J. και Buijze, A. (1994). Development of sediment toxicity tests. IV. A bioassay to determine the toxicity of field sediments to the oligochaete worm Branchiura sowerbyi. Έκθεση RIVM 719102027.

(33) Κεφάλαιο Γ.1 του παρόντος παραρτήματος, Δοκιμή οξείας τοξικότητας σε ψάρια.

(34) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals Αρ. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. ΟΟΣΑ, Παρίσι.

(35) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. και Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of Limnodrilus hoffmeisteri using two different methods. Hydrobiologia 11, 181-184.

(36) Leppänen, M.T. και Kukkonen, J.V.K. 1998: Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete Lumbriculus variegatus (Müller). Hydrobiologia 377: 183-194.

(37) Leppänen, M.T. και Kukkonen, J.V.K. 1998: Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of Lumbriculus variegatus (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

(38) Leppänen, M.T. και Kukkonen, J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (Lumbriculus variegatus, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503-1508.

(39) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. και Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. Tubifex tubifex (Müller) reproduction sediment bioassay. Ecotoxicology 8, 111-124.

▼**M6**

(40) Κεφάλαιο Γ.8 του παρόντος παραρτήματος, Δοκιμή οξείας τοξικότητας σε γαιοσκώληκες.

(41) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(42) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod Pontoporeia hoyi. Environ. Sci. Toxicol. 23, 588-595.

(43) Poddubnaya, T.L. (1980). Life cycles of mass species of Tubificidae (Oligochaeta). Στο: R.O. Brinkhurst και D.G. Cook (εκδ.): Aquatic Oligochaeta Biology, 175-184. Plenum Press, Νέα Υόρκη.

(44) ASTM (1998). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing. Αμερικανική εταιρεία δοκιμών και υλικών, E 1391-94.

(45) Hooftman, R.N., van de Guchte, K. και Roghair, C.J. (1993). Development of ecotoxicological test systems to assess contaminated sediments. Κοινή έκθεση αρ. 1: Acute and (sub)chronic tests with the model compound chlorpyrifos. RIVM-719102022.

(46) Franke, C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? Chemosphere 32, 1897-1905.

(47) Mount, D.R., Dawson, T.D. και Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with Lumbriculus variegatus. Environ. Toxicol. Chem. 18, 1244-1249.

(48) Randall, R.C., Lee II, H., Ozretich, R.J., Lake, J.L. και Pruell, R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10, 1431-1436.

(49) Gardner, W.S., Frez, W.A., Cichocki, E.A. και Parrish, C.C. (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography, 30, 1099-1105.

(50) Bligh, E.G. και Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917.

(51) De Boer, J., Smedes, F., Wells, D. και Allan, A. (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Κύκλος 1 SBT-2. Άσκηση 1000. EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

(52) Kristensen, P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods, influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Δανία.

(53) Zok, S., Görge, G., Kalsch, W. και Nagel, R. (1991). Bioconcentration, metabolism and toxicity of substituted anilines in the zebrafish (Brachydanio rerio). Sci. Total Environment 109/110, 411-421

(54) Nagel, R. (1988). Umweltchemikalien und Fische — Beiträge zu einer Bewertung. Habilitationsschrift, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Γερμανία.

(55) Janssen, M.P.M., A Bruins, T.H. De Vries και Van Straalen, N.M. (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305-312.

(56) Van Brummelen, T.C. και Van Straalen, N.M. (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod Porcellio scaber. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277-285.

▼**M6**

(57) Sterenborg, I., Vork, N.A., Verkade, S.K., Van Gestel, C.A.M. και Van Straalen, N.M. (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail Orchesella cincta. Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167-1171.

(58) Suedel, B.C. και Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1163-1175.

(59) Wachs, B. (1967). Die Oligochaeten-Fauna der Fließgewässer unter besonderer Berücksichtigung der Beziehung zwischen der Tubificiden-Besiedlung und dem Substrat. Arch. Hydr. 63, 310-386.

(60) Oliver, B. G. (1987). Biouptake of chlorinated hydrocarbons from laboratory-spiked and field sediments by oligochaete worms. Environ. Sci. Technol. 21, 785-790.

(61) Chapman, P.M., Farrell, M.A. και Brinkhurst, R.O. (1982α). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, 47-67.

(62) Chapman, P.M., Farrell, M.A. και Brinkhurst, R.O. (1982β). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to combinations of pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, 69-78.

(63) Rodriguez, P. και Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. Στο: A. Mudroch, J.M. Azcue και P. Mudroch (εκδ.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.

(64) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. Αριθ. 22.

(65) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. και Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete Lumbriculus variegatus by an international ring test. Σε συνεργασία με τους R. Nagel και B. Karaoglan. Έκθεση προς την Ομοσπονδιακή Υπηρεσία Περιβάλλοντος (Umweltbundesamt Berlin), R&D Αριθ.: 202 67 429.

(66) Aston, R.J., Sadler, K. και Milner, A.G.P. (1982). The effect of temperature on the culture of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta: Tubificidae) on activated sludge. Aquaculture 29, 137-145.

(67) Roghair, C.J., Buijze, A., Huys, M.P.A., Wolters-Balk, M.A.H., Yedema, E.S.E. και Hermens, J.L.M. (1996). Toxicity and toxicokinetics for benthic organisms, II: QSAR for base-line toxicity to the midge Chironomus riparius and the tubificid oligochaete worm Branchiura sowerbyi. Έκθεση RIVM 719101026.

(68) Aston, R.J. (1984). The culture of Branchiura sowerbyi (Tubificidae, Oligochaeta) using cellulose substrate. Aquaculture 40, 89-94.

(69) Bonacina, C., Pasteris, A., Bonomi, G. και Marzuoli, D. (1994). Quantitative observations on the population ecology of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta, Tubificidae). Hydrobiologia, 278, 267-274.

▼M7

Γ.47. ΔΟΚΙΜΉ ΤΟΞΙΚΌΤΗΤΑΣ ΣΤΑ ΑΡΧΙΚΆ ΣΤΆΔΙΑ ΖΩΉΣ ΤΩΝ ΨΑΡΙΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 210 του ΟΟΣΑ (2013). Σκοπός των δοκιμών στα αρχικά στάδια ζωής των ψαριών είναι να καθοριστούν οι θανατηφόρες και οι υποθανατηφόρες επιδράσεις των χημικών ουσιών στα υπό δοκιμή στάδια ζωής και είδη. Οι δοκιμές αυτές παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες για την εκτίμηση των χρόνιων θανατηφόρων και υποθανατηφόρων επιδράσεων των χημικών ουσιών σε άλλα είδη ψαριών.

2. Η κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 210 βασίζεται σε πρόταση του Ηνωμένου Βασιλείου, η οποία συζητήθηκε σε συνεδρίαση εμπειρογνωμόνων του ΟΟΣΑ που πραγματοποιήθηκε στο Medmenham (Ηνωμένο Βασίλειο) τον Νοέμβριο του 1988 και επικαιροποιήθηκε περαιτέρω το 2013 για να αποτυπωθούν η εμπειρία από τη χρήση της δοκιμής και οι συστάσεις που διατυπώθηκαν στην ημερίδα του ΟΟΣΑ για τις δοκιμές ιχθυοτοξικότητας, του Σεπτεμβρίου του 2010 (1).

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

3. Τα ψάρια εκτίθενται κατά τα αρχικά στάδια της ζωής τους σε ένα εύρος συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που έχει διαλυθεί σε νερό. Προτιμώνται οι συνθήκες συνεχούς ροής· εάν, ωστόσο, αυτό δεν είναι εφικτό, είναι αποδεκτές οι ημιστατικές συνθήκες. Περισσότερες λεπτομέρειες θα πρέπει να αναζητηθούν στο έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ σχετικά με τις δοκιμές υδατικής τοξικότητας δύσκολων ουσιών και μειγμάτων (2). Η δοκιμή αρχίζει με την τοποθέτηση γονιμοποιημένων αυγών σε δοκιμαστικούς θαλάμους και συνεχίζεται για την ειδική ανά είδος χρονική περίοδο που απαιτείται για να φθάσουν τα ψάρια-μάρτυρες σε νεαρή ηλικία. Οι θανατηφόρες και υποθανατηφόρες επιδράσεις αξιολογούνται και συγκρίνονται με τις τιμές των μαρτύρων για να προσδιοριστεί η κατώτατη συγκέντρωση στην οποία παρατηρούνται επιπτώσεις (LOEC) με σκοπό να προσδιοριστούν i) η συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC) και/ή ii) η ECx (π.χ. EC10, EC50) με τη χρήση μοντέλου παλινδρόμησης ώστε να εκτιμηθεί η συγκέντρωση που θα προκαλούσε μεταβολή x % στη μετρούμενη επίδραση. Η αναφορά των σχετικών συγκεντρώσεων και παραμέτρων με επίδραση μπορεί να εξαρτάται από το κανονιστικό πλαίσιο. Οι συγκεντρώσεις της δοκιμής θα πρέπει να περικλείουν την ECx, έτσι ώστε αυτή να προκύπτει από παρεμβολή και όχι από προεκβολή (βλ. προσάρτημα 1 για ορισμούς).

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

4. Με τον όρο υπό δοκιμή χημική ουσία νοείται το δοκίμιο. Θα πρέπει να είναι γνωστές η υδατοδιαλυτότητα (βλ. κεφάλαιο Α.6 του παρόντος παραρτήματος) και η τάση ατμών (βλ. κεφάλαιο Α.4 του παρόντος παραρτήματος) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και να υπάρχει αξιόπιστη αναλυτική μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της χημικής ουσίας στα διαλύματα της δοκιμής, της οποίας η ακρίβεια και το όριο ποσοτικού προσδιορισμού να είναι γνωστά και δημοσιευμένα. Αν και δεν είναι απαραίτητα για τη διεξαγωγή της δοκιμής, τα αποτελέσματα δοκιμής οξείας τοξικότητας (βλ. κεφάλαιο Γ.1 ή Γ.49 του παρόντος παραρτήματος), κατά προτίμηση στα ίδια είδη με αυτά που έχουν επιλεγεί για την παρούσα δοκιμή, μπορούν να παράσχουν χρήσιμες πληροφορίες.

5. Εάν η μέθοδος δοκιμής χρησιμοποιείται για τη δοκιμή μείγματος, θα πρέπει να περιγράφεται, στο μέτρο του δυνατού, η σύνθεσή του, π.χ. μέσω της χημικής ταυτότητας των συστατικών του, των ποσοτήτων στις οποίες απαντούν, καθώς και των ειδικών ανά ουσία ιδιοτήτων τους (όπως εκείνες που αναφέρονται ανωτέρω). Πριν από τη χρήση της μεθόδου δοκιμών για δοκιμές μείγματος στο πλαίσιο κανονιστικών ρυθμίσεων, θα πρέπει να εξετάζεται κατά πόσον οι εν λόγω δοκιμές θα παράσχουν αποδεκτά αποτελέσματα για τον επιδιωκόμενο από τις κανονιστικές ρυθμίσεις σκοπό.

6. Στις χρήσιμες πληροφορίες περιλαμβάνονται ο συντακτικός τύπος, η καθαρότητα της ουσίας, η υδατοδιαλυτότητα, η σταθερότητα στο νερό και το φως, οι τιμές pK_a, P_{ow}, καθώς και αποτελέσματα δοκιμής άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας (π.χ. κεφάλαιο Γ.4 ή Γ.9 του παρόντος παραρτήματος).

▼M7

ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

7. Οι προϋποθέσεις εγκυρότητας της δοκιμής είναι οι ακόλουθες:

— η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου θα πρέπει να είναι > 60 % της τιμής κορεσμού με αέρα σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής·

— η θερμοκρασία του νερού θα πρέπει να μη διαφέρει περισσότερο από ± 1,5 °C μεταξύ δοκιμαστικών θαλάμων ή μεταξύ διαδοχικών ημερών οποιαδήποτε στιγμή κατά τη διάρκεια της δοκιμής και να περικλείεται στο εύρος θερμοκρασιών που ορίζεται για το εκάστοτε είδος ψαριού (προσάρτημα 2).

— η αναλυτική μέτρηση των συγκεντρώσεων της δοκιμής είναι υποχρεωτική.

— η συνολική επιβίωση των γονιμοποιημένων αυγών και η επιτυχία μετά την εκκόλαψη στους μάρτυρες και, κατά περίπτωση, στους μάρτυρες με διαλύτη θα πρέπει να είναι ανώτερες ή ίσες με τις οριακές τιμές που καθορίζονται στο προσάρτημα 2.

8. Εάν παρατηρηθεί ήσσονος σημασίας απόκλιση από τα κριτήρια εγκυρότητας, οι συνέπειες θα πρέπει να εκτιμώνται σε σχέση με την αξιοπιστία των δεδομένων της δοκιμής και οι εκτιμήσεις αυτές θα πρέπει να περιλαμβάνονται στην έκθεση. Οι επιδράσεις στην επιβίωση, την εκκόλαψη ή την ανάπτυξη που εμφανίζονται στους μάρτυρες με διαλύτη, σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, θα πρέπει να αναφέρονται και να συζητούνται στο πλαίσιο της αξιοπιστίας των δεδομένων της δοκιμής.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Δοκιμαστικοί θάλαμοι

9. Μπορεί να χρησιμοποιείται οποιοδήποτε δοχείο από γυαλί, ανοξείδωτο χάλυβα ή άλλο χημικώς αδρανές υλικό. Επειδή είναι γνωστό ότι η σιλικόνη έχει μεγάλη ικανότητα απορρόφησης λιπόφιλων ουσιών, η χρήση σωλήνων από σιλικόνη σε μελέτες συνεχούς ροής και παρεμβυσμάτων σιλικόνης που έρχονται σε επαφή με το νερό θα πρέπει να ελαχιστοποιείται με τη χρησιμοποίηση π.χ. ολόσωμων ενυδρείων από γυαλί. Οι διαστάσεις των δοχείων θα πρέπει να είναι αρκετά μεγάλες ώστε να είναι δυνατή η σωστή ανάπτυξη στους μάρτυρες, η διατήρηση της συγκέντρωσης διαλυμένου οξυγόνου (π.χ. για τα είδη μικρών ψαριών, αυτό επιτυγχάνεται με δεξαμενή χωρητικότητας 7 L) και η συμμόρφωση με τα κριτήρια πληθυσμιακού φόρτου που ορίζονται στην παράγραφο 19. Είναι σκόπιμο να τοποθετούνται οι δοκιμαστικοί θάλαμοι με τυχαίο τρόπο στον χώρο εκτέλεσης των δοκιμών. Είναι προτιμότερος ο τυχαιοποιημένος σχεδιασμός κατά ομάδες (randomised block design), όπου κάθε ομάδα περιλαμβάνει όλες τις μεταχειρίσεις, αντί του πλήρως τυχαιοποιημένου σχεδιασμού (completely randomised design). Οι δοκιμαστικοί θάλαμοι θα πρέπει να προστατεύονται από ανεπιθύμητη διατάραξη. Το σύστημα της δοκιμής θα πρέπει κατά προτίμηση να εγκλιματίζεται με συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας για επαρκές χρονικό διάστημα προκειμένου να καταδεικνύονται σταθερές συγκεντρώσεις έκθεσης πριν από την εισαγωγή των υπό δοκιμή οργανισμών.

Επιλογή είδους

10. Τα είδη ψαριών που συνιστώνται για τη δοκιμή παρατίθενται στον πίνακα 1. Η σύσταση αυτή δεν αποκλείει τη χρήση άλλων ειδών, αρκεί η διαδικασία δοκιμής να προσαρμοστεί με τρόπο ώστε να επιτευχθούν οι κατάλληλες συνθήκες δοκιμής. Στην περίπτωση αυτή θα πρέπει να αναφέρεται η αιτιολογία της επιλογής του είδους και της πειραματικής μεθόδου.

Διατήρηση των γεννητόρων

11. Λεπτομέρειες σχετικά με τη διατήρηση των γεννητόρων υπό ικανοποιητικές συνθήκες μπορούν να αναζητηθούν στο προσάρτημα 3 και στις βιβλιογραφικές παραπομπές (3), (4) και (5).

Χειρισμός των γονιμοποιημένων αυγών, των εμβρύων και προνυμφών

12. Αρχικά, τα γονιμοποιημένα αυγά, τα έμβρυα και οι προνύμφες μπορούν να εκτεθούν στο εσωτερικό του βασικού δοχείου τοποθετημένα σε μικρότερα

▼M7

δοχεία από γυαλί ή ανοξείδωτο χάλυβα, εξοπλισμένα με πλευρές ή απολήξεις από πλέγμα, ώστε να είναι δυνατή η ροή του διαλύματος της δοκιμής μέσω του δοχείου. Είναι δυνατόν να προκληθεί συνεχής μη τυρβώδης ροή στα μικρά αυτά δοχεία, εάν αναρτηθούν από βραχίονα ο οποίος τα ανεβοκατεβάζει κατά τρόπο ώστε οι οργανισμοί να παραμένουν συνεχώς μέσα στο νερό. Τα γονιμοποιημένα αυγά σολομονιδών μπορούν να τοποθετηθούν σε σχάρες ή πλέγματα με ανοίγματα αρκετά μεγάλα ώστε οι προνύμφες να μπορούν να διέλθουν από αυτά μετά την εκκόλαψη.

13. Όταν χρησιμοποιούνται δοχεία, σχάρες ή πλέγματα για τη συγκράτηση των αυγών εντός του βασικού δοκιμαστικού δοχείου, πρέπει να αφαιρούνται μετά την εκκόλαψη των προνυμφών, σύμφωνα με τις οδηγίες του προσαρτήματος 3, εκτός από τα πλέγματα που χρειάζονται για να μη διαφεύγουν οι προνύμφες. Εάν είναι αναγκαίο να μεταφερθούν οι προνύμφες, θα πρέπει να μην εκτίθενται στον αέρα και να μη χρησιμοποιούνται δίχτυα για την ελευθέρωση των προνυμφών από τα δοχεία που περιέχουν τα αυγά. Η χρονική στιγμή της μεταφοράς εξαρτάται από το είδος και θα πρέπει να τεκμηριώνεται στην έκθεση. Ωστόσο, δεν είναι πάντοτε αναγκαία η μεταφορά.

Νερό

14. Ως νερό δοκιμής μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε νερό στο οποίο το υπό δοκιμή είδος εμφανίζει την ενδεδειγμένη μακρόχρονη επιβίωση και ανάπτυξη (βλ. προσάρτημα 4). Κατά τη διάρκεια της δοκιμής το νερό θα πρέπει να είναι σταθερής ποιότητας. Για να είναι βέβαιο ότι το νερό αραίωσης δεν θα επηρεάσει δυσμενώς το αποτέλεσμα της δοκιμής (π.χ. σχηματίζοντας σύμπλοκα με την υπό δοκιμή χημική ουσία) ούτε τις επιδόσεις των γεννητόρων, θα πρέπει κατά διαστήματα να λαμβάνονται δείγματα για ανάλυση. Όταν είναι γνωστό ότι η ποιότητα του νερού αραίωσης είναι σχετικά σταθερή, θα πρέπει, π.χ. κάθε έξι μήνες, να γίνονται μετρήσεις βαρέων μετάλλων (π.χ. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), βασικών ανιόντων και κατιόντων (π.χ. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), αμμωνίας, ολικών υπολειμμάτων χλωριούχων γεωργικών φαρμάκων, ολικού οργανικού άνθρακα και αιωρούμενων στερεών. Εάν είναι γνωστό ότι η ποιότητα του νερού είναι μεταβλητή, οι μετρήσεις πρέπει να διεξάγονται συχνότερα· η συχνότητα των μετρήσεων εξαρτάται από τη μεταβλητότητα της ποιότητας. Ορισμένα χημικά χαρακτηριστικά αποδεκτού νερού αραίωσης απαριθμούνται στο προσάρτημα 4.

Διαλύματα της δοκιμής

15. Στις δοκιμές συνεχούς ροής, για την παροχή σειράς συγκεντρώσεων στους δοκιμαστικούς θαλάμους απαιτείται σύστημα το οποίο να διανέμει και να αραιώνει συνεχώς ένα διάλυμα παρακαταθήκης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (π.χ. δοσιμετρική αντλία, αναλογικός αραιωτής, σύστημα κορεσμού). Οι ρυθμοί παροχής των διαλυμάτων παρακαταθήκης και του νερού αραίωσης θα πρέπει να ελέγχονται κατά διαστήματα κατά τη διάρκεια της δοκιμής και να μη μεταβάλλονται κατά περισσότερο από 10 % καθ' όλη τη διάρκειά της. Θεωρείται κατάλληλη μια τιμή παροχής ισοδύναμη με τουλάχιστον πέντε όγκους δοκιμαστικού θαλάμου ανά 24ωρο (3). Ωστόσο, εάν τηρείται ο πληθυσμιακός φόρτος που ορίζεται στην παράγραφο 19, χαμηλότερη παροχή, π.χ. 2-3 όγκοι δοκιμαστικών θαλάμων, μπορεί να αποτρέψει την ταχεία απομάκρυνση της τροφής.

16. Τα διαλύματα της δοκιμής με τις επιλεγμένες συγκεντρώσεις παρασκευάζονται με αραίωση διαλύματος παρακαταθήκης. Το διάλυμα παρακαταθήκης θα πρέπει, κατά προτίμηση, να παρασκευάζεται με απλή ανάμειξη ή ανακίνηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε νερό αραίωσης, με μηχανικά μέσα (π.χ. ανάδευση και/ή υπερήχους). Για να επιτευχθεί κατάλληλο πυκνό διάλυμα παρακαταθήκης, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν στήλες κορεσμού (στήλες διαλυτότητας) ή παθητικές δοσιμετρικές μέθοδοι (6). Δεν συνιστάται η χρήση φορέα διαλύτη. Ωστόσο, σε περίπτωση που απαιτείται διαλύτης, θα πρέπει να υποβάλλεται παράλληλα στη διαδικασία ένας μάρτυρας με διαλύτη, στην ίδια συγκέντρωση διαλύτη όπως στις ομάδες μεταχείρισης με τη χημική ουσία· δηλ. το επίπεδο του διαλύτη θα πρέπει, κατά προτίμηση, να είναι ίσο σε όλες τις συγκεντρώσεις, καθώς και στον μάρτυρα με διαλύτη. Για ορισμένα συστήματα αραιωτή, αυτό μπορεί να είναι δύσκολο από τεχνική άποψη· στην προκειμένη περίπτωση, η συγκέντρωση του διαλύτη στον μάρτυρα με διαλύτη θα πρέπει να ισούται με τη μέγιστη συγκέντρωση του διαλύτη στην ομάδα μεταχείρισης. Για ουσίες που είναι δύσκολο να υποβληθούν σε δοκιμή, οι ενδιαφερόμενοι θα πρέπει να ανατρέξουν στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 23

▼M7

του ΟΟΣΑ σχετικά με τις δοκιμές υδατικής τοξικότητας δύσκολων ουσιών και μειγμάτων (2). Εάν χρησιμοποιείται διαλύτης, η επιλογή του καθορίζεται με βάση τις χημικές ιδιότητες της χημικής ουσίας. Το έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 23 του ΟΟΣΑ συνιστά μέγιστη συγκέντρωση 100 μl/l. Για να αποφευχθεί πιθανή επίδραση του διαλύτη στα μετρούμενα τελικά σημεία (7), συνιστάται η διατήρηση της συγκέντρωσης του διαλύτη στο χαμηλότερο δυνατό επίπεδο.

17. Για ημιστατική δοκιμή, είναι δυνατόν να εφαρμοστούν δύο διαφορετικές διαδικασίες ανανέωσης. Είτε παρασκευάζονται νέα διαλύματα της δοκιμής σε καθαρά δοχεία και τα αυγά και οι προνύμφες που έχουν επιβιώσει μεταφέρονται με ήπιο τρόπο στα νέα δοχεία είτε οι υπό δοκιμή οργανισμοί διατηρούνται στα δοκιμαστικά δοχεία ενώ αντικαθίσταται μέρος μόνο (τουλάχιστον τα δύο τρίτα) του όγκου του διαλύματος δοκιμής / μάρτυρα.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Συνθήκες έκθεσης

Διάρκεια

18. Η δοκιμή θα πρέπει να αρχίζει το ταχύτερο δυνατόν μετά τη γονιμοποίηση των αυγών και, κατά προτίμηση, την εμβάπτισή τους στα διαλύματα της δοκιμής πριν αρχίσει το στάδιο της κυτταρικής αυλάκωσης των βλαστοδίσκων ή όσο το δυνατόν συντομότερα μετά το στάδιο αυτό. Η διάρκεια της δοκιμής εξαρτάται από το χρησιμοποιούμενο είδος. Ορισμένες συνιστώμενες διάρκειες παρέχονται στο προσάρτημα 2.

Φόρτωση

19. Ο αριθμός γονιμοποιημένων αυγών στην αρχή της δοκιμής θα πρέπει να είναι στατιστικώς επαρκής. Τα αυγά θα πρέπει να κατανέμονται στις διάφορες ομάδες μεταχείρισης με τυχαίο τρόπο, και θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ανά συγκέντρωση τουλάχιστον 80 αυγά, ισοκατανεμημένα σε τέσσερις τουλάχιστον όμοιους δοκιμαστικούς θαλάμους. Ο πληθυσμιακός φόρτος (βιομάζα ανά όγκο διαλύματος της δοκιμής) θα πρέπει να είναι επαρκώς χαμηλός, ώστε να διατηρείται η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου τουλάχιστον στο 60 % της τιμής κορεσμού με αέρα χωρίς αερισμό κατά το στάδιο των αυγών και των προνυμφών. Για τις δοκιμές συνεχούς ροής συνιστάται να μην υπερβαίνει ο πληθυσμιακός φόρτος τα 0,5 g/l νωπού βάρους ανά 24ωρο και τα 5 g/l διαλύματος σε καμία στιγμή (3).

Φως και θερμοκρασία

20. Η φωτοπερίοδος και η θερμοκρασία του νερού θα πρέπει να είναι κατάλληλες για τα υπό δοκιμή είδη (βλ. προσάρτημα 2).

Σίτιση

21. Η τροφή και η σίτιση έχουν καθοριστική σημασία και πρέπει απαραιτήτως να παρέχεται η σωστή τροφή για κάθε στάδιο ζωής, στον σωστό χρόνο και σε επαρκή ποσότητα για τη στήριξη της φυσιολογικής ανάπτυξης. Η σίτιση θα πρέπει να είναι περίπου ίση μεταξύ των επαναλήψεων, εκτός εάν προσαρμοστεί σε συνάρτηση με τη θνησιμότητα. Η πλεονάζουσα τροφή και τα περιττώματα θα πρέπει να απομακρύνονται, στο μέτρο του αναγκαίου, για την αποφυγή της συσσώρευσης αποβλήτων. Αναλυτικά προγράμματα σίτισης παρατίθενται στο προσάρτημα 3 αλλά, με τη συσσώρευση εμπειρίας, η τροφή και τα προγράμματα σίτισης τελειοποιούνται διαρκώς με σκοπό τη βελτίωση της επιβίωσης και τη βελτιστοποίηση της ανάπτυξης. Η ζωντανή τροφή αποτελεί πηγή εμπλουτισμού του περιβάλλοντος και, ως εκ τούτου, θα πρέπει να χρησιμοποιείται αντί ή επιπλέον της ξηράς ή κατεψυγμένης τροφής, όποτε αυτό ενδείκνυται για το είδος και το στάδιο του κύκλου ζωής.

Συγκεντρώσεις της δοκιμής

22. Απαιτούνται συνήθως πέντε συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, με τουλάχιστον τέσσερις επαναλήψεις ανά συγκέντρωση, οι οποίες να απέχουν μεταξύ τους κατά σταθερό παράγοντα που δεν υπερβαίνει το 3,2. Κατά την επιλογή του εύρους των συγκεντρώσεων της δοκιμής, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη, εάν είναι διαθέσιμα, στοιχεία σχετικά με τις δοκιμές οξείας τοξικότητας, κατά προτίμηση με το ίδιο είδος ψαριού, και/ή δοκιμή προσδιορισμού του εύρους τιμών (1). Ωστόσο, όλες οι πηγές πληροφόρησης θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την επιλογή του εύρους των συγκεντρώσεων της δοκιμής, συμπεριλαμβανομένων πηγών όπως π.χ. δεδομένα

▼M7

συγκριτικής προσέγγισης και δεδομένα δοκιμών οξείας τοξικότητας σε έμβρυα ψαριών. Οριακή δοκιμή ή διευρυμένη οριακή δοκιμή, με λιγότερες από πέντε συγκεντρώσεις ως η οριστική δοκιμή, μπορεί να είναι αποδεκτή, εφόσον πρόκειται να προσδιοριστούν μόνο εμπειρικές NOEC. Η χρήση λιγότερων από πέντε συγκεντρώσεις θα πρέπει να αιτιολογείται. Δεν χρειάζεται να δοκιμάζονται συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μεγαλύτερες από την LC_{50} 96 ωρών ή τα 10 mg/l (όποια από τις δύο είναι χαμηλότερη).

Μάρτυρες

23. Επιπλέον της σειράς συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, θα πρέπει να υποβάλλεται στη διαδικασία ένας μάρτυρας με νερό αραίωσης και, εάν είναι απαραίτητο, ένας μάρτυρας με διαλύτη που περιέχει μόνο τον φορέα διαλύτη (βλ. παράγραφο 16).

Συχνότητα αναλυτικών προσδιορισμών και μετρήσεων

24. Πριν από την έναρξη της περιόδου έκθεσης, θα πρέπει να διασφαλίζεται η ορθή λειτουργία του συστήματος παροχής της χημικής ουσίας για όλες τις επαναλήψεις (π.χ. με τη μέτρηση των συγκεντρώσεων της δοκιμής). Θα πρέπει να καθορίζονται οι αναγκαίες αναλυτικές μέθοδοι, μεταξύ άλλων ένα κατάλληλο όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) και επαρκείς γνώσεις σχετικά με τη σταθερότητα της ουσίας στο σύστημα της δοκιμής. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας προσδιορίζονται σε τακτά διαστήματα για τον χαρακτηρισμό της έκθεσης. Απαιτούνται τουλάχιστον πέντε προσδιορισμοί. Στα συστήματα συνεχούς ροής, θα πρέπει να διενεργούνται αναλυτικές μετρήσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε μία επανάληψη ανά συγκέντρωση, τουλάχιστον μια φορά την εβδομάδα, με συστηματική εναλλαγή των επαναλήψεων. Οι επιπλέον αναλυτικοί προσδιορισμοί συχνά βελτιώνουν την ποιότητα των αποτελεσμάτων της δοκιμής. Τα δείγματα θα πρέπει ενδεχομένως να διηθούνται για την απομάκρυνση τυχόν σωματιδίων (π.χ. με χρήση πόρων μεγέθους 0,45 μm) ή να φυγοκεντρούνται για να διασφαλίζεται ότι οι προσδιορισμοί εκτελούνται στην υπό δοκιμή χημική ουσία σε αληθές διάλυμα. Για να μειώνεται η προσρόφηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, οι ηθμοί θα πρέπει να έχουν κορεσθεί πριν από τη χρήση. Όταν οι μετρούμενες συγκεντρώσεις δεν παραμένουν εντός εύρους 80-120 % της ονομαστικής συγκέντρωσης, οι συγκεντρώσεις επίδρασης θα πρέπει να προσδιορίζονται και να εκφράζονται σε σχέση με τον αριθμητικό μέσο όρο των συγκεντρώσεων για τις δοκιμές συνεχούς ροής (βλ. προσάρτημα 6 της μεθόδου δοκιμών Γ.20 για τον υπολογισμό του αριθμητικού μέσου όρου (8)) και να εκφράζονται σε σχέση με τον γεωμετρικό μέσο όρο των μετρούμενων συγκεντρώσεων για τις ημιστατικές δοκιμές (βλ. κεφάλαιο 5 του εγγράφου καθοδήγησης του ΟΟΣΑ σχετικά με τις δοκιμές υδατικής τοξικότητας δύσκολων ουσιών και μειγμάτων) (2).

25. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, θα πρέπει να μετρώνται το διαλυμένο οξυγόνο, το pH και η θερμοκρασία σε όλα τα δοκιμαστικά δοχεία, τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα, καθώς και η αλατότητα και η σκληρότητα, εάν συντρέχουν λόγοι, στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής. Η θερμοκρασία θα πρέπει, κατά προτίμηση, να παρακολουθείται συνεχώς σε ένα τουλάχιστον δοκιμαστικό δοχείο.

Παρατηρήσεις

26. **Στάδιο εμβρυϊκής ανάπτυξης**: Το εμβρυϊκό στάδιο κατά την έναρξη της έκθεσης στην υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να επαληθεύεται με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ακρίβεια. Η επαλήθευση μπορεί να γίνει σε αντιπροσωπευτικό δείγμα αυγών τα οποία έχουν διατηρηθεί και καθαριστεί καταλλήλως.

27. **Εκκόλαψη και επιβίωση**: η εκκόλαψη και η επιβίωση θα πρέπει να παρατηρούνται τουλάχιστον μία φορά ημερησίως και να καταγράφονται τα αριθμητικά δεδομένα. Εάν παρατηρηθούν μύκητες στα αυγά στα αρχικά στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης (π.χ. κατά την πρώτη ή τη δεύτερη ημέρα της δοκιμής), αυτά τα αυγά θα πρέπει να καταμετρούνται και να αφαιρούνται. Τα νεκρά έμβρυα, προνύμφες και νεαρά ψάρια θα πρέπει να απομακρύνονται αμέσως μόλις γίνονται αντιληπτά, καθώς μπορεί να αποσυντεθούν ταχέως και να διαλυθούν από τις ενέργειες των άλλων ψαριών. Η απομάκρυνση των νεκρών ατόμων πρέπει να γίνεται με σχολαστική προσοχή για να μην υποστούν φυσική βλάβη τα παρακείμενα αυγά/προνύμφες. Οι ενδείξεις θανάτου διαφέρουν ανάλογα με το είδος και στάδιο του κύκλου ζωής. Για παράδειγμα:

▼M7

— για τα γονιμοποιημένα αυγά: ιδιαίτερα στα αρχικά στάδια, αισθητή μείωση της διαφάνειας και αλλαγή χρώματος, λόγω πήξης και/ή καταβύθισης των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα λευκή θαμπή όψη,

— για τα έμβρυα, τις προνύμφες και τα νεαρά ψάρια: ακινησία και/ή απώλεια αναπνευστικής κίνησης και/ή απουσία καρδιακού παλμού και/ή έλλειψη αντίδρασης σε μηχανικά ερεθίσματα.

28. **Μη φυσιολογική εμφάνιση**: ο αριθμός των προνυμφών ή νεαρών ψαριών που εμφανίζουν αφύσικο σχήμα σώματος θα πρέπει να καταγράφεται σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα ανάλογα με τη διάρκεια της δοκιμής και το είδος της παρατηρούμενης ανωμαλίας. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι είναι φυσικό να εμφανίζονται ανώμαλες προνύμφες και νεαρά ψάρια, που μπορεί να αντιπροσωπεύουν σημαντικό ποσοστό των μαρτύρων σε ορισμένα είδη. Όταν οι δυσμορφίες και η συνακόλουθη μη φυσιολογική συμπεριφορά θεωρείται ότι είναι τόσο σοβαρά ώστε να προκαλείται σημαντική ταλαιπωρία στον οργανισμό, ο οποίος έχει φθάσει σε σημείο πέραν του οποίου δεν υπάρχει δυνατότητα ανάρρωσης, ο οργανισμός επιτρέπεται να αφαιρείται από τη δοκιμή. Τα ζώα αυτά θα πρέπει να υποβάλλονται σε ευθανασία και να συνυπολογίζονται στη θνησιμότητα στη μετέπειτα ανάλυση των δεδομένων. Έχει τεκμηριωθεί φυσιολογική εμβρυϊκή ανάπτυξη για τα περισσότερα από τα είδη που συνιστώνται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών (9) (10) (11) (12).

29. **Αφύσικη συμπεριφορά**: ανωμαλίες όπως ο υπεραερισμός, η μη συντονισμένη κολύμβηση, η άτυπη ηρεμία και η άτυπη συμπεριφορά σίτισης θα πρέπει να καταγράφονται σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα ανάλογα με τη διάρκεια της δοκιμής (π.χ. μία φορά ημερησίως για τα είδη θερμών υδάτων). Αυτές οι επιδράσεις, αν και είναι δύσκολο να προσδιοριστούν ποσοτικά, μπορούν, όταν παρατηρούνται, να βοηθήσουν στην ερμηνεία των δεδομένων θνησιμότητας.

30. **Βάρος**: στο τέλος της δοκιμής ζυγίζονται όλα τα επιζώντα ψάρια τουλάχιστον σε μία από τις επαναλήψεις (αναφορά του αριθμού των ζώων στην επανάληψη και του μέσου βάρους ανά ζώο): αν και προτιμάται το νωπό βάρος (στέγνωμα με απορροφητικό χαρτί), μπορεί επίσης να αναφέρονται δεδομένα για το ξηρό βάρος (13).

31. **Μήκος**: στο τέλος της δοκιμής, μετράται το μήκος κάθε ψαριού. Συνιστάται το ολικό μήκος, αλλά αν παρουσιαστεί αποσύνθεση του ουραίου πτερυγίου ή διάβρωση πτερυγίου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί το κανονικό μήκος. Η ίδια μέθοδος θα πρέπει να χρησιμοποιείται σε όλα τα ψάρια δεδομένης δοκιμής. Το ατομικό μήκος μπορεί να μετρηθεί με παχύμετρο, ψηφιακή φωτογραφική μηχανή ή βαθμονομημένο οπτικό μικρόμετρο. Τα συνήθη ελάχιστα μήκη καθορίζονται στο προσάρτημα 2.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

32. Συνιστάται ο σχεδιασμός του πειράματος και η επιλογή στατιστικού ελέγχου να παρέχουν επαρκή ισχύ (80 % ή μεγαλύτερη) για την ανίχνευση μεταβολών βιολογικής σημασίας σε τελικά σημεία, όταν πρόκειται να αναφερθεί η NOEC. Η αναφορά των σχετικών συγκεντρώσεων και παραμέτρων με επίδραση μπορεί να εξαρτάται από το κανονιστικό πλαίσιο. Εάν πρόκειται να αναφερθεί η EC_x, ο σχεδιασμός του πειράματος και η επιλογή μοντέλου παλινδρόμησης θα πρέπει να επιτρέπουν την εκτίμηση της EC_x, έτσι ώστε i) το διάστημα εμπιστοσύνης 95 % που αναφέρεται για την EC_x να μην περιέχει το μηδέν και να μην είναι υπερβολικά ευρύ, (ii) το διάστημα εμπιστοσύνης 95 % για την προβλεπόμενη μέση τιμή της EC_x να μην περιέχει τη μέση τιμή των μαρτύρων, iii) να μην υπάρχει σημαντική έλλειψη προσαρμογής του μοντέλου παλινδρόμησης στα δεδομένα. Και οι δύο προσεγγίσεις απαιτούν να υποδειχθεί εκείνη η ποσοστιαία μεταβολή σε κάθε τελικό σημείο, η οποία είναι σημαντικό να ανιχνευτεί ή να εκτιμηθεί. Ο πειραματικός σχεδιασμός θα πρέπει να είναι ειδικά προσαρμοσμένος έτσι ώστε να παρέχει αυτή τη δυνατότητα. Όταν δεν πληρούνται οι ανωτέρω προϋποθέσεις για τον καθορισμό της ECx, θα πρέπει να χρησιμοποιείται η προσέγγιση της NOEC. Είναι απίθανο να ισχύει η ίδια ποσοστιαία μεταβολή για όλα τα τελικά σημεία, ούτε είναι εφικτό να σχεδιαστεί ένα πείραμα που θα πληροί αυτά τα κριτήρια για όλα τα τελικά σημεία και, ως εκ τούτου, έχει σημασία για τον κατάλληλο σχεδιασμό του πειράματος η εστίαση στα τελικά σημεία

▼M7

που είναι σημαντικά για το αντίστοιχο πείραμα. Στατιστικά διαγράμματα ροής και οδηγίες για κάθε προσέγγιση είναι διαθέσιμα στα προσαρτήματα 5 και 6 για την καθοδήγηση της επεξεργασίας των δεδομένων και της επιλογής του καταλληλότερου στατιστικού ελέγχου ή του καταλληλότερου στατιστικού μοντέλου προς χρήση. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες στατιστικές προσεγγίσεις, εφόσον αυτό δικαιολογείται επιστημονικά.

33. Είναι απαραίτητο να αναλύονται οι μεταβολές σε κάθε σειρά επαναλήψεων με διαδικασίες ανάλυσης διασποράς ή πίνακα συνάφειας και να χρησιμοποιούνται κατάλληλες μέθοδοι στατιστικής ανάλυσης με βάση αυτή την ανάλυση. Για την πολλαπλή σύγκριση των αποτελεσμάτων στις επιμέρους συγκεντρώσεις με τα αποτελέσματα από τους μάρτυρες, συνιστάται ο έλεγχος Jonckheere-Terpstra με αποκλιμάκωση (step-down) ή ο έλεγχος Williams, για συνεχείς αποκρίσεις, και ο έλεγχος Cochran-Armitage με αποκλιμάκωση για ασυνεχείς αποκρίσεις συμβατές με μονοτονική σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης και χωρίς ενδείξεις εξωδιωνυμικής διασποράς (14). Όταν υπάρχουν ενδείξεις εξωδιωνυμικής διασποράς, συνιστάται η τροποποίηση κατά Rao-Scott του ελέγχου Cochran-Armitage (15) (16) ή εφαρμόζεται ο έλεγχος Williams ή Dunnett (μετά από μετασχηματισμό τετραγωνικής ρίζας του τόξου ημιτόνου) ή ο έλεγχος Jonckheere-Terpstra στις αναλογίες των επαναλήψεων. Όταν τα δεδομένα δεν είναι συμβατά με μονοτονική σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης, μπορεί να είναι χρήσιμη η μέθοδος του Dunnett ή του Dunn ή η μέθοδος Mann-Whitney για συνεχείς αποκρίσεις, καθώς και ο ακριβής έλεγχος του Fisher για δυαδικές αποκρίσεις (14) (17) (18). Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε, κατά την εφαρμογή κάθε στατιστικής μεθόδου ή στατιστικού μοντέλου, να εξασφαλίζεται ότι πληρούνται οι απαιτήσεις της μεθόδου ή του μοντέλου (π.χ. η μεταβλητότητα μεταξύ των θαλάμων εκτιμάται και λαμβάνεται υπόψη κατά τον πειραματικό σχεδιασμό, καθώς και στη μέθοδο ή το μοντέλο που χρησιμοποιείται). Τα δεδομένα πρέπει να αξιολογούνται ως προς την κανονικότητα και στο προσάρτημα 5 περιγράφεται ο τρόπος χειρισμού των υπολοίπων της ανάλυσης ANOVA. Στο προσάρτημα 6 αναλύονται πρόσθετα ζητήματα για την προσέγγιση της παλινδρόμησης. Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο μετασχηματισμών για την εκπλήρωση των απαιτήσεων ενός στατιστικού ελέγχου. Ωστόσο, οι μετασχηματισμοί με σκοπό να καταστεί δυνατή η προσαρμογή ενός μοντέλου παλινδρόμησης απαιτούν ιδιαίτερη προσοχή, διότι, για παράδειγμα, μια μεταβολή κατά 25 % της μη μετασχηματισμένης απόκρισης δεν αντιστοιχεί σε μεταβολή κατά 25 % της μετασχηματισμένης. Σε όλες τις αναλύσεις, η μονάδα ανάλυσης και η πειραματική μονάδα είναι ο δοκιμαστικός θάλαμος και όχι τα μεμονωμένα ψάρια, γεγονός που θα πρέπει να αντικατοπτρίζεται τόσο στους ελέγχους υποθέσεων όσο και στην παλινδρόμηση (3) (14) (19) (20).

Έκθεση δοκιμής

34. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

Μονοσυστατική ουσία

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες·

— στοιχεία ταυτοποίησης χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμίξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ. (συμπεριλαμβανομένης της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα, κατά περίπτωση).

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγματα:

— χαρακτηρίζονται, στο μέτρο του δυνατού, π.χ. με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες

Υπό δοκιμή είδος:

— επιστημονική ονομασία, στέλεχος, πηγή και μέθοδος συλλογής των γονιμοποιημένων αυγών και μετέπειτα χειρισμός.

▼M7

Συνθήκες δοκιμής:

— εφαρμοζόμενη διαδικασία δοκιμής (π.χ. ημιστατική ή συνεχούς ροής, φόρτωση)·

— φωτοπερίοδος(-οι)·

— σχεδιασμός της δοκιμής [π.χ. αριθμός δοκιμαστικών θαλάμων και επαναλήψεων, αριθμός αυγών ανά επανάληψη, υλικό και μέγεθος του δοκιμαστικού θαλάμου (ύψος, πλάτος, όγκος), όγκος νερού ανά δοκιμαστικό θάλαμο]·

— μέθοδος παρασκευής των διαλυμάτων παρακαταθήκης και συχνότητα ανανέωσης (θα πρέπει να αναφέρονται το μέσο διαλυτοποίησης και η συγκέντρωσή του, εφόσον χρησιμοποιείται)·

— μέθοδος χορήγησης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (π.χ. αντλίες, συστήματα αραίωσης)·

— η απόδοση ανάκτησης της μεθόδου και οι ονομαστικές συγκεντρώσεις της δοκιμής, το όριο ποσοτικού προσδιορισμού, ο μέσος όρος των μετρούμενων τιμών και οι τυπικές αποκλίσεις τους στα δοκιμαστικά δοχεία και η μέθοδος με την οποία επιτεύχθηκαν, καθώς και στοιχεία που αποδεικνύουν ότι οι μετρήσεις αναφέρονται στις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε αληθές διάλυμα·

— χαρακτηριστικά του νερού αραίωσης: pH, σκληρότητα, θερμοκρασία, συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου, επίπεδα υπολειμματικού χλωρίου (εφόσον μετρούνται), ολικός οργανικός άνθρακας (εφόσον μετριέται), αιωρούμενα στερεά (εφόσον μετρούνται), αλατότητα του δοκιμαστικού μέσου (εφόσον μετριέται) και τυχόν άλλες μετρήσεις·

— ποιότητα του νερού μέσα στα δοκιμαστικά δοχεία, pH, σκληρότητα, θερμοκρασία και συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου·

— λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη σίτιση (π.χ. είδος τροφής, πηγή, ποσότητα και συχνότητα χορήγησης).

Αποτελέσματα, αναφερόμενα χωριστά (ή ανά επανάληψη) και ως μέση τιμή και συντελεστής μεταβλητότητας, κατά περίπτωση, για τα ακόλουθα τελικά σημεία:

— στοιχεία που αποδεικνύουν ότι οι μάρτυρες πληρούν το πρότυπο αποδεκτής συνολικής επιβίωσης για το είδος ψαριού που χρησιμοποιείται στη δοκιμή (προσάρτημα 2)·

— δεδομένα για τη θνησιμότητα σε κάθε στάδιο (εμβρύου, προνύμφης και νεαρών ψαριών) και σωρευτική (αθροιστική) θνησιμότητα·

— ημέρες εκκόλαψης, αριθμός προνυμφών που εκκολάφθηκαν κάθε ημέρα και λήξη της εκκόλαψης·

— αριθμός υγιών ψαριών στο τέλος της δοκιμής·

— δεδομένα σχετικά με το μήκος (διευκρινίζεται αν πρόκειται για το κανονικό ή το ολικό μήκος) και το βάρος των ζώων που επιβίωσαν·

— επίπτωση, περιγραφή και αριθμός μορφολογικών ανωμαλιών, εάν υπάρχουν·

— επίπτωση, περιγραφή και αριθμός επιδράσεων στη συμπεριφορά, εάν υπάρχουν·

— προσέγγιση για τη στατιστική ανάλυση (ανάλυση παλινδρόμησης ή ανάλυση διασποράς) και την επεξεργασία των δεδομένων (στατιστικός έλεγχος ή στατιστικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε)·

— συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης για κάθε απόκριση που αξιολογήθηκε (NOEC)·

▼M7

— κατώτατη συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται επίπτωση (LOEC) (σε p = 0,05) για κάθε απόκριση που αξιολογήθηκε·

— EC_x για κάθε απόκριση που αξιολογήθηκε, κατά περίπτωση, και διαστήματα εμπιστοσύνης (π.χ. 90 % ή 95 %), καθώς και γραφική παράσταση του προσαρμοσμένου μοντέλου που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της, κλίση της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης, μαθηματικός τύπος του μοντέλου παλινδρόμησης, εκτιμώμενες παράμετροι του μοντέλου και τα τυπικά σφάλματά τους.

Κάθε απόκλιση από τη μέθοδο δοκιμών.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων, που περιλαμβάνει τυχόν επίδραση των αποκλίσεων από τη μέθοδο δοκιμών στην έκβαση της δοκιμής.

Πίνακας 1

Είδη ψαριών που συνιστώνται για τη δοκιμή

ΓΛΥΚΟΥ ΝΕΡΟΥ	ΥΔΑΤΩΝ ΕΚΒΟΛΩΝ ΠΟΤΑΜΩΝ ΚΑΙ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΥΔΑΤΩΝ
Oncorhynchus mykiss Ιριδίζουσα πέστροφα	*Cyprinodon variegatus* Κυπρινόδοντας
Pimephales promelas Χοντροκέφαλος φοξίνος	*Menidia* sp. Πλευρασημόψαρο
Danio rerio Ζεβρόψαρο	
Oryzias latipes Ρυζόψαρο	

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.171, OECD, Paris.

(2) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. No. 23, OECD Paris.

(3) ASTM (1988), Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials, E 1241-88. 26 pp.

(4) Brauhn, J.L. and R.A. Schoettger (1975), Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel catfish and Bluegills, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

(5) Brungs, W.A. and B.R. Jones (1977), Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

(6) Adolfsson-Erici, *et al*. (2012), A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests, Chemosphere 86, 593-599.

(7) Hutchinson, T.H. *et al*. (2006), Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review, Aquatic Toxicology, 76, 69-92.

(8) Κεφάλαιο Γ. 20 του παρόντος παραρτήματος, Δοκιμή αναπαραγωγής σε *Daphnia magna*.

(9) Hansen, D.J. and P.R. Parrish (1977), Suitability of sheepshead minnows (Cyprindon variegatus) for life-cycle toxicity tests, In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.L. Mayer and J.L. Hamelink), ASTM STP 634.

(10) Kimmel, H. B.*et al*. (1995), Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental Dynamics, 203:253–310.

▼**M7**

(11) Gonzalez-Doncel, M. *et al* (2005), A quick reference guide to the normal development of *Oryzias latipes* (Teleostei, Adrinichthydae) Journal of Applied Ichthyology, 20:1–14.

(12) Devlin, E.W. *et al*. (1996), Prehatching Development of the Fathead Minnow, Pimephales promelas Rafinesque. EPA/600/R-96/079. USEPA, Office of Research and Development, Washington, D.C..

(13) Oris, J.T., S.C. Belanger, and A.J. Bailer, (2012), Baseline characteristics and statistical implications for the OECD 210 Fish Early Life Stage Chronic Toxicity Test, Environmental Toxicology and Chemistry 31; 2, 370 - 376.

(14) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54, OECD, Paris.

(15) Rao, J.N.K. και A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577-585.

(16) Rao, J.N.K. και A.J. Scott (1999), A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, Statistics in Medicine 18, 1373-1385.

(17) Dunnett C. W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of Ameican Statistical Association, 50, 1096-1121.

(18) Dunnett C. W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482-491.

(19) Rand, G.M. and S.R. Petrocelli (1985), Fundamentals of Aquatic Toxicology. Hemisphere Publication Corporation, New York.

(20) McClave, J.T., J.H. Sullivan and J.G. Pearson (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data, Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼M7

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

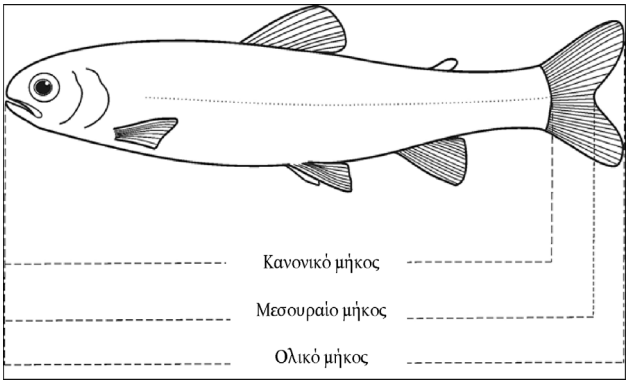
Κανονικό μήκος (SL): αναφέρεται στο μήκος ψαριού που μετράται από την άκρη του ρύγχους έως το οπίσθιο άκρο του τελευταίου σπονδύλου ή το οπίσθιο άκρο του μεσοπλάγιου τμήματος της υπουραίας πλάκας. Με απλά λόγια, η μέτρηση αυτή δεν περιλαμβάνει το μήκος του ουραίου πτερυγίου. (www.fishbase.org)

Μεσουραίο μήκος (FL): αναφέρεται στο μήκος από την άκρη του ρύγχους έως το άκρο των μεσαίων ακτίνων του ουραίου πτερυγίου και χρησιμοποιείται σε ψάρια για τα οποία είναι δύσκολο να οριοθετηθεί η κατάληξη της σπονδυλικής στήλης (www.fishbase.org)

Ολικό μήκος (TL): αναφέρεται στο μήκος από την άκρη του ρύγχους έως την άκρη του μακρύτερου λοβού του ουραίου πτερυγίου, που συνήθως μετράται με τους λοβούς συμπιεσμένους κατά μήκος του άξονα συμμετρίας. Πρόκειται για μέτρηση ευθείας γραμμής που δεν ακολουθεί την καμπύλη του σώματος (www.fishbase.org)

Εικόνα 1

Περιγραφή των χρησιμοποιούμενων διαφορετικών μηκών



Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα.

EC_x: (Συγκέντρωση επίδρασης για επίδραση x %): η συγκέντρωση που προκαλεί x % επίδρασης σε υπό δοκιμή οργανισμούς εντός συγκεκριμένης περιόδου έκθεσης σε σύγκριση με μάρτυρα. Για παράδειγμα, η EC_{50} είναι η συγκέντρωση που εκτιμάται ότι προκαλεί επίδραση σε τελικό σημείο δοκιμής σε ποσοστό 50 % του εκτιθέμενου πληθυσμού επί καθορισμένη περίοδο έκθεσης.

Κατώτατη συγκέντρωση στην οποία παρατηρούνται επιπτώσεις (LOEC) είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην οποία παρατηρείται ότι η εν λόγω ουσία έχει στατιστικά σημαντική επίδραση (με $p < 0,05$), συγκριτικά με τον μάρτυρα. Ωστόσο, όλες οι συγκεντρώσεις της δοκιμής που υπερβαίνουν τη LOEC θα πρέπει να έχουν βλαβερή επίδραση ίση ή μεγαλύτερη από εκείνη που παρατηρείται στη LOEC. Σε περίπτωση που δεν πληρούνται οι δύο αυτοί όροι, θα πρέπει να εξηγείται πλήρως ο τρόπος επιλογής της LOEC (και, κατ' επέκταση, της NOEC). Τα προσαρτήματα 5 και 6 παρέχουν οδηγίες.

Συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC) είναι η αμέσως χαμηλότερη της LOEC συγκέντρωση της δοκιμής, η οποία, συγκριτικά με τον μάρτυρα, δεν έχει στατιστικά σημαντική επίδραση (με $\rho < 0,05$) εντός συγκεκριμένης περιόδου έκθεσης.

Υπο δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

UVCB: ουσίες άγνωστης ή μεταβλητής σύνθεσης, σύμπλοκα προϊόντα αντίδρασης ή βιολογικά υλικά.

IUPAC: Διεθνής Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας.

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification (Προδιαγραφή Απλοποιημένης Μοριακής Γραμμικής Γραφής).

▼M7

Προσάρτημα 2

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΟΚΙΜΗΣ, ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΚΑΙ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΓΙΑ ΤΑ ΣΥΝΙΣΤΩΜΕΝΑ ΕΙΔΗ

ΕΙΔΟΣ	ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΟΚΙΜΗΣ			ΣΥΝΙΣΤΩΜΕΝΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ	Σύνηθες ελάχιστο μέσο ολικό μήκος των ψαριών-μαρτύρων στο τέλος της μελέτης (mm) (1)	ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΜΑΡΤΥΡΩΝ (ελάχιστη)	
	Θερμοκρασία (°C)	Αλατότητα ($^0/_{00}$)	Φωτοπερίοδος (ώρες)			Επιτυχία της εκκόλαψης	Επιτυχία μετά την εκκόλαψη
Γλυκού νερού:							
Oncorhynchus mykiss Ιριδίζουσα πέστροφα	10 ± 1,5 (2)		12 - 16 (3)	2 εβδομάδες μετά την ελεύθερη σίτιση μαρτύρων (ή 60 ημέρες μετά την εκκόλαψη)	40	75 %	75 %
Pimephales promelas Χοντροκέφαλος φοξίνος	25 ± 1,5		16	32 ημέρες από την έναρξη της δοκιμής (ή 28 ημέρες μετά την εκκόλαψη)	18	70 %	75 %
Danio rerio Ζεβρόψαρο	26 ± 1,5		12 - 16 (4)	30 ημέρες μετά την εκκόλαψη	11	70 %	75 %
Oryzias latipes Ρυζόψαρο	25 ± 2		12 - 16 (5)	30 ημέρες μετά την εκκόλαψη	17	80 %	80 %
Υδάτων εκβολών ποταμών και θαλάσσιων υδάτων:							
Cyprinodon variegatus Κυπρινόδοντας	25 ± 1,5	15-35 (5)	12 - 16 (4)	32 ημέρες από την έναρξη της δοκιμής (ή 28 ημέρες μετά την εκκόλαψη)	17	75 %	80 %
Menidia sp. Πλευρασημόψαρο	22 - 25	15-35 (5)	13	28 ημέρες	20	80 %	60 %

Υπόμνημα:

(1) Το σύνηθες ελάχιστο μέσο ολικό μήκος δεν αποτελεί κριτήριο εγκυρότητας, αλλά οι αποκλίσεις κάτω από τον αναφερόμενο αριθμό θα πρέπει να εξετάζονται προσεκτικά σε σχέση με την ευαισθησία της δοκιμής. Το ελάχιστο μέσο ολικό μήκος συνάγεται από επιλογή των δεδομένων που είναι επί του παρόντος διαθέσιμα.

(2) Το υπό δοκιμή συγκεκριμένο στέλεχος ιριδίζουσας πέστροφας μπορεί να απαιτεί τη χρήση άλλων θερμοκρασιών. Οι γεννήτορες πρέπει να διατηρούνται στην ίδια θερμοκρασία με εκείνη που χρησιμοποιείται για τα αυγά. Μετά την παραλαβή των αυγών από εμπορικό εκτροφέα, είναι απαραίτητη μια σύντομης διάρκειας προσαρμογή (π.χ. 1-2 ωρών) στη θερμοκρασία της δοκιμής μετά την άφιξη.

(3) Σκοτάδι για τις προνύμφες έως μία εβδομάδα μετά την εκκόλαψη, εκτός από τον χρόνο κατά τον οποίο επιθεωρούνται, και στη συνέχεια χαμηλός φωτισμός καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής (φωτοπερίοδος 12-16 ωρών) (4).

(4) Για δεδομένες συνθήκες δοκιμής, το πρόγραμμα φωτισμού πρέπει να είναι σταθερός.

(5) Για δεδομένη δοκιμή, η τιμή πρέπει να επιτυγχάνεται με ακρίβεια ± 2 $^0/_{00}$.

▼M7

Προσάρτημα 3

ΟΔΗΓΙΕΣ ΣΙΤΙΣΗΣ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ ΓΕΝΝΗΤΟΡΩΝ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ ΤΩΝ ΣΥΝΙΣΤΩΜΕΝΩΝ ΕΙΔΩΝ

ΕΙΔΟΣ	ΤΡΟΦΗ (*)				ΧΡΟΝΟΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΚΚΟΛΑΨΗ	ΧΡΟΝΟΣ ΠΡΩΤΗΣ ΣΙΤΙΣΗΣ
	Γεννήτορες	Νεοεκκολαφθείσες προνύμφες	Νεαρά ψάρια			
			Τύπος	Συχνότητα		
Γλυκού νερού:						
Oncorhynchus mykiss Ιριδίζουσα πέστροφα	τροφή για πέστροφες	Καμία (α)	αρχική τροφή για πέστροφες BSN	2-4 σιτηρέσια ημερησίως	14-16 ημέρες μετά την εκκόλαψη ή κατά την ανάπλευση (δεν είναι ουσιαστικής σημασίας)	19 ημέρες μετά την εκκόλαψη ή κατά την ανάπλευση
Pimephales promelas Χοντροκέφαλος, φοξίνος	BSN, νιφάδες τροφής, FBS	BSN	BSN48, νιφάδες τροφής	2-3 φορές την ημέρα	όταν η εκκόλαψη είναι 90 %	2 φορές ημερησίως μετά την εκκόλαψη
Danio rerio Ζεβρόψαρο	BSN, νιφάδες τροφής	Τροφή του εμπορίου για προνύμφες, πρωτόζωα (β), πρωτεΐνες (γ)	BSN48, νιφάδες τροφής,	Η BSN μία φορά ημερησίως· νιφάδες τροφής δύο φορές ημερησίως	όταν η εκκόλαψη είναι 90 %	2 ημέρες μετά την εκκόλαψη
Oryzias latipes Ρυζόψαρο	νιφάδες τροφής	BSN, νιφάδες τροφής (ή πρωτόζωα ή τροχόζωα)	BSN48, νιφάδες τροφής (ή τροχόζωα)	Η BSN μία φορά ημερησίως· νιφάδες τροφής δύο φορές ημερησίως ή νιφάδες τροφής και τροχόζωα μία φορά ημερησίως	ανεφάρμοστο	6-7 ημέρες μετά την ωοτοκία
Υδάτων εκβολών ποταμών και θαλάσσιων υδάτων:						
Cyprinodon variegatus Κυπρινόδοντας	BSN, τροφή σε νιφάδες FBS	BSN	BSN48	2-3 σιτηρέσια ημερησίως	ανεφάρμοστο	1 ημέρα μετά την εκκόλαψη/ ανάπλευση
Menidia sp. Πλευρασημόψαρο	BSN48, νιφάδες τροφής	BSN	BSN48	2-3 σιτηρέσια ημερησίως	ανεφάρμοστο	1 ημέρα μετά την εκκόλαψη/ ανάπλευση

Υπόμνημα:

(*) Η τροφή θα πρέπει να παρέχεται μέχρι κορεσμού. Η πλεονάζουσα τροφή και τα περιττώματα θα πρέπει να απομακρύνονται, στο μέτρο του αναγκαίου για την αποφυγή της συσσώρευσης αποβλήτων.

FBS Κατεψυγμένες γαρίδες της άλμης, ενήλικες *Artemia* sp

BSN Ναύπλιοι γαρίδας της άλμης, νεοεκκολαφθέντες

BSN48 Ναύπλιοι γαρίδας της άλμης, ηλικίας 48 ωρών

(α) οι λεκιθοφόρες προνύμφες δεν χρειάζονται τροφή

(β) διηθημένα από μεικτή καλλιέργεια

(γ) κόκκοι από διεργασία ζύμωσης

▼M7

Προσάρτημα 4

ΟΡΙΣΜΕΝΑ ΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΕΚΤΟΥ ΝΕΡΟΥ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

Συστατικό	Οριακή συγκέντρωση
Σωματίδια	5 mg/l
Ολικός οργανικός άνθρακας	2 mg/l
Μη ιονισμένη αμμωνία	1 μg/l
Υπολείμματα χλωρίου	10 μg/l
Ολικά οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα	50 ng/l
Ολικά οργανοχλωριούχα γεωργικά φάρμακα συν πολυχλωριωμένα διφαινύλια	50 ng/l
Ολικό οργανικό χλώριο	25 ng/l
Αργίλιο	1 μg/l
Αρσενικό	1 μg/l
Χρώμιο	1 μg/l
Κοβάλτιο	1 μg/l
Χαλκός	1 μg/l
Σίδηρος	1 μg/l
Μόλυβδος	1 μg/l
Νικέλιο	1 μg/l
Ψευδάργυρος	1 μg/l
Κάδμιο	100 ng/l
Υδράργυρος	100 ng/l
Άργυρος	100 ng/l

▼M7

Προσάρτημα 5

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΚΑΘΟΔΗΓΗΣΗ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ NOEC

Γενικές παρατηρήσεις

Η δεξαμενή επανάληψης είναι η μονάδα ανάλυσης. Συνεπώς, για συνεχείς παραμέτρους, όπως το μέγεθος, θα πρέπει να υπολογίζεται η μέση ή διάμεση τιμή των επαναλήψεων και οι εν λόγω τιμές επαναλήψεων είναι τα δεδομένα για ανάλυση. Θα πρέπει να καταδεικνύεται η ισχύς των δοκιμών που χρησιμοποιούνται, κατά προτίμηση βάσει επαρκών ιστορικών δεδομένων για κάθε εργαστήριο. Για κάθε τελικό σημείο θα πρέπει να παρέχεται, μαζί με τον στατιστικό έλεγχο που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί, η επίδραση μεγέθους που μπορεί να ανιχνευθεί με ισχύ 75-80 %.

Οι βάσεις δεδομένων που ήταν διαθέσιμες κατά την εκπόνηση της παρούσας μεθόδου δοκιμών καθορίζουν την ισχύ που επιτυγχάνουν οι συνιστώμενες στατιστικές διαδικασίες. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να αποδεικνύει την ικανότητά του να ανταποκρίνεται στην εν λόγω απαίτηση ισχύος, είτε διεξάγοντας ανάλυση ισχύος είτε καταδεικνύοντας ότι ο συντελεστής μεταβλητότητας (CV) για κάθε απόκριση δεν υπερβαίνει το 90ό εκατοστημόριο των CV που χρησιμοποιήθηκαν στην εκπόνηση της κατευθυντήριας γραμμής. Οι σχετικοί CV παρατίθενται στον πίνακα 1. Εάν είναι διαθέσιμες μόνο μέσες ή διάμεσες τιμές των επαναλήψεων, ο CV εντός κάθε επανάληψης μπορεί να αγνοηθεί.

Πίνακας 1

CV 90ού εκατοστημορίου για επιλεγμένα είδη γλυκού νερού

Είδος	Απόκριση	CV μεταξύ επαναλήψεων	CV εντός κάθε επανάληψης
Ιριδίζουσα πέστροφα	Μήκος	17,4	9,8
	Βάρος	10,1	28
Χοντροκέφαλος φοξίνος	Μήκος	16,9	13,5
	Βάρος	11,7	38,7
Ζεβρόψαρο	Μήκος	43,7	11,7
	Βάρος	11,9	32,8

Για όλες σχεδόν τις στατιστικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση εργαστηριακών τοξικολογικών μελετών, οι συγκρίσεις που ενδιαφέρουν είναι εκείνες που γίνονται μεταξύ των ομάδων μεταχείρισης και των μαρτύρων. Για τον λόγο αυτό, δεν ενδείκνυται να απαιτείται έλεγχος F ANOVA με σημαντικό αποτέλεσμα πριν από τη χρήση του ελέγχου Dunnett ή Williams ούτε έλεγχος Kruskal-Wallis με σημαντικό αποτέλεσμα πριν από τη χρήση του ελέγχου Jonckheere-Terpstra, Mann-Whitney ή Dunn (Hochberg και Tamhane 1987, Hsu 1996, Dunnett 1955, 1964, Williams 1971, 1972, 1975, 1977, Robertson και συν. 1988, Jonckheere 1954, Dunn 1964).

Καθώς ο έλεγχος Dunnett διαθέτει ενσωματωμένη διόρθωση ως προς την πολλαπλότητα, τα ψευδοθετικά και ψευδοαρνητικά ποσοστά του επηρεάζονται δυσμενώς από τη χρησιμοποίηση του ελέγχου F ως θυροφύλακα (gatekeeper). Ομοίως, οι εφαρμοζόμενοι με αποκλιμάκωση έλεγχοι Williams και Jonckheere-Terpstra με τη χρήση επιπέδου σημαντικότητας 0,05 σε κάθε στάδιο διατηρούν συνολικό ψευδοθετικό ποσοστό 5 %, τόσο δε το ποσοστό αυτό όσο και η ισχύς των ελέγχων επηρεάζονται δυσμενώς από τη χρησιμοποίηση του ελέγχου F ή Kruskal-Wallis ως θυροφύλακα. Οι έλεγχοι Mann-Whitney και Dunn πρέπει να διορθώνονται ως προς την πολλαπλότητα, συνιστάται δε η διόρθωση κατά Bonferroni-Holm.

Διεξοδική ανάλυση των περισσότερων συστάσεων για τους ελέγχους υποθέσεων και την επαλήθευση των παραδοχών στις οποίες βασίζονται οι εν λόγω έλεγχοι παρέχεται σε έγγραφο του ΟΟΣΑ (2006), το οποίο περιλαμβάνει επίσης εκτενή βιβλιογραφία.

▼M7

Αντιμετώπιση των μαρτύρων όταν χρησιμοποιείται διαλύτης

Εάν χρησιμοποιείται διαλύτης, θα πρέπει να περιλαμβάνονται δύο μάρτυρες: ένας με νερό αραίωσης και ένας με διαλύτη. Οι δύο μάρτυρες θα πρέπει να συγκρίνονται για κάθε απόκριση και να συνδυάζονται για στατιστική ανάλυση, εάν δεν διαπιστωθεί σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Διαφορετικά, ο μάρτυρας με διαλύτη θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της NOEC ή την εκτίμηση της ECx, ενώ ο μάρτυρας με νερό δεν χρησιμοποιείται. Βλ. περιορισμό στα κριτήρια εγκυρότητας (παράγραφος 7).

Για το μήκος, το βάρος, την αναλογία εκκολαπτόμενων αυγών ή θνησιμότητας των προνυμφών ή μη φυσιολογικών προνυμφών, καθώς και για την πρώτη ή την τελευταία ημέρα επώασης ή ανάπλευσης, θα πρέπει να χρησιμοποιείται έλεγχος T ή Mann-Whitney για τη σύγκριση μεταξύ μάρτυρα με νερό αραίωσης και μάρτυρα με διαλύτη σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05, κατά την οποία αγνοούνται όλες οι ομάδες μεταχείρισης. Τα αποτελέσματα αυτών των ελέγχων θα πρέπει να αναφέρονται.

Μετρήσεις μεγέθους (μήκους και βάρους)

Οι τιμές μήκους και βάρους κάθε ψαριού μπορούν να είναι κανονικά ή λογαριθμοκανονικά κατανεμημένες. Σε κάθε περίπτωση, οι μέσες τιμές των επαναλήψεων τείνουν να είναι κανονικά κατανεμημένες βάσει του κεντρικού οριακού θεωρήματος και να επιβεβαιώνονται από τα δεδομένα περισσότερων από 100 μελετών αρχικών σταδίων της ζωής με τρία ζωικά είδη του γλυκού νερού. Εναλλακτικά, όταν τα δεδομένα ή οι ιστορικές βάσεις δεδομένων υποδηλώνουν λογαριθμοκανονική κατανομή των μεμονωμένων τιμών μεγέθους των ψαριών, μπορεί να υπολογιστεί ο λογάριθμος των μέσων τιμών μεγέθους ανά επανάληψη, οπότε τα δεδομένα για ανάλυση θα είναι οι αντιλογάριθμοι των εν λόγω λογαρίθμων των μέσων τιμών των επαναλήψεων.

Θα πρέπει να αξιολογείται η συμφωνία των δεδομένων με την κανονική κατανομή και την ομοιογένεια της διασποράς. Για τον σκοπό αυτό, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τα υπόλοιπα από μοντέλο ANOVA, με τη συγκέντρωση ως μόνη ερμηνευτική μεταβλητή ανά κατηγορία. Επιτρέπεται ο οπτικός προσδιορισμός από διαγράμματα διασποράς και ιστογράμματα ή διαγράμματα μίσχου-φύλλου. Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάποιος επίσημος έλεγχος, όπως οι Shapiro-Wilk ή Anderson-Darling. Η συνέπεια με την ομοιογένεια της διασποράς μπορεί να αξιολογηθεί με οπτική εξέταση του ίδιου διαγράμματος διασποράς ή επίσημα με τον έλεγχο Levene. Η αξιολόγηση της κανονικότητας και της ομοιογένειας της διασποράς είναι αναγκαία μόνο στην περίπτωση των παραμετρικών ελέγχων (π.χ. έλεγχοι Williams, Dunnett).

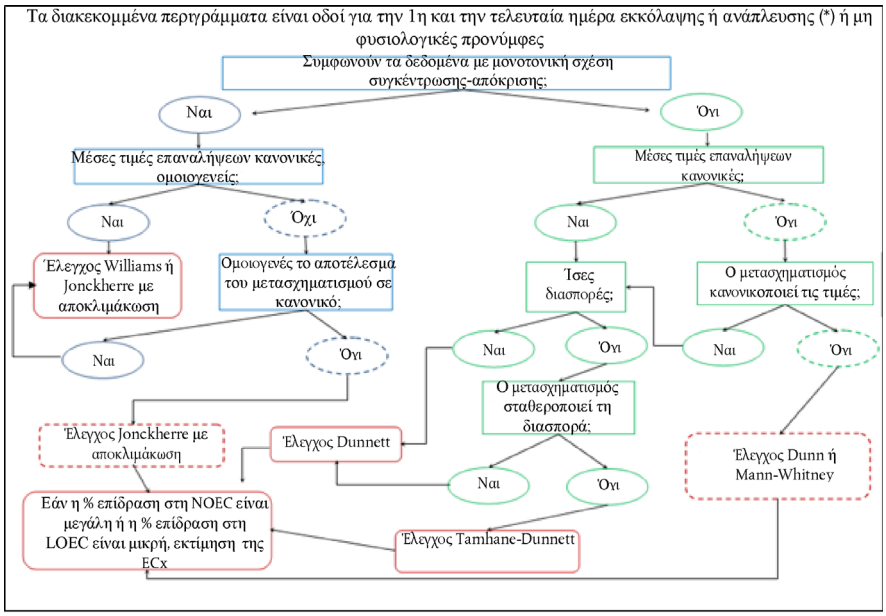
Πρέπει να δίνεται προσοχή στις πιθανές έκτοπες τιμές και την επίδρασή τους στην ανάλυση. Μπορεί να χρησιμοποιείται ο έλεγχος έκτοπων τιμών Tukey και ο οπτικός έλεγχος των διαγραμμάτων υπολοίπων που περιγράφονται ανωτέρω. Υπενθυμίζεται ότι οι παρατηρήσεις είναι πλήρεις επαναλήψεις και, ως εκ τούτου, οι έκτοπες τιμές θα πρέπει να παραλείπονται από την ανάλυση μόνο μετά από προσεκτική εξέταση.

Οι στατιστικοί έλεγχοι που αξιοποιούν τα χαρακτηριστικά του πειραματικού σχεδιασμού και της βιολογικής προσδοκίας είναι έλεγχοι τάσης με διαδικασία αποκλιμάκωσης, όπως οι έλεγχοι Williams και Jonckheere-Terpstra. Οι έλεγχοι αυτοί λαμβάνουν ως παραδοχή μονοτονική σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης και θα πρέπει να αξιολογείται η συμφωνία των δεδομένων με την παραδοχή αυτή. Η αξιολόγηση μπορεί να είναι οπτική από το διάγραμμα διασποράς των μέσων τιμών των επαναλήψεων συναρτήσει της συγκέντρωσης της δοκιμής. Είναι χρήσιμη η υπέρθεση του εν λόγω διαγράμματος διασποράς με μια τμηματικά γραμμική καμπύλη που συνδέει τις μέσες τιμές συγκέντρωσης, σταθμισμένες κατά το μέγεθος του δείγματος επανάληψης. Μια μεγάλη απόκλιση της τμηματικά γραμμικής καμπύλης από τη μονοτονικότητα θα αποτελούσε ένδειξη πιθανής ανάγκης να χρησιμοποιηθούν άλλοι έλεγχοι πλην των ελέγχων τάσης. Εναλλακτικά, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν επίσημοι έλεγχοι. Ένας απλός επίσημος έλεγχος συνίσταται στον υπολογισμό των γραμμικών και τετραγωνικών αντιθέσεων των μέσων τιμών συγκέντρωσης. Εάν η τετραγωνική αντίθεση είναι σημαντική, ενώ η γραμμική δεν είναι, αυτό αποτελεί ένδειξη πιθανού προβλήματος μονοτονικότητας, το οποίο θα πρέπει να αξιολογείται περαιτέρω από τα διαγράμματα. Όταν τίθεται ζήτημα κανονικότητας ή ομοιογένειας της διασποράς, οι αντιθέσεις αυτές μπορούν να υπολογιστούν από δεδομένα που έχουν μετασχηματιστεί με βάση τη σειρά κατάταξης. Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικές διαδικασίες, όπως ο έλεγχος Bartholomew για τη μονοτονικότητα, αλλά περιπλέκουν την εργασία.

▼M7

Εικόνα 2

Διάγραμμα ροής NOEC για τις μετρήσεις μεγέθους (μήκους και βάρους).



(*) Οι αποκρίσεις αυτές ποτέ δεν επαληθεύουν τις παραδοχές για παραμετρική ανάλυση ή παραμετρικά μοντέλα

Εάν τα δεδομένα δεν είναι σύμφωνα με τις απαιτήσεις αυτών των ελέγχων, η NOEC προσδιορίζεται με αποκλιμακωμένη εφαρμογή του ελέγχου Williams ή Jonckheere-Terpstra. Το έγγραφο του ΟΟΣΑ (2006) παρέχει λεπτομερείς πληροφορίες για τις διαδικασίες αυτές. Για τα δεδομένα που δεν είναι σύμφωνα με τις απαιτήσεις για τους ελέγχους τάσης με αποκλιμάκωση, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο έλεγχος Dunnett ή Tamhane-Dunnett (T3), οι οποίοι διαθέτουν ενσωματωμένες διορθώσεις ως προς την πολλαπλότητα. Οι έλεγχοι λαμβάνουν ως παραδοχή την κανονικότητα και, στην περίπτωση του ελέγχου Dunnett, την ομοιογένεια της διασποράς. Εάν δεν πληρούνται οι προϋποθέσεις αυτές, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο μη παραμετρικός έλεγχος Dunn. Το έγγραφο του ΟΟΣΑ (2006) παρέχει λεπτομερείς πληροφορίες για όλες αυτές τις μεθόδους. Η εικόνα 2 παρέχει μια επισκόπηση για την εξεύρεση της προτιμητέας μεθόδου.

Εκκόλαψη αυγών και επιβίωση προνυμφών

Τα δεδομένα είναι οι αναλογίες εκκολαπτόμενων αυγών ή προνυμφών που επιβιώνουν στην κάθε επανάληψη. Θα πρέπει να αξιολογείται η εξωδιωνυμική διασπορά αυτών των αναλογιών, η οποία είναι συνήθης αλλά όχι καθολική σε τέτοιες μετρήσεις. Το διάγραμμα ροής στην εικόνα 3 καθοδηγεί την αναζήτηση της προτιμητέας μεθόδου· βλ. κείμενο για αναλυτικές περιγραφές.

Χρησιμοποιούνται συνήθως δύο έλεγχοι. Πρόκειται για τον έλεγχο C(α) του Tarone (Tarone, 1979) και τον έλεγχο «χι τετράγωνο» (χ^2), καθένας από τους οποίους εφαρμόζεται χωριστά σε κάθε συγκέντρωση της δοκιμής. Εάν διαπιστωθεί εξωδιωνυμική διασπορά έστω και σε μία συγκέντρωση της δοκιμής, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν υποστηρικτικές (accommodating) μέθοδοι.

Τύπος 1.

Έλεγχος C(α) κατά Tarone (Tarone 1979)

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^{m} \frac{(x_j - n_j \hat{p})^2}{\hat{p}(1-\hat{p})} - \sum_{j=1}^{m} n_j}{\left\{2\sum_{j=1}^{m} n_j(n_j - 1)\right\}^{1/2}}$$

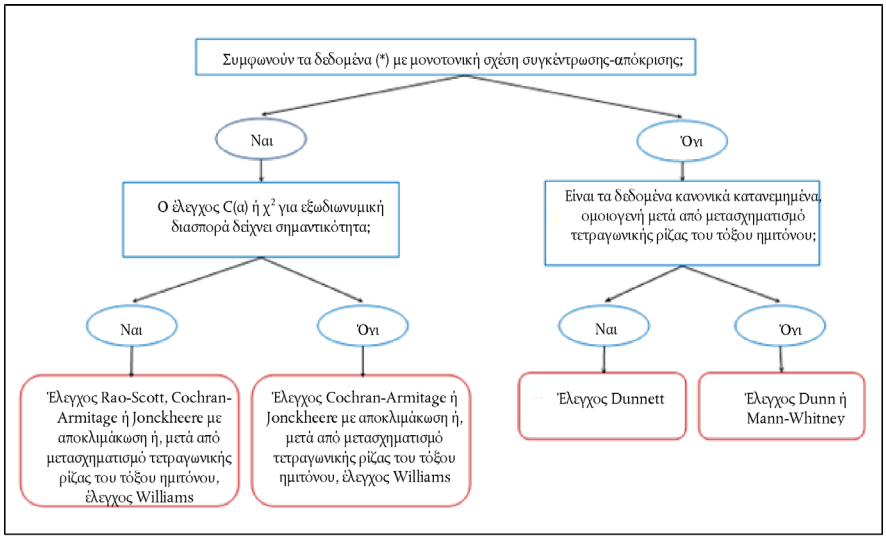
όπου $\hat{p}$ είναι η μέση αναλογία για δεδομένη συγκέντρωση, **m** ο αριθμός δεξαμενών επανάληψης, $\mathbf{n_j}$ ο αριθμός των υποκειμένων της επανάληψης **j** και $\mathbf{x_j}$ ο

▼M7

αριθμός υποκειμένων της εν λόγω επανάληψης που αποκρίθηκαν, π.χ. δεν εκκολάφθηκαν ή ήταν νεκρά. Ο έλεγχος αυτός εφαρμόζεται σε κάθε συγκέντρωση χωριστά. Μολονότι μπορεί να θεωρηθεί ένα είδος τροποποιημένου ελέγχου χ^2, οι περιορισμένες προσομοιώσεις ισχύος του Tarone έδειξαν ότι είναι ισχυρότερος από τους ελέγχους χ^2.

Εικόνα 3

Διάγραμμα ροής NOEC για την εκκόλαψη αυγών και τη θνησιμότητα προνυμφών



(*) Τα δεδομένα είναι αναλογίες επαναλήψεων

Όταν δεν υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις εξωδιωνυμικής διασποράς, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο έλεγχος Cochran-Armitage με αποκλιμάκωση. Καθώς ο έλεγχος αυτός αγνοεί τις επαναλήψεις, όταν υπάρχουν τέτοιες ενδείξεις, η διόρθωση κατά Rao-Scott του ελέγχου Cochran-Armitage (RSCA) λαμβάνει υπόψη τις επαναλήψεις, τα μεγέθη των επαναλήψεων και την εξωδιωνυμική διασπορά και συνιστάται. Εναλλακτικοί έλεγχοι είναι, μεταξύ άλλων, οι έλεγχοι Williams και Jonckheere-Terpstra με αποκλιμάκωση, καθώς και ο έλεγχος Dunnett, όπως περιγράφεται για τις μετρήσεις μεγέθους. Οι έλεγχοι αυτοί εφαρμόζονται ανεξάρτητα από την ύπαρξη εξωδιωνυμικής διασποράς, η ισχύς τους όμως είναι σχετικά μικρότερη (Agresti 2002, Morgan 1992, Rao και Scott 1992, 1999, Fung και συν. 1994, 1996).

Πρώτη ή τελευταία ημέρα επώασης ή ανάπλευσης

Η απόκριση είναι ακέραιος αριθμός που δηλώνει την ημέρα της δοκιμής κατά την οποία έγινε η αναφερόμενη παρατήρηση για δεδομένη δεξαμενή επανάληψης. Το εύρος τιμών είναι γενικά πολύ περιορισμένο και υπάρχει συχνά υψηλό ποσοστό όμοιων τιμών, π.χ. η ίδια πρώτη ημέρα εκκόλαψης παρατηρείται σε όλες τις επαναλήψεις των μαρτύρων και, ίσως, σε μία ή δύο χαμηλές συγκεντρώσεις της δοκιμής. Οι παραμετρικοί έλεγχοι, όπως των Williams και Dunnett, δεν είναι κατάλληλοι για τα εν λόγω δεδομένα. Ο έλεγχος Jonckheere-Terpstra με αποκλιμάκωση είναι πολύ ισχυρός για την ανίχνευση των επιδράσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εφόσον δεν υπάρχουν στοιχεία σοβαρής έλλειψης μονοτονικότητας. Διαφορετικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο έλεγχος Dunn.

Ανωμαλίες προνυμφών

Η απόκριση είναι ο αριθμός των προνυμφών που διαπιστώνεται ότι για κάποιο λόγο δεν είναι φυσιολογικές. Η απόκριση αυτή είναι συνήθως χαμηλής επίπτωσης και παρουσιάζει ορισμένα από τα ίδια προβλήματα όπως η πρώτη ημέρα εκκόλαψης, επιπλέον δε, σε ορισμένες περιπτώσεις, ακανόνιστη σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης. Εάν τα δεδομένα ακολουθούν τουλάχιστον σε γενικές γραμμές ένα μονοτονικό σχήμα συγκέντρωσης, ο έλεγχος Jonckheere-Terpstra με αποκλιμάκωση είναι ισχυρός για την ανίχνευση των επιδράσεων. Διαφορετικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο έλεγχος Dunn.

▼**M7**

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Agresti, A. (2002); Categorical Data Analysis, second edition, Wiley, Hoboken.

Dunnett C. W. (1955); A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control, J. American Statistical Association 50, 1096-1121.

Dunn O. J. (1964); Multiple Comparisons Using Rank Sums, Technometrics 6, 241-252.

Dunnett C. W. (1964); New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics 20, 482-491.

Fung, K.Y., D. Krewski, J.N.K. Rao, A.J. Scott (1994); Tests for Trend in Developmental Toxicity Experiments with Correlated Binary Data, Risk Analysis 14, 639-648.

Fung, K.Y, D. Krewski, R.T. Smythe (1996); A comparison of tests for trend with historical controls in carcinogen bioassay, Canadian Journal of Statistics 24, 431-454.

Hochberg, Y. and A. C. Tamhane (1987); Multiple Comparison Procedures, Wiley, New York.

Hsu, J.C. (1996); Multiple Comparisons: Theory and Methods; Chapman and Hall/CRC Press, Boca Raton.

Jonckheere, A. R. (1954); A distribution-free k-sample test against ordered alternatives, Biometrika 41, 133.

Morgan, B.J.T. (1992); Analysis of Quantal Response Data, Chapman and Hall, London.

OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series on Testing and Assessment, Aρ. 54. Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris..

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992) — A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577-585.

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1999) — A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, Statistics in Medicine 18, 1373-1385.

Robertson, T., Wright F.T. and Dykstra R.L. (1988); Order restricted statistical inference, Wiley.

Tarone, R.E. (1979); Testing the goodness of fit of the Binomial distribution, Biometrika 66, 585-590.

Williams D.A. (1971); A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics 27, 103-117.

Williams D.A. (1972); The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics 28, 519-531.

Williams D. A. (1975); The Analysis of Binary Responses from Toxicological Experiments Involving Reproduction and Teratotlogy, Biometrics 31, 949-952.

Williams D.A. (1977); Some inference procedures for monotonically ordered normal means, Biometrika 64, 9-14.

▼M7

Προσάρτημα 6

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΚΑΘΟΔΗΓΗΣΗ ΓΙΑ ΤΙΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗΣ

Γενικές παρατηρήσεις

Οι παρατηρήσεις που χρησιμοποιούνται για την προσαρμογή μοντέλων είναι οι μέσες τιμές των επαναλήψεων (μήκους και βάρους) ή οι αναλογίες των επαναλήψεων (εκκόλαψης αυγών και θνησιμότητας προνυμφών) (ΟΟΣΑ 2006).

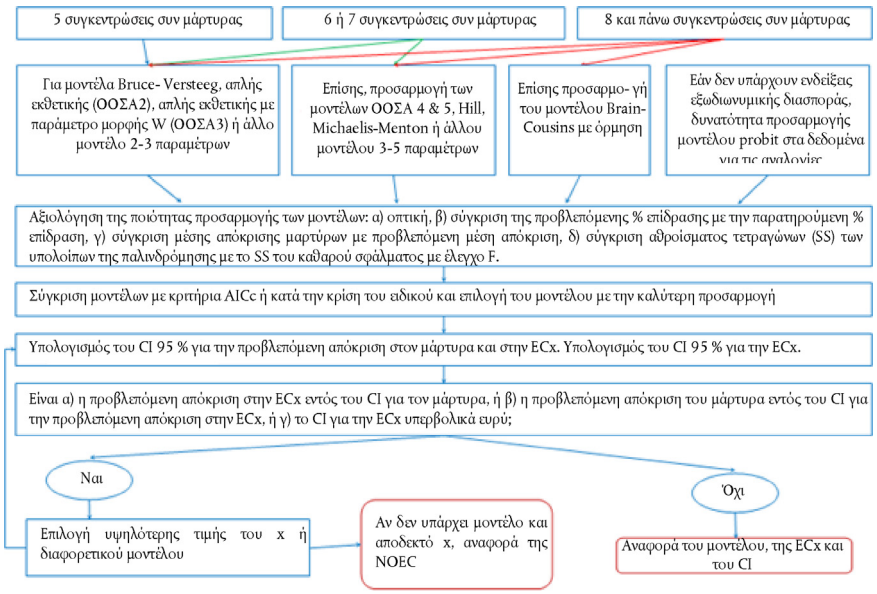
Συνιστάται γενικά η σταθμισμένη παλινδρόμηση με τη χρήση του μεγέθους δείγματος επανάληψης ως συντελεστή στάθμισης. Μπορεί να χρησιμοποιηθούν και άλλα συστήματα στάθμισης, όπως η στάθμιση με την προβλεπόμενη μέση απόκριση ή ένας συνδυασμός αυτής και του μεγέθους δείγματος επανάληψης. Δεν συνιστάται στάθμιση με την αντίστροφη δειγματική διασπορά εντός συγκέντρωσης (Bunke και συν. 1999, Seber και Wild, 2003, Motulsky και Christopoulos 2004, Huet και συν. 2003).

Κάθε μετασχηματισμός αποκρίσεων πριν από την ανάλυση θα πρέπει να διατηρεί την ανεξαρτησία των παρατηρήσεων, η δε ECx και τα όρια εμπιστοσύνης θα πρέπει να εκφράζονται στις αρχικές μονάδες μέτρησης και όχι σε μετασχηματισμένες μονάδες. Για παράδειγμα, μια μεταβολή κατά 20 % στον λογάριθμο του μήκους δεν ισοδυναμεί με μεταβολή του μήκους κατά 20 % (Lyles και συν. 2008, Draper και Smith 1999).

Το διάγραμμα ροής στην εικόνα 4 παρέχει μια επισκόπηση των εκτιμήσεων της ECx. Οι λεπτομέρειες περιγράφονται στο κείμενο που ακολουθεί.

Εικόνα 4:

Διάγραμμα ροής για την εκτίμηση της EC_x βάσει του μέσου μήκους ή βάρους των επαναλήψεων ή της αναλογίας εκκολαπτόμενων αυγών ή θνησιμότητας προνυμφών των επαναλήψεων· για περισσότερες λεπτομέρειες, βλ. κείμενο



Εκτιμήσεις για την εκκόλαψη αυγών και τη θνησιμότητα προνυμφών

Όσον αφορά την εκκόλαψη αυγών και τη θνησιμότητα προνυμφών, κατά κανόνα το καλύτερο είναι να προσαρμόζεται ένα φθίνον μοντέλο, εκτός αν προσαρμόζεται μοντέλο probit, όπως περιγράφεται κατωτέρω. Δηλαδή, πρέπει να μοντελοποιείται η αναλογία μη εκκολαπτόμενων αυγών ή νεκρών προνυμφών. Αυτό οφείλεται στο ότι η ECx αναφέρεται σε μια συγκέντρωση στην οποία επέρχεται μεταβολή ίση με x % της μέσης απόκρισης των μαρτύρων. Για παράδειγμα, αν το ποσοστό της αποτυχίας εκκόλαψης στον μάρτυρα είναι 5 % και μοντελοποιηθεί η αποτυχία εκκόλαψης, η τιμή EC20 αναφέρεται στη συγκέντρωση στην οποία επέρχεται μεταβολή ίση με 20 % του ποσοστού αποτυχίας εκκόλαψης 5 %, το οποίο σημαίνει μεταβολή 0,2 * 0,05 = 0,01 ή κατά 1 ποσοστιαία μονάδα, με

▼M7

αποτέλεσμα ποσοστό αποτυχίας εκκόλαψης 6 %. Μια τόσο μικρή μεταβολή δεν είναι δυνατόν να εκτιμηθεί από τα διαθέσιμα δεδομένα κατά τρόπο που να έχει σημασία και δεν είναι σημαντική από βιολογική άποψη. Εάν όμως μοντελοποιηθεί η αναλογία εκκολαπτόμενων αυγών, η αναλογία στους μάρτυρες θα είναι 95 % στο παράδειγμα αυτό και μια μείωση της μέσης τιμής των μαρτύρων κατά 20 % θα ισοδυναμεί με μεταβολή 0,95 * 0,2 = 0,18, δηλ. ποσοστό επιτυχίας εκκόλαψης από 95 % σε 77 % (= 95 – 18) και αυτή η συγκέντρωση επίδρασης μπορεί να εκτιμηθεί και είναι κατά τεκμήριο σημαντικότερη. Δεν τίθεται τέτοιο ζήτημα με τις μετρήσεις μεγέθους, αν και δυσμενείς επιδράσεις στο μέγεθος συνεπάγονται κατά κανόνα μείωση μεγέθους.

Μοντέλα για το μέγεθος (μήκος ή βάρος) και την επιτυχία εκκόλαψης αυγών ή την επιβίωση προνυμφών

Εκτός από το μοντέλο Brain-Cousens με όρμηση, όλα αυτά τα μοντέλα περιγράφονται και συνιστώνται στο έγγραφο του ΟΟΣΑ (2006). Τα επονομαζόμενα μοντέλα ΟΟΣΑ 2-5 εξετάζονται επίσης για πειράματα οικοτοξικότητας στη δημοσίευση Slob (2002). Πολλά άλλα διαθέσιμα μοντέλα θα ήταν, ασφαλώς, χρήσιμα. Οι Bunke και συν. (1999) παραθέτουν πολυάριθμα μοντέλα που δεν περιλαμβάνονται στο παρόν προσάρτημα, ενώ υπάρχουν πολλές βιβλιογραφικές παραπομπές σε άλλα μοντέλα. Αυτά που απαριθμούνται στη συνέχεια προτείνονται ως κατ' εξοχήν κατάλληλα για πειράματα οικοτοξικότητας και χρησιμοποιούνται ευρέως.*Με 5 συγκεντρώσεις δοκιμής συν μάρτυρα*

— Bruce-Versteeg

— Απλή εκθετική (ΟΟΣΑ 2)

— Εκθετική με παράμετρο μορφής (ΟΟΣΑ 3)

— Απλή εκθετική με κατώτατο όριο (ΟΟΣΑ 4)

Με 6 ή περισσότερες συγκεντρώσεις δοκιμής συν μάρτυρα

— Εκθετική με παράμετρο μορφής και κατώτατο όριο (ΟΟΣΑ 5)

— Michaelis-Menten

— Hill

Όταν υπάρχουν οπτικές ενδείξεις όρμησης (απίθανο στην περίπτωση της επιτυχίας εκκόλαψης αυγών ή της επιβίωσης προνυμφών, αλλά ενίοτε διακρίνονται στις παρατηρήσεις μεγέθους)

— Brain-Cousens Hormetic· Brain και Cousens (1989)

Εναλλακτικά μοντέλα για την αποτυχία εκκόλαψης αυγών και τη θνησιμότητα προνυμφών

— Είναι δυνατή η προσαρμογή αυξόντων μοντέλων για τις εν λόγω αποκρίσεις με μοντέλα probit (ή λογιστικά), εάν δεν υπάρχουν στοιχεία εξωδιωνυμικής διασποράς και η επίπτωση (incidence) στους μάρτυρες εκτιμάται στην προσαρμογή του μοντέλου. Αυτή δεν είναι η προτιμώμενη μέθοδος, διότι λαμβάνει ως μονάδα ανάλυσης το άτομο και όχι τις επαναλήψεις (Morgan 1992, O'Hara Hines και Lawless 1993, Collett 2002, 2003).

Ποιότητα προσαρμογής μεμονωμένου μοντέλου

— Συγκρίνονται οπτικά το παρατηρούμενο με το προβλεπόμενο ποσοστό μείωσης σε κάθε συγκέντρωση της δοκιμής (Motulsky και Christopoulos 2004, Draper και Smith 1999).

— Συγκρίνεται το μέσο τετραγωνικό σφάλμα παλινδρόμησης με το μέσο τετραγωνικό καθαρό σφάλμα με έλεγχο F (Draper και Smith 1999).

— Επαληθεύεται ότι κάθε όρος του μοντέλου διαφέρει σημαντικά από το μηδέν (δηλ. διαπιστώνεται αν όλοι οι όροι του μοντέλου είναι σημαντικοί), (Motulsky και Christopoulos 2004).

▼M7

— Σχεδιάζεται η καμπύλη των υπολοίπων της παλινδρόμησης συναρτήσει των συγκεντρώσεων της δοκιμής, ενδεχομένως σε λογαριθμική κλίμακα log(συγκέντρωση). Δεν θα πρέπει να υπάρχει μοτίβο στην εν λόγω καμπύλη. Τα σημεία θα πρέπει να είναι τυχαίως διασκορπισμένα γύρω από μια οριζόντια γραμμή στο ύψος του μηδέν.

— Τα δεδομένα θα πρέπει να αξιολογούνται ως προς την κανονικότητα και την ομοιογένεια της διασποράς, με τον τρόπο που υποδεικνύεται στο προσάρτημα 5.

— Επιπλέον, θα πρέπει να αξιολογείται η κανονικότητα των υπολοίπων γύρω από το μοντέλο παλινδρόμησης με τη χρήση των μεθόδων που υποδεικνύονται στο προσάρτημα 5 για τα υπόλοιπα της ανάλυσης ANOVA.

Σύγκριση μοντέλων

— Χρησιμοποιούνται τα κριτήρια AICc του Akaike. Μικρότερες τιμές AICc υποδηλώνουν καλύτερες προσαρμογές και εάν AICc(B)-AICc(A) $\geq$ 10, το μοντέλο A είναι κατά πάσα πιθανότητα καλύτερο από το μοντέλο B (Motulsky και Christopoulos (2004).

— Συγκρίνονται οπτικά τα δύο μοντέλα με βάση το κατά πόσο πληρούν τα ανωτέρω κριτήρια για μεμονωμένο μοντέλο.

— Συνιστάται η αρχή της φειδούς, σύμφωνα με την οποία χρησιμοποιείται το απλούστερο μοντέλο που προσαρμόζεται στα δεδομένα με εύλογα καλή ποιότητα (Ratkowsky 1993, Lyles και συν. 2008).

Ποιότητα της εκτίμησης της EC_x

Το διάστημα εμπιστοσύνης (CI) για την EC_x δεν θα πρέπει να είναι υπερβολικά ευρύ. Απαιτείται στατιστική κρίση για τον καθορισμό του εύρους του διαστήματος εμπιστοσύνης που εξακολουθεί να δίνει χρήσιμη ECx. Οι προσομοιώσεις της προσαρμογής μοντέλων παλινδρόμησης σε δεδομένα για την εκκόλαψη αυγών και για το μέγεθος δείχνουν ότι περίπου το 75 % των διαστημάτων εμπιστοσύνης για την ECx (x = 10, 20 ή 30) καλύπτουν το πολύ δύο συγκεντρώσεις δοκιμής. Αυτό παρέχει μια γενική κατεύθυνση για το τι είναι αποδεκτό και αποτελεί πρακτικό οδηγό για το τι είναι εφικτό. Πολλοί συγγραφείς υποστηρίζουν ότι είναι αναγκαία η αναφορά των διαστημάτων εμπιστοσύνης για όλες τις παραμέτρους του μοντέλου και ότι διαστήματα εμπιστοσύνης με μεγάλο εύρος δηλώνουν μη αποδεκτά μοντέλα (Ott και Longnecker 2008, Alvord και Rossio 1993, Motulsky και Christopoulos 2004, Lyles και συν. 2008, Seber και Wild 2003, Bunke και συν 1999, Environment Canada 2005).

Το διάστημα εμπιστοσύνης (CI) για την EC_x (ή οποιαδήποτε άλλη παράμετρο του μοντέλου) δεν θα πρέπει να περιέχει το μηδέν (Motulsky και Christopoulos 2004). Είναι η παλινδρόμηση που ισοδυναμεί με την ελάχιστη σημαντική διαφορά η οποία αναφέρεται συχνά στις προσεγγίσεις ελέγχου υποθέσεων (π.χ. Wang και συν. 2000). Επίσης, αντιστοιχεί στο διάστημα εμπιστοσύνης ώστε οι μέσες αποκρίσεις στη LOEC να μην περιέχουν τη μέση τιμή των μαρτύρων. Θα πρέπει να τίθεται το ερώτημα αν οι εκτιμήσεις των παραμέτρων είναι επιστημονικά ευλογοφανείς. Για παράδειγμα, εάν το διάστημα εμπιστοσύνης για τη μεταβλητή y0 είναι ± 20 %, καμία εκτίμηση της EC_{10} δεν είναι ευλογοφανής. Εάν το μοντέλο προβλέπει επίδραση 20 % σε μια συγκέντρωση C και η μέγιστη παρατηρούμενη επίδραση στη C και στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις είναι 10 %, η EC_{20} δεν είναι ευλογοφανής (Motulsky και Christopoulos 2004, Wang και συν. 2000, Environment Canada 2005).

Για την EC_x δεν θα πρέπει να χρειάζεται παρέκταση εκτός του εύρους των θετικών συγκεντρώσεων (Draper και Smith 1999, ΟΟΣΑ 2006). Για παράδειγμα, μια πιθανή γενική κατεύθυνση θα μπορούσε να ορίζει ότι η EC_x δεν πρέπει να είναι χαμηλότερη από την κατώτατη συγκέντρωση της δοκιμής ή υψηλότερη από την ανώτατη κατά περισσότερο από 25 % περίπου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Alvord, W.G., Rossio, J.L. (1993); Determining confidence limits for drug potency in immunoassay, Journal of Immunological Methods 157, 155-163.

Brain P. and Cousens R. (1989); An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed res. 29: 93-96.

▼M7

Bunke, O., Droge, B. and Polzehl, J. (1999). Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics* 33, 197-240.

Collett, D. (2002); Modelling Binary Data, second edition, Chapman and Hall, London.

Collett, D. (2003); Modelling Survival Data in Medical Research, second edition, Chapman and Hall, London.

Draper, N.R. and Smith, H. (1999); Applied Regression Analysis, third edition. New York: John Wiley & Sons.

Environment Canada (2005). Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests, Report EPS 1/RM/46

Huet, S., A. Bouvier, M.-A. Poursat, E. Jolivet (2003); Statistical Tools for Nonlinear Regression: A Practical Guide with S-PLUS and R Examples, Springer Series in Statistics, New York.

Lyles, R. H., C. Poindexter, A. Evans, M. Brown, and C.R. Cooper (2008); Nonlinear Model-Based Estimates of IC50 for Studies Involving Continuous Therapeutic Dose-Response Data, *Contemp Clin Trials*. 2008 November; 29(6): 878-886.

Morgan, B.J.T. (1992); Analysis of Quantal Response Data, Chapman and Hall, London.

Motulsky, H., A. Christopoulos (2004); Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting, Oxford University Press, USA.

O'Hara Hines, R. J. and J. F. Lawless (1993); Modelling Overdispersion in Toxicological Mortality Data Grouped over Time, *Biometrics* Vol. 49, pp. 107-121

OECD (2006); Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series Testing and Assessment, No. 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris.

Ott, R.L., M.T. Longnecker, An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis, sixth edition, 2008, Brooks-Cole, Belmont, CA

Ratkowsky, D.A. (1993); Principles of nonlinear regression, Journal of Industrial Microbiology 12, 195-199.

Seber, G.A.F., C.J. Wild, Nonlinear Regression, Wiley, 2003

Slob W. (2002); Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci., 66, 298-312

Wang, Q., D.L. Denton, and R. Shukla (2000); Applications and Statistical Properties Of Minimum Significant Difference-Based Criterion Testing In a Toxicity Testing Program, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 19, pp. 113–117, 2000.

▼M7

Γ.48 ΒΡΑΧΥΠΡΌΘΕΣΜΗ ΔΟΚΙΜΉ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗς ΣΕ ΨΆΡΙΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 229 του ΟΟΣΑ (2012). Η ανάγκη ανάπτυξης κι επικύρωσης δοκιμών σε ψάρια για την ανίχνευση ενδοκρινικά δραστικών χημικών ουσιών πηγάζει από τις ανησυχίες ότι τα επίπεδα των χημικών ουσιών στο περιβάλλον ενδέχεται να έχουν δυσμενείς επιδράσεις τόσο στους ανθρώπους όσο και στην άγρια πανίδα, λόγω της αλληλεπίδρασης των εν λόγω ουσιών με το ενδοκρινικό σύστημα. Το 1998 ο ΟΟΣΑ δρομολόγησε μια δραστηριότητα πρώτης προτεραιότητας με σκοπό την αναθεώρηση των υφιστάμενων κατευθυντήριων γραμμών και την ανάπτυξη νέων για τη διαλογή (screening) και τη δοκιμή δυνητικών ενδοκρινικών διαταρακτών. Ένα στοιχείο της δραστηριότητας ήταν η εκπόνηση κατευθυντήριας γραμμής δοκιμών για τη διαλογή των χημικών ουσιών που δρουν στο ενδοκρινικό σύστημα διαφόρων ειδών ψαριών. Η βραχυπρόθεσμη δοκιμή αναπαραγωγής σε ψάρια υποβλήθηκε σε εκτενές πρόγραμμα επικύρωσης, αποτελούμενο από διεργαστηριακές μελέτες με επιλεγμένες χημικές ουσίες, ώστε να καταδειχθούν η συνάφεια και η αξιοπιστία της δοκιμής για την ανίχνευση χημικών ουσιών που επηρεάζουν την αναπαραγωγή των ψαριών με διάφορους μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των ενδοκρινικών τρόπων δράσης (1, 2, 3, 4, 5). Όλα τα τελικά σημεία της κατευθυντήριας γραμμής δοκιμών του ΟΟΣΑ έχουν επικυρωθεί στον χοντροκέφαλο φοξίνο, ενώ ένα υποσύνολο των τελικών σημείων έχει επικυρωθεί στο ρυζόψαρο (η βιτελογενίνη και τα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου) και στο ζεβρόψαρο (η βιτελογενίνη). Η εργασία επικύρωσης υποβλήθηκε σε αξιολόγηση από ομότιμους κριτές, μια ομάδα εμπειρογνωμόνων που ορίστηκαν από τους εθνικούς συντονιστές του προγράμματος κατευθυντήριων γραμμών δοκιμών του ΟΟΣΑ (6), εν μέρει, και από ανεξάρτητη ομάδα εμπειρογνωμόνων κατόπιν ανάθεσης από την Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος των Ηνωμένων Πολιτειών (29). Η δοκιμή δεν έχει σχεδιαστεί για τον εντοπισμό συγκεκριμένων μηχανισμών ορμονικής διατάραξης, λόγω του ότι τα πειραματόζωα διαθέτουν άθικτο άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων (HPG), ο οποίος μπορεί να αποκριθεί σε χημικές ουσίες που τον επηρεάζουν σε διάφορα επίπεδα.

2. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών περιγράφεται μια δοκιμή διαλογής in vivo, κατά την οποία γεννητικά ώριμα αρσενικά και θηλυκά ψάρια διατηρούνται μαζί και εκτίθενται σε μία χημική ουσία για ένα μικρό μέρος του κύκλου ζωής τους (21 ημέρες). Κατά τη λήξη της περιόδου έκθεσης των 21 ημερών, μετρούνται δύο τελικά σημεία βιοδεικτών σε αρσενικά και θηλυκά άτομα ως δείκτες ενδοκρινικής δραστικότητας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας· τα τελικά αυτά σημεία είναι η βιτελογενίνη και τα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου. Η βιτελογενίνη μετράται στον χοντροκέφαλο φοξίνο, στο ρυζόψαρο και στο ζεβρόψαρο, ενώ τα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου μετρούνται στον χοντροκέφαλο φοξίνο και το ρυζόψαρο. Επιπλέον, παρακολουθείται καθημερινά η ποσοτική γονιμότητα σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Διατηρούνται επίσης οι γονάδες και είναι δυνατόν να αξιολογηθεί η ιστοπαθολογική εικόνα με σκοπό την εκτίμηση της αναπαραγωγικής υγείας των πειραματόζωων και την ενίσχυση του βάρους της απόδειξης άλλων τελικών σημείων.

3. Ο παρών βιοπροσδιορισμός λειτουργεί ως δοκιμή αναπαραγωγής in vivo για διαλογή και η εφαρμογή του θα πρέπει να εντάσσεται στο «Εννοιολογικό πλαίσιο του ΟΟΣΑ για τις δοκιμές και την αξιολόγηση χημικών ενδοκρινικών διαταρακτών» (30). Στο εν λόγω εννοιολογικό πλαίσιο, η βραχυπρόθεσμη δοκιμή αναπαραγωγής σε ψάρια προτείνεται στο επίπεδο 3 ως δοκιμή in vivo που παρέχει δεδομένα σχετικά με επιλεγμένους(-ες) ενδοκρινικούς(-ές) μηχανισμούς/οδούς.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

4. Η βιτελογενίνη (VTG) παράγεται κανονικά από το ήπαρ των θηλυκών ωοτόκων σπονδυλωτών ως απόκριση στα κυκλοφορούντα ενδογενή οιστρογόνα. Είναι πρόδρομος των πρωτεϊνών της λεκίθου του αυγού και, αφού παραχθεί στο ήπαρ, φθάνει μέσω της κυκλοφορίας του αίματος στην ωοθήκη, όπου απορροφάται και τροποποιείται από τα αναπτυσσόμενα αυγά. Η βιτελογενίνη είναι σχεδόν μη ανιχνεύσιμη στο πλάσμα των ανώριμων θηλυκών και των αρσενικών ψαριών, επειδή αυτά δεν διαθέτουν επαρκή κυκλοφορούντα οιστρογόνα· ωστόσο, το ήπαρ είναι ικανό να συνθέτει και να εκκρίνει βιτελογενίνη ως απόκριση σε εξωγενή διέγερση από οιστρογόνα.

▼M7

5. Η μέτρηση της βιτελογενίνης χρησιμεύει στην ανίχνευση χημικών ουσιών με διάφορους τρόπους οιστρογόνου δράσης. Η ανίχνευση χημικών ουσιών με οιστρογόνο δράση είναι εφικτή μέσω της μέτρησης της επαγωγής βιτελογενίνης σε αρσενικά ψάρια και έχει τεκμηριωθεί σε πληθώρα επιστημονικών δημοσιεύσεων αξιολογημένων από ομότιμους κριτές (π.χ. (7)). Η επαγωγή βιτελογενίνης έχει επίσης καταδειχτεί μετά από έκθεση σε αρωματοποιήσιμα ανδρογόνα (8, 9). Μείωση των κυκλοφορούντων επιπέδων οιστρογόνων σε θηλυκά άτομα, για παράδειγμα μέσω αναστολής της αρωματάσης που μετατρέπει τα ενδογενή ανδρογόνα στο φυσικό οιστρογόνο 17β-οιστραδιόλη, προκαλεί μείωση των επιπέδων VTG, η οποία χρησιμοποιείται για την ανίχνευση χημικών ουσιών με ιδιότητες αναστολής της αρωματάσης (10, 11). Η βιολογική σημασία της απόκρισης της βιτελογενίνης μετά από αναστολή των οιστρογόνων / της αρωματάσης έχει αποδειχθεί και τεκμηριωθεί ευρέως. Ωστόσο, η παραγωγή VTG στα θηλυκά άτομα μπορεί επίσης να επηρεαστεί από γενική τοξικότητα και μη ενδοκρινικούς τοξικούς τρόπους δράσης, π.χ. ηπατοτοξικότητα.

6. Διάφορες μέθοδοι μέτρησης έχουν αναπτυχθεί με επιτυχία και έχουν τυποποιηθεί για συστηματική χρήση. Αυτό ισχύει για τις ειδικές ανά ζωικό είδος μεθόδους ενζυμικού ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού (ELISA) με τη χρήση ανοσοχημείας για τον ποσοτικό προσδιορισμό της παραγόμενης VTG σε μικρά δείγματα αίματος ή ήπατος που συλλέγονται από μεμονωμένα ψάρια (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Λαμβάνονται δείγματα αίματος από χοντροκέφαλο φοξίνο, αίματος ή ομογενοποιήματος κεφαλής/ουράς από ζεβρόψαρο και ήπατος από ρυζόψαρο για μέτρηση της VTG. Στο ρυζόψαρο υπάρχει ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ της VTG που μετράται στο αίμα και εκείνης που μετράται στο ήπαρ (19). Στο προσάρτημα 6 παρέχονται οι συνιστώμενες διαδικασίες συλλογής δειγμάτων για την ανάλυση VTG. Προπαρασκευασμένα αντιδραστήρια (κιτ) για τη μέτρηση της VTG είναι ευρέως διαθέσιμα· τα εν λόγω κιτ θα πρέπει να βασίζονται σε επικυρωμένη ειδική ανά ζωικό είδος μέθοδο ELISA.

7. Τα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου στα αρσενικά ψάρια ορισμένων ειδών είναι εξωτερικά ορατά, ποσοτικοποιήσιμα και αποκρίνονται στα κυκλοφορούντα επίπεδα ενδογενών ανδρογόνων· αυτό ισχύει για τον χοντροκέφαλο φοξίνο και το ρυζόψαρο, όχι όμως για το ζεβρόψαρο, που δεν διαθέτει ποσοτικοποιήσιμα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου. Τα θηλυκά άτομα διατηρούν την ικανότητα ανάπτυξης αρσενικών δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου, όταν εκτεθούν σε ανδρογόνες χημικές ουσίες στο νερό. Στην επιστημονική βιβλιογραφία είναι διαθέσιμες διάφορες μελέτες που τεκμηριώνουν αυτό το είδος απόκρισης στον χοντροκέφαλο φοξίνο (20) και στο ρυζόψαρο (21). Η μείωση των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου σε αρσενικά άτομα θα πρέπει να ερμηνεύεται με προσοχή, λόγω της χαμηλής στατιστικής ισχύος, και να βασίζεται στην κρίση εμπειρογνωμόνων και στο βάρος της απόδειξης. Υπάρχουν περιορισμοί στη χρήση ζεβρόψαρου στην παρούσα δοκιμή, λόγω της απουσίας ποσοτικοποιήσιμων δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου που να αποκρίνονται σε χημικές ουσίες με ανδρογόνο δράση.

8. Στον χοντροκέφαλο φοξίνο, ο κύριος δείκτης εξωγενούς έκθεσης σε ανδρογόνα είναι ο αριθμός των γαμήλιων φυματίων που βρίσκονται στο ράγχος των θηλυκών ψαριών. Στο ρυζόψαρο, ο αριθμός των θηλοειδών αποφύσεων αποτελεί τον κύριο δείκτη εξωγενούς έκθεσης θηλυκών ψαριών σε ανδρογόνες χημικές ουσίες. Στα προσαρτήματα 5Α και 5Β αναφέρονται οι συνιστώμενες διαδικασίες που πρέπει να ακολουθούνται για την αξιολόγηση των χαρακτηριστικών του φύλου στον χοντροκέφαλο φοξίνο και το ρυζόψαρο αντίστοιχα.

9. Η δοκιμή 21 ημερών σε ψάρια περιλαμβάνει αξιολόγηση της ποσοτικής παραγωγής αυγών και τη διατήρηση των γονάδων για προαιρετική ιστοπαθολογική εξέταση. Ορισμένες ρυθμιστικές αρχές ενδέχεται να απαιτούν αυτό το πρόσθετο τελικό σημείο για μια πιο ολοκληρωμένη αξιολόγηση της αναπαραγωγικής υγείας των πειραματόζωων ή σε περιπτώσεις που η βιτελογενίνη και τα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου δεν αποκρίνονται στην έκθεση στη χημική ουσία. Αν και ορισμένα τελικά σημεία μπορεί να έχουν υψηλή διαγνωστική αξία (π.χ. η επαγωγή VTG σε αρσενικά άτομα και ο σχηματισμός φυματίων σε θηλυκά), δεν προορίζονται όλα τα τελικά σημεία της δοκιμής (π.χ. γονιμότητα και ιστοπαθολογική εξέταση γονάδων) για τον αδιαμφισβήτητο εντοπισμό ειδικών κυτταρικών μηχανισμών δράσης. Αντίθετα, το σύνολο των τελικών σημείων επιτρέπει συλλογικά την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τις πιθανές ενδοκρινικές διαταράξεις και, ως

▼M7

εκ τούτου, παρέχει καθοδήγηση για περαιτέρω δοκιμές. Μολονότι δεν συνδέεται ειδικά με το ενδοκρινικό σύστημα, η γονιμότητα, λόγω της αποδεδειγμένης ευαισθησίας της σε γνωστές ενδοκρινικά δραστικές χημικές ουσίες (5), αποτελεί σημαντικό τελικό σημείο που πρέπει να συμπεριλαμβάνεται, διότι, όταν αυτή και άλλα τελικά σημεία δεν επηρεάζονται, αυξάνεται η πεποίθηση ότι μια ένωση είναι απίθανο να είναι ενδοκρινικά δραστική. Όταν, όμως, υπάρχει επίδραση στη γονιμότητα, αυτή συνεισφέρει σε μεγάλο βαθμό στην εξαγωγή συμπερασμάτων βάσει του βάρους της απόδειξης. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών παρέχει περαιτέρω καθοδήγηση για την ερμηνεία των δεδομένων και την αποδοχή των αποτελεσμάτων των δοκιμών.

10. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

11. Στη δοκιμή, αρσενικά και θηλυκά ψάρια σε αναπαραγωγική κατάσταση εκτίθενται μαζί μέσα σε δοκιμαστικά δοχεία. Η ενήλικη και αναπαραγωγική τους κατάσταση επιτρέπει σαφή διαφοροποίηση του κάθε φύλου και, ως εκ τούτου, τη φυλοσύνδετη ανάλυση κάθε τελικού σημείου και εξασφαλίζει την ευαισθησία τους έναντι εξωγενών χημικών ουσιών. Στο τέλος της δοκιμής, το φύλο επιβεβαιώνεται με μακροσκοπική εξέταση των γονάδων έπειτα από διάνοιξη της κοιλιακής πλευράς της κοιλίας με ψαλίδι. Το προσάρτημα 2 παρέχει επισκόπηση των σημαντικών συνθηκών βιοπροσδιορισμού. Η δοκιμή αρχίζει συνήθως με δείγματα ψαριών από πληθυσμό που βρίσκεται σε ωοτοκία· δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υπερήλικα ζώα. Οδηγίες για την ηλικία των ψαριών και την αναπαραγωγική κατάσταση περιλαμβάνονται στην ενότητα για την επιλογή των ψαριών. Η δοκιμή διεξάγεται με τη χρήση τριών συγκεντρώσεων έκθεσης στη χημική ουσία και ενός μάρτυρα με νερό, καθώς και ενός μάρτυρα με διαλύτη, εάν είναι απαραίτητο. Για τα ζεβρόψαρα χρησιμοποιούνται δύο δοχεία ή επαναλήψεις ανά μεταχείριση (κάθε δοχείο περιέχει 5 αρσενικά και 5 θηλυκά άτομα). Για τους χοντροκέφαλους φοξίνους χρησιμοποιούνται τέσσερα δοχεία ή επαναλήψεις ανά μεταχείριση (κάθε δοχείο περιέχει 2 αρσενικά και 4 θηλυκά άτομα). Αυτό γίνεται για να εξυπηρετείται η χωροκρατική συμπεριφορά του αρσενικού χοντροκέφαλου φοξίνου και, παράλληλα, να διατηρεί η δοκιμή επαρκή ισχύ. Για τα ρυζόψαρα χρησιμοποιούνται τέσσερα δοχεία ή επαναλήψεις ανά μεταχείριση (κάθε δοχείο περιέχει 3 αρσενικά και 3 θηλυκά άτομα). Η έκθεση διαρκεί 21 ημέρες και η δειγματοληψία ψαριών διενεργείται την 21η ημέρα της έκθεσης. Η ποσοτική γονιμότητα παρακολουθείται σε καθημερινή βάση.

12. Για τη δειγματοληψία κατά την 21η ημέρα, τα ζώα θανατώνονται με τρόπο ανώδυνο. Τα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου μετρούνται σε χοντροκέφαλους φοξίνους και ρυζόψαρα (βλ. προσαρτήματα 5Α και 5Β)· για τον προσδιορισμό της VTG σε ζεβρόψαρα και χοντροκέφαλους φοξίνους συλλέγονται δείγματα αίματος· εναλλακτικά μπορούν να συλλεχθούν κεφαλή/ουρά για τον προσδιορισμό της VTG στα ζεβρόψαρα (προσάρτημα 6)· για την ανάλυση VTG στα ρυζόψαρα συλλέγεται το ήπαρ (προσάρτημα 6)· οι γονάδες μονιμοποιούνται είτε ολόκληρες είτε ανατετμημένες για ενδεχόμενη ιστοπαθολογική αξιολόγηση (22).

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΠΟΔΟΧΗΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

13. Για να είναι αποδεκτά τα αποτελέσματα της δοκιμής, πρέπει να πληρούνται οι ακόλουθες προϋποθέσεις:

— η θνησιμότητα μαρτύρων σε νερό (ή διαλύτη) δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 10 % στο τέλος της περιόδου έκθεσης·

— η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 60 % της τιμής κορεσμού με αέρα (ASV) καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης·

— η θερμοκρασία του νερού θα πρέπει να μη διαφέρει μεταξύ των δοκιμαστικών δοχείων κατά περισσότερο από ± 1,5 °C οποιαδήποτε χρονική στιγμή κατά τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης και να διατηρείται με απόκλιση 2 °C εντός του εύρους θερμοκρασιών που ορίζεται για το υπό δοκιμή είδος (προσάρτημα 2)·

— θα πρέπει να υπάρχουν στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο διάλυμα διατηρήθηκαν ικανοποιητικά στα όρια του ± 20 % των μέσων τιμών που μετρήθηκαν·

▼M7

— πρέπει να υπάρχουν στοιχεία που να αποδεικνύουν ενεργό ωοτοκία των ψαριών σε όλες τις επαναλήψεις πριν από την έναρξη της έκθεσης στη χημική ουσία και στις επαναλήψεις με μάρτυρες κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Εργαστηριακός εξοπλισμός

14. Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός και, ειδικότερα, τα ακόλουθα:

α. οξυγονόμετρα και πεχάμετρα·

β. εξοπλισμός για τον προσδιορισμό της σκληρότητας και αλκαλικότητας του νερού·

γ. κατάλληλη συσκευή για τον έλεγχο και, κατά προτίμηση, τη συνεχή παρακολούθηση της θερμοκρασίας·

δ. δεξαμενές κατασκευασμένες από χημικώς αδρανές υλικό και κατάλληλης χωρητικότητας ανάλογα με τον συνιστώμενο πληθυσμιακό φόρτο και την πληθυσμιακή πυκνότητα (βλ. προσάρτημα 2)·

ε. υπόστρωμα ωοτοκίας για χοντροκέφαλους φοξίνους και ζεβρόψαρα — το παράρτημα 4 παρέχει τις απαραίτητες λεπτομέρειες·

στ. ζυγός κατάλληλης ακρίβειας (δηλαδή ακρίβεια έως ± 0,5mg).

Νερό

15. Ως νερό δοκιμής μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε νερό στο οποίο το υπό δοκιμή είδος εμφανίζει την ενδεδειγμένη μακροπρόθεσμη επιβίωση και ανάπτυξη. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής το νερό θα πρέπει να είναι σταθερής ποιότητας. Το pH του νερού θα πρέπει να κυμαίνεται από 6,5 έως 8,5, κατά τη διάρκεια όμως μιας δεδομένης δοκιμής δεν θα πρέπει να αποκλίνει πέραν των ± 0,5 μονάδων pH. Για να διασφαλίζεται ότι το νερό αραίωσης δεν πρόκειται να επηρεάσει αδικαιολόγητα το αποτέλεσμα της δοκιμής (π.χ. μέσω του σχηματισμού συμπλόκων με την υπό δοκιμή χημική ουσία)· θα πρέπει κατά διαστήματα να λαμβάνονται δείγματα για ανάλυση. Όταν είναι γνωστό ότι η ποιότητα του νερού αραίωσης είναι σχετικά σταθερή, θα πρέπει, π.χ. κάθε τρεις μήνες, να γίνονται μετρήσεις βαρέων μετάλλων (π.χ. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd και Ni), βασικών ανιόντων και κατιόντων (π.χ. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} και SO_4^{2-}), γεωργικών φαρμάκων (π.χ. ολικών οργανοφωσφορικών και ολικών οργανοχλωριούχων γεωργικών φαρμάκων), ολικού οργανικού άνθρακα και αιωρούμενων στερεών. Εάν η ποιότητα του νερού έχει αποδειχθεί ότι είναι σταθερή για ένα τουλάχιστον έτος, η συχνότητα των προσδιορισμών μπορεί να περιοριστεί και τα διαστήματα να αυξηθούν (π.χ. κάθε έξι μήνες). Μερικά χημικά χαρακτηριστικά αποδεκτού νερού αραίωσης καταγράφονται στο παράρτημα 3.

Διαλύματα της δοκιμής

16. Τα διαλύματα της δοκιμής με τις επιλεγμένες συγκεντρώσεις παρασκευάζονται με αραίωση διαλύματος παρακαταθήκης. Το διάλυμα παρακαταθήκης θα πρέπει, κατά προτίμηση, να παρασκευάζεται με απλή ανάμειξη ή ανακίνηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε νερό αραίωσης, με τη χρήση μηχανικών μέσων (π.χ. ανάδευση ή υπερήχους). Για να επιτευχθεί το κατάλληλο πυκνό διάλυμα παρακαταθήκης είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν στήλες κορεσμού (στήλες διαλυτότητας). Δεν συνιστάται η χρήση φορέα διαλύτη. Ωστόσο, σε περίπτωση που απαιτείται διαλύτης, θα πρέπει να υποβάλλεται παράλληλα στη διαδικασία ένας μάρτυρας με διαλύτη, στην ίδια συγκέντρωση διαλύτη όπως στις ομάδες μεταχείρισης με τη χημική ουσία. Για χημικές ουσίες που είναι δύσκολο να υποβληθούν σε δοκιμή, ο διαλύτης μπορεί να είναι, από τεχνική άποψη, η βέλτιστη λύση· οι ενδιαφερόμενοι θα πρέπει να ανατρέξουν στο έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ σχετικά με τις δοκιμές υδατικής τοξικότητας δύσκολων ουσιών και μειγμάτων (23). Η επιλογή του διαλύτη καθορίζεται από τις χημικές ιδιότητες της χημικής ουσίας ή του μείγματος. Το έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ συνιστά μέγιστη συγκέντρωση 100μl/l, όριο που θα πρέπει να τηρείται. Ωστόσο, μια πρόσφατη ανασκόπηση (24) ανέδειξε πρόσθετες ανησυχίες όταν χρησιμοποιούνται διαλύτες για δοκιμές ενδοκρινικής δραστικότητας. Ως εκ τούτου, συνιστάται η συγκέντρωση του διαλύτη, εφόσον χρειάζεται, να ελαχιστοποιείται όποτε αυτό είναι τεχνικά εφικτό (εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας).

▼M7

17. Χρησιμοποιείται σύστημα δοκιμής συνεχούς ροής. Ένα τέτοιο σύστημα διανέμει και αραιώνει συνεχώς ένα διάλυμα παρακαταθήκης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (π.χ. δοσιμετρική αντλία, αναλογικός αραιωτής, σύστημα κορεσμού) για την παροχή σειράς συγκεντρώσεων στους δοκιμαστικούς θαλάμους. Οι ταχύτητες ροής των διαλυμάτων παρακαταθήκης και του νερού αραίωσης θα πρέπει να ελέγχονται κατά διαστήματα, κατά προτίμηση καθημερινά, κατά τη διάρκεια της δοκιμής και να μη μεταβάλλονται κατά περισσότερο από 10 % σε όλη τη διάρκειά της. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγεται η χρήση χαμηλής ποιότητας πλαστικών σωληνώσεων ή άλλων υλικών που ενδέχεται να περιέχουν βιολογικά δραστικές χημικές ουσίες. Κατά την επιλογή του υλικού για το σύστημα συνεχούς ροής, θα πρέπει να συνυπολογίζεται η πιθανή προσρόφηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο υλικό αυτό.

Διατήρηση των ψαριών

18. Τα υπό δοκιμή ψάρια θα πρέπει να επιλέγονται από εργαστηριακό πληθυσμό, κατά προτίμηση από ένα και μόνο απόθεμα, που έχει εγκλιματιστεί για δύο εβδομάδες τουλάχιστον πριν από τη δοκιμή, υπό συνθήκες ποιότητας νερού και φωτισμού παρόμοιες με εκείνες που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή. Είναι σημαντικό, ο φόρτος και η πυκνότητα του πληθυσμού (για ορισμούς βλ. προσάρτημα 1) να είναι κατάλληλα για το χρησιμοποιούμενο υπό δοκιμή είδος ψαριών (βλέπε προσάρτημα 2).

19. Έπειτα από ένα 48ωρο εγκατάστασης, καταγράφονται οι θνησιμότητες και εφαρμόζονται τα ακόλουθα κριτήρια:

— ποσοστά θνησιμότητας άνω του 10 % του πληθυσμού σε επτά ημέρες: απορρίπτεται ολόκληρη η παρτίδα·

— ποσοστά θνησιμότητας μεταξύ 5 % και 10 % του πληθυσμού: εγκλιματισμός για επτά ακόμη ημέρες. Εάν, κατά τη διάρκεια του δεύτερου επταημέρου, καταγραφεί ποσοστό θνησιμότητας άνω του 5 %, απορρίπτεται ολόκληρη η παρτίδα·

— ποσοστά θνησιμότητας κάτω του 5 % του πληθυσμού σε επτά ημέρες: η παρτίδα γίνεται αποδεκτή.

20. Τα ψάρια δεν θα πρέπει να λαμβάνουν αγωγή για ασθένεια κατά τη διάρκεια της περιόδου εγκλιματισμού, της περιόδου προέκθεσης και της περιόδου έκθεσης.

Προέκθεση και επιλογή των ψαριών

21. Συνιστάται περίοδος προέκθεσης μίας ή δύο εβδομάδων, με τα ζώα τοποθετημένα σε δοχεία παρόμοια με εκείνα της πραγματικής δοκιμής. Τα ψάρια θα πρέπει να σιτίζονται κατά βούληση (*ad libitum*), καθ' όλη την περίοδο διατήρησης και κατά τη διάρκεια της φάσης έκθεσης. Το στάδιο της έκθεσης αρχίζει με ενήλικα ψάρια με φυλετικό διμορφισμό, προερχόμενα από εργαστηριακή πηγή αναπαραγωγικά ώριμων ζώων (π.χ. με σαφή δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου, ορατά στην περίπτωση του χοντροκέφαλου φοξίνου και του ρυζόψαρου), που βρίσκονται σε ενεργό ωοτοκία. Ως γενική κατεύθυνση και μόνο (και να μην ληφθεί υπόψη ανεξάρτητα από την παρατήρηση της πραγματικής αναπαραγωγικής κατάστασης δεδομένης παρτίδας ψαριών), οι χοντροκέφαλοι φοξίνοι θα πρέπει να είναι ηλικίας περίπου 20 (± 2) εβδομάδων, εφόσον έχουν καλλιεργηθεί στους 25 ± 2 °C κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Τα ρυζόψαρα θα πρέπει να είναι ηλικίας περίπου 16 (± 2) εβδομάδων, εφόσον έχουν καλλιεργηθεί στους 25 ± 2 °C κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Τα ζεβρόψαρα θα πρέπει να είναι ηλικίας περίπου 16 (± 2) εβδομάδων, εφόσον έχουν καλλιεργηθεί στους 26 ± 2 °C κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Η παραγωγή αυγών πρέπει να αξιολογείται καθημερινά κατά το στάδιο της προέκθεσης. Συνιστάται να παρατηρείται η ωοτοκία σε όλες τις δεξαμενές επανάληψης, πριν από την ενσωμάτωσή τους στο στάδιο της έκθεσης της δοκιμής. Ποσοτικές κατευθύνσεις σχετικά με την επιθυμητή ημερήσια παραγωγή αυγών δεν μπορούν να παρασχεθούν επί του παρόντος, αλλά είναι σχετικά σύνηθες να παρατηρείται μέση εναπόθεση > 10 αυγών/θηλυκό άτομο/ημέρα για κάθε είδος. Για την κατανομή των επαναλήψεων στα διάφορα πειραματικά επίπεδα θα πρέπει να χρησιμοποιείται τυχαιοποιημένος σχεδιασμός κατά ομάδες με βάση την παραγωγή αυγών, ώστε να εξασφαλίζεται ισόρροπη κατανομή των επαναλήψεων.

▼M7

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

22. Χρησιμοποιούνται τρεις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, ένας μάρτυρας (νερό) και, εφόσον χρειαστεί, ένας μάρτυρας με διαλύτη. Τα δεδομένα μπορούν να αναλυθούν για να προσδιοριστούν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των αποκρίσεων μεταχείρισης και των αποκρίσεων μαρτύρων. Από τις αναλύσεις αυτές θα προκύψουν στοιχεία σχετικά με το κατά πόσον απαιτείται περαιτέρω μακροπρόθεσμη δοκιμή για δυσμενείς επιδράσεις της χημικής ουσίας (δηλ. στην επιβίωση, την ανάπτυξη, την αύξηση και την αναπαραγωγή) και όχι για χρήση στην εκτίμηση κινδύνου (25).

23. Για τα ζεβρόψαρα, την 21η ημέρα του πειράματος, αρσενικά και θηλυκά άτομα από κάθε επίπεδο μεταχείρισης (5 αρσενικά και 5 θηλυκά καθεμίας από τις δύο επαναλήψεις) και από τον(τους) μάρτυρα(ες) υποβάλλονται σε δειγματοληψία για τη μέτρηση της βιτελογενίνης. Για τα ρυζόψαρα, την 21η ημέρα του πειράματος, αρσενικά και θηλυκά άτομα από κάθε επίπεδο μεταχείρισης (3 αρσενικά και 3 θηλυκά καθεμίας από τις τέσσερις επαναλήψεις) και από τον(τους) μάρτυρα(ες) υποβάλλονται σε δειγματοληψία για τη μέτρηση της βιτελογενίνης και των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου. Για τους χοντροκέφαλους φοξίνους, την 21η ημέρα της έκθεσης, αρσενικά και θηλυκά άτομα (2 αρσενικά και 4 θηλυκά καθεμίας από τις τέσσερις επαναλήψεις) και από τον(τους) μάρτυρα(ες) υποβάλλονται σε δειγματοληψία για τη μέτρηση της βιτελογενίνης και των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου. Απαιτείται ποσοτική εκτίμηση της γονιμότητας και οι ιστοί των γονάδων θα πρέπει να μονιμοποιούνται ολόκληροι ή να ανατέμνονται για πιθανή ιστοπαθολογική αξιολόγηση, εάν χρειαστεί.

Επιλογή των συγκεντρώσεων δοκιμής

24. Για τους σκοπούς της παρούσας δοκιμής, η υψηλότερη συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να καθορίζεται από τη μέγιστη ανεκτή συγκέντρωση (ΜΑΣ), η οποία έχει προσδιοριστεί με δοκιμή προσδιορισμού του εύρους τιμών ή με βάση άλλα δεδομένα τοξικότητας, ή τα 10 mg/l ή τη μέγιστη υδατοδιαλυτότητα, αναλόγως του ποια από τις τιμές αυτές είναι χαμηλότερη. Η ΜΑΣ ορίζεται ως η υψηλότερη συγκέντρωση της χημικής ουσίας στη δοκιμή που έχει ως αποτέλεσμα θνησιμότητα μικρότερη από 10 %. Η χρήση αυτής της προσέγγισης προϋποθέτει την ύπαρξη εμπειρικών δεδομένων οξείας τοξικότητας ή άλλων δεδομένων τοξικότητας από τα οποία μπορεί να γίνει εκτίμηση της ΜΑΣ. Η εκτίμηση της ΜΑΣ μπορεί να μην είναι ακριβής και συνήθως απαιτεί τη γνώμη ενός ειδικού.

25. Απαιτούνται τρεις συγκεντρώσεις δοκιμής, οι οποίες να απέχουν μεταξύ τους κατά σταθερό παράγοντα που δεν υπερβαίνει το 10, και ένας μάρτυρα με νερό αραίωσης (και μάρτυρας με διαλύτη, εάν χρειάζεται). Συνιστάται εύρος παραγόντων απόστασης μεταξύ 3,2 και 10.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Επιλογή και ζύγιση των υπό δοκιμή ψαριών

26. Είναι σημαντικό να ελαχιστοποιείται η διακύμανση του βάρους των ψαριών στην αρχή της δοκιμής. Κατάλληλες περιοχές μεγεθών για τα διάφορα είδη που συνιστώνται για χρήση στην παρούσα δοκιμή παρέχονται στο προσάρτημα 2. Για το σύνολο της παρτίδας ψαριών που χρησιμοποιείται στη δοκιμή, το εύρος βάρους σώματος ανά άτομο για αρσενικά και θηλυκά ψάρια στην έναρξη της δοκιμής θα πρέπει, εάν είναι δυνατόν, να διατηρείται εντός του ± 20 % του αριθμητικού μέσου βάρους του ιδίου φύλου. Πριν από τη δοκιμή συνιστάται να ζυγίζεται ένα μερικό δείγμα του αποθέματος ψαριών, για να εκτιμάται το μέσο βάρος.

Συνθήκες έκθεσης

Διάρκεια

27. Η διάρκεια της δοκιμής είναι 21 ημέρες, μετά από μια περίοδο προέκθεσης. Η συνιστώμενη περίοδος προέκθεσης είναι μία έως δύο εβδομάδες.

Σίτιση

28. Τα ψάρια θα πρέπει να σιτίζονται κατά βούληση με κατάλληλη τροφή (προσάρτημα 2) και σε επίπεδα επαρκή για να διατηρηθεί η φυσική κατάσταση. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγεται η ανάπτυξη μικροβίων και η θολερότητα του νερού. Ως γενική κατεύθυνση, το ημερήσιο

▼M7

σιτηρέσιο μπορεί να διαιρείται σε δύο ή τρεις ίσες μερίδες για πολλαπλές σιτίσεις την ημέρα, διαχωριζόμενες από διαστήματα τουλάχιστον τριών ωρών. Ένα μόνο μεγαλύτερο σιτηρέσιο είναι αποδεκτό, ιδίως για τα σαββατοκύριακα. Η σίτιση των ψαριών θα πρέπει να διακόπτεται 12 ώρες πριν από τη δειγματοληψία/νεκροψία.

29. Η τροφή των ψαριών θα πρέπει να αξιολογείται για την παρουσία προσμείξεων, όπως τα οργανοχλωριούχα γεωργικά φάρμακα, οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAH), τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCB). Θα πρέπει να αποφεύγονται τροφές με υψηλό επίπεδο φυτοοιστρογόνων που μπορούν να διακυβεύσουν την απόκριση της δοκιμής σε γνωστό αγωνιστή οιστρογόνων (π.χ. 17b-οιστραδιόλη).

30. Τα υπολείμματα των τροφών και τα περιττώματα θα πρέπει να απομακρύνονται από τα δοκιμαστικά δοχεία τουλάχιστον δύο φορές την εβδομάδα, π.χ. με προσεκτικό καθαρισμό του πυθμένα κάθε δεξαμενής με σίφωνα.

Φως και θερμοκρασία

31. Η φωτοπερίοδος και η θερμοκρασία του νερού θα πρέπει να είναι κατάλληλες για τα υπό δοκιμή είδη (βλ. προσάρτημα 2).

Συχνότητα αναλυτικών προσδιορισμών και μετρήσεων

32. Πριν από την έναρξη της περιόδου έκθεσης, θα πρέπει να διασφαλίζεται η ορθή λειτουργία του συστήματος παροχής της χημικής ουσίας. Όλες οι αναλυτικές μέθοδοι που απαιτούνται θα πρέπει να είναι καθιερωμένες, συμπεριλαμβανομένων επαρκών γνώσεων σχετικά με τη χημική σταθερότητα στο σύστημα δοκιμής. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας προσδιορίζονται σε τακτά διαστήματα, ως εξής: οι ταχύτητες ροής του μέσου αραίωσης και του διαλύματος παρακαταθήκης του τοξικού παράγοντα θα πρέπει να ελέγχονται κατά προτίμηση καθημερινά ή τουλάχιστον δύο φορές την εβδομάδα και να μη διαφέρουν περισσότερο από 10 % καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Συνιστάται να μετρώνται οι πραγματικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε όλα τα δοχεία κατά την έναρξη της δοκιμής και, κατόπιν, ανά εβδομάδα.

33. Συνιστάται να βασίζονται τα αποτελέσματα σε μετρηθείσες συγκεντρώσεις. Ωστόσο, εάν η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο διάλυμα έχει διατηρηθεί ικανοποιητικά εντός του ± 20 % της ονομαστικής συγκέντρωσης καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής, τα αποτελέσματα μπορούν να βασίζονται στις ονομαστικές ή στις μετρηθείσες τιμές.

34. Τα δείγματα μπορεί να χρειάζεται να διηθηθούν (π.χ. με τη χρήση διηθητικού μέσου με πόρους διαμέτρου 0,45 μm) ή να φυγοκεντρηθούν. Εάν χρειάζεται, η συνιστώμενη διαδικασία είναι η φυγοκέντρηση. Πάντως, εφόσον η υπό δοκιμή ύλη δεν προσροφάται στους ηθμούς, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η διήθηση.

35. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, το διαλυμένο οξυγόνο, η θερμοκρασία και το pH θα πρέπει να μετρώνται σε όλα τα δοκιμαστικά δοχεία τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα. Η ολική σκληρότητα και αλκαλικότητα θα πρέπει να μετρώνται στους μάρτυρες και σε ένα δοχείο με την υψηλότερη συγκέντρωση τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα. Η θερμοκρασία θα πρέπει, κατά προτίμηση, να παρακολουθείται συνεχώς σε ένα τουλάχιστον δοκιμαστικό δοχείο.

Παρατηρήσεις

36. Ορισμένες γενικές (π.χ. επιβίωση) και βιολογικές αποκρίσεις (π.χ. τα επίπεδα VTG) αξιολογούνται κατά τη διάρκεια της δοκιμής ή στο τέλος της. Απαιτείται καθημερινή ποσοτική παρακολούθηση της γονιμότητας. Η μέτρηση και αξιολόγηση αυτών των τελικών σημείων, καθώς και η χρησιμότητά τους, περιγράφονται κατωτέρω.

Επιβίωση

37. Τα ψάρια θα πρέπει να εξετάζονται καθημερινά κατά τη διάρκεια της περιόδου δοκιμής, τυχόν θνησιμότητα να καταγράφεται και τα νεκρά ψάρια να απομακρύνονται το ταχύτερο δυνατό. Τα νεκρά ψάρια δεν θα πρέπει να αντικαθίστανται ούτε στα δοχεία του μάρτυρα ούτε στα δοχεία αγωγής. Το φύλο των ψαριών που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμής θα πρέπει να προσδιορίζεται με μακροσκοπική αξιολόγηση των γονάδων.

▼M7

Συμπεριφορά και εμφάνιση

38. Κάθε μη φυσιολογική συμπεριφορά (σε σχέση με τους μάρτυρες) θα πρέπει να σημειώνεται· αυτό μπορεί να περιλαμβάνει σημεία γενικής τοξικότητας, μεταξύ των οποίων υπεραερισμό, ασυντόνιστες κολυμβητικές κινήσεις, απώλεια ισορροπίας και άτυπη ηρεμία ή συμπεριφορά σίτισης. Επίσης, θα πρέπει να σημειώνονται τυχόν εξωτερικές ανωμαλίες (όπως π.χ. αιμορραγία, αποχρωματισμός). Τα εν λόγω σημεία τοξικότητας θα πρέπει να εξετάζονται με προσοχή κατά την ερμηνεία των δεδομένων, δεδομένου ότι μπορεί να υποδηλώνουν συγκεντρώσεις στις οποίες οι βιοδείκτες ενδοκρινικής δραστικότητας δεν είναι αξιόπιστοι. Τέτοιες παρατηρήσεις σχετικά με τη συμπεριφορά ενδέχεται επίσης να παράσχουν χρήσιμες ποιοτικές πληροφορίες για τη διατύπωση πιθανών μελλοντικών απαιτήσεων για δοκιμές σε ψάρια. Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί χωροκρατική επιθετικότητα σε κανονικούς αρσενικούς ή αρρενοποιημένους θηλυκούς χοντροκέφαλους φοξίνους όταν εκτίθενται σε ανδρογόνα· στα ζεβρόψαρα, η χαρακτηριστική συμπεριφορά ζευγαρώματος και ωοτοκίας με το πρώτο φως της αυγής ελαττώνεται ή παρεμποδίζεται από την έκθεση σε οιστρογόνα ή αντιανδρογόνα.

39. Επειδή ορισμένες πτυχές της εμφάνισης (κυρίως το χρώμα) μπορούν να αλλάξουν γρήγορα λόγω των χειρισμών, είναι σημαντικό οι ποιοτικές παρατηρήσεις να πραγματοποιούνται πριν από την απομάκρυνση των ζώων από το σύστημα δοκιμής. Η μέχρι σήμερα εμπειρία με τον χοντροκέφαλο φοξίνο δείχνει ότι μερικές ενδοκρινικά δραστικές χημικές ουσίες ενδέχεται αρχικά να επιφέρουν αλλαγές στα ακόλουθα εξωτερικά χαρακτηριστικά: χρώμα σώματος (ανοιχτό ή σκούρο), μοτίβα χρωματισμού (παρουσία κάθετων λωρίδων) και σχήμα σώματος (κεφαλή και θωρακική περιοχή). Ως εκ τούτου, οι παρατηρήσεις της φυσικής εμφάνισης των ψαριών θα πρέπει να πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια της δοκιμής και όταν ολοκληρώνεται η μελέτη.

Γονιμότητα

40. Οι καθημερινές ποσοτικές παρατηρήσεις της ωοτοκίας θα πρέπει να καταγράφονται ανά επανάληψη. Η παραγωγή αυγών θα πρέπει να καταγράφεται ανά επανάληψη ως αριθμός αυγών/επιζών θηλυκό άτομο/ημέρα. Τα αυγά θα πρέπει να απομακρύνονται καθημερινά από τους δοκιμαστικούς θαλάμους Για τον χοντροκέφαλο φοξίνο και το ζεβρόψαρο θα πρέπει να τοποθετούνται στον δοκιμαστικό θάλαμο υποστρώματα ωοτοκίας, ώστε να μπορούν τα ψάρια να εναποθέτουν τα αυγά τους υπό κανονικές συνθήκες. Το προσάρτημα 4 παρέχει περαιτέρω λεπτομέρειες των συνιστώμενων υποστρωμάτων ωοτοκίας για το ζεβρόψαρο (προσάρτημα 4α) και τον χοντροκέφαλο φοξίνο (προσάρτημα 4Β). Δεν θεωρείται αναγκαίο για το ρυζόψαρο το υπόστρωμα ωοτοκίας.

Ανώδυνη θανάτωση των ψαριών

41. Την 21η ημέρα, δηλ. κατά τον τερματισμό της έκθεσης, τα ψάρια θα πρέπει να υποβάλλονται σε ευθανασία με κατάλληλες ποσότητες τρικαΐνης [μεθανοσουλφονική τρικαΐνη, μετακαΐνη, MS-222 (αριθ. CAS 886-86-2)], διάλυμα 100-500 mg/l, στο οποίο έχει προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα $NaHCO_3$ (διττανθρακικό νάτριο, αριθ. CAS.144-55-8) 300 mg/l για τον περιορισμό του ερεθισμού του βλεννογόνου· στη συνέχεια λαμβάνονται δείγματα αίματος ή ιστών για τον προσδιορισμό της VTG, όπως εξηγείται στην ενότητα για τη βιτελογενίνη.

Παρατήρηση των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου

42. Μερικές ενδοκρινικά δραστικές χημικές ουσίες μπορεί να επιφέρουν αλλαγές σε εξειδικευμένα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου (αριθμός γαμήλιων φυματίων σε αρσενικούς χοντροκέφαλους φοξίνους, θηλοειδών αποφύσεων σε αρσενικά ρυζόψαρα). Ειδικότερα, χημικές ουσίες με ορισμένους τρόπους δράσης μπορεί να προκαλέσουν μη φυσιολογική εμφάνιση δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου σε ζώα του αντίθετου φύλου· για παράδειγμα, αγωνιστές των υποδοχέων ανδρογόνων, όπως η τρενβολόνη, η μεθυλοτεστοστερόνη και η διυδροτεστοστερόνη, μπορούν να προκαλέσουν την ανάπτυξη εμφανών γαμήλιων φυματίων στους θηλυκούς χοντροκέφαλους φοξίνους ή θηλοειδών αποφύσεων στα θηλυκά ρυζόψαρα (11, 20, 21). Έχει επίσης αναφερθεί ότι οι αγωνιστές των υποδοχέων οιστρογόνων μπορούν να μειώσουν τον αριθμό των γαμήλιων φυματίων και το μέγεθος του ραχιαίου αυχενικού σπογγώδους εξογκώματος στους ενήλικες αρσενικούς χοντροκέφαλους φοξίνους (26, 27). Τέτοιες μακροσκοπικές μορφολογικές παρατηρήσεις ενδέχεται να παράσχουν χρήσιμες ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες για τη διατύπωση πιθανών μελλοντικών απαιτήσεων για δοκιμές σε ψάρια.

▼M7

Ο αριθμός και το μέγεθος των γαμήλιων φυματίων στους χοντροκέφαλους φοξίνους και των θηλοειδών αποφύσεων στα ρυζόψαρα μπορούν να προσδιοριστούν ποσοτικά απευθείας ή, πιο πρακτικά, σε διατηρημένα δείγματα. Οι συνιστώμενες διαδικασίες για την αξιολόγηση των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου στους χοντροκέφαλους φοξίνους και στα ρυζόψαρα είναι διαθέσιμες στα προσαρτήματα 5α και 5β αντίστοιχα.

Βιτελογενίνη (VTG)

43. Συλλέγεται αίμα από την ουραία αρτηρία/φλέβα με ηπαρινισμένο τριχοειδές σωληνάριο μικροαιματοκρίτη ή, εναλλακτικά, με καρδιακή παρακέντηση με σύριγγα. Ανάλογα με το μέγεθος των ψαριών, οι ποσότητες αίματος που μπορούν να συλλεχθούν κυμαίνονται γενικά από 5 έως 60 μl ανά άτομο για τους χοντροκέφαλους φοξίνους και 5-15 μl ανά άτομο για τα ζεβρόψαρα. Το πλάσμα διαχωρίζεται από το αίμα με φυγοκέντρηση και φυλάσσεται με αναστολείς πρωτεάσης στους – 80 °C, μέχρι να αναλυθεί για VTG. Εναλλακτικά, στα ρυζόψαρα χρησιμοποιείται το ήπαρ, ενώ στα ζεβρόψαρα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ομογενοποίημα κεφαλής/ουράς ως πηγή ιστών για τον προσδιορισμό της VTG (προσάρτημα 6). Η μέτρηση της VTG θα πρέπει να βασίζεται σε επικυρωμένη ομόλογη μέθοδο ELISA, με χρήση ομόλογου προτύπου VTG και ομόλογων αντισωμάτων. Συνιστάται η χρήση μεθόδου που να επιτρέπει την ανίχνευση επιπέδων VTG λίγων μόλις ng/ml πλάσματος (ή ng/mg ιστού), που αποτελούν το επίπεδο υποβάθρου σε μη εκτεθειμένα αρσενικά ψάρια.

44. Ο ποιοτικός έλεγχος της ανάλυσης VTG διεξάγεται με τη χρήση προτύπων, τυφλών δειγμάτων και τουλάχιστον διπλών αναλύσεων. Για κάθε μέθοδο ELISA θα πρέπει να διεξάγεται δοκιμή για την επίδραση της μήτρας (επίδραση της αραίωσης του δείγματος) με σκοπό τον προσδιορισμό του ελάχιστου παράγοντα αραίωσης του δείγματος. Κάθε πλάκα ELISA που χρησιμοποιείται για δοκιμές VTG θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα δείγματα ποιοτικού ελέγχου: τουλάχιστον 6 πρότυπα βαθμονόμησης που καλύπτουν το εύρος των αναμενόμενων συγκεντρώσεων VTG και τουλάχιστον μία τυφλή δοκιμή μη ειδικής δέσμευσης (ανάλυση εις διπλούν). Η απορρόφηση των εν λόγω τυφλών δειγμάτων θα πρέπει να είναι μικρότερη από 5 % της μέγιστης απορρόφησης του προτύπου βαθμονόμησης. Αναλύονται τουλάχιστον δύο κλάσματα (σε διπλές μικροκοιλότητες) από κάθε αραίωση του δείγματος. Οι διπλές μικροκοιλότητες που διαφέρουν κατά περισσότερο από 20 % θα πρέπει να υποβάλλονται σε νέα ανάλυση.

45. Ο συντελεστής συσχέτισης (R^2) για τις καμπύλες βαθμονόμησης θα πρέπει να είναι μεγαλύτερος του 0,99. Ωστόσο, η υψηλή συσχέτιση δεν αρκεί για να διασφαλιστεί επαρκής πρόβλεψη της συγκέντρωσης σε όλο το εύρος τιμών. Πέρα από την ύπαρξη αρκούντως υψηλής συσχέτισης για την καμπύλη βαθμονόμησης, η συγκέντρωση του κάθε προτύπου, όπως υπολογίζεται από την καμπύλη βαθμονόμησης, θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 70 και 120 % της ονομαστικής συγκέντρωσης. Εάν οι ονομαστικές συγκεντρώσεις τείνουν να απομακρύνονται από τη γραμμή παλινδρόμησης της βαθμονόμησης (π.χ. σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις), μπορεί να είναι απαραίτητο να χωριστεί η καμπύλη βαθμονόμησης σε χαμηλό και υψηλό εύρος τιμών ή να χρησιμοποιηθεί μη γραμμικό μοντέλο για την επαρκή προσαρμογή στα δεδομένα απορρόφησης. Εάν η καμπύλη διαχωριστεί, αμφότερα τα τμήματα γραμμής θα πρέπει να έχουν $R^2 > 0,99$.

46. Το όριο ανίχνευσης (LOD) ορίζεται ως η συγκέντρωση του χαμηλότερου αναλυτικού προτύπου και το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) ως το γινόμενο της συγκέντρωσης του χαμηλότερου αναλυτικού προτύπου επί τον χαμηλότερο συντελεστή αραίωσης.

47. Κάθε ημέρα κατά την οποία εκτελούνται δοκιμές VTG, αναλύεται ένα εμπλουτισμένο δείγμα που παρασκευάζεται με χρήση προτύπου αναφοράς μεταξύ δοκιμών (προσάρτημα 7). Ο λόγος της αναμενόμενης συγκέντρωσης προς τη μετρούμενη συγκέντρωση αναφέρεται μαζί με τα αποτελέσματα από κάθε σειρά δοκιμών που διενεργούνται τη συγκεκριμένη ημέρα.

Αξιολόγηση της ιστοπαθολογικής εικόνας των γονάδων

48. Η διενέργεια ιστοπαθολογικής εξέτασης των γονάδων μπορεί να απαιτείται από τις ρυθμιστικές αρχές για να μελετηθεί το στοχευόμενο όργανο στον άξονα HPG, μετά την έκθεση σε χημικές ουσίες. Στο πλαίσιο αυτό, οι γονάδες μονιμοποιούνται είτε ολόκληρες ή ανατετμημένες. Όταν απαιτείται

▼M7

ιστοπαθολογική εξέταση, αναζητούνται στις γονάδες ειδικές αποκρίσεις που σχετίζονται με το ενδοκρινικό σύστημα κατά την αξιολόγηση της ενδοκρινικής δραστικότητας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Αυτές οι διαγνωστικές αποκρίσεις περιλαμβάνουν κυρίως την παρουσία ορχικών ωοκυττάρων, υπερπλασία των κυττάρων Leydig (διάμεσα ορχικά κύτταρα), μειωμένο σχηματισμό λεκίθου, αυξημένη σπερματογένεση και περιθυλακική υπερπλασία. Άλλες βλάβες των γονάδων, όπως ατρησία ωοκυττάρων, εκφυλισμός των όρχεων και αλλαγές σταδίων, ενδέχεται να οφείλονται σε διάφορες αιτίες. Το έγγραφο καθοδήγησης σχετικά με την ιστοπαθολογία των γονάδων ψαριών προσδιορίζει τις διαδικασίες που χρησιμοποιούνται για την ανατομή, τη μονιμοποίηση, την τμήση και την ιστοπαθολογική αξιολόγηση των γονάδων (22).

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αξιολόγηση των αποκρίσεων βιοδεικτών με ανάλυση διασποράς (ANOVA)

49. Για τον προσδιορισμό της δυνητικής δραστικότητας μιας χημικής ουσίας, συγκρίνονται οι αποκρίσεις μεταξύ των ομάδων μεταχείρισης και των ομάδων μαρτύρων με ανάλυση διασποράς (ANOVA). Εάν χρησιμοποιείται μάρτυρας με διαλύτη, θα πρέπει να εκτελείται κατάλληλος στατιστικός έλεγχος μεταξύ του μάρτυρα με νερό αραίωσης και του μάρτυρα με διαλύτη για κάθε τελικό σημείο. Οδηγίες για τον τρόπο χειρισμού των δεδομένων που αφορούν τον μάρτυρα με νερό αραίωσης και τον μάρτυρα με διαλύτη στη μετέπειτα στατιστική ανάλυση περιέχονται στο έγγραφο ΟΟΣΑ, 2006c (28). Όλα τα δεδομένα βιολογικής απόκρισης θα πρέπει να αναλύονται και να αναφέρονται χωριστά ανά φύλο. Εάν δεν πληρούνται οι παραδοχές που απαιτούνται για παραμετρικές μεθόδους — μη κανονική κατανομή (π.χ. έλεγχος Shapiro-Wilk) ή ετερογενής διασπορά (έλεγχος Bartlett ή Leven), θα πρέπει να εξετάζεται ο μετασχηματισμός των δεδομένων για την ομοιογενοποίηση των διασπορών πριν από την εκτέλεση της ANOVA ή η εκτέλεση σταθμισμένης ANOVA. Για μη μονοτονική σχέση δόσης-απόκρισης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο έλεγχος Dunnett (παραμετρικός) σε πολλαπλές συγκρίσεις με ζεύγη ή ένας έλεγχος Mann-Whitney με διόρθωση Bonferroni (μη παραμετρικός). Εάν η σχέση δόσης-απόκρισης είναι σχεδόν μονοτονική, μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλοι στατιστικοί έλεγχοι (π.χ. έλεγχος Jonckheere-Terpstra ή Williams). Στο προσάρτημα 8 παρέχεται στατιστικό διάγραμμα ροής για να βοηθήσει στη λήψη αποφάσεων σχετικά με τον καταλληλότερο στατιστικό έλεγχο που πρέπει να χρησιμοποιηθεί. Συμπληρωματικές πληροφορίες διατίθενται επίσης από το έγγραφο του ΟΟΣΑ σχετικά με τις τρέχουσες προσεγγίσεις για στατιστική ανάλυση των δεδομένων οικοτοξικότητας (28).

Αναφορά των αποτελεσμάτων των δοκιμών

50. Στα δεδομένα της μελέτης θα πρέπει να περιλαμβάνονται τα εξής:

Εγκαταστάσεις δοκιμών:

— Υπεύθυνο προσωπικό και οι αρμοδιότητές του στη μελέτη·

— Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να έχει αποδείξει ότι διαθέτει τεχνική ικανότητα χρησιμοποιώντας ένα ευρύ φάσμα αντιπροσωπευτικών χημικών ουσιών

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

— Χαρακτηρισμός της υπό δοκιμή χημικής ουσίας

— Φυσική μορφή και φυσικοχημικές ιδιότητες που άπτονται της δοκιμής

— Μέθοδος και συχνότητα παρασκευής των συγκεντρώσεων δοκιμής

— Πληροφορίες για τη σταθερότητα και τη βιοαποδομησιμότητα

Διαλύτης:

— Χαρακτηρισμός του διαλύτη (είδος, χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση)

— Αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη (εάν δεν πρόκειται για νερό)

▼**M7**

Ζώα δοκιμής:

— Είδος και στέλεχος

— Προμηθευτής και συγκεκριμένες εγκαταστάσεις του προμηθευτή

— Ηλικία των ψαριών κατά την έναρξη της δοκιμής και κατάσταση αναπαραγωγής/ωοτοκίας

— Λεπτομέρειες σχετικά με τη διαδικασία εγκλιματισμού των ζώων

— Σωματικό βάρος των ψαριών κατά την έναρξη της έκθεσης (από ένα μερικό δείγμα από το απόθεμα ψαριών)

Συνθήκες δοκιμής:

— Χρησιμοποιηθείσα διαδικασία δοκιμής (είδος δοκιμής, πληθυσμιακός φόρτος, πληθυσμιακή πυκνότητα κ.λπ.)·

— Μέθοδος παρασκευής των διαλυμάτων παρακαταθήκης και ταχύτητα ροής·

— Ονομαστικές συγκεντρώσεις δοκιμής, εβδομαδιαία μετρούμενες συγκεντρώσεις των διαλυμάτων δοκιμής και αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιείται, μέσες μετρηθείσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις τους στα δοκιμαστικά δοχεία και στοιχεία που αποδεικνύουν ότι οι μετρήσεις αναφέρονται στις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε αληθές διάλυμα·

— Χαρακτηριστικά του νερού αραίωσης (συμπεριλαμβανομένων του pH, της σκληρότητας, της αλκαλικότητας, της θερμοκρασίας, της συγκέντρωσης διαλυμένου οξυγόνου, των επιπέδων υπολειμματικού χλωρίου, του ολικού οργανικού άνθρακα, των αιωρούμενων στερεών και τυχόν άλλων μετρήσεων)·

— Ποιότητα του νερού στα δοκιμαστικά δοχεία: pH, σκληρότητα, θερμοκρασία και συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου·

— Λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη σίτιση (π.χ. είδος τροφής, πηγή, ποσότητα και συχνότητα χορήγησης), καθώς και αναλύσεις για την ανίχνευση σχετικών προσμείξεων, εάν υπάρχουν (π.χ. PCB, PAH και οργανοχλωριούχα γεωργικά φάρμακα).

Αποτελέσματα

— Στοιχεία που αποδεικνύουν ότι οι μάρτυρες πληρούν τα κριτήρια αποδοχής της δοκιμής·

— Δεδομένα για τη θνησιμότητα σε κάθε συγκέντρωση δοκιμής και μάρτυρα·

— Χρησιμοποιηθείσες τεχνικές στατιστικής ανάλυσης, επεξεργασία των δεδομένων και αιτιολόγηση των χρησιμοποιηθεισών τεχνικών·

— Δεδομένα σχετικά με τις βιολογικές παρατηρήσεις μακροσκοπικής μορφολογίας, συμπεριλαμβανομένων των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου, της παραγωγής αυγών και της VTG·

— Αποτελέσματα της ανάλυσης των δεδομένων, κατά προτίμηση σε μορφή πίνακα και γραφήματος·

— Επίπτωση (incidence) τυχόν ασυνήθων αντιδράσεων των ψαριών και ορατών επιδράσεων που προκλήθηκαν από την υπό δοκιμή χημική ουσία.

▼M7

ΚΑΘΟΔΗΓΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΟΔΟΧΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

51. Η παρούσα ενότητα περιλαμβάνει ορισμένα θέματα που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμής για τα διάφορα τελικά σημεία που μετρήθηκαν. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να ερμηνεύονται με ιδιαίτερη προσοχή όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία φαίνεται να προκαλεί έκδηλη τοξικότητα ή να επιδρά στη γενική κατάσταση του πειραματόζωου.

52. Στον καθορισμό του εύρους των συγκεντρώσεων της δοκιμής, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μην υπερβαίνεται η μέγιστη ανεκτή συγκέντρωση για να είναι δυνατή η ουσιαστική ερμηνεία των δεδομένων. Είναι σημαντικό να υπάρχει τουλάχιστον μία μεταχείριση χωρίς σημεία τοξικών επιδράσεων. Τα συμπτώματα νόσου και τα σημεία τοξικών επιδράσεων θα πρέπει να αξιολογούνται ενδελεχώς και να αναφέρονται. Για παράδειγμα, η παραγωγή VTG στα θηλυκά άτομα είναι πιθανόν να επηρεαστεί επίσης από γενική τοξικότητα και μη ενδοκρινικούς τοξικούς τρόπους δράσης, π.χ. ηπατοτοξικότητα. Ωστόσο, η ερμηνεία των επιδράσεων μπορεί να ενισχυθεί με βάση άλλα επίπεδα μεταχείρισης στα οποία η συστημική τοξικότητα δεν αποτελεί συγχυτικό παράγοντα.

53. Υπάρχουν ορισμένες πτυχές που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη για την αποδοχή των αποτελεσμάτων των δοκιμών. Ενδεικτικά, τα επίπεδα VTG στις ομάδες αρσενικών και θηλυκών μαρτύρων θα πρέπει να είναι διακριτά και να διαφέρουν κατά περίπου τρεις τάξεις μεγέθους στον χοντροκέφαλο φοξίνο και το ζεβρόψαρο και κατά περίπου μία τάξη μεγέθους στο ρυζόψαρο. Παραδείγματα του εύρους τιμών που συναντάται στις ομάδες μαρτύρων και μεταχείρισης είναι διαθέσιμα στις εκθέσεις επικύρωσης (1, 2, 3, 4). Υψηλές τιμές VTG στους αρσενικούς μάρτυρες μπορούν να διακυβεύσουν την αποκρισιμότητα της δοκιμής και την ικανότητα ανίχνευσης ασθενών αγωνιστών οιστρογόνων. Χαμηλές τιμές VTG στους θηλυκούς μάρτυρες μπορούν να διακυβεύσουν την αποκρισιμότητα της δοκιμής και την ικανότητα ανίχνευσης αναστολέων αρωματάσης και αγωνιστών οιστρογόνων. Για την εκπόνηση της παρούσας καθοδήγησης χρησιμοποιήθηκαν οι μελέτες επικύρωσης.

54. Όσον αφορά τον ποσοτικό προσδιορισμό της παραγωγής αυγών, αυτός υπόκειται σε σημαντικές διακυμάνσεις [ο συντελεστής μεταβλητότητας (CV) μπορεί να κυμαίνεται από 20 έως 60 %] που επηρεάζουν την ικανότητα της δοκιμής να ανιχνεύει σημαντική μείωση της παραγωγής αυγών σε ποσοστό κατώτερο από 70 %, όσο ο CV προσεγγίζει ή υπερβαίνει το 50 %. Όταν ο CV περιορίζεται σε χαμηλότερες τιμές (περίπου 20-30 %), η δοκιμή έχει αποδεκτή ισχύ (80 %) για την ανίχνευση μείωσης της παραγωγής αυγών κατά 40-50 %. Ο σχεδιασμός της δοκιμής για τον χοντροκέφαλο φοξίνο, που περιλαμβάνει τέσσερις επαναλήψεις ανά επίπεδο μεταχείρισης, αναμένεται να παρέχει μεγαλύτερη ισχύ για το τελικό σημείο γονιμότητας σε σύγκριση με έναν σχεδιασμό δοκιμής μόνο με δύο επαναλήψεις.

55. Εάν το εργαστήριο δεν έχει εκτελέσει τη δοκιμή στο παρελθόν ή εάν έχουν επέλθει ουσιαστικές αλλαγές (π.χ. αλλαγή της ποικιλίας ή του προμηθευτή των ψαριών), είναι σκόπιμο να διεξαχθεί μελέτη τεχνικής ικανότητας. Συνιστάται η χρήση χημικών ουσιών που καλύπτουν ένα φάσμα τρόπων δράσης ή επιπτώσεων σε ορισμένα από τα τελικά σημεία της δοκιμής. Στην πράξη, κάθε εργαστήριο ενθαρρύνεται να συγκροτήσει δικά του ιστορικά δεδομένα μαρτύρων για αρσενικά και θηλυκά ψάρια και να διεξαγάγει δοκιμή με θετικό μάρτυρα οιστρογόνου δράσης (π.χ. 17β-οιστραδιόλη σε συγκέντρωση 100 ng/l ή γνωστό ασθενή αγωνιστή) που προκαλεί αύξηση της VTG σε αρσενικά ψάρια, δοκιμή με θετικό μάρτυρα αναστολής της αρωματάσης (π.χ. φαδροζόλη ή prochloraz σε συγκέντρωση 300 μg/l) που προκαλεί μείωση της VTG σε θηλυκά ψάρια, καθώς και δοκιμή με θετικό μάρτυρα ανδρογόνου δράσης (π.χ. 17β-τρενβολόνη σε συγκέντρωση 5 μg/l) που προκαλεί την επαγωγή δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου σε θηλυκούς χοντροκέφαλους φοξίνους και ρυζόψαρα. Όλα αυτά τα δεδομένα μπορούν να συγκρίνονται με τα διαθέσιμα δεδομένα από τις μελέτες επικύρωσης (1, 2, 3) ώστε να διασφαλίζεται η τεχνική ικανότητα του εργαστηρίου.

56. Σε γενικές γραμμές, οι μετρήσεις VTG θα πρέπει να θεωρούνται θετικές, εάν προκύπτει στατιστικά σημαντική αύξηση της VTG στα αρσενικά άτομα ($p < 0,05$) ή στατιστικά σημαντική μείωση στα θηλυκά ($p < 0,05$), τουλάχιστον

▼M7

στην υψηλότερη δόση δοκιμής σε σύγκριση με την ομάδα μάρτυρα και εφόσον δεν υπάρχουν σημεία γενικής τοξικότητας. Το θετικό αποτέλεσμα ενισχύεται περαιτέρω εάν καταδειχθεί η ύπαρξη βιολογικά ευλογοφανούς σχέσης μεταξύ της δόσης και της καμπύλης απόκρισης. Όπως προαναφέρθηκε, η μείωση της VTG μπορεί να μην οφείλεται αποκλειστικά στο ενδοκρινικό σύστημα· ωστόσο, ένα θετικό αποτέλεσμα θα πρέπει εν γένει να ερμηνεύεται ως ένδειξη ενδοκρινικής δραστικότητας *in vivo* και να αποτελεί κανονικά το έναυσμα για ενέργειες με σκοπό την περαιτέρω διασαφήνιση.

57. Ιστοπαθολογική αξιολόγηση των γονάδων μπορεί να απαιτείται από τις ρυθμιστικές αρχές για να διαπιστώνεται η αναπαραγωγική υγεία των πειραματόζωων και να καθίσταται δυνατή η αξιολόγηση του βάρους της απόδειξης των αποτελεσμάτων της δοκιμής. Η διενέργεια ιστολογικής εξέτασης των γονάδων μπορεί να μην είναι αναγκαία στις περιπτώσεις κατά τις οποίες είτε η VTG είτε τα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου είναι θετικά (δηλ. αύξηση ή μείωση της VTG ή επαγωγή δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, Paris.

(2) OECD (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, Paris.

(3) OECD (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, Paris.

(4) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects (accessed 18/09/08).

(5) US EPA (2007). Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. 15 Δεκεμβρίου 2007 US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 pp.

(6) OECD (2008). Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, Paris.

(7) Sumpter J.P. and S. Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives; 103 Suppl 7:173-8 Review.

(8) Pawlowski S., *et al.* (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. Aquatic Toxicology; 68(3):277-91.

(9) Andersen L., *et al* (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (Danio rerio). Aquatic Toxicology; 76(3-4):343-52.

(10) Ankley G.T., *et al.* (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Toxicological Sciences; 67(1):121-30.

▼**M7**

(11) Panter G.H., *et al.* (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. Aquatic Toxicology; 70(1):11-21.

(12) Parks L.G., *et al.* (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2):113-25.

(13) Panter G.H., *et al.* (1999). Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.

(14) Fenske M., *et al.* (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. Comp. Biochem. Phys. C 129 (3): 217-232.

(15) Holbech H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 130: 119-131

(16) Rose J., *et al.* (2002). Vitellogenin induction by 17β-estradiol and 17α-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). Comp. Biochem. Physiol. C. 131: 531-539.

(17) Brion F., *et al.* (2002). Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Toxicology and Chemistry; vol 21: 1699-1708.

(18) Yokota H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4:87–98.

(19) Tatarazako N., *et al.* (2004). Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50:301-308.

(20) Ankley G.T., *et al.* (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environmental Toxicology and Chemistry; 22(6): 1350-60.

(21) Seki M, *et al* (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry; 23(3):774-81.

(22) OECD (2010). Guidance Document on Fish Gonadal Histopathology. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 123, Paris.

(23) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris

(24) Hutchinson T.H., *et al.* (2006a). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; pp.69–92.

(25) Hutchinson T.H., *et al.* (2006b). Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as «signposts,» not «traffic lights,» in risk assessment. Environmental Health Perspectives; 114 Suppl 1:106-14.

▼**M7**

(26) Miles-Richardson S.R., *et al*. (1999). Effects of waterborne exposure to 17β-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Aquat. Toxicol. 47, 129-145.

(27) Martinovic D., *et al*. (2008). Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. Environ. Toxicol. Chem. 27, 478-488.

(28) OECD (2006c), Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.54, OECD, Paris.

(29) US EPA (2008), Peer-Review Results for the Fish Short-Term Reproduction Assay, dated 30 January 2008, US Environmental Protection Agency, Washington DC. 110 pp.

(30) OECD (2012), *OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupter*, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 150, OECD, Paris.

▼**M7**

Προσάρτημα 1

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΟΡΙΣΜΟΙ

Άξονας HPG: ο άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων.

ΜΑΣ: Μέγιστη Ανεκτή Συγκέντρωση, που αντιπροσωπεύει περίπου 10 % της LC_{50}.

Πληθυσμιακή πυκνότητα: ο αριθμός ψαριών κατ' όγκο νερού.

Πληθυσμιακός φόρτος: το νωπό βάρος των ψαριών κατ' όγκο νερού.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα.

CV: Συντελεστής μεταβλητότητας

ELISA: ενζυμικός ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός

VTG: η βιτελογενίνη — φωσφολιπογλυκοπρωτεΐνη που αποτελεί πρόδρομη ένωση των πρωτεϊνών της λεκίθου του αυγού και συναντάται κανονικά σε σεξουαλικά ενεργά θηλυκά άτομα όλων των ωοτόκων ειδών.

▼M7

Προσάρτημα 2

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΟΚΙΜΗ ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΗΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ ΣΕ ΨΑΡΙΑ

1. Συνιστώμενα είδη	Χοντροκέφαλος φοξίνος (*Pimephales promelas*)	Ρυζόψαρο (*Oryzias latipes*)	Ζεβρόψαρο (*Danio rerio*)
2. Τύπος δοκιμής	Συνεχούς ροής	Συνεχούς ροής	Συνεχούς ροής
3. Θερμοκρασία νερού	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Ποιότητα φωτισμού	Λαμπτήρες φθορισμού (ευρέος φάσματος)	Λαμπτήρες φθορισμού (ευρέος φάσματος)	Λαμπτήρες φθορισμού (ευρέος φάσματος)
5. Ένταση φωτός	10-20 μE/m^2/s, 540-1 000 lux ή 50-100 ft-c (επίπεδα περιβάλλοντος του εργαστηρίου)	10-20 μE/m^2/s, 540-1 000 lux ή 50-100 ft-c (επίπεδα περιβάλλοντος του εργαστηρίου)	10-20 μE/m^2/s, 540-1 000 lux ή 50-100 ft-c (επίπεδα περιβάλλοντος του εργαστηρίου)
6. Φωτοπερίοδος (οι φάσεις μετάβασης — αυγή/λυκόφως — είναι προαιρετικές, ωστόσο δεν θεωρούνται απαραίτητες)	16 ώρες φως, 8 ώρες σκοτάδι	12-16 ώρες φως, 12-8 ώρες σκοτάδι	12-16 ώρες φως, 12-8 ώρες σκοτάδι
7. Πληθυσμιακός φόρτος	< 5 g ανά l	< 5 g ανά l	< 5 g ανά l
8. Μέγεθος δοκιμαστικού θαλάμου	10 l (τουλάχιστον)	2 l (τουλάχιστον)	5 l (τουλάχιστον)
9. Όγκος διαλύματος δοκιμής	8 l (τουλάχιστον)	1,5 l (τουλάχιστον)	4 l (τουλάχιστον)
10. Ανανεώσεις του όγκου των διαλυμάτων δοκιμής	Τουλάχιστον 6 ημερησίως	Τουλάχιστον 5 ημερησίως	Τουλάχιστον 5 ημερησίως
11. Ηλικία των υπό δοκιμή οργανισμών	Βλ. σημείο 21.	Βλ. σημείο 21.	Βλ. σημείο 21.
12. Κατά προσέγγιση νωπό βάρος των ενήλικων ψαριών (g)	Θηλυκά 1,5 ± 20 % Αρσενικά: 2,5 ± 20 %	Θηλυκά 0,35 ± 20 % Αρσενικά: 0,35 ± 20 %	Θηλυκά 0,65 ± 20 % Αρσενικά: 0,4 ± 20 %
13. Αριθμός ψαριών ανά δοκιμαστικό δοχείο	6 (2 αρσενικά και 4 θηλυκά)	6 (3 αρσενικά και 3 θηλυκά)	10 (5 αρσενικά και 5 θηλυκά)
14. Αριθμός μεταχειρίσεων	= 3 (συν κατάλληλοι μάρτυρες)	= 3 (συν κατάλληλοι μάρτυρες)	= 3 (συν κατάλληλοι μάρτυρες)
15. Αριθμός δοχείων ανά μεταχείριση	4 κατ' ελάχιστο	4 κατ' ελάχιστο	2 κατ' ελάχιστο
16. Αριθμός ψαριών ανά συγκέντρωση δοκιμής	16 ενήλικα θηλυκά και 8 αρσενικά (4 θηλυκά και 2 αρσενικά σε κάθε δοχείο επανάληψης)	12 ενήλικα θηλυκά και 12 αρσενικά (3 θηλυκά και 3 αρσενικά σε κάθε δοχείο επανάληψης)	10 ενήλικα θηλυκά και 10 αρσενικά (5 θηλυκά και 5 αρσενικά σε κάθε δοχείο επανάληψης)
17. Πρόγραμμα σίτισης	Ζωντανές ή κατεψυγμένες ενήλικες γαρίδες της άλμης (*Artemia*) ή προνύμφες (ναύπλιοι) γαρίδας της άλμης, δύο ή τρεις φορές ημερησίως κατά βούληση, τροφή που διατίθεται στο εμπόριο ή συνδυασμός των παραπάνω	Ναύπλιοι γαρίδας της άλμης δύο ή τρεις φορές ημερησίως κατά βούληση, τροφή που διατίθεται στο εμπόριο ή συνδυασμός των παραπάνω	Ναύπλιοι γαρίδας της άλμης δύο ή τρεις φορές ημερησίως κατά βούληση, τροφή που διατίθεται στο εμπόριο ή συνδυασμός των παραπάνω

▼**M7**

18. Αερισμός	Καθόλου, εκτός εάν η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου μειωθεί σε επίπεδα κάτω από το 60 % της τιμής κορεσμού με αέρα	Καθόλου, εκτός εάν η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου μειωθεί σε επίπεδα κάτω από το 60 % της τιμής κορεσμού με αέρα	Καθόλου, εκτός εάν η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου μειωθεί σε επίπεδα κάτω από το 60 % της τιμής κορεσμού με αέρα
19. Νερό αραίωσης	Καθαρό νερό από επιφανειακά ύδατα, γεώτρηση ή ανασύσταση ή αποχλωριωμένο νερό βρύσης	Καθαρό νερό από επιφανειακά ύδατα, γεώτρηση ή ανασύσταση ή αποχλωριωμένο νερό βρύσης	Καθαρό νερό από επιφανειακά ύδατα, γεώτρηση ή ανασύσταση ή αποχλωριωμένο νερό βρύσης
20. Περίοδος προέκθεσης	Συνιστώμενο διάστημα: 7-14 ημέρες	Συνιστώμενο διάστημα: 7-14 ημέρες	Συνιστώμενο διάστημα: 7-14 ημέρες
21. Διάρκεια έκθεσης στη χημική ουσία	21 ημέρες	21 ημέρες	21 ημέρες
22. Βιολογικά τελικά σημεία	— επιβίωση — συμπεριφορά — γονιμότητα — δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου — VTG — προαιρετικά, ιστοπαθολογική εξέταση γονάδων	— επιβίωση — συμπεριφορά — γονιμότητα — δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου — VTG — προαιρετικά, ιστοπαθολογική εξέταση γονάδων	— επιβίωση — συμπεριφορά — γονιμότητα — VTG — προαιρετικά, ιστοπαθολογική εξέταση γονάδων
23. Κριτήρια αποδοχής της δοκιμής	Διαλυμένο οξυγόνο ≥ 60 % της τιμής κορεσμού· μέση θερμοκρασία 25 ± 2 °C· 90 % επιβίωση των ψαριών στους μάρτυρες· μετρούμενες συγκεντρώσεις δοκιμής εντός εύρους 20 % των μέσων μετρούμενων τιμών ανά επίπεδο μεταχείρισης.	Διαλυμένο οξυγόνο ≥ 60 % της τιμής κορεσμού· μέση θερμοκρασία 25 ± 2 °C· 90 % επιβίωση των ψαριών στους μάρτυρες· μετρούμενες συγκεντρώσεις δοκιμής εντός εύρους 20 % των μέσων μετρούμενων τιμών ανά επίπεδο μεταχείρισης.	Διαλυμένο οξυγόνο ≥ 60 % της τιμής κορεσμού· μέση θερμοκρασία 26 ± 2 °C· 90 % επιβίωση των ψαριών στους μάρτυρες· μετρούμενες συγκεντρώσεις δοκιμής εντός εύρους 20 % των μέσων μετρούμενων τιμών ανά επίπεδο μεταχείρισης.

▼**M7**

Προσάρτημα 3

ΟΡΙΣΜΕΝΑ ΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΕΚΤΟΥ ΝΕΡΟΥ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

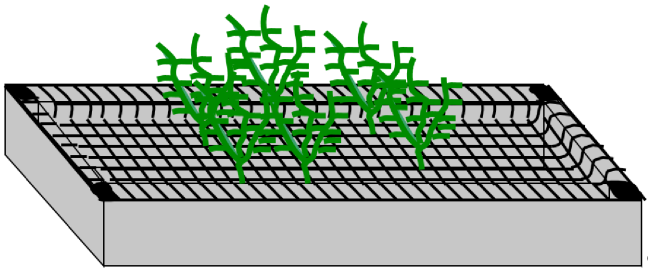
ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ
Σωματίδια	< 20 mg/l
Ολικός οργανικός άνθρακας	< 2 mg/l
Μη ιονισμένη αμμωνία	< 1 μg/l
Υπολείμματα χλωρίου	< 10 μg/l
Ολικά οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα	< 50 ng/l
Ολικά οργανοχλωριούχα γεωργικά φάρμακα συν πολυχλωριωμένα διφαινύλια	< 50 ng/l
Ολικό οργανικό χλώριο	< 25 ng/l

▼M7

Προσάρτημα 4Α

ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΩΟΤΟΚΙΑΣ ΓΙΑ ΖΕΒΡΟΨΑΡΑ

Δίσκος ωοτοκίας: δίσκος εργαστηριακών σκευών, εξ ολοκλήρου από γυαλί, για παράδειγμα διαστάσεων 22 × 15 × 5,5 cm (μήκος x× πλάτος × ύψος), καλυμμένος με αποσπώμενο συρμάτινο πλέγμα από ανοξείδωτο χάλυβα (με οπές πλάτους 2mm). Το πλέγμα θα πρέπει να καλύπτει το άνοιγμα του δίσκου εργαστηριακών σκευών σε επίπεδο χαμηλότερο από το χείλος.



Πάνω στο πλέγμα θα πρέπει να στερεωθεί υπόστρωμα ωοτοκίας, το οποίο θα πρέπει να αποτελεί μια κατασκευή που επιτρέπει στα ψάρια να εισχωρούν σε αυτή. Για παράδειγμα, κατάλληλα είναι τα τεχνητά φυτά ενυδρείου, κατασκευασμένα από πράσινο πλαστικό υλικό (Σημ.: θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το ενδεχόμενο προσρόφησης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο πλαστικό υλικό). Το πλαστικό υλικό θα πρέπει να εκπλένεται σχολαστικά με επαρκή ποσότητα θερμού νερού για επαρκές χρονικό διάστημα, ώστε να διασφαλίζεται ότι δεν πρόκειται να ελευθερωθούν χημικές ουσίες στο νερό της δοκιμής. Όταν χρησιμοποιούνται γυάλινα υλικά, θα πρέπει να διασφαλίζεται ότι τα ψάρια δεν θα τραυματιστούν ούτε θα συνωθούνται κατά τη διάρκεια ζωηρών κινήσεων.

Η απόσταση μεταξύ του δίσκου και των γυάλινων τοιχωμάτων θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 3 cm για να εξασφαλίζεται ότι δεν αποτίθενται αυγά εκτός του δίσκου. Τα αυγά που αποτίθενται πάνω στον δίσκο πέφτουν μέσα από το πλέγμα και μπορούν να συλλεχθούν 45-60 λεπτά μετά την έναρξη του φωτισμού. Τα διαφανή αυγά δεν προσκολλώνται και μπορούν εύκολα να καταμετρηθούν με τη χρήση εγκάρσιου φωτός. Όταν χρησιμοποιούνται πέντε θηλυκά άτομα ανά δοχείο, μέχρι 20 αυγά ημερησίως μπορούν να θεωρηθούν χαμηλός αριθμός, μέχρι 100 μέτριος και πάνω από 100 υψηλός αριθμός. Ο δίσκος ωοτοκίας αφαιρείται, συλλέγονται τα αυγά και ο δίσκος επανεισάγεται στο δοκιμαστικό δοχείο, είτε όσο το δυνατόν αργότερα το βράδυ είτε πολύ νωρίς το πρωί. Ο δίσκος θα πρέπει να επανεισάγεται το αργότερο ύστερα από μία ώρα, διαφορετικά το σήμα από το υπόστρωμα ωοτοκίας μπορεί να επαγάγει μεμονωμένα ζευγαρώματα και ωοτοκία σε ασυνήθη χρόνο. Εάν μια κατάσταση επιβάλλει να εισαχθεί αργότερα ο δίσκος ωοτοκίας, αυτό θα πρέπει να γίνει τουλάχιστον 9 ώρες μετά την έναρξη του φωτισμού. Την προχωρημένη αυτή ώρα της ημέρας δεν επάγεται πλέον ωοτοκία.

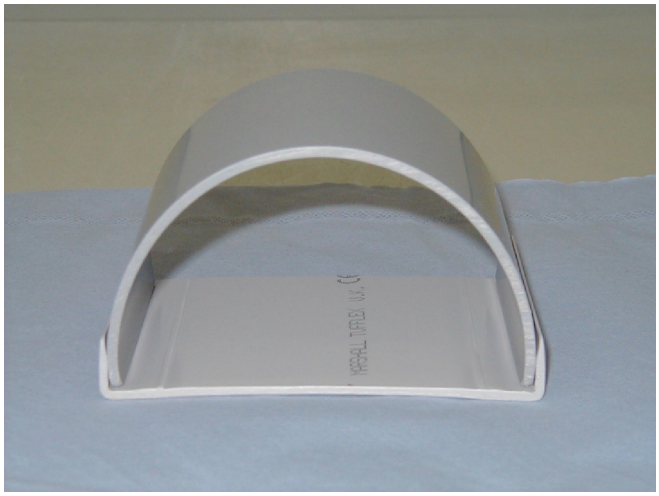
▼**M7**

Προσάρτημα 4Β

ΥΠΟΣΤΩΜΑ ΩΟΤΟΚΙΑΣ ΓΙΑ ΧΟΝΤΡΟΚΕΦΑΛΟΥΣ ΦΟΞΙΝΟΥΣ

Σε κάθε δοκιμαστικό θάλαμο τοποθετούνται δύο ή τρία συνδυασμένα πλαστικά/κεραμικά/γυάλινα ή από ανοξείδωτο χάλυβα πλακίδια και δίσκοι ωοτοκίας (π.χ. τεμάχιο ημικυκλικής υδρορροής χρώματος γκρι, μήκους 80 mm, στερεωμένο επάνω σε δίσκο με ανυψωμένα άκρα μήκους 130 mm) (βλ. εικόνα). Καταλλήλως πατιναρισμένα πλακίδια από PVC ή κεραμικό υλικό έχει αποδειχθεί ότι ενδείκνυνται ως υπόστρωμα ωοτοκίας (Thorpe και συν., 2007).

Συνιστάται τράχυνση των πλακιδίων για να βελτιώνεται η πρόσφυση. Ο δίσκος θα πρέπει επίσης να διαθέτει διαχωριστικό ώστε να μην έχουν τα ψάρια πρόσβαση στα πεσμένα αυγά, εκτός εάν έχει αποδειχθεί η απόδοση πρόσφυσης των αυγών για το χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα ωοτοκίας.



Η βάση είναι σχεδιασμένη έτσι ώστε να συγκρατεί τα αυγά που ενδεχομένως δεν προσκολλώνται στην επιφάνεια των πλακιδίων και, ως εκ τούτου, θα μπορούσαν να πέσουν στον πυθμένα της δεξαμενής (ή εκείνα που αποτίθενται απευθείας επάνω στην επίπεδη πλαστική βάση). Όλα τα υποστρώματα ωοτοκίας θα πρέπει να εκπλένονται τουλάχιστον για 12 ώρες, με νερό αραίωσης, πριν από τη χρήση.

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas.* Aquatic Toxicology, 81, 90–98.

▼M7

Προσάρτημα 5Α

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ ΣΤΟΝ ΧΟΝΤΡΟΚΕΦΑΛΟ ΦΟΞΙΝΟ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΑ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Επισκόπηση

Τα δυνητικά σημαντικά χαρακτηριστικά της φυσικής εμφάνισης των ενηλίκων χοντροκέφαλων φοξίνων σε δοκιμές ενδοκρινικών διαταρακτών περιλαμβάνουν το χρώμα του σώματος (ανοικτό/σκούρο), τα μοτίβα χρωματισμού (παρουσία ή απουσία κάθετων λωρίδων), το σχήμα του σώματος (σχήμα κεφαλής και θωρακικής περιοχής, διάταση κοιλίας) και εξειδικευμένα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου (αριθμός και μέγεθος των γαμήλιων φυματίων, μέγεθος του ραχιαίου σπογγώδους εξογκώματος και του ωοθέτη).

Τα γαμήλια φυμάτια βρίσκονται στην κεφαλή (ραχιαίο σπογγώδες εξόγκωμα) του αναπαραγωγικά ενεργού αρσενικού χοντροκέφαλου φοξίνου και είναι συνήθως διατεταγμένα με αμφίπλευρη συμμετρία (Jensen και συν. 2001). Οι θηλυκοί μάρτυρες και οι νεαροί αρσενικοί και θηλυκοί φοξίνοι δεν παρουσιάζουν ανάπτυξη φυματίων (Jensen και συν. 2001). Έως και οκτώ μεμονωμένα φυμάτια μπορούν να υπάρχουν γύρω από τα μάτια και μεταξύ των ρωθώνων των αρσενικών ατόμων. Τα περισσότερα και μεγαλύτερα φυμάτια βρίσκονται σε δύο παράλληλες γραμμές ακριβώς κάτω από τους ρώθωνες και πάνω από το στόμα. Σε πολλά ψάρια υπάρχουν ομάδες φυματίων κάτω από την κάτω γνάθο· τα εγγύτερα στο στόμα απαντώνται γενικά ως ένα και μοναδικό ζεύγος, ενώ η ομάδα που βρίσκεται προς την κοιλιά μπορεί να αποτελείται από έως και τέσσερα φυμάτια. Οι πραγματικοί αριθμοί φυματίων σπάνια υπερβαίνουν τα 30 (εύρος 18-28· Jensen και συν. 2001). Τα πιο κοινά φυμάτια (από άποψη αριθμού) απαντώνται ως χωριστή, σχετικά στρογγυλή δομή, με ύψος περίπου ίσο με την ακτίνα. Τα περισσότερα αναπαραγωγικά ενεργά αρσενικά άτομα διαθέτουν επίσης ορισμένα, τουλάχιστον, φυμάτια που είναι τόσο διευρυμένα και πρόδηλα ώστε να μην είναι διακριτά ως μεμονωμένες δομές.

Ορισμένα είδη ενδοκρινοδιαταρακτικών χημικών ουσιών μπορούν να προκαλέσουν ανώμαλη εμφάνιση ορισμένων δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου στο αντίθετο φύλο· για παράδειγμα, αγωνιστές των υποδοχέων ανδρογόνων, όπως η 17α-μεθυλοτεστοστερόνη ή η 17β-τρενβολόνη, μπορούν να προκαλέσουν την ανάπτυξη γαμήλιων φυματίων σε θηλυκούς χοντροκέφαλους φοξίνους (Smith 1974· Ankley και συν 2001, 2003), ενώ αγωνιστές των υποδοχέων οιστρογόνων ενδέχεται να μειώσουν τον αριθμό ή το μέγεθος των γαμήλιων φυματίων στα αρσενικά άτομα (Miles-Richardson και συν. 1999· Harries και συν. 2000).

Ακολουθεί περιγραφή του χαρακτηρισμού των γαμήλιων φυματίων σε χοντροκέφαλους φοξίνους βάσει των διαδικασιών που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο της Υπηρεσίας Προστασίας του Περιβάλλοντος των ΗΠΑ, στο Duluth της Μινεσότα. Τα διάφορα προϊόντα και/ή ο εξοπλισμός μπορούν να αντικατασταθούν με συγκρίσιμα διαθέσιμα υλικά.

Η παρατήρηση επιτυγχάνεται καλύτερα με τη χρήση μεγεθυντικού φακού με φωτισμό ή στερεοσκοπίου με φωτισμό και μεγέθυνση 3x. Εξετάζονται τα ψάρια νωτιαίως και με την πρόσθια πλευρά προς τα εμπρός (η κεφαλή προς την πλευρά του εξεταστή).

— Τοποθετείται το ψάρι σε μικρό τρυβλίο Petri (π.χ. διαμέτρου 100 mm), με την πρόσθια πλευρά προς τα εμπρός και την κοιλιά προς τα κάτω. Εστιάζεται ο φακός ώστε να είναι δυνατός ο εντοπισμός των φυματίων. Κυλίεται το ψάρι ήπια και αργά από τη μία πλευρά στην άλλη για τον εντοπισμό των περιοχών με φυμάτια. Καταμετρώνται και βαθμολογούνται τα φυμάτια.

— Επαναλαμβάνεται η παρατήρηση στην κοιλιακή επιφάνεια της κεφαλής, αφού τοποθετηθεί το ψάρι νωτιαίως και με την πρόσθια πλευρά προς τα εμπρός στο τρυβλίο Petri.

— Οι παρατηρήσεις θα πρέπει να ολοκληρώνονται εντός 2 λεπτών για κάθε ψάρι.

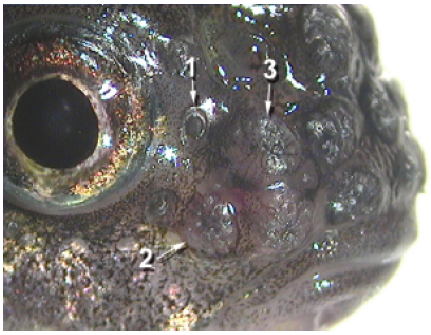
▼M7

Καταμέτρηση και αξιολόγηση των φυματίων

Έχουν προσδιοριστεί έξι συγκεκριμένες περιοχές για την αξιολόγηση της παρουσίας και της ανάπτυξης φυματίων στους ενήλικους χοντροκέφαλους φοξίνους. Εκπονήθηκε υπόδειγμα για τη χαρτογράφηση της θέσης και της ποσότητας των υπαρχόντων φυματίων (βλ. τέλος του παρόντος προσαρτήματος). Ο αριθμός φυματίων καταγράφεται και το μέγεθός τους μπορεί να ταξινομηθεί ποσοτικά ως εξής: 0-απουσία, 1-παρόν, 2-διευρυμένο και 3-πρόδηλο για κάθε οργανισμό (εικόνα 1).

Κλάση 0- απουσία φυματίων. Κλάση 1-παρόν φυμάτιο, χαρακτηριζόμενο ως κάθε φυμάτιο που έχει ένα μόνο σημείο του οποίου το ύψος είναι σχεδόν ίσο με την ακτίνα του. Κλάση 2-διευρυμένο φυμάτιο, χαρακτηριζόμενο από ιστό που μοιάζει με αστερίσκο στην όψη και διαθέτει συνήθως μεγάλη ακτινωτή βάση με ραβδώσεις ή αύλακες που ξεκινούν από το κέντρο. Η κορυφή του φυματίου είναι συχνά πιο οδοντωτή αλλά μπορεί να είναι ελαφρώς στρογγυλεμένη σε μερικές περιπτώσεις. Κλάση 3-πρόδηλο φυμάτιο, συνήθως πολύ μεγάλο και στρογγυλεμένο με λιγότερο σαφή δομή. Σε μερικές περιπτώσεις τα εν λόγω φυμάτια συρρέουν σχηματίζοντας ενιαία μάζα κατά μήκος μιας μεμονωμένης περιοχής ή ενός συνδυασμού περιοχών (Β, Γ και Δ, όπως περιγράφεται παρακάτω). Ο χρωματισμός και το σχέδιο είναι παρόμοια με εκείνα της κλάσης 2, αλλά σε μερικές περιπτώσεις αρκετά απροσδιόριστα. Η χρήση του εν λόγω συστήματος κατάταξης οδηγεί κατά κανόνα σε συνολική βαθμολογία φυματίων < 50 σε έναν φυσιολογικό αρσενικό μάρτυρα που διαθέτει από 18 έως 20 φυμάτια (Jensen και συν. 2001).

Εικόνα 1



Ο πραγματικός αριθμός φυματίων σε ορισμένα ψάρια μπορεί να είναι μεγαλύτερος από τα διαθέσιμα τετραγωνίδια του υποδείγματος για δεδομένη περιοχή κατάταξης. Στην περίπτωση αυτή, επιτρέπεται να σημειωθούν επιπλέον αριθμοί κλάσεων εντός, στα δεξιά ή στα αριστερά του τετραγωνιδίου. Ως εκ τούτου, το υπόδειγμα δεν χρειάζεται να εμφανίζει συμμετρία. Ως πρόσθετη τεχνική για τη χαρτογράφηση φυματίων που είναι σε ζεύγη ή συνδέονται κάθετα κατά μήκος του οριζόντιου επιπέδου του στόματος μπορούν να σημειωθούν δύο κλάσεις φυματίων στο ίδιο τετραγωνίδιο.

Περιοχές χαρτογράφησης:

Α — Φυμάτια που βρίσκονται γύρω από τον οφθαλμό. Χαρτογράφηση με κατεύθυνση από τη ράχη προς την κοιλιά γύρω από το πρόσθιο τμήμα της περιφέρειας του οφθαλμού. Συνήθως πολλαπλά σε ώριμους αρσενικούς μάρτυρες, απόντα σε θηλυκούς μάρτυρες, γενικά σε ζεύγη (ένα κοντά σε κάθε οφθαλμό) ή άζυγα σε θηλυκά άτομα που έχουν εκτεθεί σε ανδρογόνα.

Β-Φυμάτια που βρίσκονται ανάμεσα στους ρώθωνες (αισθητήριους πόρους). Κατά κανόνα σε ζεύγη στους αρσενικούς μάρτυρες, σε ανώτερα επίπεδα ανάπτυξης (2- διευρυμένα ή 3- πρόδηλα). Απόντα στους θηλυκούς μάρτυρες, σε ορισμένες περιπτώσεις εμφάνιση και ανάπτυξη σε θηλυκά άτομα που έχουν εκτεθεί σε ανδρογόνα.

Γ — Φυμάτια που βρίσκονται ακριβώς μπροστά από τους ρώθωνες, παράλληλα στο στόμα. Γενικά διευρυμένα ή πρόδηλα σε ώριμους αρσενικούς μάρτυρες. Παρόντα ή διευρυμένα σε λιγότερο ανεπτυγμένα αρσενικά άτομα ή σε θηλυκά άτομα που έχουν υποστεί μεταχείριση με ανδρογόνα.

▼M7

Δ — Φυμάτια που βρίσκονται παράλληλα κατά μήκος της γραμμής του στόματος. Συνήθως κατατάσσονται στα ανεπτυγμένα στους αρσενικούς μάρτυρες. Απόντα στους θηλυκούς μάρτυρες αλλά παρόντα σε θηλυκά άτομα που έχουν εκτεθεί σε ανδρογόνα.

Ε — Φυμάτια που βρίσκονται στην κάτω γνάθο, κοντά στο στόμα, συνήθως μικρά και σε ζεύγη. Ποικίλλουν στους αρσενικούς μάρτυρες και σε άτομα, αρσενικά και θηλυκά, που έχουν υποστεί μεταχείριση.

ΣΤ — Φυμάτια που βρίσκονται κοιλιακά των Ε. Κατά κανόνα μικρά και σε ζεύγη. Παρόντα στους αρσενικούς μάρτυρες και σε θηλυκά άτομα που έχουν εκτεθεί σε ανδρογόνα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow *(Pimephales promelas). Environ Toxicol Chem* 20:1276-1290.

(2) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray EL. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17-β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ Toxicol Chem* 22:1350-1360.

(3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA, Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows *(Pimephales promelas). Environ Sci Technol* 34:3003-3011.

(4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow *(Pimephales promelas). Comp Biochem Physiol C* 128:127-141.

(5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J Fish Biol* 59:515-523.

(6) Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows *(Pimephales promelas). Aquat Toxicol* 47:129-145.

(7) Smith RJF. 1974. Effects of 17α-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows *(Pimephales promelas). Can J Zool* 52:1031-1038.

Υπόδειγμα καταγραφής φυματίων

ID _____ **Αριθμητική ταξινόμηση**

Ημερομηνία _____ 1-παρόν

Συνολική βαθμολογία _____ 2-διευρυμένο

3-πρόδηλο

	A	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**						
	B	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**						
	Γ	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
	Δ	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
		E	**X1**	**X1**							
	ΣΤ	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**						

▼M7

Προσάρτημα 5Β

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ ΣΤΟ ΡΥΖΟΨΑΡΟ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΑ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Ακολουθεί περιγραφή της μέτρησης των θηλοειδών αποφύσεων ([1]), που είναι τα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου στο ρυζόψαρο (*Oryzias latipes*).

(1) Μετά την εκτομή του ήπατος (προσάρτημα 6), το νεκρό σώμα τοποθετείται με την κεφαλή προς τα επάνω και την ουρά προς τα κάτω μέσα σε κωνικό σωλήνα που περιέχει περίπου 10 ml ουδέτερου διαλύματος φορμαλδεΰδης 10 % (φορμόλη) στο οποίο έχει προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα. Εάν η γονάδα πρόκειται να μονιμοποιηθεί σε διάλυμα διαφορετικό από το ουδέτερο διάλυμα φορμαλδεΰδης 10 % στο οποίο έχει προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα, εκτελείται με ξυριστική λεπίδα εγκάρσια τομή στο νεκρό σώμα μεταξύ της πρόσθιας περιοχής του εδρικού πτερυγίου και του πρωκτού, με προσοχή ώστε να μην τρωθεί ο γεννητικός πόρος ούτε η γονάδα (εικόνα 3). Τοποθετείται η κρανιακή πλευρά του σώματος του ψαριού στο μονιμοποιητικό διάλυμα για τη διατήρηση της γονάδας και η ουραία πλευρά του σε ουδέτερο διάλυμα φορμαλδεΰδης 10 % στο οποίο έχει προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα, όπως περιγράφεται παραπάνω.

(2) Μετά την τοποθέτηση του σώματος του ψαριού σε ουδέτερο διάλυμα φορμαλδεΰδης 10 % στο οποίο έχει προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα, η πρόσθια περιοχή του εδρικού πτερυγίου πιάνεται με μικρή λαβίδα και αναδιπλώνεται για περίπου 30 δευτερόλεπτα ώστε το εδρικό πτερύγιο να μείνει ανοικτό. Κατά τον χειρισμό του εδρικού πτερυγίου με τη λαβίδα, πιάνονται μερικές ακτίνες του στην πρόσθια περιοχή, με προσοχή ώστε να μην προκληθούν αμυχές στις θηλοειδείς αποφύσεις.

(3) Αφού παραμείνει το εδρικό πτερύγιο ανοικτό για περίπου 30 δευτερόλεπτα, φυλάσσεται το σώμα του ψαριού σε ουδέτερο διάλυμα φορμαλδεΰδης 10 % στο οποίο έχει προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα, σε θερμοκρασία δωματίου, μέχρι τη μέτρηση των θηλοειδών αποφύσεων (η μέτρηση θα πρέπει να διενεργείται έπειτα από μονιμοποίηση για τουλάχιστον 24 ώρες).

Μέτρηση

(1) Μετά τη μονιμοποίηση του σώματος του ψαριού για τουλάχιστον 24 ώρες σε ουδέτερο διάλυμα φορμαλδεΰδης 10 % στο οποίο έχει προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα, αφαιρείται το νεκρό σώμα του ψαριού από τον κωνικό σωλήνα και σπογγίζεται η φορμόλη με διηθητικό χαρτί (ή απορροφητικό χαρτί).

(2) Τοποθετείται το ψάρι με την κοιλιά προς τα πάνω. Στη συνέχεια αποκόπτεται προσεκτικά το εδρικό πτερύγιο με μικρό ψαλίδι ανατομίας (είναι προτιμότερο να αποκόπτεται το εδρικό πτερύγιο μαζί με μικρή ποσότητα πτερυγιοφόρου).

(3) Πιάνεται η πρόσθια περιοχή του αποκομμένου εδρικού πτερυγίου με μικρή λαβίδα και τοποθετείται επάνω σε γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα μαζί με αρκετές σταγόνες νερού. Στη συνέχεια καλύπτεται το εδρικό πτερύγιο με καλυπτρίδα. Κατά τον χειρισμό του εδρικού πτερυγίου με τη λαβίδα λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μην προκληθούν αμυχές στις θηλοειδείς αποφύσεις.

(4) Μετράται ο αριθμός των αρθρικών πλακών που εμφανίζουν θηλοειδείς αποφύσεις με τη χρήση απαριθμητή κάτω από βιολογικό μικροσκόπιο (ορθό ή ανεστραμμένο). Οι θηλοειδείς αποφύσεις αναγνωρίζονται από τους μικρούς σχηματισμούς αποφύσεων που είναι ορατοί στην οπίσθια παρυφή των αρθρικών πλακών. Σημειώνεται στο φύλλο εργασίας ο αριθμός αρθρικών πλακών με θηλοειδείς αποφύσεις που εμφανίζονται σε κάθε ακτίνα του πτερυγίου (π.χ. πρώτη ακτίνα του πτερυγίου: 0, δεύτερη ακτίνα του πτερυγίου: 10,

([1]) Οι θηλοειδείς αποφύσεις κανονικά εμφανίζονται μόνο σε ενήλικα αρσενικά άτομα και απαντώνται στις ακτίνες του εδρικού πτερυγίου, από τη δεύτερη έως την έβδομη ή όγδοη, αριθμώντας από το οπίσθιο άκρο του (εικόνες 1 και 2). Ωστόσο, σπάνια εμφανίζονται αποφύσεις στην πρώτη ακτίνα του εδρικού πτερυγίου, αριθμώντας από το οπίσθιο άκρο του. Η παρούσα τυποποιημένη διαδικασία (SOP) καλύπτει τη μέτρηση των αποφύσεων στην πρώτη ακτίνα του πτερυγίου (ο αριθμός ακτίνας πτερυγίου παραπέμπει στη σειρά αρίθμησης από το οπίσθιο άκρο του εδρικού πτερυγίου στην παρούσα SOP).

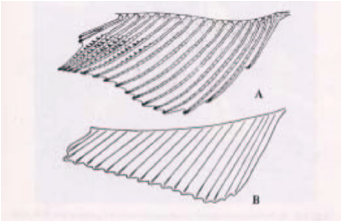
▼M7

τρίτη ακτίνα του πτερυγίου: 12, κ.λπ.) και εγγράφεται το άθροισμα των αριθμών αυτών στο λογιστικό φύλλο Excel για κάθε ψάρι. Εάν χρειάζεται, φωτογραφίζεται το εδρικό πτερύγιο και μετράται ο αριθμός των αρθρικών πλακών με θηλοειδείς αποφύσεις πάνω στη φωτογραφία.

(5) Μετά τη μέτρηση, το εδρικό πτερύγιο τοποθετείται στον κωνικό σωλήνα που περιγράφεται στο σημείο 1) και φυλάσσεται.

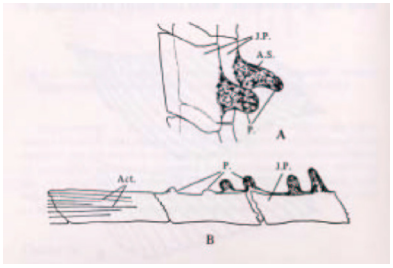
Εικόνα 1.

Διάγραμμα που απεικονίζει τη διαφορά των φύλων ως προς το σχήμα και το μέγεθος του εδρικού πτερυγίου. A, αρσενικό· B, θηλυκό. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



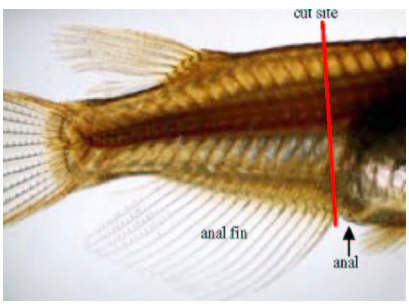
Εικόνα 2.

A, Αποφύσεις σε αρθρικές πλάκες ακτίνας εδρικού πτερυγίου. J.P., αρθρική πλάκα· A.S., αξονικός χώρος· P., απόφυση. B, άπω άκρο της ακτίνας του πτερυγίου. Τα ακτινοτρίχια (Act.) βρίσκονται στην άκρη. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



Εικόνα 3.

Φωτογραφία του σώματος του ψαριού που δείχνει το σημείο τομής όταν η γονάδα πρόκειται να μονιμοποιηθεί σε διάλυμα μονιμοποίησης διαφορετικό του ουδέτερου διαλύματος φορμαλδεΰδης 10 % (φορμόλη) στο οποίο έχει προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα. Σε αυτή την περίπτωση, το υπόλοιπο σώμα αποκόπτεται μεταξύ της πρόσθιας περιοχής του εδρικού πτερυγίου και του πρωκτού με ξυριστική λεπίδα (κόκκινη γραμμή) και το τμήμα του σώματος του ψαριού με την κεφαλή τοποθετείται στο μονιμοποιητικό διάλυμα για τη γονάδα, ενώ το ουραίο τμήμα του σώματος του ψαριού τοποθετείται σε ουδέτερο διάλυμα φορμαλδεΰδης 10 % στο οποίο έχει προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα.



▼M7

Προσάρτημα 6

ΣΥΝΙΣΤΩΜΕΝΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΒΙΤΕΛΟΓΕΝΙΝΗΣ

Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποτρέπεται η διασταυρούμενη μόλυνση μεταξύ των δειγμάτων VTG αρσενικών και θηλυκών ατόμων.

Διαδικασία 1Α: Χοντροκέφαλος φοξίνος, αιμοληψία από την ουραία φλέβα/αρτηρία

Μετά την αναισθητοποίηση, αποκόπτεται μερικώς ο ουραίος μίσχος με λεπίδα νυστεριού και συλλέγεται αίμα από την ουραία φλέβα/αρτηρία με ηπαρινισμένο τριχοειδή σωλήνα μικροαιματοκρίτη. Αφού συλλεχθεί το αίμα, απομονώνεται γρήγορα το πλάσμα με φυγοκέντρηση για 3 λεπτά σε 15 000 g (ή εναλλακτικά για 10 λεπτά σε 15 000 g στους 4 °C). Εάν κριθεί σκόπιμο, μπορεί να προσδιοριστεί ο αιματοκρίτης μετά τη φυγοκέντρηση. Στη συνέχεια, το κλάσμα πλάσματος απομακρύνεται από τον σωλήνα μικροαιματοκρίτη και φυλάσσεται σε σωλήνα φυγοκέντρου με 0,13 μονάδες απροτινίνης (αναστολέας πρωτεάσης) στους – 80 °C μέχρι τον προσδιορισμό της VTG. Ανάλογα με το μέγεθος του χοντροκέφαλου φοξίνου (το οποίο εξαρτάται από το φύλο), οι όγκοι πλάσματος που μπορούν να συλλεχθούν κυμαίνονται γενικά ανάμεσα σε 5 και 60 μικρόλιτρα ανά ψάρι (Jensen και συν. 2001).

Διαδικασία 1Β: Χοντροκέφαλος φοξίνος, αιμοληψία από την καρδιά

Εναλλακτικά, είναι επίσης δυνατόν να συλλεχθεί αίμα με καρδιακή παρακέντηση με χρήση ηπαρινισμένης σύριγγας (1 000 μονάδες ηπαρίνης ανά ml). Το αίμα μεταγγίζεται σε σωλήνες Eppendorf (που διατηρούνται σε πάγο) και στη συνέχεια φυγοκεντρείται (5 λεπτά, 7 000 g, θερμοκρασία δωματίου). Το πλάσμα θα πρέπει να μεταγγίζεται σε καθαρούς σωλήνες Eppendorf (σε κλάσματα εφόσον ο όγκος του πλάσματος το καθιστά εφικτό) και να καταψύχεται αμέσως στους – 80 °C μέχρι την ανάλυση (Panter και συν., 1998).

Διαδικασία 2Α: Ρυζόψαρο, εκτομή του ήπατος

Απομάκρυνση των υπό δοκιμή ψαριών από τον δοκιμαστικό θάλαμο

(1) Τα υπό δοκιμή ψάρια θα πρέπει να απομακρύνονται από τον δοκιμαστικό θάλαμο με χρήση μικρής απόχης. Λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μην πέσουν τα υπό δοκιμή ψάρια σε άλλους δοκιμαστικούς θαλάμους.

(2) Κατ' αρχήν, τα υπό δοκιμή ψάρια θα πρέπει να απομακρύνονται με την ακόλουθη σειρά: μάρτυρας, μάρτυρας με διαλύτη (κατά περίπτωση), χαμηλότερη συγκέντρωση, μεσαία συγκέντρωση, υψηλότερη συγκέντρωση και θετικός μάρτυρας. Επιπλέον, όλα τα αρσενικά άτομα θα πρέπει να απομακρύνονται από τον δοκιμαστικό θάλαμο προτού απομακρυνθούν τα εναπομένοντα θηλυκά.

(3) Το φύλο κάθε υπό δοκιμή ψαριού προσδιορίζεται με βάση τα εξωτερικά δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου (π.χ. το σχήμα του εδρικού πτερυγίου).

(4) Τοποθετείται το υπό δοκιμή ψάρι σε δοχείο μεταφοράς και μεταφέρεται στον σταθμό εργασίας για εκτομή του ήπατος. Ελέγχονται οι ετικέτες του δοκιμαστικού θαλάμου και του δοχείου μεταφοράς για να διαπιστωθεί η ακρίβειά τους και να επιβεβαιωθεί ότι ο αριθμός των ψαριών που απομακρύνθηκαν από τον δοκιμαστικό θάλαμο και ο αριθμός των ψαριών που απομένουν σε αυτόν είναι οι αναμενόμενοι.

(5) Εάν το φύλο δεν μπορεί να προσδιοριστεί από την εξωτερική εμφάνιση του ψαριού, απομακρύνονται όλα τα ψάρια από τον δοκιμαστικό θάλαμο. Σε αυτή την περίπτωση, το φύλο θα πρέπει να προσδιορίζεται με παρατήρηση των γονάδων ή των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου σε στερεομικροσκόπιο.

Εκτομή του ήπατος

(1) Μεταφέρονται τα υπό δοκιμή ψάρια από το δοχείο μεταφοράς στο αναισθητικό διάλυμα με τη μικρή απόχη.

▼M7

(2) Αφού αναισθητοποιηθεί το υπό δοκιμή ψάρι, μεταφέρεται σε διηθητικό χαρτί (ή απορροφητικό χαρτί) με τη βοήθεια μικρής λαβίδας (κοινού τύπου). Το υπό δοκιμή ψάρι πιάνεται με τη λαβίδα από τα πλάγια της κεφαλής για να μη διαλυθεί η ουρά.

(3) Σπογγίζεται το νερό από την επιφάνεια του υπό δοκιμή ψαριού με το διηθητικό χαρτί (ή το απορροφητικό χαρτί).

(4) Τοποθετείται το ψάρι με την κοιλιά προς τα πάνω. Στη συνέχεια εκτελείται μικρή εγκάρσια τομή σε ένα σημείο μεταξύ της κοιλιακής πλευράς του αυχένα και του μέσου της κοιλίας με ψαλίδι ανατομίας.

(5) Εισάγεται το ψαλίδι ανατομίας στην μικρή τομή και τέμνεται η κοιλία κατά μήκος του άξονα συμμετρίας της από ένα σημείο ουραίο ως προς το βραγχιακό επικάλυμμα μέχρι την κρανιακή πλευρά του πρωκτού. Λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μην εισάγεται το ψαλίδι ανατομίας πολύ βαθιά, έτσι ώστε να μην προκαλείται βλάβη στο ήπαρ και τη γονάδα.

(6) Εκτελούνται οι ακόλουθες εργασίες στο στερεοσκόπιο.

(7) Τοποθετείται το υπό δοκιμή ψάρι με την κοιλία προς τα επάνω στο απορροφητικό χαρτί (μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί γυάλινο τρυβλίο Petri ή γυάλινη αντικειμενοφόρος πλάκα).

(8) Απομακρύνονται τα τοιχώματα της κοιλιακής κοιλότητας με λαβίδα ακριβείας ώστε να αποκαλυφθούν τα εσωτερικά όργανα. Είναι επίσης αποδεκτό να αποκαλύπτονται τα εσωτερικά όργανα με αφαίρεση της μίας πλευράς του τοιχώματος της κοιλιακής κοιλότητας, εάν χρειάζεται.

(9) Εκτίθενται τα συνδεδεμένα τμήματα του ήπατος και της χοληδόχου κύστης με τη χρήση άλλης λαβίδας ακριβείας. Στη συνέχεια πιάνεται ο χοληδόχος πόρος και αποκόπτεται η χοληδόχος κύστη. Λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μη διαρραγεί η χοληδόχος κύστη.

(10) Πιάνεται ο οισοφάγος και εκτέμνεται ο γαστρεντερικός σωλήνας από το ήπαρ με τον ίδιο τρόπο. Λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μη διαρρεύσει το περιεχόμενο του γαστρεντερικού σωλήνα. Εκτέμνεται το ουραίο τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα από τον πρωκτό και αφαιρείται από την κοιλιακή κοιλότητα.

(11) Περικόπτεται η μάζα λίπους και άλλων ιστών από την περιφέρεια του ήπατος. Λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μην προκληθούν αμυχές στο ήπαρ.

(12) Πιάνεται με τη λαβίδα ακριβείας η περιοχή της ηπατικής πύλης και αφαιρείται το ήπαρ από την κοιλιακή κοιλότητα.

(13) Τοποθετείται το ήπαρ στη γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα. Με τη βοήθεια της λαβίδας ακριβείας, αφαιρούνται τυχόν επιπλέον λίπος και ξένοι ιστοί (π.χ. κοιλιακή μεμβράνη), εάν χρειάζεται, από την επιφάνεια του ήπατος.

(14) Μετράται το βάρος του ήπατος με ηλεκτρονικό αναλυτικό ζυγό, με τη χρήση μικροσωληναρίου των 1,5 ml ως απόβαρο. Καταγράφεται η τιμή στο φύλλο εργασίας (ακρίβεια ενδείξεων: 0,1 mg). Επιβεβαιώνονται τα στοιχεία ταυτοποίησης στην ετικέτα του μικροσωληναρίου.

(15) Πωματίζεται το μικροσωληνάριο που περιέχει το ήπαρ και φυλάσσεται σε στατό ψύξης (ή στατό με πάγο).

(16) Μετά την εκτομή ενός ήπατος, τα εργαλεία ανατομίας καθαρίζονται ή αντικαθίστανται με καθαρά.

▼M7

(17) Αφαιρείται το ήπαρ από όλα τα ψάρια που βρίσκονται στο δοχείο μεταφοράς, όπως περιγράφεται παραπάνω.

(18) Μετά την εκτομή του ήπατος από όλα τα ψάρια του δοχείου μεταφοράς (δηλ. όλα τα αρσενικά ή θηλυκά ψάρια ενός δοκιμαστικού θαλάμου), τοποθετούνται όλα τα δείγματα ήπατος σε στατό δοκιμαστικών σωλήνων με ετικέτα για ταυτοποίηση και φυλάσσονται σε καταψύκτη. Όταν τα δείγματα ήπατος δωρίζονται για προκατεργασία αμέσως μετά την εκτομή, μεταφέρονται στον επόμενο σταθμό εργασίας σε στατό ψύξης (ή στατό με πάγο).

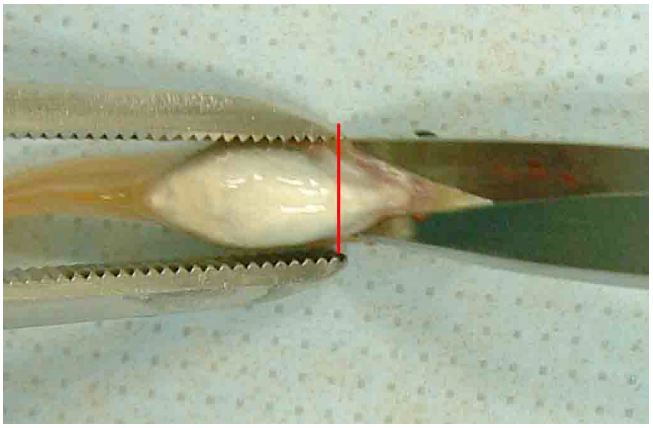
Μετά την εκτομή του ήπατος, το νεκρό σώμα του ψαριού είναι διαθέσιμο για ιστολογική εξέταση των γονάδων και μέτρηση των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου.

Δείγμα

Τα δείγματα ήπατος που λαμβάνονται από τα υπό δοκιμή ψάρια φυλάσσονται στους ≤ -70 °C εάν δεν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για προκατεργασία αμέσως μετά την εκτομή.

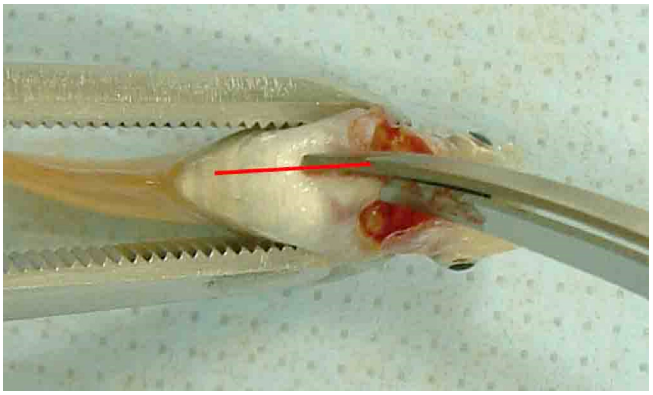
Εικόνα 1

Πραγματοποιείται τομή με ψαλίδι ακριβώς μπροστά από τα θωρακικά πτερύγια.



Εικόνα 2

Τέμνεται η κοιλία κατά μήκος του άξονα συμμετρίας της με ψαλίδι μέχρι περίπου 2 mm από την κρανιακή πλευρά του πρωκτού.



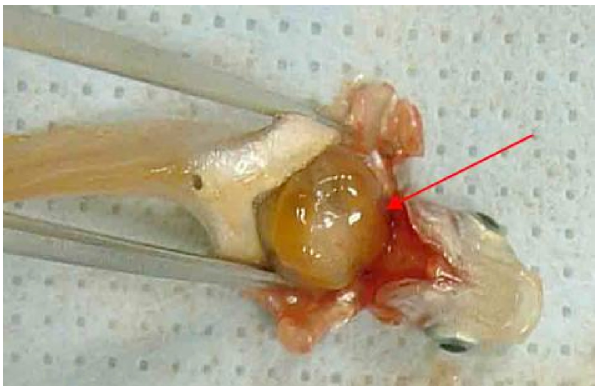
▼M7

Εικόνα 3

Τα κοιλιακά τοιχώματα ανοίγονται με λαβίδα ώστε να αποκαλυφθούν το ήπαρ και τα άλλα εσωτερικά όργανα.

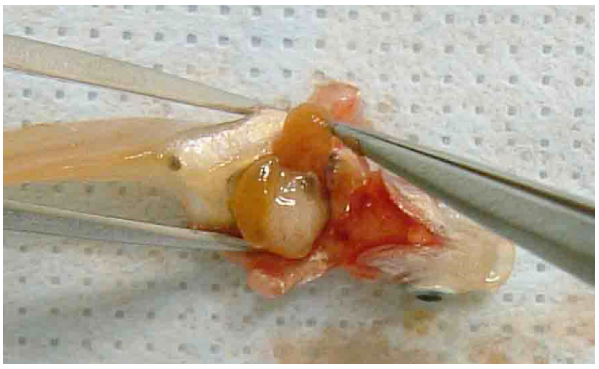
(Εναλλακτικά, επιτρέπεται να καρφιτσωθούν τα κοιλιακά τοιχώματα στα πλάγια).

Το βέλος δείχνει το ήπαρ.



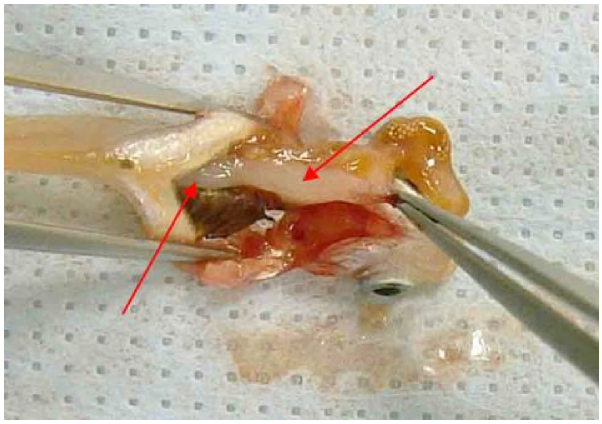
Εικόνα 4

Το ήπαρ ανατέμνεται με αμβλύ όργανο και εκτέμνεται με λαβίδα.



Εικόνα 5

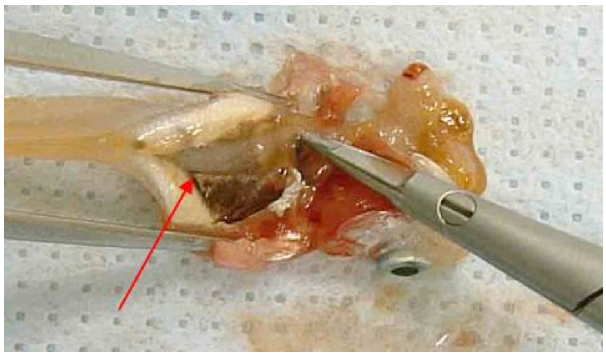
Τα έντερα ανασύρονται με απαλές κινήσεις με τη βοήθεια λαβίδας.



▼M7

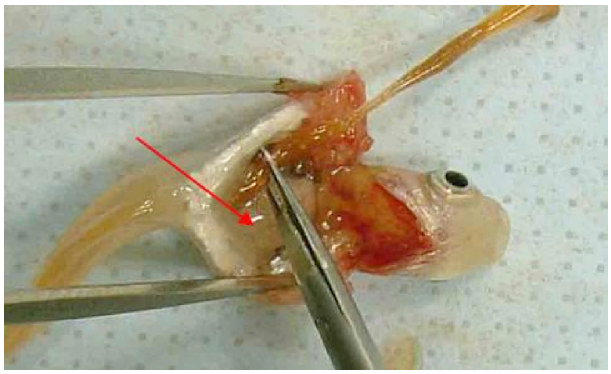
Εικόνα-6

Τα δύο άκρα των εντέρων και τα σημεία πρόσφυσης του μεσεντερίου αποκόπτονται με ψαλίδι.



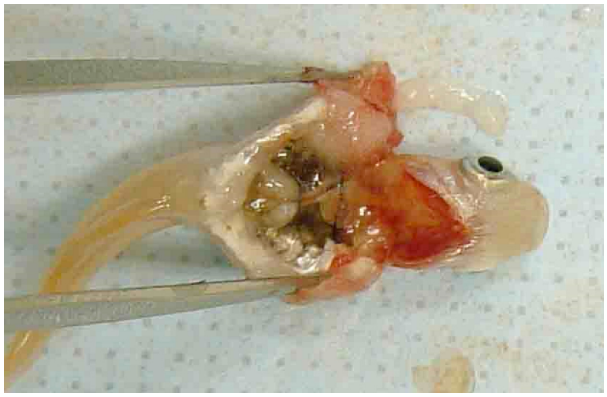
Εικόνα 7 (θηλυκό)

Η διαδικασία είναι πανομοιότυπη για τα θηλυκά άτομα.



Εικόνα 8

Η ολοκληρωμένη διαδικασία.



▼M7

Διαδικασία 2Β: Ρυζόψαρο (*Oryzias latipes*), προκατεργασία ήπατος για ανάλυση βιτελογενίνης

Λαμβάνεται η φιάλη με το ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης από το κιτ ELISA και ψύχεται με θρυμματισμένο πάγο (θερμοκρασία του διαλύματος: ≤ 4 °C). Αν χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης από σύστημα EnBio ELISA, αποψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου και, στη συνέχεια, η φιάλη ψύχεται με θρυμματισμένο πάγο.

Υπολογίζεται ο όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος ομογενοποίησης για το ήπαρ βάσει του βάρους του (50 μl ρυθμιστικού διαλύματος ομογενοποίησης ανά mg βάρους ήπατος). Για παράδειγμα, εάν το βάρος του ήπατος είναι 4,5 mg, ο όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος ομογενοποίησης για το ήπαρ θα είναι 225 μl. Καταρτίζεται κατάλογος με τον όγκο ρυθμιστικού διαλύματος ομογενοποίησης για όλα τα ήπατα.

Προετοιμασία του ήπατος για την προκατεργασία

1) Το μικροσωληνάριο των 1,5 ml που περιέχει το ήπαρ λαμβάνεται από τον καταψύκτη ακριβώς πριν από την προκατεργασία.

2) Η προκατεργασία του ήπατος των αρσενικών ατόμων πρέπει να εκτελείται πριν από εκείνη των θηλυκών για την αποφυγή της μόλυνσης με βιτελογενίνη. Επιπροσθέτως, η προκατεργασία για τις υπό δοκιμή ομάδες θα πρέπει να διεξάγεται με την ακόλουθη σειρά: μάρτυρας, μάρτυρας με διαλύτη (κατά περίπτωση), χαμηλότερη συγκέντρωση, μεσαία συγκέντρωση, υψηλότερη συγκέντρωση και θετικός μάρτυρας.

3) Ο αριθμός μικροσωληναρίων των 1,5 ml που περιέχουν τα δείγματα ήπατος και λαμβάνονται από τον καταψύκτη σε μια δεδομένη στιγμή δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τον αριθμό μικροσωληναρίων που μπορούν να φυγοκεντρηθούν τη συγκεκριμένη στιγμή.

4) Τα μικροσωληνάρια των 1,5 ml που περιέχουν τα δείγματα ήπατος διατάσσονται κατά τη σειρά του αριθμού δείγματος στο στατό με πάγο (δεν χρειάζεται απόψυξη του ήπατος).

Εκτέλεση της προκατεργασίας

1) Προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος ομογενοποίησης

Εξακριβώνεται από τον κατάλογο ο όγκος ρυθμιστικού διαλύματος ομογενοποίησης που πρέπει να χρησιμοποιηθεί για το εκάστοτε δείγμα ήπατος και ρυθμίζεται μικροπιπέτα (εύρος όγκου: 100-1 000 μl) στον κατάλληλο όγκο. Εφαρμόζεται καθαρό ρύγχος στη μικροπιπέτα.

Το ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης λαμβάνεται από τη φιάλη αντιδραστηρίου και προστίθεται στο μικροσωληνάριο των 1,5 ml που περιέχει το ήπαρ.

Προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης σε όλα τα μικροσωληνάρια των 1,5 ml που περιέχουν ήπαρ, σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω. Δεν υπάρχει λόγος να αλλάζεται το ρύγχος της μικροπιπέτας. Ωστόσο, εάν το ρύγχος μολυνθεί ή υπάρχει υπόνοια ότι έχει μολυνθεί, θα πρέπει να αντικαθίσταται.

2) Ομογενοποίηση του ήπατος

— Εφαρμόζεται νέος ύπερος ομογενοποίησης στον ομογενοποιητή για μικροσωληνάρια.

— Εισάγεται ο ύπερος στο μικροσωληνάριο των 1,5 ml. Συγκρατείται ο ομογενοποιητής για να πιεστεί το ήπαρ ανάμεσα στην επιφάνεια του ύπερου και το εσωτερικό τοίχωμα του μικροσωληναρίου των 1,5 ml.

— Τίθεται σε λειτουργία ο ομογενοποιητής για 10 έως 20 δευτερόλεπτα. Κατά τη διάρκεια της λειτουργίας, το μικροσωληνάριο των 1,5 ml ψύχεται με θρυμματισμένο πάγο.

▼M7

— Ανυψώνεται ο ύπερος από το μικροσωληνάριο των 1,5 ml και το τελευταίο αφήνεται σε ηρεμία για περίπου 10 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια διενεργείται οπτικός έλεγχος της κατάστασης του εναιωρήματος.

— Εάν παρατηρηθούν τεμάχια ήπατος στο εναιώρημα, επαναλαμβάνονται οι διαδικασίες (3) και (4) ώστε να παρασκευαστεί ικανοποιητικό ομογενοποίημα ήπατος.

— Το εναιώρημα ομογενοποιημένου ήπατος ψύχεται στο στατό με πάγο μέχρι τη φυγοκέντρηση.

— Ο ύπερος αντικαθίσταται με νέο για κάθε ομογενοποίημα.

— Ομογενοποιούνται όλα τα ήπατα με ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω.

3) Φυγοκέντρηση του εναιωρήματος ομογενοποιημένου ήπατος

— Επιβεβαιώνεται ότι η θερμοκρασία του θαλάμου της ψυχόμενης φυγοκέντρου είναι ≤ 5 °C.

— Εισάγονται στην ψυχόμενη φυγόκεντρο τα μικροσωληνάρια των 1,5 ml που περιέχουν το εναιώρημα ομογενοποιημένου ήπατος (αν χρειάζεται, εξισορροπείται το φορτίο).

— Το εναιώρημα ομογενοποιημένου ήπατος φυγοκεντρείται σε 13 000 g για 10 λεπτά στους ≤ 5 °C. Ωστόσο, εάν τα υπερκείμενα υγρά διαχωρίζονται επαρκώς, η φυγόκεντρος δύναμη και ο χρόνος μπορούν να προσαρμοστούν αναλόγως.

— Μετά τη φυγοκέντρηση, ελέγχεται αν τα υπερκείμενα υγρά έχουν διαχωριστεί επαρκώς (επιφανειακή στιβάδα: λιπίδια, ενδιάμεση στιβάδα: υπερκείμενο υγρό, κατώτερη στιβάδα: ηπατικός ιστός). Αν ο διαχωρισμός δεν είναι επαρκής, το εναιώρημα υποβάλλεται σε νέα φυγοκέντρηση υπό τις ίδιες συνθήκες.

— Απομακρύνονται όλα τα δείγματα από την ψυχόμενη φυγόκεντρο και τοποθετούνται στο στατό με πάγο κατά τη σειρά του αριθμού δείγματος. Λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μη επαναιωρηθούν οι διαχωρισμένες στιβάδες μετά τη φυγοκέντρηση.

4) Συλλογή του υπερκείμενου υγρού

— Τοποθετούνται τέσσερα μικροσωληνάρια των 0,5 ml στο στατό δοκιμαστικών σωλήνων για τη φύλαξη του υπερκείμενου υγρού.

— Συλλέγονται 30 μl από κάθε υπερκείμενο υγρό (διαχωρισμένο ως ενδιάμεση στιβάδα) με τη μικροπιπέτα και μεταφέρονται σε μικροσωληνάριο των 0,5 ml. Λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μη συλλέγονται λιπίδια από την επιφάνεια ούτε ηπατικός ιστός από την κατώτερη στιβάδα.

— Το υπερκείμενο υγρό συλλέγεται και μεταφέρεται σε άλλα δύο μικροσωληνάρια των 0,5 ml με τον τρόπο που περιγράφεται παραπάνω.

— Συλλέγεται το υπόλοιπο υπερκείμενο υγρό με τη μικροπιπέτα (αν είναι εφικτό: ≥ 100 μl). Στη συνέχεια το υπερκείμενο υγρό μεταφέρεται στο εναπομένον μικροσωληνάριο των 0,5 ml. Λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μη συλλέγονται λιπίδια από την επιφάνεια ούτε ηπατικός ιστός από την κατώτερη στιβάδα.

— Πωματίζεται το μικροσωληνάριο των 0,5 ml και αναγράφεται στην ετικέτα ο όγκος του υπερκείμενου υγρού. Κατόπιν, τα μικροσωληνάρια ψύχονται αμέσως στο στατό με πάγο.

— Για κάθε υπερκείμενο υγρό, το ρύγχος της μικροπιπέτας αντικαθίσταται με νέο. Αν προσκολληθεί στο ρύγχος μεγάλη ποσότητα λιπιδίων, αυτό αντικαθίσταται αμέσως για να αποτραπεί η μόλυνση του εκχυλίσματος ήπατος με λίπος.

▼M7

— Διανέμεται όλο το φυγοκεντρημένο υπερκείμενο υγρό σε τέσσερα μικροσωληνάρια των 0,5 ml σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω.

— Μετά τη διανομή του υπερκείμενου υγρού στα μικροσωληνάρια των 0,5 ml, τοποθετούνται όλα στο στατό δοκιμαστικών σωλήνων με ετικέτα ταυτοποίησης και, στη συνέχεια, καταψύχονται αμέσως στον καταψύκτη. Αν οι συγκεντρώσεις VTG πρόκειται να μετρηθούν αμέσως μετά την προκατεργασία, διατηρείται ένα μικροσωληνάριο των 0,5 ml (που περιέχει 30 μl υπερκείμενου υγρού) σε ψύξη στο στατό και μεταφέρεται στον σταθμό εργασίας όπου διεξάγεται ο προσδιορισμός ELISA. Σε μια τέτοια περίπτωση, τα υπόλοιπα μικροσωληνάρια τοποθετούνται σε στατό και καταψύχονται στον καταψύκτη.

— Μετά τη συλλογή του υπερκείμενου υγρού, απορρίπτεται το υπόλειμμα με τον ενδεδειγμένο τρόπο.

Φύλαξη του δείγματος

Τα μικροσωληνάρια των 0,5 ml που περιέχουν το υπερκείμενο υγρό του ομογενοποιημένου ήπατος φυλάσσονται στους ≤ – 70 °C έως ότου χρησιμοποιηθούν στον προσδιορισμό ELISA.

Διαδικασία 3Α: Ρυζόψαρο, αιμοληψία από την ουραία φλέβα/αρτηρία

Αμέσως μετά την αναισθητοποίηση, αποκόπτεται εγκαρσίως ο ουραίος μίσχος και αφαιρείται το αίμα από την ουραία αρτηρία/φλέβα με ηπαρινισμένο τριχοειδή σωλήνα μικροαιματοκρίτη. Ο όγκος του αίματος κυμαίνεται μεταξύ 5 και 15 μικρόλιτρων ανάλογα με το μέγεθος του ψαριού. Στον μικροτριχοειδή σωλήνα προστίθεται ίσος όγκος ρυθμιστικού διαλύματος απροτινίνης (6 μικρογραμμάρια/ml σε PBS) και διαχωρίζεται το πλάσμα από το αίμα με φυγοκέντρηση (5 λεπτά στα 600 *g*). Το πλάσμα συλλέγεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες και φυλάσσεται στους – 20 °C έως ότου διεξαχθεί ανάλυση για VTG ή άλλες πρωτεΐνες που αποτελούν αντικείμενο ενδιαφέροντος.

Διαδικασία 3Β: Ζεβρόψαρο, αιμοληψία μέσω καρδιακής παρακέντησης

Για να αποφευχθεί η πήξη του αίματος και η αποδόμηση των πρωτεϊνών, τα δείγματα συλλέγονται μέσα σε φυσιολογικό ορό με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (phosphate-buffered saline, PBS), που περιέχει ηπαρίνη (1 000 μονάδες/ml) και τον αναστολέα πρωτεάσης απροτινίνη (2 TIU/ml). Ως συστατικά για το ρυθμιστικό διάλυμα συνιστώνται το μετ' αμμωνίου άλας της ηπαρίνης και η λυοφιλιωμένη απροτινίνη. Για την αιμοληψία συνιστάται σύριγγα (1 ml) με σταθερή λεπτή βελόνα (π.χ. Braun Omnikan-F). Η σύριγγα θα πρέπει να είναι προπληρωμένη με ρυθμιστικό διάλυμα (περίπου 100 μικρόλιτρα) για να εκλούονται πλήρως οι μικροί όγκοι αίματος από κάθε ψάρι. Τα δείγματα αίματος λαμβάνονται με καρδιακή παρακέντηση. Αρχικά, τα ψάρια θα πρέπει να αναισθητοποιούνται με MS-222 (100 mg/l). Το κατάλληλο επίπεδο αναισθησίας επιτρέπει στον χρήστη να διακρίνει τον καρδιακό παλμό του ζεβρόψαρου. Κατά την καρδιακή παρακέντηση το έμβολο της σύριγγας διατηρείται υπό ελαφρά έλξη. Οι συλλέξιμοι όγκοι αίματος κυμαίνονται ανάμεσα σε 20 και 40 μικρόλιτρα. Μετά την καρδιακή παρακέντηση, το μείγμα αίματος/ρυθμιστικού διαλύματος εισάγεται στον δοκιμαστικό σωλήνα. Το πλάσμα διαχωρίζεται από το αίμα με φυγοκέντρηση (20 λεπτά· 5 000 *g*) και θα πρέπει να φυλάσσεται στους – 80 °C έως ότου χρησιμοποιηθεί για ανάλυση.

Διαδικασία 3Γ: Τυποποιημένη διαδικασία (SOP): Ζεβρόψαρο, ομογενοποίηση κεφαλής και ουράς

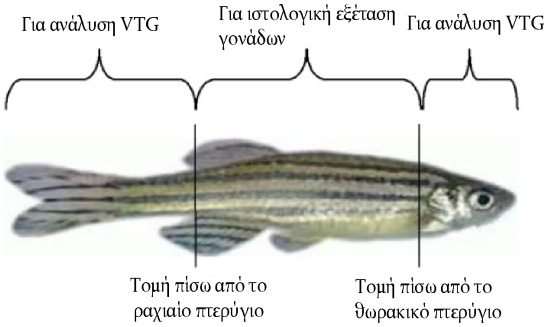
1. Τα ψάρια υποβάλλονται σε αναισθητοποίηση και ευθανασία, σύμφωνα με την περιγραφή της δοκιμής.

2. Η κεφαλή και η ουρά αποκόπτονται από το ψάρι σύμφωνα με την εικόνα 1.

Προσοχή: *Όλα τα εργαλεία ανατομίας και η πλάκα κοπής θα πρέπει να εκπλένονται και να καθαρίζονται δεόντως (π.χ. με αιθανόλη 96 %) μεταξύ των χειρισμών μεμονωμένων ψαριών ώστε να αποφεύγεται η «ρύπανση με βιτελογενίνη» από τα θηλυκά άτομα ή τα αρσενικά στα οποία έχει επαχθεί παραγωγή VTG προς τα αρσενικά άτομα στα οποία δεν έχει επαχθεί παραγωγή VTG.*

▼**M7**

Εικόνα 1



3. Το συνολικό βάρος κεφαλής και ουράς από κάθε ψάρι μετράται με ακρίβεια χιλιοστόγραμμου.

4. Αφού ζυγιστούν, τα μέρη του ψαριού τοποθετούνται σε κατάλληλους σωλήνες (π.χ. σωληνάρια Eppendorf των 1,5 ml) και καταψύχονται στους – 80 °C μέχρι να ομογενοποιηθούν ή ομογενοποιούνται απευθείας σε πάγο με δύο πλαστικούς υπέρους. (Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες μέθοδοι, εάν εφαρμόζονται με πάγο και το αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός ομοιογενούς μάζας). Προσοχή: *Τα σωληνάρια θα πρέπει να αριθμούνται σωστά, ώστε η κεφαλή και η ουρά του ψαριού να μπορούν να συσχετιστούν με το αντίστοιχο σώμα που χρησιμοποιείται για την ιστολογική εξέταση των γονάδων.*

5. Όταν επιτευχθεί ομοιογενής μάζα, προστίθεται παγωμένο **ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης** ([1]) σε ποσότητα τετραπλάσια του βάρους του ιστού. Συνεχίζεται η κατεργασία με τους υπέρους μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές. Σημαντική σημείωση: *Για κάθε ψάρι χρησιμοποιούνται νέοι ύπεροι.*

6. Τα δείγματα τοποθετούνται πάνω σε πάγο μέχρι τη φυγοκέντρησή τους στους **4 °C** με ταχύτητα 50.000 g για 30 λεπτά.

7. Με τη βοήθεια πιπέτας διανέμονται 20 μl υπερκείμενου υγρού σε **τουλάχιστον δύο** σωληνάρια, με βύθιση του ρύγχους της πιπέτας κάτω από τη στιβάδα λίπους που βρίσκεται στην επιφάνεια και προσεκτική αναρρόφηση του υπερκείμενου υγρού χωρίς κλάσματα λίπους ή ιζήματος.

8. Τα σωληνάρια φυλάσσονται στους – 80 °C μέχρι τη χρήση.

([1]) Ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης:
— (50 mM Tris-HCl pH 7,4· μείγμα αναστολέων πρωτεάσης 1 % (Sigma)): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 μl μείγματος αναστολέων πρωτεάσης.
— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN) π.χ. της Bie & Berntsen, Δανία.
— Μείγμα αναστολέων πρωτεάσης: της Sigma (για ιστούς θηλαστικών). Κωδικός προϊόντος P 8340.
ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Το ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ημέρα παρασκευής του. Κατά τη διάρκεια της χρήσης να τοποθετείται σε πάγο.

▼M7

Προσάρτημα 7

ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΕΝΑΜΕ ΒΙΤΕΛΟΓΕΝΙΝΗ ΚΑΙ ΠΡΟΤΥΠΟ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΜΕΤΑΞΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Κάθε ημέρα κατά την οποία εκτελούνται δοκιμές VTG, αναλύεται ένα εμπλουτισμένο δείγμα που παρασκευάζεται με χρήση προτύπου αναφοράς μεταξύ δοκιμών. Η VTG που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του προτύπου αναφοράς μεταξύ δοκιμών προέρχεται από διαφορετική παρτίδα από εκείνη που χρησιμοποιείται για την παρασκευή των προτύπων βαθμονόμησης για την εκτελούμενη δοκιμή.

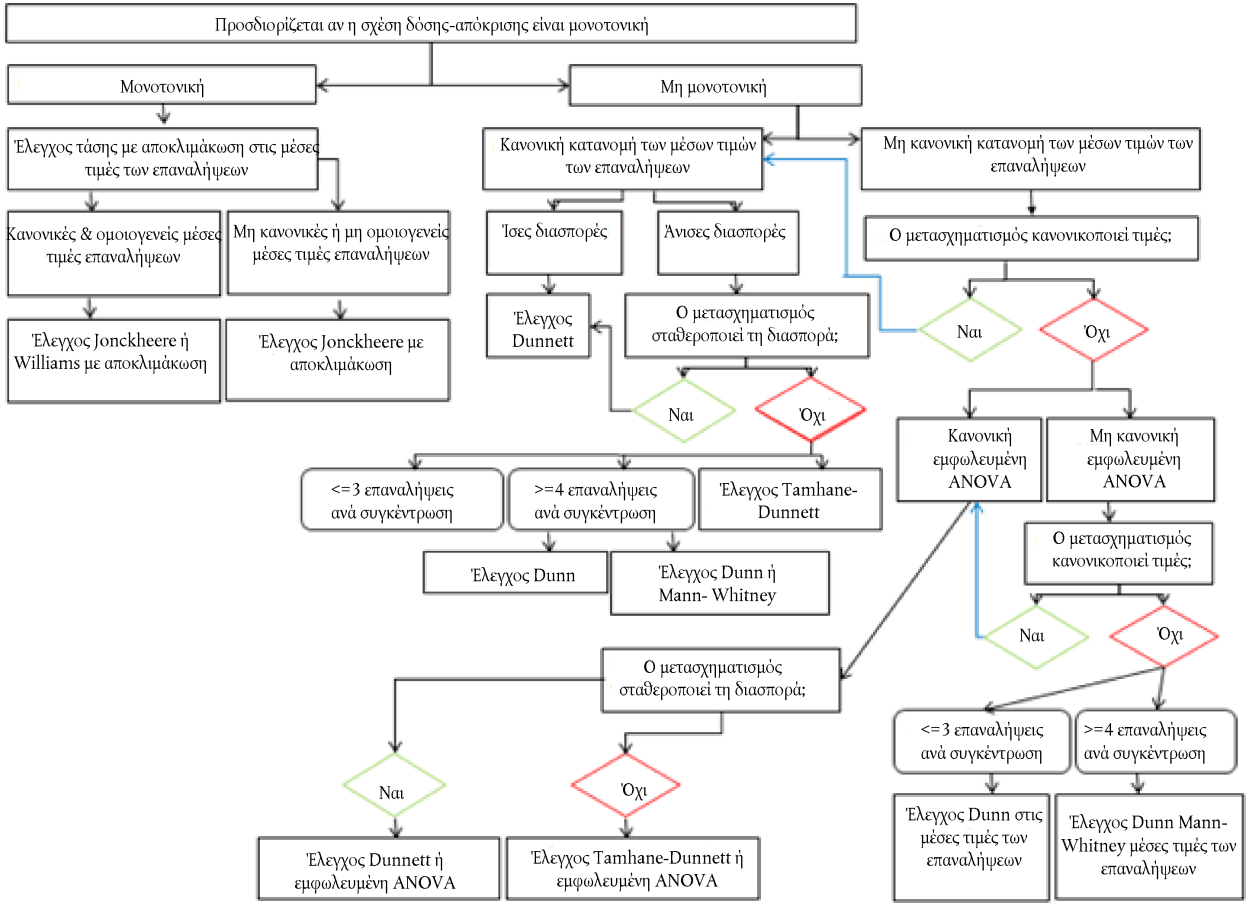
Το εμπλουτισμένο δείγμα παρασκευάζεται με την προσθήκη γνωστής ποσότητας του προτύπου αναφοράς μεταξύ δοκιμών σε δείγμα πλάσματος αρσενικού μάρτυρα. Το δείγμα εμπλουτίζεται ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση VTG 10πλάσια έως 100πλάσια της αναμενόμενης συγκέντρωσης βιτελογενίνης στα αρσενικά ψάρια-μάρτυρες. Το δείγμα πλάσματος αρσενικού μάρτυρα που εμπλουτίζεται μπορεί να προέρχεται από μεμονωμένο ψάρι ή να είναι σύνθετο, προερχόμενο από περισσότερα ψάρια.

Υποβάλλεται σε ανάλυση ένα μερικό δείγμα μη εμπλουτισμένου πλάσματος αρσενικού μάρτυρα σε δύο τουλάχιστον διπλές μικροκοιλότητες πλάκας. Το εμπλουτισμένο δείγμα αναλύεται και αυτό σε δύο τουλάχιστον διπλές μικροκοιλότητες πλάκας. Η μέση ποσότητα βιτελογενίνης στα δύο μη εμπλουτισμένα δείγματα πλάσματος αρσενικού μάρτυρα προστίθεται στην υπολογιζόμενη ποσότητα VTG που έχει προστεθεί στα εμπλουτισμένα δείγματα, ώστε να προκύψει η αναμενόμενη συγκέντρωση. Ο λόγος της εν λόγω αναμενόμενης συγκέντρωσης προς τη μετρούμενη συγκέντρωση θα πρέπει να αναφέρεται μαζί με τα αποτελέσματα κάθε σειράς δοκιμών που διενεργούνται τη συγκεκριμένη ημέρα.

▼M7

Προσάρτημα 8

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΛΗΨΗΣ ΑΠΟΦΑΣΕΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ



▼M7

Γ.49 ΔΟΚΙΜΉ ΟΞΕΊΑς ΤΟΞΙΚΌΤΗΤΑς ΣΕ ΈΜΒΡΥΑ ΨΑΡΙΏΝ (FET)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών (ΜΔ) είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 236 του ΟΟΣΑ (2013). Περιγράφεται μια δοκιμή οξείας τοξικότητας σε έμβρυα ψαριών (FET) στην οποία χρησιμοποιείται το ζεβρόψαρο (*Danio rerio*). Σκοπός της παρούσας δοκιμασίας είναι ο προσδιορισμός της οξείας τοξικότητας χημικών ουσιών στα στάδια εμβρυϊκής ανάπτυξης των ψαριών. Η δοκιμή FET βασίζεται σε μελέτες και δραστηριότητες επικύρωσης με ζεβρόψαρα (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13)(14). Η δοκιμή FET εφαρμόζεται με επιτυχία σε ευρύ φάσμα χημικών ουσιών με διαφορετικούς τρόπους δράσης, διαλυτότητα, πτητικότητα και υδροφοβία (για ανασκόπηση, βλ. παραπομπές 15 και 16).

2. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

3. Προσφάτως γονιμοποιημένα αυγά ζεβρόψαρου εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία επί 96 ώρες. Κάθε 24 ώρες, καταγράφονται έως και τέσσερις παρατηρήσεις κορυφαίων τελικών σημείων ως δείκτες φονικότητας (6): i) πήξη γονιμοποιημένων αυγών, ii) απουσία σχηματισμού σωμιτών, iii) απουσία απόσπασης της ουραίας καταβολής από τον λεκιθικό σάκο και iv) απουσία καρδιακού παλμού. Στο τέλος της περιόδου έκθεσης, η οξεία τοξικότητα προσδιορίζεται με βάση θετικό αποτέλεσμα σε οποιαδήποτε από τις καταγραφείσες τέσσερις παρατηρήσεις κορυφαίων τελικών σημείων και υπολογίζεται η τιμή LC_{50}.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

4. Οι χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με ειδικές ιδιότητες μιας ουσίας περιλαμβάνουν τον συντακτικό τύπο, το μοριακό βάρος, την καθαρότητα, τη σταθερότητα στο νερό και το φως, τις σταθερές K_a και K_{ow}, την υδατοδιαλυτότητα και την τάση ατμών, καθώς και αποτελέσματα δοκιμής άμεσης βιοαποδομησιμότητας [ΜΔ Γ.4 (17) ή ΜΔ Γ.29 (18)]. Η υδατοδιαλυτότητα και η τάση ατμών μπορούν να χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της σταθεράς του νόμου του Henry, η οποία δείχνει αν είναι πιθανόν να σημειωθούν απώλειες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας λόγω εξάτμισης. Πρέπει επίσης να υπάρχει αξιόπιστη αναλυτική μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της ουσίας στα υπό δοκιμή διαλύματα, της οποίας η ακρίβεια και το όριο ανίχνευσης να είναι γνωστά και δημοσιευμένα.

5. Εάν η μέθοδος δοκιμών χρησιμοποιείται για τη δοκιμή μείγματος, η σύνθεσή του θα πρέπει να περιγράφεται, στο μέτρο του δυνατού, π.χ. με τη χημική ταυτότητα των συστατικών του, την ποσότητα στην οποία απαντούν, καθώς και τις ειδικές ιδιότητές τους (βλ. παράγραφο 4). Πριν από τη χρήση της μεθόδου δοκιμών για δοκιμές κανονιστικού χαρακτήρα ενός μείγματος, θα πρέπει να εξετάζεται κατά πόσον η μέθοδος αποδίδει αποδεκτά αποτελέσματα για τον επιδιωκόμενο κανονιστικό σκοπό.

6. Όσον αφορά τις ουσίες που μπορεί να ενεργοποιηθούν μέσω του μεταβολισμού, υπάρχουν στοιχεία που αποδεικνύουν ότι τα έμβρυα ζεβρόψαρου έχουν ικανότητες βιομετασχηματισμού (19)(20)(21)(22). Ωστόσο, η μεταβολική ικανότητα των ψαριών σε εμβρυϊκό στάδιο δεν είναι πάντοτε ανάλογη με εκείνη των νεαρών ή των ενήλικων ψαριών. Για παράδειγμα, η FET αστοχεί με την προτοξική ουσία αλλυλική αλκοόλη. Ως εκ τούτου, εάν υπάρχουν ενδείξεις ότι κάποιοι μεταβολίτες ή άλλα σημαντικά προϊόντα μετασχηματισμού μπορεί να είναι πιο τοξικά από τη μητρική ένωση, συνιστάται επίσης να διενεργείται η δοκιμή με αυτούς τους μεταβολίτες/προϊόντα μετασχηματισμού και να χρησιμοποιούνται τα αποτελέσματα αυτά για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την τοξικότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ή, εναλλακτικά, να διενεργείται άλλη δοκιμή, στην οποία λαμβάνεται περισσότερο υπόψη ο μεταβολισμός.

7. Εκτιμάται ότι τα έμβρυα δεν θα είναι ευαίσθητα σε ουσίες με μοριακό βάρος ≥ 3kDa, ουσίες με πολύ ογκώδη μοριακή δομή, καθώς και ουσίες επιβραδυντικές της εκκόλαψης οι οποίες θα μπορούσαν να αποκλείσουν ή να μειώσουν τη μετά την εκκόλαψη έκθεση, λόγω περιορισμένης βιοδιαθεσιμότητας της ουσίας, και συνεπώς άλλες δοκιμές τοξικότητας θα ήταν καταλληλότερες.

▼M7

ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

8. Για να είναι έγκυρα τα αποτελέσματα της δοκιμής, εφαρμόζονται τα ακόλουθα κριτήρια:

α) Το συνολικό ποσοστό γονιμοποίησης όλων των αυγών που συλλέγονται θα πρέπει να είναι ≥ 70 % στην υπό δοκιμή παρτίδα.

β) Η θερμοκρασία του νερού θα πρέπει να διατηρείται στους 26 ± 1 °C στους δοκιμαστικούς θαλάμους καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής.

γ) Η συνολική επιβίωση εμβρύων στον αρνητικό μάρτυρα (με νερό αραίωσης) και, κατά περίπτωση, στον μάρτυρα με διαλύτη θα πρέπει να είναι ≥ 90 % έως το τέλος της 96ωρης έκθεσης.

δ) Η έκθεση στον θετικό μάρτυρα (π.χ. 4,0 mg/l 3,4-διχλωροανιλίνης για το ζεβρόψαρο) θα πρέπει να έχει ως αποτέλεσμα ελάχιστη φονικότητα 30 % στο τέλος της 96ωρης έκθεσης.

ε) Το ποσοστό εκκόλαψης στον αρνητικό μάρτυρα (και στον μάρτυρα με διαλύτη, κατά περίπτωση) θα πρέπει να είναι ≥ 80 % στο τέλος της 96ωρης έκθεσης.

στ) Στο τέλος της 96ωρης έκθεσης, η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου στον αρνητικό μάρτυρα και στην υψηλότερη συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να είναι ≥ 80 % της τιμής κορεσμού.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

9. Επισκόπηση των συνιστώμενων συνθηκών διατήρησης και δοκιμής παρέχεται στο προσάρτημα 2.

Εργαστηριακός εξοπλισμός

10. Απαιτείται ο ακόλουθος εξοπλισμός:

α) Δεξαμενές ψαριών κατασκευασμένες από χημικώς αδρανές υλικό (π.χ. γυαλί) και κατάλληλης χωρητικότητας σε σχέση με τον συνιστώμενο πληθυσμιακό φόρτο (βλ. «Διατήρηση γεννητόρων», παράγραφος 14)·

β) ανεστραμμένο και/ή διοφθάλμιο μικροσκόπιο με ικανότητα μεγέθυνσης τουλάχιστον 80x. Εάν η θερμοκρασία της αίθουσας που χρησιμοποιείται για την καταγραφή των παρατηρήσεων δεν μπορεί να ρυθμιστεί στους 26 ± 1 °C, απαιτείται θερμοστατούμενη τράπεζα μικροσκοπίου σταυροειδούς κίνησης ή άλλες μέθοδοι για τη διατήρηση της θερμοκρασίας·

γ) δοκιμαστικοί θάλαμοι· π.χ. συνήθεις πλάκες 24 μικροκοιλοτήτων, βάθους περίπου 20 mm (βλ. «Δοκιμαστικοί θάλαμοι», παράγραφος 11)·

δ) π.χ. αυτοκόλλητη μεμβράνη για την κάλυψη των πλακών των 24 μικροκοιλοτήτων·

ε) επωαστήρας ή κλιματιζόμενος θάλαμος με ελεγχόμενη θερμοκρασία, που διατηρεί τη θερμοκρασία στους 26 ± 1 °C στις μικροκοιλότητες (ή τους δοκιμαστικούς θαλάμους)·

στ) πεχάμετρο·

ζ) οξυγονόμετρο·

η) εξοπλισμός για τον προσδιορισμό της σκληρότητας του νερού και της αγωγιμότητας·

θ) παγίδα απόθεσης αυγών: δίσκοι εργαστηριακών σκευών από γυαλί, ανοξείδωτο χάλυβα ή άλλα αδρανή υλικά· συρμάτινο πλέγμα (μέγεθος οπών 2 ± 0,5 mm) από ανοξείδωτο χάλυβα ή άλλο αδρανές υλικό για την προστασία των αυγών μετά την απόθεση· υπόστρωμα ωοτοκίας (π.χ. ομοιώματα φυτών από αδρανές υλικό) [ΜΔ Γ.48, προσάρτημα 4α (23)]·

ι) σιφώνια με διευρυμένα ανοίγματα για τη συλλογή αυγών·

▼M7

ια) γυάλινα δοχεία για την παρασκευή των διαλυμάτων με τις διάφορες συγκεντρώσεις δοκιμής και του νερού αραίωσης (ποτήρια ζέσεως, ογκομετρικές φιάλες, ογκομετρικοί κύλινδροι και ογκομετρικά σιφώνια) ή για τη συλλογή αυγών ζεβρόψαρων (π.χ. ποτήρια ζέσεως, δοχεία κρυστάλλωσης)·

ιβ) εάν για τη διεξαγωγή της δοκιμής χρησιμοποιούνται εναλλακτικά συστήματα έκθεσης, όπως συστήματα συνεχούς ροής (24) ή παθητικής δοσιμετρίας (25), απαιτούνται οι κατάλληλες εγκαταστάσεις και εξοπλισμός.

Δοκιμαστικοί θάλαμοι

11. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται δοκιμαστικοί θάλαμοι από γυαλί ή πολυστυρόλιο (π.χ. πλάκες 24 μικροκοιλοτήτων με χωρητικότητα πλήρωσης 2,5-5 ml ανά μικροκοιλότητα). Εάν υπάρχει υπόνοια προσρόφησης στο πολυστυρόλιο (π.χ. στην περίπτωση μη πολικών ουσιών με επίπεδη γεωμετρία και υψηλή K_{OW}), θα πρέπει να χρησιμοποιούνται αδρανή υλικά (γυαλί) για τη μείωση των απωλειών λόγω προσρόφησης (26). Οι δοκιμαστικοί θάλαμοι θα πρέπει να τοποθετούνται με τυχαίο τρόπο στον επωαστήρα.

Νερό και συνθήκες δοκιμής

12. Συνιστάται αραίωση του νερού διατήρησης για να επιτυγχάνονται επίπεδα σκληρότητας χαρακτηριστικά ενός μεγάλου φάσματος επιφανειακών υδάτων. Το νερό αραίωσης θα πρέπει να παρασκευάζεται από ανασυσταθέν νερό (27). Ο βαθμός σκληρότητας που προκύπτει θα πρέπει να είναι ισοδύναμος με 100-300 mg/l $CaCO_3$, ώστε να αποφεύγεται η υπέρμετρη καθίζηση ανθρακικού ασβεστίου. Επιτρέπεται η χρησιμοποίηση άλλου επακριβώς χαρακτηρισμένου νερού, προερχόμενου από επιφανειακά ύδατα ή γεώτρηση. Το ανασυσταθέν νερό μπορεί να προσαρμοστεί για να ληφθεί νερό διατήρησης χαμηλής σκληρότητας, με αραίωση με απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:5, ώστε να προκύψει ελάχιστη σκληρότητα 30-35 mg/l $CaCO_3$. Το νερό αερίζεται μέχρι την επίτευξη κορεσμού με οξυγόνο πριν από την προσθήκη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Η θερμοκρασία θα πρέπει να διατηρείται στους 26 ± 1 °C στις μικροκοιλότητες, καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Το pH θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 6,5 και 8,5 και η διακύμανσή του εντός αυτού του εύρους τιμών να μην υπερβαίνει τις 1,5 μονάδες κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Εάν εκτιμάται ότι το pH δεν θα παραμείνει εντός αυτού του εύρους τιμών, θα πρέπει να γίνεται ρύθμιση του pH πριν από την έναρξη της δοκιμής. Το pH θα πρέπει να ρυθμίζεται με τρόπο ώστε να μη μεταβάλλεται σημαντικά η συγκέντρωση του διαλύματος παρακαταθήκης και να μην προκαλείται χημική αντίδραση ή καθίζηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Συνιστάται η χρήση υδροχλωρίου (HCl) και υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) για τη διόρθωση του pH των διαλυμάτων που περιέχουν την υπό δοκιμή χημική ουσία.

Διαλύματα δοκιμής

13. Τα διαλύματα της δοκιμής με τις επιλεγμένες συγκεντρώσεις μπορούν να παρασκευαστούν, π.χ., με αραίωση διαλύματος παρακαταθήκης. Το διαλύματα παρακαταθήκης θα πρέπει κατά προτίμηση να παρασκευάζονται με απλή ανάμειξη ή ανακίνηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο νερό αραίωσης με μηχανικά μέσα (π.χ. ανάδευση και/ή υπερήχους). Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι δυσδιάλυτη στο νερό, θα πρέπει να ακολουθούνται οι διαδικασίες που προβλέπονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 23 του ΟΟΣΑ σχετικά με τον χειρισμό δύσκολων ουσιών και μειγμάτων (28). Η χρήση διαλυτών θα πρέπει να αποφεύγεται, αλλά μπορεί να είναι απαραίτητη σε ορισμένες περιπτώσεις για να παρασκευαστεί ένα κατάλληλα πυκνό διάλυμα παρακαταθήκης. Όταν χρησιμοποιείται διαλύτης για την υποβοήθηση της παρασκευής διαλύματος παρακαταθήκης, η τελική συγκέντρωσή του θα πρέπει να μην υπερβαίνει τα 100 μl/l και να είναι η ίδια σε όλα τα δοκιμαστικά δοχεία. Όταν χρησιμοποιείται διαλύτης, απαιτείται ένας επιπλέον μάρτυρας με διαλύτη.

Διατήρηση των γεννητόρων

14. Για την παραγωγή αυγών χρησιμοποιούνται μη εκτεθειμένα ζεβρόψαρα αναπαραγωγής, φυσικού τύπου, με επαρκώς τεκμηριωμένο ποσοστό γονιμοποίησης αυγών. Τα ψάρια θα πρέπει να μην εμφανίζουν μακροσκοπικώς διακριτά συμπτώματα λοίμωξης και νόσων και να μην έχουν υποβληθεί σε καμία φαρμακευτική αγωγή (αντιμετώπισης ή πρόληψης) για 2 μήνες πριν από την ωοτοκία. Τα ψάρια αναπαραγωγής διατηρούνται σε ενυδρεία με

▼M7

συνιστώμενη χωρητικότητα 1 λίτρου νερού ανά ψάρι και σταθερή φωτοπερίοδο 12-16 ωρών (29)(30)(31)(32)(33). Οι ρυθμοί διήθησης θα πρέπει να ρυθμίζονται στις βέλτιστες τιμές· θα πρέπει να αποφεύγονται οι υπερβολικοί ρυθμοί διήθησης που προκαλούν έντονη αναταραχή του νερού. Για λεπτομέρειες σχετικά με τη σίτιση βλ. προσάρτημα 2. Η υπερσίτιση θα πρέπει να αποφεύγεται, ενώ η ποιότητα του νερού και η καθαρότητα των ενυδρείων θα πρέπει να παρακολουθούνται τακτικά και να επαναφέρονται στην αρχική κατάσταση, εάν είναι απαραίτητο.

Δοκιμή τεχνικής ικανότητας

15. Ως χημική ουσία αναφοράς, η 3,4-διχλωροανιλίνη [που χρησιμοποιήθηκε στις μελέτες επικύρωσης (1)(2)] θα πρέπει να υποβάλλεται σε δοκιμή σε πλήρη κλίμακα συγκεντρώσεων-απόκρισης για να ελέγχεται η ευαισθησία της χρησιμοποιούμενης φυλής ψαριού, κατά προτίμηση ανά εξάμηνο. Τα εργαστήρια που διεξάγουν για πρώτη φορά την παρούσα δοκιμή θα πρέπει να χρησιμοποιούν τη χημική ουσία αναφοράς. Τα εργαστήρια μπορούν να χρησιμοποιούν αυτή τη χημική ουσία για να αποδείξουν την τεχνική τους ικανότητα στη διεξαγωγή της δοκιμής, πριν από την υποβολή δεδομένων για κανονιστικούς σκοπούς.

Παραγωγή αυγών

16. Τα αυγά ζεβρόψαρου είναι δυνατόν να παραχθούν από ομάδες ωοτοκίας (σε μεμονωμένες δεξαμενές ωοτοκίας) ή με μαζική ωοτοκία (στις δεξαμενές διατήρησης). Στην περίπτωση των ομάδων ωοτοκίας, τα αρσενικά και θηλυκά άτομα (π.χ. σε αναλογία 2:1) μιας ομάδας αναπαραγωγής φέρονται σε δεξαμενές ωοτοκίας λίγες ώρες πριν σκοτεινιάσει την προηγουμένη της ημέρας της δοκιμής. Επειδή οι ομάδες ωοτοκίας από ζεβρόψαρα μπορεί περιστασιακά να μην ωοτοκήσουν, συνιστάται η παράλληλη χρήση τουλάχιστον τριών δεξαμενών ωοτοκίας. Για την αποφυγή της γενετικής μεροληψίας, αυγά από τουλάχιστον τρεις ομάδες αναπαραγωγής συλλέγονται, αναμειγνύονται και επιλέγονται τυχαία.

17. Για τη συλλογή των αυγών, τοποθετούνται παγίδες απόθεσης αυγών στις δεξαμενές ωοτοκίας ή διατήρησης πριν σκοτεινιάσει την προηγουμένη της ημέρας της δοκιμής ή πριν από το πρώτο φως της ημέρας της δοκιμής. Για να αποτρέπεται η θήρευση αυγών από ενήλικα ζεβρόψαρα, οι παγίδες απόθεσης αυγών καλύπτονται με συρμάτινο πλέγμα από αδρανές υλικό με κατάλληλο μέγεθος οπών (περίπου 2 ± 0,5 mm). Εάν θεωρηθεί αναγκαίο, μπορούν να στερεωθούν στο πλέγμα τεχνητά φυτά από αδρανές υλικό (π.χ. γυαλί ή πλαστικό) ως ερέθισμα ωοτοκίας (3)(4)(5)(23)(35). Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πατιναρισμένα πλαστικά υλικά που δεν ελευθερώνουν ουσίες με απόπλυση (π.χ. φθαλικές ενώσεις). Το ζευγάρωμα, η ωοτοκία και η γονιμοποίηση πραγματοποιούνται εντός 30 λεπτών από το πρώτο φως και οι παγίδες απόθεσης αυγών με τα συλλεγμένα αυγά μπορούν να απομακρυνθούν προσεκτικά. Συνιστάται η έκπλυση των αυγών με ανασυσταθέν νερό μετά τη συλλογή τους από τις παγίδες απόθεσης αυγών.

Διαφοροποίηση των αυγών

18. Στους 26 °C, τα γονιμοποιημένα αυγά υφίστανται την πρώτη αυλάκωση μετά από περίπου 15 λεπτά και με διαδοχικές συγχρονισμένες αυλακώσεις σχηματίζονται τα βλαστομερίδια 4, 8, 16 και 32 κυττάρων (βλ. προσάρτημα 3)(35). Σε αυτά τα στάδια, τα γονιμοποιημένα αυγά μπορούν να αναγνωριστούν σαφώς από την ανάπτυξη βλαστιδίων.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Συνθήκες έκθεσης

19. Είκοσι έμβρυα ανά συγκέντρωση (ένα έμβρυο ανά μικροκοιλότητα) εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία. Η έκθεση θα πρέπει να είναι τέτοια ώστε η συγκέντρωση της χημικής ουσίας να διατηρείται εντός εύρους ± 20 % της ονομαστικής της συγκέντρωσης καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Εάν αυτό δεν είναι εφικτό σε στατικό σύστημα, θα πρέπει να εφαρμόζεται ημιστατικό σύστημα με εύλογο διάστημα ανανέωσης (π.χ. ανανέωση κάθε 24 ώρες). Στις περιπτώσεις αυτές οι συγκεντρώσεις έκθεσης πρέπει να επαληθεύονται τουλάχιστον στην υψηλότερη και τη χαμηλότερη συγκέντρωση δοκιμής στην αρχή και στο τέλος κάθε διαστήματος έκθεσης (βλ. παράγραφο 36). Εάν δεν είναι δυνατόν να διατηρηθεί μια συγκέντρωση έκθεσης εντός εύρους ± 20 % της ονομαστικής συγκέντρωσης, πρέπει να μετριούνται όλες οι συγκεντρώσεις στην αρχή και στο τέλος κάθε διαστήματος έκθεσης (βλ. παράγραφο 36). Κατά την ανανέωση, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα

▼M7

ώστε τα έμβρυα να εξακολουθούν να καλύπτονται από μικρή ποσότητα των παλαιών διαλυμάτων δοκιμής, ώστε να αποφεύγεται η ξήρανση. Ο σχεδιασμός της δοκιμής μπορεί να προσαρμοστεί ώστε να ανταποκρίνεται στις σχετικές με τις δοκιμές απαιτήσεις για συγκεκριμένες ουσίες [π.χ. συστήματα συνεχούς ροής (24) ή παθητικής δοσιμετρίας (25) για ευκόλως αποδομήσιμες ή εξαιρετικά προσροφητικές ουσίες (29) ή άλλα συστήματα για πτητικές ουσίες (36)(37)]. Σε κάθε περίπτωση, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να ελαχιστοποιείται το στρες που υφίστανται τα έμβρυα. Οι δοκιμαστικοί θάλαμοι θα πρέπει να εγκλιματίζονται με τα διαλύματα δοκιμής τουλάχιστον επί 24 ώρες πριν από την έναρξη της δοκιμής. Οι συνθήκες δοκιμής συνοψίζονται στο προσάρτημα 2.

Συγκεντρώσεις δοκιμής

20. Για την ικανοποίηση των στατιστικών απαιτήσεων απαιτούνται κανονικά πέντε συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, οι οποίες να απέχουν μεταξύ τους κατά σταθερό παράγοντα που δεν υπερβαίνει το 2,2. Εάν χρησιμοποιούνται λιγότερες από πέντε συγκεντρώσεις, αυτό θα πρέπει να αιτιολογείται. Κατά προτίμηση, η υψηλότερη υπό δοκιμή συγκέντρωση θα πρέπει να προκαλεί φονικότητα 100 % και η χαμηλότερη να μην έχει παρατηρήσιμη επίδραση, όπως ορίζεται στην παράγραφο 28. Μια δοκιμή προσδιορισμού περιοχής συγκεντρώσεων πριν από την οριστική δοκιμή επιτρέπει την επιλογή του κατάλληλου εύρους συγκεντρώσεων. Η δοκιμή προσδιορισμού περιοχής πραγματοποιείται συνήθως με τη χρήση δέκα εμβρύων ανά συγκέντρωση. Οι οδηγίες που ακολουθούν αφορούν την εκτέλεση της δοκιμής σε πλάκες 24 μικροκοιλοτήτων. Εάν χρησιμοποιούνται διαφορετικοί δοκιμαστικοί θάλαμοι (π.χ. μικρά τρυβλία Petri) ή περισσότερες συγκεντρώσεις, οι οδηγίες θα πρέπει να προσαρμόζονται αναλόγως.

21. Λεπτομέρειες και οπτικές οδηγίες για την κατανομή των συγκεντρώσεων στις πλάκες 24 μικροκοιλοτήτων διατίθενται στην παράγραφο 27 και στο προσάρτημα 4, εικόνα 1.

Μάρτυρες

22. Απαιτούνται μάρτυρες με νερό αραίωσης, τόσο ως αρνητικοί μάρτυρες όσο και ως εσωτερικοί μάρτυρες πλάκας. Εάν υπάρχουν περισσότερα από ένα νεκρά έμβρυα στον εσωτερικό μάρτυρα πλάκας, η πλάκα απορρίπτεται και, συνεπώς, μειώνεται ο αριθμός των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιούνται για να συναχθεί η τιμή LC_{50}. Η απόρριψη μιας ολόκληρης πλάκας μπορεί να δυσχεράνει την ικανότητα αξιολόγησης και διάκρισης των παρατηρούμενων επιδράσεων, ιδίως εάν πρόκειται για την πλάκα μάρτυρα με διαλύτη ή για πλάκα στην οποία υφίστανται επίδραση και τα υπό μεταχείριση έμβρυα. Στην πρώτη περίπτωση, η δοκιμή πρέπει να επαναλαμβάνεται. Στη δεύτερη περίπτωση η απώλεια μιας ολόκληρης ομάδας μεταχείρισης ή και περισσότερων της μίας ομάδων, λόγω θνησιμότητας των εσωτερικών μαρτύρων, μπορεί να περιορίσει την ικανότητα αξιολόγησης των επιδράσεων και προσδιορισμού των τιμών LC_{50}.

23. Με κάθε παρτίδα αυγών που χρησιμοποιείται για τη δοκιμή αναλύεται ένας θετικός μάρτυρας με 3,4-διχλωροανιλίνη σε σταθερή συγκέντρωση 4 mg/l.

24. Σε περίπτωση χρήσης διαλύτη, μια πρόσθετη ομάδα 20 εμβρύων εκτίθεται στον διαλύτη σε χωριστή πλάκα 24 μικροκοιλοτήτων, που χρησιμεύει ως μάρτυρας με διαλύτη. Για να θεωρηθεί η δοκιμή αποδεκτή, ο διαλύτης θα πρέπει αποδεδειγμένα να μην έχει σημαντική επίδραση στον χρόνο εκκόλαψης και την επιβίωση ούτε άλλες δυσμενείς επιδράσεις στα έμβρυα [βλ. παράγραφο 8 στοιχείο 8γ)].

Έναρξη της έκθεσης και διάρκεια της δοκιμής

25. Η δοκιμή αρχίζει το συντομότερο δυνατόν μετά τη γονιμοποίηση των αυγών και ολοκληρώνεται μετά από 96 ώρες έκθεσης. Τα έμβρυα θα πρέπει να εμβαπτίζονται στα διαλύματα δοκιμής πριν από την έναρξη της αυλάκωσης των βλαστοδίσκων ή, το αργότερο, στο στάδιο 16 κυττάρων. Για να αρχίσει η έκθεση με την ελάχιστη δυνατή καθυστέρηση, επιλέγεται τυχαία αριθμός αυγών τουλάχιστον διπλάσιος του αναγκαίου ανά ομάδα μεταχείρισης και τα αυγά μεταφέρονται στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις και μάρτυρες (π.χ. σε δοχεία κρυστάλλωσης των 100 ml· τα αυγά θα πρέπει να καλύπτονται πλήρως) το αργότερο 90 λεπτά μετά τη γονιμοποίηση.

26. Τα βιώσιμα γονιμοποιημένα αυγά θα πρέπει να διαχωρίζονται από τα αγονιμοποίητα και να μεταφέρονται σε πλάκες 24 μικροκοιλοτήτων που έχουν

▼M7

προεγκλιματιστεί επί 24 ώρες και πληρωθεί εκ νέου με 2 ml πρόσφατα παρασκευασμένων διαλυμάτων δοκιμής ανά μικροκοιλότητα εντός 180 λεπτών από τη γονιμοποίηση. Με τη βοήθεια στερεοσκοπίου (κατά προτίμηση με μεγέθυνση ≥ 30x), επιλέγονται τα γονιμοποιημένα αυγά που εκτελούν αυλάκωση και δεν παρουσιάζουν εμφανείς ανωμαλίες κατά την αυλάκωση (π.χ. ασυμμετρία ή σχηματισμό κυστιδίων) ή βλάβες του χορίου. Για τη συλλογή και τον διαχωρισμό των αυγών, βλ. προσάρτημα 3 εικόνες 1 και 3 και προσάρτημα 4 εικόνα 2.

Κατανομή των αυγών στις πλάκες 24 μικροκοιλοτήτων

27. Τα αυγά κατανέμονται σε πλάκες με μικροκοιλότητες κατά τους ακόλουθους αριθμούς (βλ. επίσης προσάρτημα 4 εικόνα 1)

— 20 αυγά σε μία πλάκα για κάθε συγκέντρωση δοκιμής·

— 20 αυγά ως μάρτυρας με διαλύτη σε μία πλάκα (εάν είναι αναγκαίο)·

— 20 αυγά ως θετικός μάρτυρας σε μία πλάκα·

— 4 αυγά σε νερό αραίωσης ως εσωτερικός μάρτυρας πλάκας σε καθεμία από τις παραπάνω πλάκες·

— 24 αυγά σε νερό αραίωσης ως αρνητικός μάρτυρας σε μία πλάκα.

Παρατηρήσεις

28. Οι παρατηρήσεις κορυφαίων τελικών σημείων που πραγματοποιούνται σε κάθε υπό δοκιμή έμβρυο περιλαμβάνουν: πήξη εμβρύων, απουσία σχηματισμού σωμιτών, απουσία απόσπασης της ουράς και απουσία καρδιακού παλμού (πίνακας 1). Οι παρατηρήσεις αυτές χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της φονικότητας: θετικό αποτέλεσμα σε μία από τις παρατηρήσεις αυτές σημαίνει ότι το έμβρυο ζεβρόψαρου είναι νεκρό. Επιπλέον, η εκκόλαψη στις ομάδες μεταχείρισης και μαρτύρων καταγράφεται καθημερινά, με έναρξη μετά τις 48 ώρες. Οι παρατηρήσεις καταγράφονται κάθε 24 ώρες, μέχρι τη λήξη της δοκιμής.

Πίνακας 1

Παρατηρήσεις κορυφαίων τελικών σημείων οξείας τοξικότητας σε έμβρυα ζεβρόψαρου 24-96 ώρες μετά τη γονιμοποίηση

	Χρόνοι έκθεσης			
	24 ώρες	48 ώρες	72 ώρες	96 ώρες
Πηγμένα έμβρυα	+	+	+	+
Απουσία σχηματισμού σωμιτών	+	+	+	+
Απουσία απόσπασης της ουράς	+	+	+	+
Απουσία καρδιακού παλμού		+	+	+

29. *Πήξη του εμβρύου:* Τα πηγμένα έμβρυα είναι γαλακτόχρωμα και εμφανίζονται σκουρόχρωμα στο μικροσκόπιο (βλ. προσάρτημα 5 εικόνα 1). Ο αριθμός πηγμένων εμβρύων προσδιορίζεται στις 24, 48, 72 και 96 ώρες.

30. *Απουσία σχηματισμού σωμιτών:* Στους 26 ± 1 °C, σε ένα φυσιολογικά αναπτυσσόμενο έμβρυο ζεβρόψαρου έχουν σχηματιστεί περίπου 20 σωμίτες μετά από 24 ώρες (βλ. προσάρτημα 5, εικόνα 2). Ένα φυσιολογικά ανεπτυγμένο έμβρυο παρουσιάζει αυθόρμητες κινήσεις (πλευρικές συσπάσεις). Οι αυθόρμητες κινήσεις δηλώνουν τον σχηματισμό σωμιτών. Η απουσία σωμιτών καταγράφεται στις 24, 48, 72 και 96 ώρες. Η απουσία σχηματισμού σωμιτών μετά από 24 ώρες μπορεί να οφείλεται σε γενική καθυστέρηση της ανάπτυξης. Το αργότερο μετά από 48 ώρες, θα πρέπει να έχουν σχηματιστεί σωμίτες. Εάν όχι, τα έμβρυα θεωρούνται νεκρά.

31. *Απουσία απόσπασης της ουράς:* Σε ένα φυσιολογικά αναπτυσσόμενο έμβρυο ζεβρόψαρου, η απόσπαση της ουράς από τη λέκιθο (βλ. προσάρτημα 5,

▼M7

εικόνα 3) παρατηρείται μετά από οπίσθια επιμήκυνση του εμβρυϊκού σώματος. Η απουσία απόσπασης της ουράς καταγράφεται στις 24, 48, 72 και 96 ώρες.

32. *Απουσία καρδιακού παλμού:* Σε ένα φυσιολογικά αναπτυσσόμενο έμβρυο ζεβρόψαρου στους 26 ± 1 °C, ο καρδιακός παλμός είναι ορατός μετά από 48 ώρες (βλ. προσάρτημα 5, εικόνα 4). Θα πρέπει να λαμβάνεται ιδιαίτερη μέριμνα κατά την καταγραφή αυτού του τελικού σημείου, δεδομένου ότι ο άρρυθμος (ακανόνιστος) καρδιακός παλμός *δεν* θα πρέπει να καταγράφεται ως θανατηφόρος. Επιπλέον, ο ορατός καρδιακός παλμός χωρίς κυκλοφορία στην κοιλιακή αορτή θεωρείται μη θανατηφόρος. Για την καταγραφή αυτού του τελικού σημείου, τα έμβρυα που δεν παρουσιάζουν καρδιακό παλμό θα πρέπει να παρατηρούνται με μεγέθυνση τουλάχιστον 80x για ένα τουλάχιστον λεπτό. Η απουσία καρδιακού παλμού καταγράφεται στις 48, 72 και 96 ώρες.

33. Τα ποσοστά επώασης όλων των ομάδων μεταχείρισης και μαρτύρων θα πρέπει να καταγράφονται και να αναφέρονται μετά τις 48 ώρες. Αν και η εκκόλαψη δεν είναι τελικό σημείο που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της τιμής LC_{50}, εν τούτοις εξασφαλίζει την έκθεση του εμβρύου χωρίς τη δυνητική λειτουργία φραγμού του χορίου και, ως εκ τούτου, μπορεί να βοηθήσει στην ερμηνεία των δεδομένων.

34. Αναλυτικές περιγραφές της φυσιολογικής ανάπτυξης (35) και παραδείγματα ανώμαλης ανάπτυξης εμβρύων ζεβρόψαρου απεικονίζονται στα προσαρτήματα 3 και 5.

Αναλυτικές μετρήσεις

35. Στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής μετρώνται το pH, η ολική σκληρότητα και η αγωγιμότητα στους μάρτυρες και στην υψηλότερη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Στα ημιστατικά συστήματα με ανανέωση το pH θα πρέπει να μετράται πριν και μετά την ανανέωση του νερού. Στο τέλος της δοκιμής μετράται η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου στους αρνητικούς μάρτυρες και στην υψηλότερη συγκέντρωση δοκιμής με βιώσιμα έμβρυα, όπου θα πρέπει να είναι σύμφωνη με τα κριτήρια εγκυρότητας της δοκιμής [βλ. παράγραφο 8 στοιχείο στ)]. Εάν υπάρχει ανησυχία μήπως η θερμοκρασία διαφέρει μεταξύ των πλακών των 24 μικροκοιλοτήτων, μετράται σε τρία δοχεία που επιλέγονται τυχαία. Η θερμοκρασία θα πρέπει να καταγράφεται, κατά προτίμηση συνεχώς σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής ή, τουλάχιστον, σε ημερήσια βάση.

36. Στα στατικά συστήματα, η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να μετράται, τουλάχιστον, στην υψηλότερη και τη χαμηλότερη συγκέντρωση δοκιμής, αλλά κατά προτίμηση σε κάθε ομάδα μεταχείρισης, στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής. Στις ημιστατικές δοκιμές (με ανανέωση), εφόσον η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας αναμένεται να παραμείνει εντός του ορίου του ± 20 % των ονομαστικών τιμών, συνιστάται, κατ' ελάχιστο, να αναλύονται η υψηλότερη και η χαμηλότερη συγκέντρωση δοκιμής μόλις παρασκευαστούν τα διαλύματα και αμέσως πριν από την ανανέωση. Στις δοκιμές όπου η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας αναμένεται να μην παραμείνει εντός του ορίου του ± 20 % των ονομαστικών τιμών, πρέπει να αναλύονται όλες οι συγκεντρώσεις δοκιμής μόλις παρασκευαστούν τα διαλύματα και αμέσως πριν από την ανανέωση. Σε περίπτωση ανεπαρκούς όγκου για την ανάλυση, μπορεί να είναι χρήσιμη η συγχώνευση των διαλυμάτων δοκιμής ή η χρήση υποκατάστατων θαλάμων που αποτελούνται από το ίδιο υλικό και έχουν τον ίδιο λόγο όγκου προς επιφάνεια με αυτόν των πλακών των 24 μικροκοιλοτήτων. Συνιστάται ένθερμα να βασίζονται τα αποτελέσματα σε μετρηθείσες συγκεντρώσεις. Όταν οι συγκεντρώσεις δεν παραμένουν εντός των ορίων του 80-120 % της ονομαστικής συγκέντρωσης, οι συγκεντρώσεις με επίδραση θα πρέπει να εκφράζονται σε σχέση με τον γεωμετρικό μέσο των μετρούμενων συγκεντρώσεων· για περισσότερες λεπτομέρειες βλ. κεφάλαιο 5 του εγγράφου καθοδήγησης του ΟΟΣΑ σχετικά με τις δοκιμές υδατικής τοξικότητας δύσκολων ουσιών και μειγμάτων (28).

ΟΡΙΑΚΗ ΔΟΚΙΜΗ

37. Είναι δυνατόν να διεξαχθεί οριακή δοκιμή με συγκέντρωση της υπό δοκιμής χημικής ουσίας ίση με 100 mg/l ή με το όριο διαλυτότητάς της στο θρεπτικό μέσο δοκιμής (όποια από τις δύο τιμές είναι μικρότερη) για να διαπιστωθεί αν η LC_{50} είναι μεγαλύτερη από αυτή τη συγκέντρωση, με την εφαρμογή

▼M7

των διαδικασιών που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών. Η οριακή δοκιμή θα πρέπει να εκτελείται με τη χρήση 20 εμβρύων στην ομάδα μεταχείρισης, στον θετικό μάρτυρα και, εάν είναι αναγκαίο, στον μάρτυρα με τον διαλύτη, και 24 εμβρύων στον αρνητικό μάρτυρα. Εάν η φονικότητα στην υπό δοκιμή συγκέντρωση υπερβαίνει τη θνησιμότητα στον αρνητικό μάρτυρα (ή στον μάρτυρα με τον διαλύτη) κατά 10 %, θα πρέπει να διεξάγεται πλήρης μελέτη. Θα πρέπει να καταγράφεται κάθε παρατηρούμενη επίδραση. Εάν η θνησιμότητα υπερβαίνει το 10 % στον αρνητικό μάρτυρα (ή στον μάρτυρα με διαλύτη), η δοκιμή είναι άκυρη και θα πρέπει να επαναλαμβάνεται.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

38. Στην παρούσα δοκιμή, κάθε μικροκοιλότητα θεωρείται ανεξάρτητη επανάληψη για τη στατιστική ανάλυση. Χαράσσεται καμπύλη των ποσοστών εμβρύων για τα οποία τουλάχιστον μία από τις παρατηρήσεις κορυφαίων τελικών σημείων είναι θετική στις 48 και/ή τις 96 ώρες συναρτήσει των συγκεντρώσεων δοκιμής. Για τον υπολογισμό των κλίσεων της καμπύλης, των τιμών LC_{50} και των ορίων εμπιστοσύνης (95 %), θα πρέπει να εφαρμόζονται οι κατάλληλες στατιστικές μέθοδοι (38) και να γίνεται χρήση του εγγράφου καθοδήγησης του ΟΟΣΑ σχετικά με τις τρέχουσες προσεγγίσεις στη στατιστική ανάλυση των δεδομένων οικοτοξικότητας (39).

Έκθεση δοκιμής

39. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

Μονοσυστατική ουσία

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες·

— στοιχεία ταυτοποίησης της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ. (συμπεριλαμβανομένης της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα, κατά περίπτωση).

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγματα:

— περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Υπό δοκιμή οργανισμοί:

— επιστημονική ονομασία, ποικιλία, πηγή και μέθοδος συλλογής των γονιμοποιημένων αυγών και μετέπειτα χειρισμός.

Συνθήκες δοκιμής:

— χρησιμοποιηθείσα διαδικασία δοκιμής (π.χ. ημιστατική ανανέωση)·

— φωτοπερίοδος·

— σχεδιασμός της δοκιμής (π.χ. αριθμός δοκιμαστικών θαλάμων, είδη μαρτύρων)·

— ποιοτικά χαρακτηριστικά του νερού διατήρησης των ψαριών (π.χ. pH, σκληρότητα, θερμοκρασία, αγωγιμότητα, διαλυμένο οξυγόνο)·

— συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου, pH, ολική σκληρότητα, θερμοκρασία και αγωγιμότητα των διαλυμάτων δοκιμής κατά την έναρξη και στις 96 ώρες·

— μέθοδος παρασκευής των διαλυμάτων παρακαταθήκης και των διαλυμάτων δοκιμής, καθώς και συχνότητα ανανέωσης·

▼M7

— αιτιολόγηση της χρήσης διαλύτη και της επιλογής του διαλύτη, εάν δεν είναι το νερό·

— ονομαστικές συγκεντρώσεις δοκιμής και αποτελέσματα όλων των αναλύσεων για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στα δοκιμαστικά δοχεία· πρέπει επίσης να αναφέρονται η απόδοση ανάκτησης της μεθόδου και το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LoQ)·

— στοιχεία που αποδεικνύουν ότι οι μάρτυρες πληρούν το σχετικό με τη συνολική επιβίωση κριτήριο εγκυρότητας·

— ποσοστό γονιμοποίησης αυγών·

— ποσοστό εκκόλαψης στις ομάδες μεταχείρισης και μαρτύρων.

Αποτελέσματα:

— μέγιστη συγκέντρωση που δεν προκαλεί θνησιμότητα κατά τη διάρκεια της δοκιμής·

— ελάχιστη συγκέντρωση που προκαλεί θνησιμότητα 100 % κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

— αθροιστική θνησιμότητα για κάθε συγκέντρωση στους συνιστώμενους χρόνους παρατήρησης·

— οι τιμές LC_{50} στις 96 ώρες (και προαιρετικά στις 48 ώρες) για τη θνησιμότητα με όριο εμπιστοσύνης 95 %, εάν είναι δυνατόν·

— γραφική παράσταση της καμπύλης συγκέντρωσης-θνησιμότητας στο τέλος της δοκιμής·

— θνησιμότητα στους μάρτυρες (αρνητικούς μάρτυρες, εσωτερικούς μάρτυρες πλάκας, καθώς και στους θετικούς μάρτυρες και τους μάρτυρες με διαλύτη που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν)·

— δεδομένα σχετικά με τα αποτελέσματα κάθε μίας από τις τέσσερις παρατηρήσεις κορυφαίων τελικών σημείων·

— επίπτωση (incidence) και περιγραφή μορφολογικών και φυσιολογικών ανωμαλιών, εάν υπάρχουν (βλ. παραδείγματα που παρατίθενται στο προσάρτημα 5, εικόνα 2)·

— συμβάντα κατά τη δοκιμή που ενδέχεται να έχουν επηρεάσει τα αποτελέσματα·

— στατιστική ανάλυση και επεξεργασία των δεδομένων (ανάλυση probit, μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης και γεωμετρικός μέσος για την τιμή LC_{50})·

— κλίση και όρια εμπιστοσύνης της παλινδρόμησης της (μετασχηματισμένης) καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης.

Κάθε παρέκκλιση από τη μέθοδο δοκιμών και σχετικές εξηγήσεις.

Συζήτηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2011) Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II. Series on Testing and Assessment No. 157, OECD, Paris.

(2) OECD (2012) Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II (Annexes). Series on Testing and Assessment No. 179, OECD, Paris.

(3) Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M. and Seitz, N. (2005) Towards an alternative for the acute

▼M7

fish LC_{50} test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species-an update. ALTEX 22: 87-102.

(4) ISO (2007) International Standard Water quality — Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). ISO 15088:2007(E) International Organization for Standardization.

(5) Nagel, R. (2002) DarT: The embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*) — a general model in ecotoxicology and toxicology. ALTEX 19: 38-48.

(6) Schulte, C. and Nagel, R. (1994) Testing acute toxicity in embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* as alternative to the acute fish test — preliminary results. ATLA 22, 12-19.

(7) Bachmann, J. (2002) Development and validation of a teratogenicity screening test with embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). PhD-thesis, Technical University of Dresden, Germany.

(8) Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. and Nagel, R. (1995) Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish (*Brachydanio rerio*), and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. Chemosphere 30/11: 2087-2102.

(9) Knöbel, M., Busser, F.J.M., Rico-Rico, A., Kramer, N.I., Hermens, J.L.M., Hafner, C., Tanneberger, K., Schirmer, K., Scholz, S. (2012). Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. Environ. Sci. Technol. 46, 9690-9700.

(10) Kammann, U., Vobach, M. and Wosniok, W. (2006) Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 51: 97-102.

(11) Groth, G., Kronauer, K. and Freundt, K.J. (1994) Effects of *N,N*-diemethylformamide and its degradation products in zebrafish embryos. Toxicol. *In Vitro* 8: 401-406.

(12) Groth, G., Schreeb, K., Herdt, V. and Freundt, K.J. (1993) Toxicity studies in fertilized zebrafish fish eggs treated with *N*-methylamine, *N,N*-dimethylamine, 2-aminoethanol, isopropylamine, aniline, *N*-methylaniline, *N,N*-dimethylaniline, quinone, chloroacetaldehyde, or cyclohexanol. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 50: 878-882.

(13) Nguyen, L.T. and Janssen, C.R. (2001) Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity assays with African catfish (*Clarias gariepinus*) and zebra fish (*Danio rerio*). Environ. Toxicol. 16: 566-571.

(14) Cheng, S.H., Wai, A.W.K., So, C.H. and Wu, R.S.S. (2000) Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. Environ. Toxicol. Chem. 19: 3024-3031.

(15) Belanger, S. E., Rawlings J. M. and Carr G. J. (2013). Use of Fish Embryo Toxicity Tests for the Prediction of Acute Fish Toxicity to Chemicals. Environmental Toxicology and Chemistry 32: 1768-1783.

(16) Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., Braunbeck, T. (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.: 149 (2), 196 – 209

(17) Κεφάλαιο Γ.4 του παρόντος παραρτήματος: Άμεση βιοαποικοδομησιμότητα.

(18) Κεφάλαιο Β.55 του παρόντος παραρτήματος: Άμεση βιοαποικοδομησιμότητα, CO_2 σε σφραγισμένα δοχεία.

(19) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011) Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. Toxicology 281: 25-36.

▼M7

(20) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2012) Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Reprod. Toxicol. 33: 133-141.

(21) Incardona, J.P, Linbo, T.L., Scholz, N.L. (2011) Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. Toxicol. Appl. Pharmacol. 257: 242-249.

(22) Kubota, A., Stegeman, J.J., Woodin, B.R., Iwanaga, T., Harano, R., Peterson, R.E., Hiraga, T., Teraoka, H. (2011) Role of zebrafish cytochrome P450 CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by activation of AHR2. Toxicol. Appl. Pharmacol. 253: 244-252.

(23) Κεφάλαιο Γ.48 του παρόντος παραρτήματος: Βραχυπρόθεσμη δοκιμή αναπαραγωγής σε ψάρια. Βλ. προσάρτημα 4α:

(24) Lammer, E., Kamp, H.G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E.R., Wendlar, K., Zok, S., Braunbeck, T. (2009) Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with zebrafish (*Danio rerio*). Toxicol. *in vitro* 23: 1436-1442.

(25) Brown, R.S., Akhtar, P., Åkerman, J., Hampel, L., Kozin, I.S., Villerius, L.A., Klamer, H.J.C., (2001) Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. Environ. Sci. Technol. 35, 4097-4102.

(26) Schreiber, R., Altenburger, R., Paschke, A., Küster, E. (2008) How to deal with lipophilic and volatile organic substances in microtiter plate assays. Environ. Toxicol. Chem 27, 1676-1682

(27) ISO (1996) International Standards. Water quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. ISO 7346-3: Μέθοδος συνεχούς ροής. Διαθέσιμη στη διεύθυνση: [http://www.iso.org].

(28) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.

(29) Laale, H.W. (1977) The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in fisheries research. A literature review. J. Fish Biol. 10: 121-173.

(30) Westerfield, M. (2007) The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). 5η έκδοση. Eugene, University of Oregon Press, Institute of Neuroscience, USA.

(31) Canadian Council on Animal Care (2005) Guidelines on: the Care and Use of Fish in Research, Teaching and Testing, ISBN: 0-919087-43-4 http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf

(32) Σύσταση της Επιτροπής, της 18ης Ιουνίου 2007, σχετικά με τη χάραξη κατευθύνσεων για την παροχή στέγης και φροντίδας στα ζώα που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς και άλλους επιστημονικούς σκοπούς (κοινοποιηθείσα υπό τον αριθμό Ε(2007) 2525) Ε(2007) 2525) [http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:EN:PDF]

(33) Ευρωπαϊκή Ένωση (2010) Οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 22ας Σεπτεμβρίου 2010 περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς. Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης L 276:33-79· 20.10.2010

http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:EN:PDF

(34) Nagel, R. (1986) Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.). Toxicol. Ichthyol. 2: 173-181.

▼**M7**

(35) Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. and Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn. 203: 253-310.

(36) Κεφάλαιο Γ.2 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμή οξείας ακινητοποίησης σε δαφνία.

(37) Weil, M., Scholz, S., Zimmer, M., Sacher, F., Duis, K. (2009) Gene expression analysis in zebrafish embryos: a potential approach to predict effect conentrations in the fish early life stage test. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1970-1978

(38) ISO (2006) International Standard. Water quality — Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data ISO TS 20281. Διαθέσιμη στη διεύθυνση: [http://www.iso.org].

(39) OECD (2006) Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54. OECD, Paris.

(40) Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. Detailed review paper «Fish embryo toxicity assays». UBA report under contract no. 20385422 German Federal Environment Agency, Berlin. 298 pp.

▼M7

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Βλαστίδιο: κυτταρικός σχηματισμός γύρω από τον ζωικό πόλο που καλύπτει ένα μέρος της λεκίθου.

Δοκιμή συνεχούς ροής: δοκιμή με συνεχή ροή των διαλυμάτων δοκιμής μέσω του συστήματος δοκιμής κατά τη διάρκεια της έκθεσης.

Επιβολή: ο μαζικός πολλαπλασιασμός κυρίως επιδερμικών κυττάρων στη φάση της γαστριδίωσης του εμβρύου και η μετακίνησή τους από τη νωτιαία στην κοιλιακή πλευρά, με την οποία ενδοδερμικές κυτταρικές στιβάδες εσωτερικεύονται με μια διαδικασία που προσομοιάζει με εγκόλπωση και η λέκιθος ενσωματώνεται στο έμβρυο.

Εσωτερικός μάρτυρας πλάκας: εσωτερικός μάρτυρας αποτελούμενος από 4 μικροκοιλότητες ανά πλάκα 24 μικροκοιλοτήτων, πληρούμενες με νερό αραίωσης, για τον εντοπισμό πιθανής μόλυνσης των πλακών από τον κατασκευαστή ή από τον ερευνητή κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, καθώς και τυχόν επίδρασης πλάκας που ενδεχομένως επηρεάζει το αποτέλεσμα της δοκιμής (π.χ. βαθμίδωση θερμοκρασίας).

Ημιστατική δοκιμή με ανανέωση: δοκιμή με τακτική ανανέωση των διαλυμάτων δοκιμής μετά από καθορισμένες περιόδους (π.χ. κάθε 24 ώρες).

Κορυφαίο τελικό σημείο: που έχει επίδραση σε επίπεδο πληθυσμού.

Μέση θανατηφόρος συγκέντρωση (LC_{50}): η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που εκτιμάται ότι είναι θανατηφόρος για το 50 % των υπό δοκιμή οργανισμών κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

Νερό διατήρησης: νερό στο οποίο εκτρέφονται τα ενήλικα ψάρια.

Στατική δοκιμή: δοκιμή στην οποία τα διαλύματα δοκιμής παραμένουν αμετάβλητα καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής.

Σωμίτης: στα αναπτυσσόμενα έμβρυα σπονδυλωτών, οι σωμίτες είναι μάζες μεσοδέρματος κατανεμημένες στα πλάγια του νευρικού σωλήνα, που τελικά θα αναπτύξουν το χόριο (δερμοτόμιο), τους σκελετικούς μύες (μυοτόμιο) και τους σπονδύλους (σκληροτόμιο).

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών

Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα

IUPAC: Διεθνής Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας.

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification (Προδιαγραφή Απλοποιημένης Μοριακής Γραμμικής Γραφής)

UVCB: ουσίες άγνωστης ή μεταβλητής σύνθεσης, σύμπλοκα προϊόντα αντίδρασης ή βιολογικά υλικά

▼M7

Προσάρτημα 2

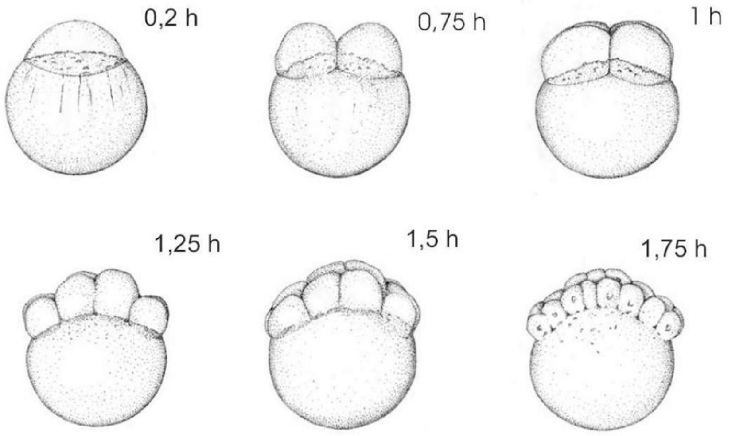
ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ, ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΤΥΠΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΣΤΙΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΟΞΕΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΕΜΒΡΥΑ ΖΕΒΡΟΨΑΡΟΥ

Ζεβρόψαρο (*Danio rerio*)		
Καταγωγή είδους		Ινδία, Μιανμάρ, Malakka, Σουμάτρα
Φυλετικός διμορφισμός		Θηλυκά άτομα: προεξέχουσα κοιλιά, όταν κυοφορούν αυγά Αρσενικά άτομα: λεπτότερο σώμα, πορτοκαλί απόχρωση ανάμεσα σε μπλε διαμήκεις ραβδώσεις (κυρίως στο εδρικό πτερύγιο)
Πρόγραμμα σίτισης		Ξηρά τροφή σε νιφάδες (μέγιστη ποσότητα 3 % του βάρους των ψαριών ανά ημέρα), 3-5 φορές ημερησίως· επιπλέον, προνύμφες (ναύπλιοι) γαρίδας της άλμης (*Artemia* sp.) και/ή μικρές δαφνίδες κατάλληλου μεγέθους που λαμβάνονται από μη μολυσμένη πηγή. Η σίτιση με ζωντανή τροφή αποτελεί πηγή εμπλουτισμού του περιβάλλοντος και, ως εκ τούτου, θα πρέπει να χορηγείται ζωντανή τροφή όποτε αυτό είναι δυνατόν. Για να διασφαλιστεί η βέλτιστη ποιότητα νερού, η πλεονάζουσα τροφή και τα περιττώματα θα πρέπει να απομακρύνονται περίπου μία ώρα μετά τη σίτιση.
Κατά προσέγγιση βάρος ενήλικων ψαριών		Θηλυκά άτομα: 0,65 ± 0,13 g Αρσενικά άτομα: 0,5 ± 0,1 g
Διατήρηση γεννητόρων	Φωτισμός	Λαμπτήρες φθορισμού (ευρέος φάσματος)· 10-20 μE/m^2/s, 540-1080 lux, ή 50-100 ft-c (επίπεδα στο περιβάλλον του εργαστηρίου)· φωτοπερίοδος 12-16 ωρών
	Θερμοκρασία νερού	26 ± 1 °C
	Ποιότητα του νερού	O_2 ≥ 80 % κορεσμός, σκληρότητα: π.χ. ~ 30-300 mg/l $CaCO_3$, NO_3^-: ≤ 48 mg/l, NH_4^+ και NO_2^-: < 0,001 mg/l, υπολειμματικό χλώριο < 10 μg/l, ολικό οργανικό χλώριο < 25 ng/l, pH = 6,5 – 8,5
	Πρόσθετα κριτήρια ποιότητας νερού	σωματίδια < 20 mg/l, ολικός οργανικός άνθρακας < 2 mg/l, ολικά οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα < 50 ng/l, ολικά οργανοχλωριούχα γεωργικά φάρμακα συν πολυχλωριωμένα διφαινύλια < 50 ng/l
	Μέγεθος δεξαμενών διατήρησης	π.χ. 180 l, 1 ψάρι/l
	Καθαρισμός νερού	Διαρκής (με φίλτρα ενεργού άνθρακα)· άλλες δυνατότητες περιλαμβάνουν συνδυασμούς με ημιστατικά συστήματα ανανέωσης ή με σύστημα συνεχούς ροής με συνεχή ανανέωση του νερού
	Συνιστώμενη αναλογία αρσενικών προς θηλυκά άτομα για την αναπαραγωγή	1:2 (ή μαζική ωοτοκία)
Δεξαμενές ωοτοκίας		π.χ. δεξαμενές 4 l εξοπλισμένες με χαλύβδινο πλέγμα πυθμένα και ομοίωμα φυτού ως ερέθισμα ωοτοκίας· εξωτερικά θερμαντικά στρώματα ή μαζική ωοτοκία εντός των δεξαμενών διατήρησης
Δομή και εμφάνιση των αυγών		Σταθερό χόριο (δηλ. υψηλής διαφάνειας, μη κολλώδες, με διάμετρο ~ 0,8–1,5 mm)
Ρυθμός ωοτοκίας		Ένα ώριμο θηλυκό άτομο αποθέτει τουλάχιστον 50-80 αυγά ημερησίως. Ανάλογα με την ποικιλία, οι ρυθμοί ωοτοκίας μπορεί να είναι σημαντικά υψηλότεροι. Το ποσοστό γονιμοποίησης θα πρέπει να είναι ≥ 70 %. Στα ψάρια που γεννούν αυγά για πρώτη φορά, το ποσοστό γονιμοποίησης των αυγών μπορεί να είναι χαμηλότερο τις πρώτες λίγες ωοτοκίες.
Τύπος δοκιμής		Στατική, ημιστατική με ανανέωση, συνεχούς ροής, θερμοκρασία 26 ± 1 °C, δοκιμαστικοί θάλαμοι εγκλιματισμένοι επί 24 ώρες (π.χ. πλάκες 24 μικροκοιλοτήτων, 2,5-5 ml ανά κοιλότητα)

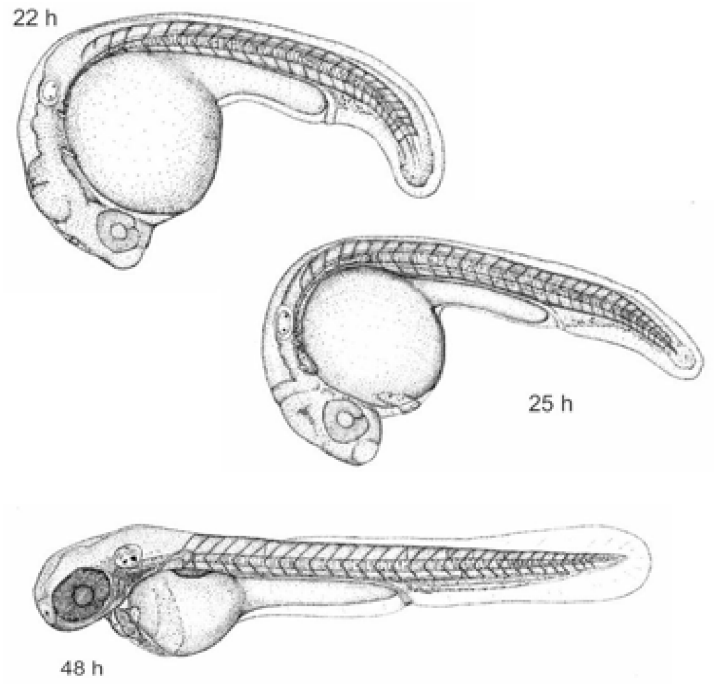
▼**M7**

Προσάρτημα 3

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΖΕΒΡΟΨΑΡΩΝ ΣΤΟΥΣ 26 °C

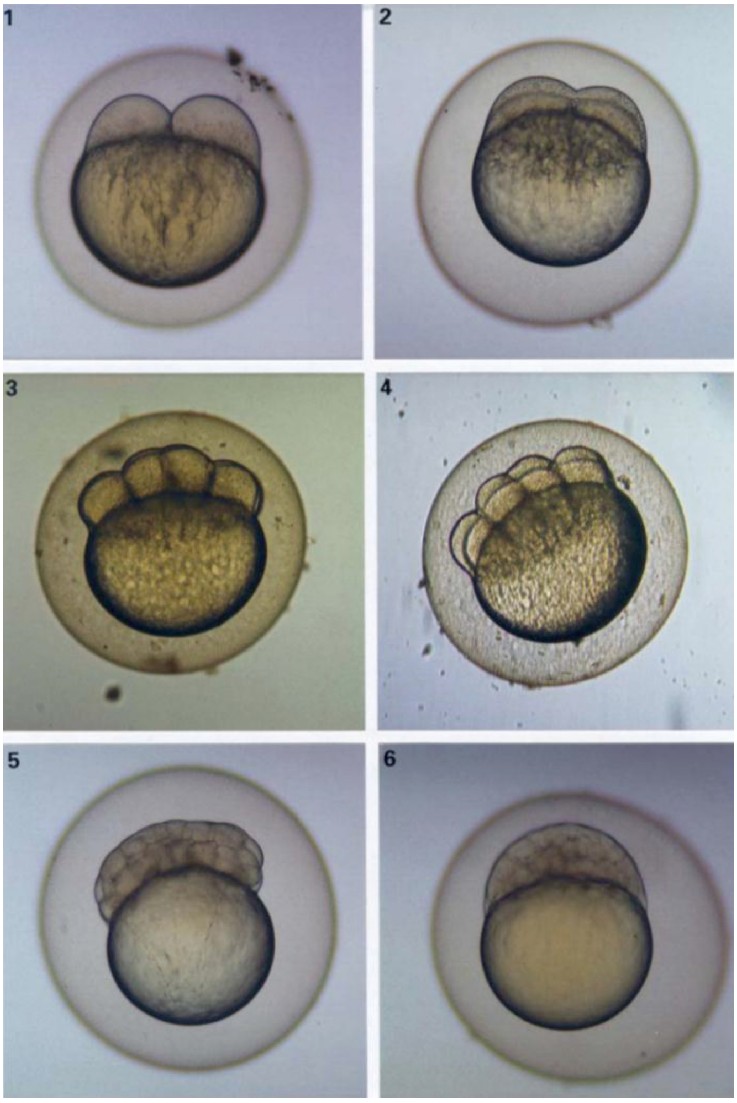


Εικόνα 1: Επιλεγμένα στάδια πρώιμης ανάπτυξης ζεβρόψαρων (*Danio rerio*): 0,2-1,75 ώρες μετά τη γονιμοποίηση [πηγή: Kimmel και συν., 1995 (35)]. Η χρονική ακολουθία της φυσιολογικής ανάπτυξης μπορεί να ληφθεί υπόψη για τη διάγνωση τόσο της γονιμοποίησης όσο και της βιωσιμότητας των αυγών (βλ. παράγραφο 26: Επιλογή των γονιμοποιημένων αυγών).



Εικόνα 2: Επιλεγμένα στάδια όψιμης ανάπτυξης ζεβρόψαρων (*Danio rerio*) (έμβρυο μετά από αφαίρεση του χορίου για βελτιωμένη απεικόνιση): 22-48 ώρες μετά τη γονιμοποίηση [πηγή: Kimmel και συν., 1995 (35)].

▼**M7**



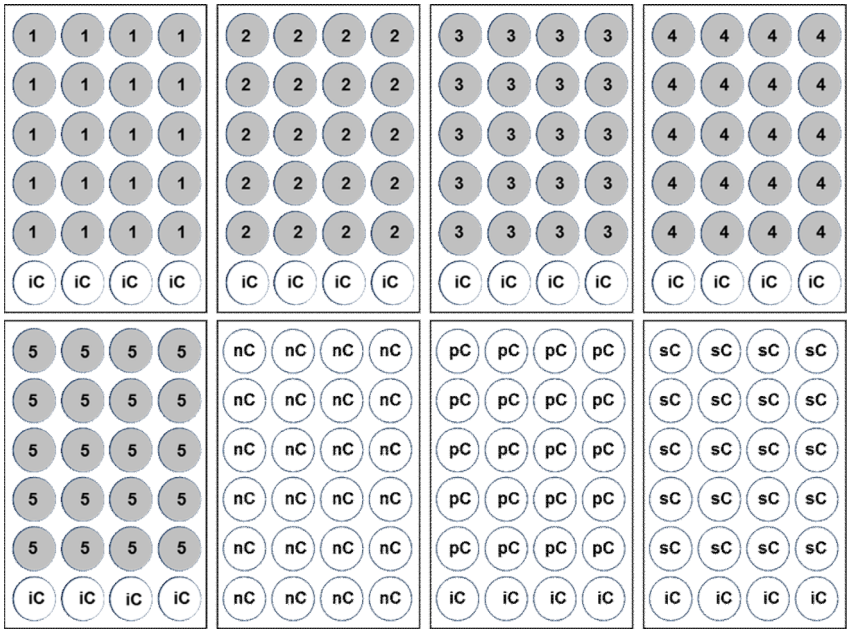
Εικόνα 3: Φυσιολογική ανάπτυξη εμβρύων ζεβρόψαρου (*Danio rerio*): (1) 0,75 ώρες, στάδιο 2 κυττάρων· (2) 1 ώρα, στάδιο 4 κυττάρων· (3) 1,2 ώρες, στάδιο 8 κυττάρων· (4) 1,5 ώρες, στάδιο 16 κυττάρων· (5) 4,7 ώρες, έναρξη επιβολής· (6) 5,3 ώρες, επιβολή περίπου 50 % [από Braunbeck & Lammer 2006 (40)].

▼**M7**

Προσάρτημα 4

Εικόνα 1

Σχεδιάγραμμα των πλακών των 24 μικροκοιλοτήτων



1-5 = πέντε συγκεντρώσεις δοκιμής ανά χημική ουσία·

nC = αρνητικός μάρτυρας (νερό αραίωσης)·

iC = εσωτερικός μάρτυρας πλάκας (νερό αραίωσης)·

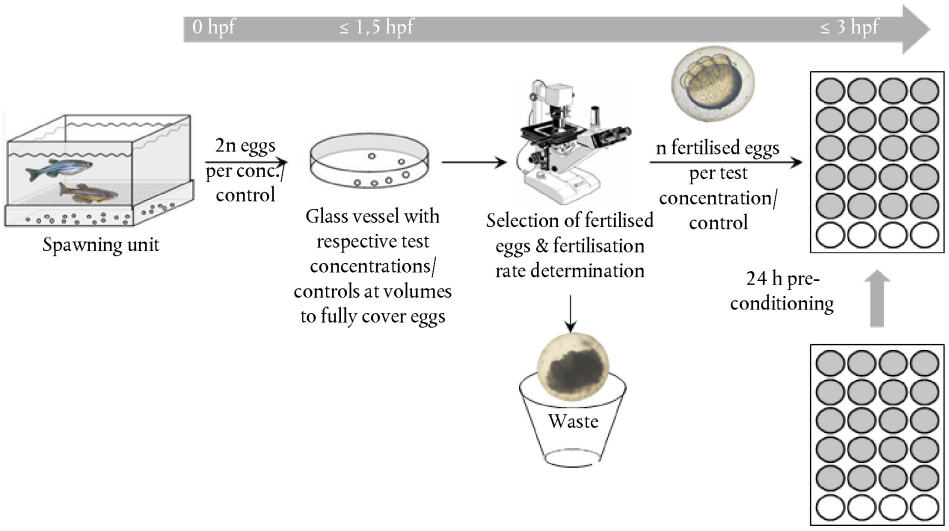
pC = θετικός μάρτυρας (3,4-διχλωροανιλίνη 4 mg/l)·

sC = μάρτυρας με διαλύτη

▼M7

Εικόνα 2

Διάγραμμα της διαδικασίας δοκιμής οξείας τοξικότητας σε έμβρυα ζεβρόψαρου (από αριστερά προς τα δεξιά): παραγωγή αυγών, συλλογή των αυγών, προέκθεση αμέσως μετά τη γονιμοποίηση σε γυάλινα δοχεία, επιλογή των γονιμοποιημένων αυγών με ανεστραμμένο ή διοφθάλμιο μικροσκόπιο και κατανομή των γονιμοποιημένων αυγών σε πλάκες 24 μικροκοιλοτήτων που έχουν προετοιμαστεί με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοκιμής/μάρτυρες, n = αριθμός αυγών που απαιτούνται ανά συγκέντρωση δοκιμής/μάρτυρα (εν προκειμένω 20), hpf = ώρες μετά τη γονιμοποίηση.



▼M7

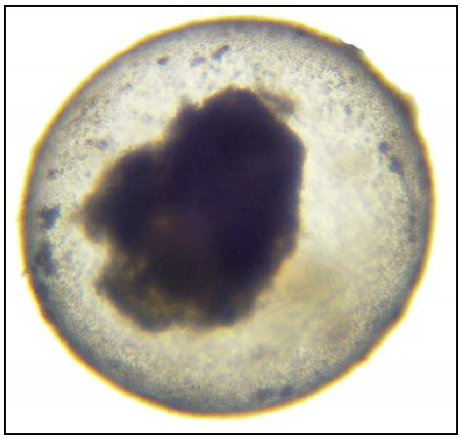
Προσάρτημα 5

ΑΤΛΑΣ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΩΝ ΤΕΛΙΚΩΝ ΣΗΜΕΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΔΟΚΙΜΗ ΟΞΕΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΕΜΒΡΥΑ ΖΕΒΡΟΨΑΡΟΥ

Τα ακόλουθα κορυφαία τελικά σημεία υποδηλώνουν οξεία τοξικότητα και, κατά συνέπεια, τον θάνατο των εμβρύων: *πήξη του εμβρύου, απουσία απόσπασης της ουράς, απουσία σχηματισμού σωμιτών και απουσία καρδιακού παλμού.* Οι ακόλουθες φωτομικρογραφίες έχουν επιλεγεί για να επεξηγήσουν αυτά τα τελικά σημεία.

Εικόνα 1

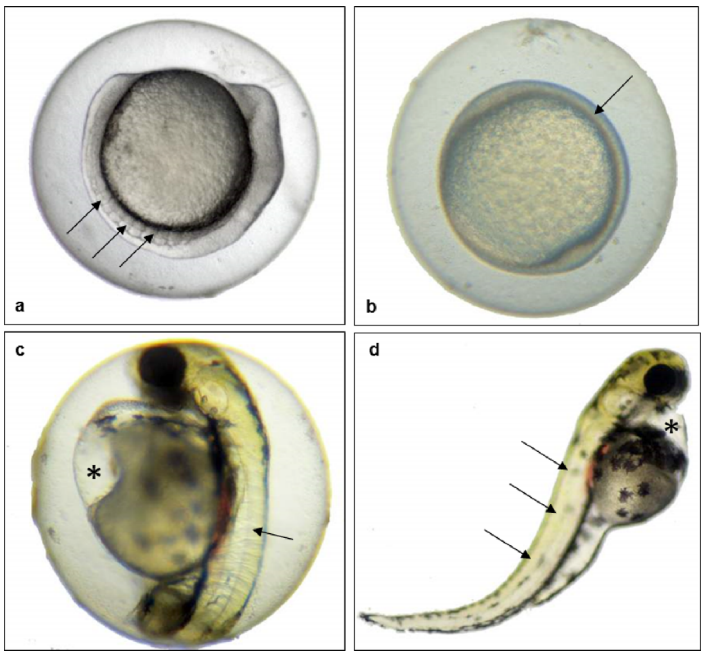
Πήξη του εμβρύου:



Με φωτισμό φωτεινού πεδίου, τα πηγμένα έμβρυα ζεβρόψαρου παρουσιάζουν ποικίλα αδιαφανή έγκλειστα.

Εικόνα 2

Απουσία σχηματισμού σωμιτών:

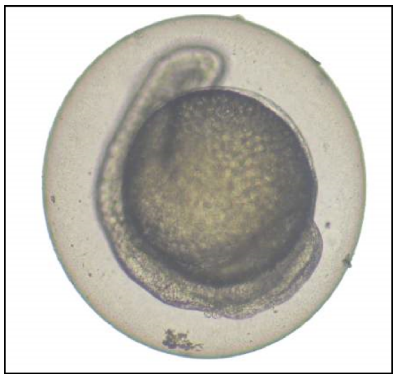


▼M7

Αν και με περίπου 10ωρη καθυστέρηση ανάπτυξης, το έμβρυο ζεβρόψαρου 24 ωρών στην εικόνα α) παρουσιάζει καλώς ανεπτυγμένους σωμίτες (→), ενώ στην εικόνα β) δεν παρουσιάζει σημεία σχηματισμού σωμιτών (→). Αν και εμφανίζει έντονο οίδημα λεκιθικού σάκου (*), το έμβρυο ζεβρόψαρου 48 ωρών στην εικόνα γ) παρουσιάζει σαφή σχηματισμό σωμιτών (→), ενώ το έμβρυο ζεβρόψαρου 96 ωρών στην εικόνα δ) δεν παρουσιάζει σημεία σχηματισμού σωμιτών (→). Επισημαίνεται επίσης το κύρτωμα της σπονδυλικής στήλης (σκολίωση) και το περικαρδιακό οίδημα (*) του εμβρύου που εμφαίνεται στην εικόνα δ).

Εικόνα 3

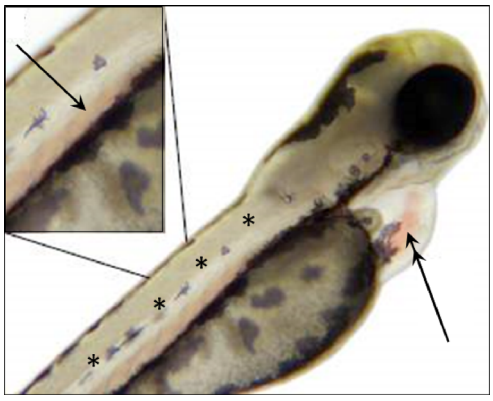
Απουσία απόσπασης της ουραίας καταβολής, πλάγια όψη



(a: →· έμβρυο ζεβρόψαρου 96 ωρών). Επισημαίνεται επίσης η έλλειψη οπτικού κυστιδίου (*).

Εικόνα 4

Απουσία καρδιακού παλμού



Η απουσία καρδιακού παλμού είναι εξ ορισμού δύσκολο να απεικονιστεί σε φωτομικρογραφία. Η απουσία καρδιακού παλμού δηλώνεται με την απουσία σπασμού της καρδιάς (διπλό βέλος). Η ακινησία αιμοκυττάρων, π.χ. στην κοιλιακή αορτή (→ στο ένθετο) δεν είναι δείκτης απουσίας καρδιακού παλμού. Επισημαίνεται επίσης η απουσία σχηματισμού σωμιτών σε αυτό το έμβρυο (*, ομοιογενής και όχι κατατμημένη όψη των μυϊκών ιστών). Ο χρόνος παρατήρησης για την καταγραφή απουσίας καρδιακού παλμού θα πρέπει να είναι τουλάχιστον ένα λεπτό με ελάχιστη μεγέθυνση 80×.

▼M7

Γ. 50 ΔΟΚΙΜΉ ΤΟΞΙΚΌΤΗΤΑς ΣΕ *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* ΜΕ ΣΎΣΤΗΜΑ ΧΩΡΙς ΊΖΗΜΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 238 του ΟΟΣΑ (2014). Έχει σχεδιαστεί με σκοπό την εκτίμηση της τοξικότητας χημικών ουσιών για το *Myriophyllum spicatum*, υφυδατικό υδρόβιο δικοτυλήδονο φυτό της οικογένειας των μυριόφυλλων. Βασίζεται σε υφιστάμενη μέθοδο δοκιμών ASTM (1) που τροποποιήθηκε έτσι ώστε να χρησιμοποιείται ένα σύστημα δοκιμών χωρίς ίζημα (2) για την εκτίμηση της εγγενούς οικοτοξικότητας των υπό δοκιμή χημικών ουσιών (ανεξάρτητα από τη συμπεριφορά κατανομής τους μεταξύ νερού και ιζήματος). Τα συστήματα δοκιμών χωρίς ίζημα παρουσιάζουν χαμηλή αναλυτική πολυπλοκότητα (μόνο στην υδατική φάση) και τα αποτελέσματα μπορούν να αναλυθούν παράλληλα και/ή σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της δοκιμής σε *Lemna sp.* (3)· επιπλέον, οι απαιτούμενες στείρες συνθήκες επιτρέπουν να περιορίζονται οι επιδράσεις μικροοργανισμών και φυκών (πρόσληψη/αποδόμηση της χημικής ουσίας κ.λπ.) σε όσο το δυνατόν χαμηλότερο επίπεδο. Η παρούσα δοκιμή δεν αντικαθιστά άλλες δοκιμές υδατοτοξικότητας· αντίθετα, θα πρέπει να τις συμπληρώνει, ώστε να είναι εφικτή μια πιο ολοκληρωμένη εκτίμηση των κινδύνων και της επικινδυνότητας για τα υδρόβια φυτά. Η μέθοδος δοκιμών έχει επικυρωθεί με διεργαστηριακή δοκιμή τεχνικής ικανότητας (ring test) (4).

2. Περιγράφεται λεπτομερώς η διεξαγωγή της δοκιμής με ανανέωση (ημιστατική μέθοδος) και χωρίς ανανέωση (στατική μέθοδος) του διαλύματος δοκιμής. Ανάλογα με τους στόχους της δοκιμής και τις απαιτήσεις των κανονιστικών ρυθμίσεων, συνιστάται η χρήση ημιστατικής μεθόδου, π.χ. για ουσίες που εξαφανίζονται ταχέως από το διάλυμα λόγω εξάτμισης, προσρόφησης, φωτοαποδόμησης, υδρόλυσης, καθίζησης ή βιοαποδόμησης. Περαιτέρω καθοδήγηση παρέχεται στο έγγραφο (5). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών εφαρμόζεται σε ουσίες για τις οποίες έχει επικυρωθεί [βλ. λεπτομέρειες στην έκθεση διεργαστηριακής δοκιμής (4)] ή σε σκευάσματα ή γνωστά μείγματα· εάν υποβάλλεται σε δοκιμή ένα μείγμα, τα συστατικά του θα πρέπει να ταυτοποιούνται και να προσδιορίζονται ποσοτικά με τη μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια. Η μέθοδος δοκιμών σε *Myriophyllum spicatum* με σύστημα χωρίς ίζημα συμπληρώνει τη δοκιμή τοξικότητας σε *Myriophyllum spicatum* με σύστημα νερού-ιζήματος (6). Πριν από την εφαρμογή της μεθόδου δοκιμών σε μείγμα για ρυθμιστικούς σκοπούς, θα πρέπει να εξετάζεται αν –και, εάν ναι, για ποιον λόγο– αυτή μπορεί να αποδώσει επαρκή αποτελέσματα για τον επιδιωκόμενο σκοπό. Οι εκτιμήσεις αυτές δεν είναι αναγκαίες όταν οι κανονιστικές ρυθμίσεις επιβάλλουν την υποβολή του μείγματος στη δοκιμή.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

3. Συνεχώς αναπτυσσόμενες καλλιέργειες *Myriophyllum spicatum* (μόνο στο τροποποιημένο θρεπτικό μέσο του Andrews, βλ. προσάρτημα 2) αφήνονται να αναπτυχθούν ως μονοκαλλιέργειες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας για περίοδο 14 ημερών σε σύστημα δοκιμής χωρίς ίζημα. Σκοπός της δοκιμής είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός των επιδράσεων της χημικής ουσίας στη βλαστητική αύξηση κατά την ανωτέρω περίοδο, με βάση εκτιμήσεις επιλεγμένων μετρούμενων μεταβλητών. Οι μετρούμενες μεταβλητές είναι η αύξηση του μήκους του βλαστού, η αύξηση των πλευρικών κλάδων και των ριζών, καθώς και η εξέλιξη του νωπού και ξηρού βάρους και η αύξηση των σπονδύλων. Επιπλέον, λαμβάνονται υπόψη χαρακτηριστικές ποιοτικές αλλαγές στους υπό δοκιμή οργανισμούς, όπως η παραμόρφωση ή η χλώρωση και νέκρωση που εκδηλώνονται με κίτρινη ή με λευκή και καστανή χρώση. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιδράσεων της χημικής ουσίας, συγκρίνεται η ανάπτυξη στα διαλύματα δοκιμής με την ανάπτυξη των μαρτύρων και προσδιορίζεται η συγκέντρωση που προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης κατά συγκεκριμένο ποσοστό x %, η οποία εκφράζεται ως EC_x· όπου ο δείκτης x μπορεί να λάβει οποιαδήποτε τιμή, ανάλογα με τις απαιτήσεις των κανονιστικών ρυθμίσεων, π.χ. EC_{10}, EC_{20}, EC_{50}. Επισημαίνεται ότι οι εκτιμήσεις των τιμών EC_{10} και EC_{20} είναι αξιόπιστες και κατάλληλες μόνο σε δοκιμές στις οποίες οι συντελεστές μεταβλητότητας στα φυτά-μάρτυρες είναι χαμηλότεροι από το εκτιμώμενο επίπεδο επίδρασης, δηλ. οι συντελεστές μεταβλητότητας θα πρέπει να είναι < 20 % για να είναι εύρωστη η εκτίμηση της EC_{20}.

4. Θα πρέπει να προσδιορίζονται τόσο ο μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης (που υπολογίζεται από εκτιμήσεις του μήκους του κύριου βλαστού και τρεις επιπλέον μετρούμενες μεταβλητές) όσο και η απόδοση (που υπολογίζεται

▼M7

από την αύξηση του μήκους του κύριου βλαστού και τρεις επιπλέον μετρούμενες μεταβλητές) των φυτών χωρίς μεταχείριση και των φυτών υπό μεταχείριση. Στη συνέχεια ο ειδικός ρυθμός αύξησης (r) και η απόδοση (y) χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των τιμών E_rC_x (π.χ. E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) και E_yC_x (e.g. E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}) αντίστοιχα.

5. Επιπροσθέτως, είναι δυνατόν να προσδιοριστούν στατιστικά η κατώτατη συγκέντρωση στην οποία παρατηρούνται επιπτώσεις (LOEC) και η συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC).

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

6. Θα πρέπει να υπάρχει αναλυτική μέθοδος επαρκούς ευαισθησίας για τον ποσοτικό προσδιορισμό της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο θρεπτικό μέσο δοκιμής. Οι πληροφορίες σχετικά με την υπό δοκιμή χημική ουσία που μπορεί να είναι χρήσιμες για τον καθορισμό των συνθηκών δοκιμής περιλαμβάνουν τον συντακτικό τύπο, την καθαρότητα και τις ξένες προσμείξεις, την υδατοδιαλυτότητα, τη σταθερότητα στο νερό και στο φως, τη σταθερά διάστασης οξέος (pK_a), τον συντελεστή κατανομής σε μείγμα οκτανόλης-νερού (K_{ow}), την τάση ατμών και τη βιοαποδομησιμότητα. Η υδατοδιαλυτότητα και η τάση ατμών μπορούν να χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της σταθεράς του νόμου του Henry, η οποία δείχνει αν είναι πιθανόν να σημειωθούν σημαντικές απώλειες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στη διάρκεια της δοκιμής. Με τον τρόπο αυτό αποφασίζεται ευκολότερα αν θα πρέπει να ληφθούν ιδιαίτερα μέτρα για τον περιορισμό των εν λόγω απωλειών. Σε περίπτωση που οι πληροφορίες για τη διαλυτότητα και τη σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας είναι αβέβαιες, συνιστάται να αξιολογούνται οι ιδιότητες αυτές στις συνθήκες δοκιμής, δηλ. με το θρεπτικό μέσο και στις συνθήκες θερμοκρασίας και φωτισμού που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή.

7. Ο έλεγχος του pH του θρεπτικού μέσου δοκιμής έχει ιδιαίτερη σημασία, π.χ. στις δοκιμές μετάλλων ή ασταθών στην υδρόλυση ουσιών. Περαιτέρω καθοδήγηση για τον έλεγχο χημικών ουσιών που οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες δυσχεραίνουν τη δοκιμή τους παρέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ (5).

ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

8. Για να είναι έγκυρη η δοκιμή, ο χρόνος διπλασιασμού του μήκους του κύριου βλαστού του μάρτυρα πρέπει να είναι μικρότερος από 14 ημέρες. Με τα θρεπτικά μέσα και στις συνθήκες δοκιμής που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, το κριτήριο αυτό μπορεί να ικανοποιηθεί με τη χρήση στατικού ή ημιστατικού συστήματος δοκιμών.

9. Η μέση τιμή του συντελεστή μεταβλητότητας της απόδοσης με βάση μετρήσεις του νωπού βάρους του βλαστού (δηλ. από την έναρξη μέχρι τον τερματισμό της δοκιμής) και των πρόσθετων μετρούμενων μεταβλητών (βλ. παράγραφο 37) στις καλλιέργειες μάρτυρα δεν υπερβαίνει το 35 % μεταξύ των επαναλήψεων.

10. Ποσοστό άνω του 50 % των επαναλήψεων της ομάδας μάρτυρα διατηρείται στείρο κατά τη διάρκεια της 14ήμερης περιόδου έκθεσης, που σημαίνει ότι είναι εμφανώς απαλλαγμένο από μόλυνση από άλλους οργανισμούς, όπως φύκη (άλγες), μύκητες και βακτήρια (διαυγές διάλυμα). *Σημείωση*: Καθοδήγηση σχετικά με το πώς πρέπει να εκτιμάται η στειρότητα παρέχεται στην έκθεση διεργαστηριακής δοκιμής (4).

ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

11. Για να ελεγχθεί η διαδικασία δοκιμής είναι δυνατόν να υποβληθούν σε δοκιμή μία ή περισσότερες χημικές ουσίες αναφοράς, όπως η 3,5-διχλωροφαινόλη που χρησιμοποιήθηκε στη διεργαστηριακή δοκιμή· σύμφωνα με τα δεδομένα της διεργαστηριακής δοκιμής, οι μέσες τιμές EC_{50} της 3,5-διχλωροφαινόλης για τις διάφορες μεταβλητές απόκρισης (βλ. παραγράφους 37-41 της παρούσας μεθόδου δοκιμών) κυμαίνονται μεταξύ 3,2 mg/l και 6,9 mg/l (για λεπτομέρειες σχετικά με το διάστημα εμπιστοσύνης για τις τιμές αυτές, βλ. έκθεση διεργαστηριακής δοκιμής). Είναι σκόπιμο να πραγματοποιείται δοκιμή με μια ουσία αναφοράς τουλάχιστον ανά εξάμηνο ή, εάν εκτελούνται δοκιμές με μικρότερη συχνότητα, παράλληλα με τον προσδιορισμό της τοξικότητας μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

▼M7

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Εργαστηριακός εξοπλισμός

12. Όλα τα στοιχεία του εξοπλισμού που έρχονται σε επαφή με τα θρεπτικά μέσα δοκιμής θα πρέπει να είναι κατασκευασμένα από γυαλί ή άλλο χημικώς αδρανές υλικό. Τα γυάλινα σκεύη που χρησιμοποιούνται για καλλιέργεια και δοκιμές θα πρέπει να καθαρίζονται, ώστε να απομακρύνονται οι ξένες χημικές ουσίες που θα μπορούσαν να αποπλυθούν στο θρεπτικό μέσο δοκιμής, και να είναι στείρα. Τα δοκιμαστικά δοχεία θα πρέπει να έχουν αρκετό μήκος ώστε να αναπτύσσεται ο βλαστός στα δοχεία μάρτυρα στην υδατική φάση, χωρίς να φθάνει στην επιφάνεια του θρεπτικού μέσου δοκιμής στο τέλος της δοκιμής. Συνιστάται η χρήση δοκιμαστικών σωλήνων από βοριοπυριτικό γυαλί με παχύ τοίχωμα, χωρίς χείλος, εσωτερικής διαμέτρου περίπου 20 mm και μήκους περίπου 250 mm, με πώματα αλουμινίου.

13. Δεδομένου ότι το τροποποιημένο θρεπτικό μέσο του Andrews περιέχει σακχαρόζη (η οποία προάγει την ανάπτυξη μυκήτων και βακτηρίων), τα διαλύματα δοκιμής πρέπει να παρασκευάζονται σε στείρες συνθήκες. Όλα τα υγρά καθώς και ο εξοπλισμός αποστειρώνονται πριν από τη χρήση. Η αποστείρωση επιτυγχάνεται με κατεργασία με θερμό αέρα (στους 210 °C) επί 4 ώρες ή σε αυτόκαυστο επί 20 λεπτά στους 121 °C. Επιπλέον, όλες οι φιάλες, τα τρυβλία, τα κύπελλα κ.λπ. και ο λοιπός εξοπλισμός υποβάλλονται σε κατεργασία με φλόγα σε στείρα επιφάνεια εργασίας αμέσως πριν από τη χρήση τους.

14. Οι καλλιέργειες και τα δοκιμαστικά δοχεία δεν θα πρέπει να φυλάσσονται μαζί. Ο καλύτερος τρόπος για να επιτευχθεί αυτό είναι η χρήση χωριστών θαλάμων, επωαστήρων ή αιθουσών ανάπτυξης σε ελεγχόμενο περιβάλλον. Ο φωτισμός και η θερμοκρασία θα πρέπει να μπορούν να ρυθμίζονται και να διατηρούνται σταθερά.

Υπό δοκιμή οργανισμός

15. Το *Myriophyllum spicatum* –υφυδατικό υδρόβιο δικοτυλήδονο φυτό– είναι είδος της οικογένειας των μυριόφυλλων. Μεταξύ Ιουνίου και Αυγούστου, δυσδιάκριτα λευκορόδινα άνθη αναδύονται από την επιφάνεια του νερού. Τα φυτά ριζώνουν στο έδαφος με ένα σύστημα ισχυρών ριζωμάτων και συναντώνται σε ολόκληρο το βόρειο ημισφαίριο σε ευτροφικά, αλλά μη ρυπασμένα και περισσότερο ασβεστοφόρα λιμνάζοντα ύδατα με λασπώδες υπόστρωμα. Το *Myriophyllum spicatum* προτιμά τα γλυκά ύδατα, αλλά συναντάται και σε υφάλμυρα.

16. Για τη δοκιμή τοξικότητας με σύστημα χωρίς ίζημα, απαιτούνται στείρα φυτά. Εάν το εργαστήριο δοκιμών δεν διαθέτει τακτικές καλλιέργειες *Myriophyllum spicatum*, μπορεί να προμηθευτεί στείρο φυτικό υλικό από άλλο εργαστήριο ή (μη στείρο) φυτικό υλικό από τη φύση ή από το εμπόριο· εάν τα φυτά προέρχονται από τη φύση, θα πρέπει να προβλέπεται ταξινομική επαλήθευση του είδους. Εάν τα φυτά λαμβάνονται από τη φύση ή από το εμπόριο, θα πρέπει να αποστειρώνονται (1) και να διατηρούνται σε καλλιέργεια στο ίδιο θρεπτικό μέσο με εκείνο που χρησιμοποιείται στη δοκιμή τουλάχιστον επί οκτώ εβδομάδες πριν από τη χρήση τους. Οι φυσικές τοποθεσίες από τις οποίες συλλέγονται τα φυτά των αρχικών καλλιεργειών πρέπει να είναι απαλλαγμένες από εμφανείς πηγές μόλυνσης. Θα πρέπει να λαμβάνεται ιδιαίτερη μέριμνα κατά τη συλλογή του *Myriophyllum spicatum* από τη φύση ώστε να διασφαλίζεται ότι λαμβάνεται το σωστό είδος, ιδίως σε περιοχές στις οποίες μπορεί να διασταυρωθεί στη φύση με άλλα είδη μυριόφυλλου. Εάν τα φυτά λαμβάνονται από άλλο εργαστήριο, θα πρέπει να διατηρούνται σε ανάλογες συνθήκες για χρονικό διάστημα τουλάχιστον τριών εβδομάδων. Θα πρέπει πάντα να αναφέρονται η πηγή του φυτικού υλικού και το είδος που χρησιμοποιήθηκε στη δοκιμή.

17. Η ποιότητα και η ομοιομορφία των φυτών που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή επηρεάζουν σημαντικά την έκβασή της και, συνεπώς, θα πρέπει να επιλέγονται επιμελώς. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται νεαρά, ταχέως αναπτυσσόμενα φυτά, χωρίς ορατές βλάβες ή αποχρωματισμό (χλώρωση). Λεπτομέρειες σχετικά με την προετοιμασία του υπό δοκιμή οργανισμού παρατίθεται στο προσάρτημα 4.

Καλλιέργεια

18. Για να μειώνεται η συχνότητα συντήρησης των καλλιεργειών (π.χ. όταν δεν προγραμματίζονται δοκιμές σε *Myriophyllum* για κάποιο διάστημα), οι καλλιέργειες μπορούν να διατηρούνται σε ελαττωμένο φωτισμό και θερμοκρασία ($50\ \mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$, 20 ± 2 °C). Λεπτομέρειες σχετικά με την καλλιέργεια παρέχονται στο προσάρτημα 3.

▼M7

19. Τουλάχιστον 14 έως 21 ημέρες πριν από τη δοκιμή, επαρκής ποσότητα υπό δοκιμή οργανισμών μεταφέρεται ασηπτικά σε πρόσφατα παρασκευασμένο στείρο θρεπτικό μέσο και καλλιεργείται επί 14 έως 21 ημέρες υπό στις συνθήκες δοκιμής ως προκαλλιέργεια. Λεπτομέρειες για την παρασκευή προκαλλιέργειας παρέχονται στο προσάρτημα 4.

Θρεπτικό μέσο δοκιμής

20. Συνιστάται η χρησιμοποίηση ενός μόνο θρεπτικού μέσου για το *Myriophyllum spicatum* σε σύστημα δοκιμών χωρίς ίζημα, όπως περιγράφεται στο προσάρτημα 2. Για την καλλιέργεια *Myriophyllum spicatum* και τη διεξαγωγή δοκιμών με το συγκεκριμένο φυτό συνιστάται τροποποίηση του θρεπτικού μέσου του Andrews, όπως περιγράφεται στο έγγραφο (1). Το τροποποιημένο θρεπτικό μέσο του Andrews παρασκευάζεται από πέντε χωριστά διαλύματα παρακαταθήκης θρεπτικών στοιχείων με την προσθήκη 3 % σακχαρόζης. Λεπτομέρειες σχετικά με το θρεπτικό μέσο παρέχονται στο προσάρτημα 2.

21. Απαιτείται τροποποιημένο θρεπτικό μέσο του Andrews δεκαπλάσιας συγκέντρωσης για τη λήψη των διαλυμάτων δοκιμής (με την κατάλληλη αραίωση). Η σύνθεση αυτού του θρεπτικού μέσου παρέχεται στο προσάρτημα 2.

Διαλύματα δοκιμής

22. Τα διαλύματα δοκιμής παρασκευάζονται συνήθως με αραίωση διαλύματος παρακαταθήκης. Τα διαλύματα παρακαταθήκης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας παρασκευάζονται, κατά κανόνα, με διάλυση της χημικής ουσίας σε απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό. Η προσθήκη των θρεπτικών στοιχείων επιτυγχάνεται με τη χρήση του δεκαπλάσιας συγκέντρωσης τροποποιημένου θρεπτικού μέσου του Andrews.

23. Τα διαλύματα παρακαταθήκης της υπό δοκιμής χημικής ουσίας μπορούν να αποστειρωθούν σε αυτόκαυστο στους 121 °C επί 20 λεπτά ή με αποστειρωτική διήθηση, υπό την προϋπόθεση ότι η χρησιμοποιούμενη τεχνική αποστείρωσης δεν μετουσιώνει την υπό δοκιμή χημική ουσία. Τα διαλύματα δοκιμής μπορούν επίσης να παρασκευαστούν σε αποστειρωμένο απιονισμένο νερό ή θρεπτικό μέσο, υπό στείρες συνθήκες. Κατά την επιλογή της διαδικασίας αποστείρωσης των διαλυμάτων παρακαταθήκης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη η θερμική σταθερότητα και η προσρόφηση σε διάφορες επιφάνειες. Για τον λόγο αυτό, συνιστάται να παρασκευάζονται τα διαλύματα παρακαταθήκης σε στείρες συνθήκες, δηλ. με τη χρήση αποστειρωμένων υλικών για τη διάλυση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε στείρες συνθήκες (π.χ. αποστείρωση με φλόγα, απαγωγοί στρωτής ροής κ.λπ.) σε στείρο νερό. Αυτή η τεχνική παρασκευής στείρων διαλυμάτων παρακαταθήκης ισχύει τόσο για τις ουσίες όσο και για τα μείγματα.

24. Η υψηλότερη συγκέντρωση δοκιμής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει κανονικά να μην υπερβαίνει την υδατοδιαλυτότητά της υπό τις συνθήκες της δοκιμής. Σε περίπτωση υπό δοκιμή χημικών ουσιών χαμηλής υδατοδιαλυτότητας, ενδέχεται να είναι απαραίτητο να παρασκευαστεί πυκνό διάλυμα ή διασπορά παρακαταθήκης της χημικής ουσίας με τη βοήθεια οργανικού διαλύτη ή μέσου διασποράς, ώστε να διευκολυνθεί η προσθήκη επακριβών ποσοτήτων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο θρεπτικό μέσο δοκιμής και να υποβοηθηθούν η διασπορά και η διάλυσή της. Θα πρέπει να καταβάλλεται κάθε δυνατή προσπάθεια για την αποφυγή της χρήσης τέτοιων υλικών. Η χρήση βοηθητικών διαλυτών ή μέσων διασποράς δεν θα πρέπει να προκαλεί φυτοτοξικότητα. Παραδείγματα διαλυτών ευρείας χρήσης που δεν προκαλούν φυτοτοξικότητα σε συγκεντρώσεις έως 100 μl/l είναι η ακετόνη και το διμεθυλοφορμαμίδιο. Εάν χρησιμοποιείται διαλύτης ή μέσο διασποράς, η τελική του συγκέντρωση θα πρέπει να αναφέρεται, να διατηρείται στο ελάχιστο επίπεδο (≤ 100 μl/l) και να είναι η ίδια σε κάθε ομάδα μεταχείρισης και μάρτυρα. Περαιτέρω καθοδήγηση για τη χρήση μέσων διασποράς παρέχεται στην παραπομπή (5).

Ομάδες δοκιμής και ομάδες μάρτυρες

25. Η εκ των προτέρων γνώση της τοξικότητας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας για το *Myriophyllum spicatum* από δοκιμή προσδιορισμού περιοχής συγκεντρώσεων διευκολύνει την επιλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων δοκιμής.

▼M7

Στην οριστική δοκιμή τοξικότητας, θα πρέπει κανονικά να χρησιμοποιούνται πέντε (όπως στη δοκιμή αναστολής της ανάπτυξης του είδους *Lemna*, κεφάλαιο Γ.26 του παρόντος παραρτήματος), διατεταγμένες σε γεωμετρική πρόοδο· θα πρέπει να επιλέγονται κατά τρόπον ώστε οι τιμές NOEC και EC_{50} να εμπίπτουν στην περιοχή των συγκεντρώσεων (βλ. κατωτέρω). Κατά προτίμηση, ο λόγος προόδου μεταξύ των συγκεντρώσεων δοκιμής δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 3,2· επιτρέπεται, ωστόσο, η χρήση υψηλότερης τιμής εάν η καμπύλη συγκέντρωσης-απόκρισης είναι επίπεδη. Όταν χρησιμοποιούνται λιγότερες από πέντε συγκεντρώσεις, η επιλογή αυτή θα πρέπει να αιτιολογείται. Σε κάθε συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να διενεργούνται τουλάχιστον πέντε επαναλήψεις.

26. Κατά τον καθορισμό του εύρους των συγκεντρώσεων δοκιμής (για τη δοκιμή προσδιορισμού περιοχής και/ή την οριστική δοκιμή τοξικότητας), θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα εξής:

Για τον προσδιορισμό της EC_x, η τιμή της θα πρέπει να περικλείεται από τις συγκεντρώσεις δοκιμής, ώστε να εξασφαλίζεται το ενδεδειγμένο επίπεδο εμπιστοσύνης. Για παράδειγμα, εάν πρόκειται να εκτιμηθεί η EC_{50}, η υψηλότερη συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να υπερβαίνει την τιμή EC_{50}. Εάν η τιμή EC_{50} βρίσκεται εκτός του εύρους των συγκεντρώσεων δοκιμής, τα σχετικά διαστήματα εμπιστοσύνης θα είναι μεγάλα, με αποτέλεσμα να καθίσταται ενδεχομένως αδύνατη η ορθή αξιολόγηση της στατιστικής προσαρμογής του μοντέλου.

Εάν το ζητούμενο είναι η εκτίμηση των LOEC/NOEC, η χαμηλότερη συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να είναι αρκούντως χαμηλή, ώστε η ανάπτυξη να μην είναι σημαντικά μικρότερη από την ανάπτυξη του μάρτυρα. Επιπλέον, η υψηλότερη συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να είναι αρκούντως υψηλή, ώστε η ανάπτυξη να είναι σημαντικά μικρότερη από την ανάπτυξη του μάρτυρα. Σε αντίθετη περίπτωση, η δοκιμή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται με διαφορετικό εύρος συγκεντρώσεων (εκτός εάν η υψηλότερη συγκέντρωση βρίσκεται στο όριο διαλυτότητας ή το μέγιστο απαιτούμενο όριο συγκέντρωσης, π.χ. 100 mg/l).

27. Κάθε δοκιμή θα πρέπει να περιλαμβάνει μάρτυρες που να αποτελούνται από το ίδιο θρεπτικό μέσο, τον ίδιο υπό δοκιμή οργανισμό (επιλογή όσο το δυνατό περισσότερο ομοιογενούς φυτικού υλικού, νέων πλευρικών κλάδων από προκαλλιέργειες, που κόβονται σε μήκος 2,5 cm από τη βάση) και τις ίδιες συνθήκες περιβάλλοντος και διαδικασίες με εκείνες των δοκιμαστικών δοχείων, αλλά χωρίς την υπό δοκιμή χημική ουσία. Εάν χρησιμοποιείται βοηθητικός διαλύτης ή μέσο διασποράς, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται πρόσθετη μεταχείριση μάρτυρα με τον διαλύτη/το μέσο διασποράς στην ίδια συγκέντρωση με τη χρησιμοποιούμενη στα δοχεία που περιέχουν την υπό δοκιμή χημική ουσία. Θα πρέπει να πραγματοποιούνται τουλάχιστον δέκα επαναλήψεις των δοχείων μαρτύρων (και δοχείων με διαλύτη, κατά περίπτωση).

28. Εάν δεν απαιτείται προσδιορισμός της NOEC, ο σχεδιασμός της δοκιμής είναι δυνατόν να τροποποιηθεί, ώστε να αυξηθεί ο αριθμός των συγκεντρώσεων και να μειωθεί ο αριθμός των επαναλήψεων ανά συγκέντρωση. Ωστόσο, σε κάθε περίπτωση, ο αριθμός επαναλήψεων των μαρτύρων πρέπει να είναι τουλάχιστον δέκα.

Έκθεση

29. Νέοι πλευρικοί κλάδοι από προκαλλιέργειες, που κόβονται σε μήκος 2,5 cm από τη βάση, κατανέμονται τυχαία στα δοκιμαστικά δοχεία σε άσηπτες συνθήκες· κάθε δοκιμαστικό δοχείο θα πρέπει να περιέχει έναν πλευρικό κλάδο μήκους 2,5 cm, ο οποίος θα πρέπει να φέρει κορυφαίο (επάκριο) μερίστωμα στο ένα άκρο. Το επιλεγμένο φυτικό υλικό θα πρέπει να είναι της ίδιας ποιότητας σε όλα τα δοκιμαστικά δοχεία.

30. Απαιτείται τυχαιοποιημένος σχεδιασμός για τη θέση των δοκιμαστικών δοχείων στον επωαστήρα, ώστε να ελαχιστοποιείται η επιρροή των χωρικών διαφορών ως προς τη φωτεινή ένταση ή τη θερμοκρασία. Απαιτείται επίσης σχεδιασμός κατά ομάδες ή τυχαία αναδιάταξη των δοχείων (ή συχνότερη αλλαγή θέσης) κατά τη διεξαγωγή των παρατηρήσεων.

31. Εάν από προκαταρκτική δοκιμή σταθερότητας προκύπτει ότι δεν είναι δυνατόν να διατηρηθεί η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (δηλ. η μετρούμενη συγκέντρωση μειώνεται κάτω του 80 % της μετρηθείσας αρχικής συγκέντρωσης) σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής (14 ημέρες), συνιστάται ημιστατικό σύστημα δοκιμών. Στην περίπτωση αυτή, τα φυτά θα πρέπει να

▼M7

εκτίθενται σε πρόσφατα παρασκευασμένα διαλύματα δοκιμής και μάρτυρα τουλάχιστον μία φορά κατά τη διάρκεια της δοκιμής (π.χ. την 7η ημέρα). Η συχνότητα έκθεσης στο πρόσφατα παρασκευασμένο θρεπτικό μέσο θα εξαρτάται από τη σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας· ενδέχεται να χρειαστεί μεγαλύτερη συχνότητα για τη διατήρηση σχεδόν σταθερών συγκεντρώσεων εξαιρετικά ασταθών ή πτητικών χημικών ουσιών.

32. Το σενάριο έκθεσης μέσω εφαρμογής στο φύλλωμα (ψεκασμός) δεν καλύπτεται από την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

Συνθήκες δοκιμής

33. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται φωτισμός με θερμό και/ή ψυχρό λευκό φως φθορισμού, ώστε να εξασφαλίζεται ροή φωτεινής ακτινοβολίας της τάξεως των 100-150 μE m^{-2} s^{-1} (ισοδύναμη με 6 000-9 000 lux), μετρούμενη ως φωτοσυνθετικά ενεργός ακτινοβολία (μήκος κύματος 400-700 nm), σε σημεία που βρίσκονται στην ίδια απόσταση από τη φωτεινή πηγή, όπως ο πυθμένας των δοκιμαστικών δοχείων, και σε κύκλο φωτός-σκότους 16:8 ωρών. Η μέθοδος ανίχνευσης και μέτρησης του φωτός, ιδίως δε ο τύπος του αισθητήρα, επηρεάζει τη μετρούμενη τιμή. Οι σφαιρικοί αισθητήρες (που αποκρίνονται στο φως το οποίο εκπέμπεται από όλες τις γωνίες επάνω και κάτω από το επίπεδο μέτρησης) και οι αισθητήρες συνημιτόνου (που αποκρίνονται στο φως το οποίο εκπέμπεται από όλες τις γωνίες επάνω από το επίπεδο μέτρησης) προτιμώνται έναντι των αισθητήρων μονής κατεύθυνσης και παρέχουν μεγαλύτερες ενδείξεις για τις πολυσημειακές φωτεινές πηγές του είδους που περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο.

34. Η θερμοκρασία στα δοκιμαστικά δοχεία θα πρέπει να είναι 23 ± 2 °C. Πρέπει να αποδίδεται μεγαλύτερη προσοχή στη μεταβολή του pH σε ειδικές περιπτώσεις, όπως κατά τη δοκιμή ασταθών ουσιών ή μετάλλων· η τιμή pH θα πρέπει να παραμείνει εντός του εύρους 6-9. Περαιτέρω καθοδήγηση παρέχεται στο έγγραφο (5).

Διάρκεια

35. Η δοκιμή τερματίζεται 14 ημέρες μετά τη μεταφορά των φυτών στα δοκιμαστικά δοχεία.

Μετρήσεις και αναλυτικοί προσδιορισμοί

36. Κατά την έναρξη της δοκιμής, το μήκος του κύριου βλαστού του υπό δοκιμή οργανισμού είναι 2,5 cm (βλ. παράγραφο 29)· μετράται με κανόνα (βλ. προσάρτημα 4) ή με φωτογράφιση και ανάλυση εικόνων. Το μήκος του κύριου βλαστού του υπό δοκιμή οργανισμού με φυσιολογική ή ασυνήθη εμφάνιση πρέπει να προσδιορίζεται στην αρχή της δοκιμής, τουλάχιστον μία φορά κατά τη διάρκεια της 14ήμερης περιόδου έκθεσης και κατά τον τερματισμό της δοκιμής. Σημείωση: Ως εναλλακτική δυνατότητα σε περίπτωση αδυναμίας ανάλυσης εικόνων, εάν η επιφάνεια εργασίας αποστειρώνεται πριν από την εισαγωγή των φυτών στα δοκιμαστικά δοχεία, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί στείρος κανόνας για τη μέτρηση του μήκους των κύριων βλαστών κατά την έναρξη της δοκιμής και κατά τη διάρκειά της. Θα πρέπει να σημειώνονται οι αλλαγές στην ανάπτυξη των φυτών, π.χ. παραμόρφωση των βλαστών, εμφάνιση, ενδείξεις νέκρωσης, χλώρωσης, θραύσης ή απώλειας πλευστότητας, καθώς και στο μήκος και στην όψη των ριζών. Θα πρέπει επίσης να σημειώνονται τα σημαντικά χαρακτηριστικά του θρεπτικού μέσου δοκιμής (π.χ. παρουσία αδιάλυτων υλών, ανάπτυξη φυκών, μυκήτων και βακτηρίων στο δοκιμαστικό δοχείο).

37. Εκτός από τον προσδιορισμό του μήκους των κύριων βλαστών κατά τη δοκιμή, θα πρέπει να εκτιμώνται και οι επιδράσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε τρεις (ή περισσότερες) από τις ακόλουθες μετρούμενες μεταβλητές:

i. Συνολικό μήκος πλευρικών κλάδων

ii. Συνολικό μήκος βλαστών

iii. Συνολικό μήκος ριζών

iv. Νωπό βάρος

v. Ξηρό βάρος

vi. Αριθμός σπονδύλων

▼**M7**

Σημείωση 1: Οι παρατηρήσεις κατά τη διάρκεια της δοκιμής προσδιορισμού περιοχής θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην επιλογή κατάλληλων πρόσθετων μετρήσεων μεταξύ των έξι μεταβλητών που απαριθμούνται ανωτέρω.

Σημείωση 2: Είναι ιδιαίτερα σκόπιμος ο προσδιορισμός του νωπού και του ξηρού βάρους (παράμετροι iv και v).

Σημείωση 3: Επειδή η σακχαρόζη και το φως (έκθεση των ριζών στο φως κατά τη διάρκεια της δοκιμής) μπορεί να επηρεάσουν τους φορείς μεταφοράς της αυξίνης (αυξητική ορμόνη των φυτών) και ορισμένες χημικές ουσίες μπορεί να έχουν παρόμοιο τρόπο δράσης με αυτόν της αυξίνης, η συνεκτίμηση τελικών σημείων που σχετίζονται με τις ρίζες (παράμετρος iii) είναι αμφισβητήσιμη.

Σημείωση 4: Τα αποτελέσματα της διεργαστηριακής δοκιμής δείχνουν υψηλούς συντελεστές μεταβλητότητας (> 60 %) για το συνολικό μήκος πλευρικών κλάδων (παράμετρος i). Το συνολικό μήκος των πλευρικών κλάδων περιλαμβάνεται σε κάθε περίπτωση στη μέτρηση του συνολικού μήκους των βλαστών (παράμετρος ii), που παρουσιάζει περισσότερο αποδεκτούς συντελεστές μεταβλητότητας (< 30 %).

Σημείωση 5: Βάσει των ανωτέρω στοιχείων, τα συνιστώμενα κύρια μετρούμενα τελικά σημεία είναι: το συνολικό μήκος βλαστών, το νωπό βάρος και το ξηρό βάρος (παράμετροι ii, iv και v)· η παράμετρος vi –αριθμός σπονδύλων– επαφίεται στην κρίση του πειραματιζόμενου.

38. Το μήκος του κύριου βλαστού και ο αριθμός σπονδύλων έχουν το πλεονέκτημα ότι μπορούν να προσδιοριστούν για κάθε δοκιμαστικό δοχείο και δοχείο μάρτυρα στην αρχή, κατά τη διάρκεια και στο τέλος της δοκιμής με φωτογράφιση και ανάλυση εικόνων, αν και μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί (στείρος) κανόνας.

39. Το συνολικό μήκος πλευρικών κλάδων, το συνολικό μήκος ριζών (ως άθροισμα όλων των πλευρικών κλάδων ή των ριζών) και το συνολικό μήκος βλαστών (ως άθροισμα του μήκους του κύριου βλαστού και του συνολικού μήκους των πλευρικών κλάδων) μπορούν να μετρηθούν με κανόνα στο τέλος της έκθεσης.

40. Το νωπό και/ή το ξηρό βάρος θα πρέπει να προσδιορίζονται στην αρχή της δοκιμής, σε δείγμα της προκαλλιέργειας αντιπροσωπευτικό του υλικού που χρησιμοποιείται για την έναρξη της δοκιμής, καθώς και στο τέλος της στο φυτικό υλικό κάθε δοκιμαστικού δοχείου και δοχείου μάρτυρα.

41. Το συνολικό μήκος πλευρικών στελεχών, το συνολικό μήκος βλαστών, το συνολικό μήκος ριζών, το νωπό βάρος, το ξηρό βάρος και ο αριθμός σπονδύλων μπορούν να προσδιοριστούν ως εξής:

i. Συνολικό μήκος πλευρικών κλάδων: Το μήκος των πλευρικών κλάδων μπορεί να προσδιοριστεί με μέτρηση όλων των πλευρικών κλάδων με κανόνα στο τέλος της έκθεσης. Το συνολικό μήκος πλευρικών κλάδων είναι το άθροισμα όλων των πλευρικών κλάδων κάθε δοκιμαστικού δοχείου και δοχείου μάρτυρα.

ii. Συνολικό μήκος βλαστών: Το μήκος του κύριου βλαστού μπορεί να προσδιοριστεί με ανάλυση εικόνων ή με τη χρήση κανόνα. Το συνολικό μήκος βλαστών είναι το άθροισμα του συνολικού μήκους των πλευρικών κλάδων και του μήκους του κύριου βλαστού κάθε δοκιμαστικού δοχείου και δοχείου μάρτυρα στο τέλος της έκθεσης.

iii. Συνολικό μήκος ριζών: Το μήκος των ριζών μπορεί να προσδιοριστεί με μέτρηση όλων των ριζών με κανόνα στο τέλος της έκθεσης. Το συνολικό μήκος ριζών είναι το άθροισμα όλων των ριζών κάθε δοκιμαστικού δοχείου και δοχείου μάρτυρα.

iv. Νωπό βάρος: Το νωπό βάρος μπορεί να προσδιοριστεί με ζύγιση των υπό δοκιμή οργανισμών στο τέλος της έκθεσης. Το σύνολο του φυτικού

▼M7

υλικού κάθε δοκιμαστικού δοχείου και δοχείου μάρτυρα εκπλένεται με απεσταγμένο νερό και στεγνώνεται με χαρτί από κυτταρίνη. Μετά την προετοιμασία αυτή, προσδιορίζεται το νωπό βάρος με ζύγιση. Η αρχική βιομάζα (νωπό βάρος) προσδιορίζεται σε δείγμα των υπό δοκιμή οργανισμών που λαμβάνεται από την παρτίδα που χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό των δοκιμαστικών δοχείων.

v. Ξηρό βάρος: Μετά τις προπαρασκευαστικές εργασίες για τον προσδιορισμό του νωπού βάρους, οι υπό δοκιμή οργανισμοί ξηραίνονται στους 60 °C μέχρι σταθερού βάρους. Η μάζα αυτή είναι το ξηρό βάρος. Η αρχική βιομάζα (ξηρό βάρος) προσδιορίζεται σε δείγμα των υπό δοκιμή οργανισμών που λαμβάνεται από την παρτίδα που χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό των δοκιμαστικών δοχείων.

vi. Αριθμός σπονδύλων: Μετρώνται όλοι οι σπόνδυλοι κατά μήκος του κύριου βλαστού.

Συχνότητα των μετρήσεων και των αναλυτικών προσδιορισμών

42. Εάν εφαρμόζεται σχεδιασμός στατικής δοκιμής, θα πρέπει να μετράται το pH κάθε μεταχείρισης στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής. Εάν εφαρμόζεται σχεδιασμός ημιστατικής δοκιμής, το pH θα πρέπει να μετράται σε κάθε παρτίδα «πρόσφατου» διαλύματος δοκιμής, πριν από κάθε ανανέωση, καθώς και στα αντίστοιχα «αναλωμένα» διαλύματα.

43. Η ένταση του φωτός θα πρέπει να μετράται στον θάλαμο, τον επωαστήρα ή την αίθουσα ανάπτυξης, σε σημεία που βρίσκονται στην ίδια απόσταση από τη φωτεινή πηγή και τους υπό δοκιμή οργανισμούς. Οι μετρήσεις θα πρέπει να εκτελούνται τουλάχιστον μία φορά στη διάρκεια της δοκιμής. Θα πρέπει να καταγράφεται, τουλάχιστον ημερησίως (ή αδιαλείπτως με καταγραφέα δεδομένων), η θερμοκρασία του θρεπτικού μέσου σε υποκατάστατο δοχείο, το οποίο διατηρείται υπό τις ίδιες συνθήκες στον θάλαμο, τον επωαστήρα ή την αίθουσα ανάπτυξης.

44. Στη διάρκεια της δοκιμής, οι συγκεντρώσεις των υπό δοκιμή χημικών ουσιών προσδιορίζονται σε κατάλληλα διαστήματα. Η ελάχιστη απαίτηση για τις στατικές δοκιμές είναι ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής.

45. Στις ημιστατικές δοκιμές στις οποίες οι συγκεντρώσεις των υπό δοκιμή χημικών ουσιών δεν αναμένεται να παραμείνουν εντός των ορίων της ονομαστικής συγκέντρωσης ± 20 %, είναι αναγκαίο να υποβάλλονται σε ανάλυση όλα τα προσφάτως παρασκευασμένα διαλύματα δοκιμής, καθώς και τα ίδια διαλύματα σε κάθε ανανέωση. Ωστόσο, στην περίπτωση των δοκιμών κατά τις οποίες οι μετρηθείσες αρχικές συγκεντρώσεις των υπό δοκιμή χημικών ουσιών δεν είναι εντός των ορίων της ονομαστικής συγκέντρωσης ± 20 % αλλά μπορούν να προσκομιστούν επαρκή στοιχεία που αποδεικνύουν ότι οι αρχικές συγκεντρώσεις είναι επαναλήψιμες και σταθερές (δηλ. εντός του εύρους του 80 - 120 % της αρχικής συγκέντρωσης), μπορεί να γίνει προσδιορισμός της χημικής ουσίας μόνο για την υψηλότερη και τη χαμηλότερη συγκέντρωση δοκιμής. Σε κάθε περίπτωση, οι συγκεντρώσεις δοκιμής πριν από την ανανέωση αρκεί να προσδιορίζονται μόνο σε ένα από τα δοχεία επανάληψης για κάθε συγκέντρωση δοκιμής (ή στο αναμεμειγμένο περιεχόμενο όλων των δοχείων κάθε επανάληψης).

46. Εάν υπάρχουν στοιχεία που αποδεικνύουν ότι οι συγκεντρώσεις δοκιμής έχουν διατηρηθεί ικανοποιητικά εντός των ορίων της ονομαστικής ή μετρηθείσας αρχικής συγκέντρωσης ± 20 % σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής, η ανάλυση των αποτελεσμάτων μπορεί να βασίζεται στις ονομαστικές ή τις μετρηθείσες αρχικές τιμές. Εάν η απόκλιση από την ονομαστική ή τη μετρηθείσα αρχική συγκέντρωση δεν βρίσκεται εντός του ± 20 %, σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής, η ανάλυση των αποτελεσμάτων μπορεί να βασίζεται στις ονομαστικές ή τις μετρηθείσες αρχικές τιμές (5).

Οριακή δοκιμή

47. Σε ορισμένες περιπτώσεις, π.χ. όταν από προκαταρκτική δοκιμή προκύπτει ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν έχει τοξικές επιδράσεις σε συγκεντρώσεις έως 100 mg/l ή έως το όριο διαλυτότητάς της στο θρεπτικό μέσο δοκιμής ή, σε περίπτωση σκευάσματος, έως το όριο διασπαρσιμότητάς του, είναι δυνατόν να διεξαχθεί οριακή δοκιμή, η οποία συνίσταται σε

▼M7

σύγκριση των αποκρίσεων μιας ομάδας μάρτυρα και μιας ομάδας μεταχείρισης (συγκέντρωση ίση με 100 mg/l ή με το όριο διαλυτότητας). Συνιστάται ένθερμα να τεκμηριώνεται αυτό με ανάλυση της συγκέντρωσης έκθεσης. Η οριακή δοκιμή υπόκειται σε όλες τις συνθήκες δοκιμής και όλα τα κριτήρια εγκυρότητας που περιγράφονται ανωτέρω, με εξαίρεση τον αριθμό των επαναλήψεων μεταχείρισης, ο οποίος θα πρέπει να είναι διπλάσιος. Η αύξηση των φυτών στην ομάδα μάρτυρα και στην ομάδα μεταχείρισης είναι δυνατόν να υποβληθεί σε ανάλυση με στατιστικό έλεγχο σύγκρισης μέσων τιμών, π.χ. έλεγχος t του Student.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Μεταβλητές απόκρισης

48. Η δοκιμή αποσκοπεί στον προσδιορισμό των επιδράσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στη βλαστητική αύξηση του *Myriophyllum spicatum*. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών περιγράφονται δύο μεταβλητές απόκρισης.

α) Μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης: Αυτή η μεταβλητή απόκρισης υπολογίζεται με βάση τις μεταβολές των λογαρίθμων του μήκους του κύριου βλαστού και, επιπλέον, τις μεταβολές των λογαρίθμων άλλων μετρούμενων παραμέτρων, δηλ. του συνολικού μήκους βλαστών, του νωπού βάρους, του ξηρού βάρους ή του αριθμού των σπονδύλων με την πάροδο του χρόνου (εκφραζόμενες ανά ημέρα) στους μάρτυρες και σε κάθε ομάδα μεταχείρισης. Σημείωση: Για δύο μετρούμενες παραμέτρους, το συνολικό μήκος πλευρικών κλάδων και το συνολικό μήκος ριζών, δεν είναι δυνατό να υπολογιστεί ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης. Κατά την έναρξη της δοκιμής, ο υπό δοκιμή οργανισμός δεν έχει πλευρικούς κλάδους ούτε ρίζες (με βάση την παρασκευή από την προκαλλιέργεια)· ο υπολογισμός του μέσου ειδικού ρυθμού αύξησης δεν ορίζεται για μηδενική αρχική τιμή.

β) Απόδοση: Αυτή η μεταβλητή απόκρισης υπολογίζεται με βάση τις μεταβολές του μήκους του κύριου βλαστού και, επιπλέον, τις μεταβολές άλλων μετρούμενων παραμέτρων –κατά προτίμηση το συνολικό μήκος βλαστών, το νωπό βάρος, το ξηρό βάρος ή τον αριθμό σπονδύλων και άλλες παραμέτρους, εάν κριθεί χρήσιμο– στους μάρτυρες και σε κάθε ομάδα μεταχείρισης μέχρι το τέλος της δοκιμής.

49. Οι εκτιμήσεις της τοξικότητας θα πρέπει να βασίζονται στο μήκος του κύριου βλαστού και σε τρεις επιπλέον μετρούμενες μεταβλητές (δηλ. κατά προτίμηση στο συνολικό μήκος βλαστών, το νωπό βάρος, το ξηρό βάρος ή τον αριθμό σπονδύλων, βλ. παράγραφο 37 και τις σημειώσεις 2, 4 και 5 της εν λόγω παραγράφου), διότι ορισμένες χημικές ουσίες μπορεί να έχουν πολύ μεγαλύτερη επίδραση σε άλλες μετρούμενες μεταβλητές απ' ό,τι στο μήκος του κύριου βλαστού. Η επίδραση αυτή δεν ανιχνεύεται μόνο με τον υπολογισμό του μήκους του κύριου βλαστού.

Μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης

50. Ο μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης για συγκεκριμένη χρονική περίοδο υπολογίζεται ως η λογαριθμική αύξηση των μεταβλητών ανάπτυξης –μήκος του κύριου βλαστού και τρεις επιπλέον μετρούμενες μεταβλητές (δηλ. συνολικό μήκος βλαστών, νωπό βάρος, ξηρό βάρος ή αριθμός σπονδύλων)– με τη χρήση του ακόλουθου τύπου για κάθε επανάληψη μαρτύρων και μεταχείρισης:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

όπου:

μ_{i-j}: ο μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης κατά το χρονικό διάστημα i έως j,

N_i: η μετρούμενη μεταβλητή στο δοχείο δοκιμής ή μάρτυρα κατά τη χρονική στιγμή i,

N_j: η μετρούμενη μεταβλητή στο δοχείο δοκιμής ή μάρτυρα κατά τη χρονική στιγμή j,

t: το χρονικό διάστημα i έως j.

▼M7

Για κάθε ομάδα μεταχείρισης και ομάδα μάρτυρα υπολογίζεται η μέση τιμή του ρυθμού αύξησης, συνοδευόμενη από εκτίμηση της διασποράς.

51. Ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης θα πρέπει να υπολογίζεται για τη συνολική διάρκεια της δοκιμής (η χρονική στιγμή «i» στον ανωτέρω τύπο είναι η αρχή της δοκιμής και η χρονική στιγμή «j» το τέλος της). Για κάθε συγκέντρωση δοκιμής και κάθε μάρτυρα, υπολογίζεται η μέση τιμή του μέσου ειδικού ρυθμού αύξησης, συνοδευόμενη από εκτίμηση της διασποράς. Επιπλέον, θα πρέπει να υπολογίζεται ο τμηματικός ρυθμός αύξησης με σκοπό την αξιολόγηση των επιδράσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στη διάρκεια της περιόδου έκθεσης (π.χ. με εξέταση των λογαριθμικά μετασχηματισμένων καμπυλών αύξησης).

52. Στη συνέχεια, είναι δυνατόν να υπολογιστεί η εκατοστιαία αναστολή του ρυθμού αύξησης (I_r) για κάθε συγκέντρωση δοκιμής (ομάδα μεταχείρισης) από τον ακόλουθο τύπο:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

όπου:

% Ir: η εκατοστιαία αναστολή του μέσου ειδικού ρυθμού αύξησης

μC: η μέση τιμή του μ στον μάρτυρα

μT: η μέση τιμή του μ στην ομάδα μεταχείρισης.

Απόδοση

53. Οι επιδράσεις στην απόδοση προσδιορίζονται με βάση τη μετρούμενη μεταβλητή μήκος του κύριου βλαστού και τρεις επιπλέον μετρούμενες μεταβλητές (δηλ., κατά προτίμηση, το συνολικό μήκος των βλαστών, το νωπό βάρος, το ξηρό βάρος ή τον αριθμό σπονδύλων) των οποίων η παρουσία διαπιστώνεται σε κάθε δοκιμαστικό δοχείο στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής. Στην περίπτωση του νωπού ή του ξηρού βάρους, η αρχική βιομάζα προσδιορίζεται σε δείγμα των υπό δοκιμή οργανισμών που λαμβάνεται από την παρτίδα που χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό των δοκιμαστικών δοχείων. Για κάθε συγκέντρωση δοκιμής και κάθε μάρτυρα υπολογίζεται η μέση τιμή της απόδοσης, συνοδευόμενη από εκτίμηση της διασποράς. Η μέση εκατοστιαία αναστολή της απόδοσης (% I_y) μπορεί να υπολογιστεί για κάθε ομάδα μεταχείρισης με τον ακόλουθο τύπο:

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c}$$

όπου:

% Iy: η εκατοστιαία μείωση της απόδοσης

bC: η τελική βιομάζα μείον την αρχική βιομάζα στην ομάδα μάρτυρα

bT: η τελική βιομάζα μείον την αρχική βιομάζα στην ομάδα μεταχείρισης.

Χρόνος διπλασιασμού

54. Για τον προσδιορισμό του χρόνου διπλασιασμού (T_d) του μήκους του κύριου βλαστού και την τήρηση αυτού του κριτηρίου εγκυρότητας (βλ. παράγραφο 8), εφαρμόζεται ο ακόλουθος τύπος στα δεδομένα που προκύπτουν από τα δοχεία μάρτυρα:

$T_d = \ln 2/\mu$

όπου μ είναι ο μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης, ο οποίος προσδιορίζεται όπως περιγράφεται στις παραγράφους 50-52.

▼M7

Χάραξη των καμπυλών συγκέντρωσης-απόκρισης

55. Θα πρέπει να χαράσσονται καμπύλες συγκέντρωσης-απόκρισης που να συνδέουν τη μέση εκατοστιαία αναστολή της μεταβλητής της απόκρισης (I_r, ή I_y, υπολογιζόμενη όπως υποδεικνύεται στην παράγραφο 53) με τον λογάριθμο της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Εκτίμηση της EC_x

56. Οι εκτιμήσεις της EC_x θα πρέπει να βασίζονται τόσο στον μέσο ειδικό ρυθμό αύξησης (E_rC_x) όσο και στην απόδοση (E_yC_x), ενώ καθεμία από τις τιμές αυτές θα πρέπει με τη σειρά της να βασίζεται στο μήκος του κύριου βλαστού και, ενδεχομένως, σε επιπλέον μετρούμενες μεταβλητές (δηλ., κατά προτίμηση, συνολικό μήκος βλαστών, νωπό βάρος, ξηρό βάρος ή αριθμός σπονδύλων). Αυτό οφείλεται στο ότι υπάρχουν χημικές ουσίες που επιδρούν διαφορετικά στο μήκος του κύριου βλαστού και σε άλλες μετρούμενες μεταβλητές. Επομένως, οι επιθυμητές παράμετροι τοξικότητας είναι τέσσερις τιμές EC_x για κάθε βαθμό αναστολής x που έχει υπολογιστεί: E_rC_x (μήκος του κύριου βλαστού)· E_rC_x (δηλ., κατά προτίμηση, συνολικό μήκος βλαστών, νωπό βάρος, ξηρό βάρος ή αριθμός σπονδύλων)· E_yC_x (μήκος του κύριου βλαστού)· και E_yC_x (δηλ., κατά προτίμηση, συνολικό μήκος βλαστών, νωπό βάρος, ξηρό βάρος ή αριθμός σπονδύλων).

57. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι τιμές EC_x που υπολογίζονται με τη χρήση των ανωτέρω δύο μεταβλητών απόκρισης δεν είναι συγκρίσιμες και η διαφορά αυτή αναγνωρίζεται όταν χρησιμοποιούνται τα αποτελέσματα της δοκιμής. Οι τιμές EC_x που βασίζονται στον μέσο ειδικό ρυθμό αύξησης (E_rC_x) είναι στις περισσότερες περιπτώσεις υψηλότερες από τα αποτελέσματα που βασίζονται στην απόδοση (E_yC_x), εφόσον τηρούνται οι συνθήκες της παρούσας μεθόδου δοκιμών, λόγω της μαθηματικής βάσης των αντίστοιχων προσεγγίσεων. Αυτή η διαφορά δεν θα πρέπει να ερμηνεύεται ως διαφορά ευαισθησίας μεταξύ των δύο μεταβλητών απόκρισης· πρόκειται απλώς για μαθηματική διαφορά τιμών.

Στατιστικές διαδικασίες

58. Το ζητούμενο είναι να ληφθεί ποσοτική σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης με ανάλυση παλινδρόμησης. Είναι δυνατόν να εφαρμοστεί σταθμισμένη γραμμική παλινδρόμηση, μετά από γραμμικό μετασχηματισμό των δεδομένων απόκρισης, π.χ. σε μοντέλα probit ή logit ή Weibull (7), αλλά προτιμώνται οι τεχνικές μη γραμμικής παλινδρόμησης, με τις οποίες αντιμετωπίζονται καλύτερα οι αναπόφευκτες ανωμαλίες των δεδομένων και οι αποκλίσεις τους από τις ομαλές κατανομές. Κοντά στις περιοχές είτε της μηδενικής είτε της πλήρους αναστολής, οι ανωμαλίες αυτές ενδέχεται να μεγεθυνθούν από τον μετασχηματισμό και να αλλοιώσουν την ανάλυση (7). Σημειωτέον ότι οι συνήθεις μέθοδοι ανάλυσης με χρήση αποτελεσμάτων μετασχηματισμού probit, logit ή Weibull προορίζονται για δεδομένα που δέχονται μόνο δύο τιμές (π.χ. θνησιμότητα ή επιβίωση) και θα πρέπει να τροποποιούνται για να καλύψουν δεδομένα ρυθμού αύξησης ή δεδομένα απόδοσης. Ειδικές διαδικασίες για τον προσδιορισμό των τιμών EC_x από συνεχή δεδομένα παρατίθενται στα έγγραφα (8) (9) (10).

59. Για κάθε μεταβλητή απόκρισης που πρόκειται να αναλυθεί, χρησιμοποιείται η σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης για να υπολογιστούν σημειακές εκτιμήσεις των τιμών EC_x. Όπου είναι δυνατόν, θα πρέπει να προσδιορίζονται, για κάθε εκτίμηση, τα όρια εμπιστοσύνης 95 %. Η ποιότητα προσαρμογής των δεδομένων απόκρισης στο μοντέλο παλινδρόμησης θα πρέπει να αξιολογείται με γραφική ή στατιστική μέθοδο. Η ανάλυση παλινδρόμησης θα πρέπει να εκτελείται με τη χρήση των αποκρίσεων της κάθε επανάληψης και όχι των μέσων όρων των ομάδων μεταχείρισης.

60. Εάν τα διαθέσιμα μοντέλα/μέθοδοι παλινδρόμησης είναι ακατάλληλα για τα δεδομένα, μπορούν επίσης να λαμβάνονται εκτιμήσεις και όρια εμπιστοσύνης για την EC_{50} με γραμμική παρεμβολή με τη μέθοδο bootstrap (10).

61. Για την εκτίμηση της LOEC και, κατ' επέκταση, της NOEC, είναι αναγκαία η σύγκριση των μέσων όρων των ομάδων μεταχείρισης με την εφαρμογή τεχνικών ανάλυσης της διασποράς (ANOVA). Στη συνέχεια, ο μέσος όρος για κάθε συγκέντρωση συγκρίνεται με τον μέσο όρο του μάρτυρα με κατάλληλη μέθοδο πολλαπλής σύγκρισης ή ελέγχου τάσης. Μπορεί να είναι χρήσιμος ο έλεγχος Dunnett ή Williams (12) (13) (14) (15) (16). Είναι απαραίτητο να κρίνεται αν ευσταθεί η παραδοχή της ANOVA για ομοιογενή διασπορά. Η κρίση αυτή μπορεί να βασιστεί σε γραφική μέθοδο ή επίσημη δοκιμασία (15). Κατάλληλοι είναι οι έλεγχοι του Levene ή του Bartlett.

▼M7

Εάν δεν ισχύει η παραδοχή της ομοιογενούς διασποράς, αυτό είναι μερικές φορές δυνατόν να διορθωθεί με λογαριθμικό μετασχηματισμό των δεδομένων. Στις περιπτώσεις ακραίας ετερογένειας της διασποράς η οποία δεν είναι δυνατόν να διορθωθεί με μετασχηματισμό, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο ανάλυσης με μεθόδους όπως οι έλεγχοι τάσης κατά Jonckheere με αποκλιμάκωση. Πρόσθετη καθοδήγηση για τον προσδιορισμό της NOEC παρέχεται στο έγγραφο (10).

62. Οι πρόσφατες επιστημονικές εξελίξεις οδήγησαν στη σύσταση να εγκαταλειφθεί η έννοια της NOEC και να αντικατασταθεί από σημειακές εκτιμήσεις των τιμών EC_x βάσει παλινδρόμησης. Δεν έχει καθοριστεί κατάλληλη τιμή του x για την παρούσα δοκιμή σε *Myriophyllum*. Ωστόσο, κρίνεται κατάλληλο ένα εύρος 10 % έως 20 % (ανάλογα με την επιλεγμένη μεταβλητή απόκρισης) και, κατά προτίμηση, θα πρέπει να αναφέρονται τόσο οι τιμές EC_{10} όσο και EC_{20}.

Αναφορά αποτελεσμάτων

63. Η έκθεση δοκιμής περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία

Μονοσυστατική ουσία:

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες·

— στοιχεία ταυτοποίησης της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμίξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ. (περιλαμβανομένης της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα, κατά περίπτωση).

Πολυσυστατική ουσία, UVCB ή μείγμα:

— περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Υπό δοκιμή είδος

— Επιστημονική ονομασία και πηγή.

Συνθήκες δοκιμής

— Εφαρμοζόμενη διαδικασία δοκιμής (στατική ή ημιστατική).

— Ημερομηνία έναρξης και διάρκεια της δοκιμής.

— Θρεπτικό μέσο δοκιμής.

— Περιγραφή του πειραματικού σχεδιασμού: δοκιμαστικά δοχεία και καλύμματα, όγκοι διαλυμάτων, μήκος του κύριου βλαστού ανά δοκιμαστικό δοχείο κατά την έναρξη της δοκιμής.

— Συγκεντρώσεις δοκιμής (ονομαστικές και μετρηθείσες, κατά περίπτωση) και αριθμός επαναλήψεων ανά συγκέντρωση.

— Μέθοδοι παρασκευής των διαλυμάτων παρακαταθήκης και των διαλυμάτων δοκιμής, συμπεριλαμβανομένης τυχόν χρήσης διαλυτών ή μέσων διασποράς.

— Θερμοκρασία κατά τη δοκιμή.

— Φωτεινή πηγή, ένταση και ομοιογένεια του φωτός.

— Τιμές pH των θρεπτικών μέσων δοκιμής και μαρτύρων.

— Μέθοδος ανάλυσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας με τα κατάλληλα δεδομένα αξιολόγησης της ποιότητας (μελέτες επικύρωσης, τυπικές αποκλίσεις ή όρια εμπιστοσύνης των αναλύσεων)·

▼M7

— Μέθοδοι για τον προσδιορισμό του μήκους του κύριου βλαστού και άλλων μετρούμενων μεταβλητών, όπως συνολικό μήκος πλευρικών κλάδων, συνολικό μήκος βλαστών, συνολικό μήκος ριζών, νωπό βάρος, ξηρό βάρος ή αριθμός σπονδύλων.

— Κατάσταση της καλλιέργειας (στείρα ή μη) κάθε δοκιμαστικού δοχείου και δοχείου μάρτυρα σε κάθε παρατήρηση.

— Όλες οι παρεκκλίσεις από την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

Αποτελέσματα

— Ανεπεξέργαστα δεδομένα: μήκος του κύριου βλαστού και άλλες μετρούμενες μεταβλητές για κάθε δοκιμαστικό δοχείο και δοχείο μάρτυρα σε κάθε παρατήρηση και χρόνο ανάλυσης.

— Μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις για κάθε μετρούμενη μεταβλητή.

— Καμπύλες αύξησης για κάθε μετρούμενη μεταβλητή.

— Υπολογισθείσες μεταβλητές απόκρισης για κάθε επανάληψη μεταχείρισης, με τις μέσες τιμές και τον συντελεστή μεταβλητότητας για τις επαναλήψεις·

— Γραφική παράσταση της σχέσης συγκέντρωσης-επίδρασης

— Εκτιμήσεις τοξικών τελικών σημείων για τις μεταβλητές απόκρισης, π.χ. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, και αντίστοιχα διαστήματα εμπιστοσύνης. Τιμές LOEC και/ή NOEC, εάν έχουν υπολογιστεί, και στατιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό τους.

— Εάν έχει χρησιμοποιηθεί τεχνική ANOVA, το ανιχνεύσιμο μέγεθος της επίδρασης (π.χ. η ελάχιστη σημαντική διαφορά).

— Διέγερση της ανάπτυξης που ενδεχομένως διαπιστώθηκε σε οποιοδήποτε δοχείο μεταχείρισης.

— Τυχόν ορατά σημεία φυτοτοξικότητας, καθώς και παρατηρήσεις των διαλυμάτων δοκιμής.

— Συζήτηση των αποτελεσμάτων, συμπεριλαμβανομένης της επίδρασης τυχόν παρεκκλίσεων από την παρούσα μέθοδο δοκιμών στην έκβαση της δοκιμής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) ASTM Designation E 1913-04, Standard Guide for Conducting Static, Axenic, 14-Day Phytotoxicity Tests in Test Tubes with the Submersed Aquatic Macrophyte, *Myriophyllum sibiricum* Komarov.

(2) Maletzki, D. *et al*. (2010), *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol, *Umweltwiss Schadst Forsch,* No. 22, pp. 702–710.

(3) Κεφάλαιο Γ.26 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμή αναστολής της ανάπτυξης του είδους *Lemna* sp..

(4) OECD (2014), «*Myriophyllum spicatum* Toxicity Test: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series Testing and Assessment, No. 205, OECD Publishing, Paris.

(5) OECD (2000), «Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.

(6) Κεφάλαιο Γ.51 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμασία τοξικότητας σε *Myriophyllum spicatum* με σύστημα νερού-ιζήματος

▼**M7**

(7) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science & Technology*, Vol. 18/9, 713-718.

(8) Nyholm, N. *et al*. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chem*istry, Vol. 11/2, pp. 157-167.

(9) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/10, pp. 1485-1494.

(10) OECD (2006), «Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.

(11) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88, US EPA, Duluth, MN.

(12) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.

(13) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, Vol. 20/3, pp. 482-491.

(14) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 27/1, pp. 103-117.

(15) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 28/2, pp. 519-531.

(16) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, Vol. 29/2, pp. 93-96.

▼M7

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Απόδοση: τιμή μετρούμενης μεταβλητής που εκφράζει τη βιομάζα στο τέλος της περιόδου έκθεσης μείον την τιμή της ίδιας μεταβλητής στην αρχή της περιόδου έκθεσης. Σημείωση: Όταν ο τύπος ανάπτυξης των οργανισμών που δεν έχουν εκτεθεί είναι εκθετικός, οι μεταβλητές απόκρισης που βασίζονται στην απόδοση μειώνονται όσο αυξάνεται η διάρκεια της δοκιμής.

Αύξηση: αύξηση της μετρούμενης μεταβλητής, π.χ. μήκος του κύριου βλαστού, συνολικό μήκος πλευρικών κλάδων, συνολικό μήκος βλαστών, συνολικό μήκος ριζών, νωπό βάρος, ξηρό βάρος ή αριθμός σπονδύλων, κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

Βιομάζα: το νωπό και/ή ξηρό βάρος της ζώσας ύλης την οποία περιέχει ένας πληθυσμός. Στην παρούσα δοκιμή η βιομάζα είναι το άθροισμα του κύριου βλαστού, όλων των πλευρικών κλάδων και όλων των ριζών.

Ημιστατική δοκιμή (με ανανέωση): δοκιμή στη διάρκεια της οποίας το διάλυμα δοκιμής αντικαθίσταται περιοδικά σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα.

Θρεπτικό μέσο δοκιμής: το πλήρες συνθετικό θρεπτικό μέσο, στο οποίο αναπτύσσονται τα υπό δοκιμή φυτά όταν εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία. Η υπό δοκιμή χημική ουσία διαλύεται, κατά κανόνα, στο θρεπτικό μέσο δοκιμής.

Κατώτατη συγκέντρωση στην οποία παρατηρούνται επιπτώσεις (LOEC): η χαμηλότερη ελεγχθείσα συγκέντρωση στην οποία παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της ανάπτυξης (με $p < 0,05$) υπό την επίδραση της ουσίας, σε σύγκριση με τον μάρτυρα, εντός δεδομένου χρόνου έκθεσης. Ωστόσο, όλες οι συγκεντρώσεις δοκιμής που υπερβαίνουν τη LOEC αναμένεται να έχουν βλαβερή επίδραση ίση ή μεγαλύτερη από εκείνη που παρατηρείται στη LOEC. Σε περίπτωση που δεν είναι δυνατόν να πληρούνται οι δύο αυτοί όροι, θα πρέπει να εξηγείται πλήρως ο τρόπος επιλογής της LOEC (και, κατ' επέκταση, της NOEC).

Μεταβλητή απόκρισης: μεταβλητή για την εκτίμηση της τοξικότητας, η οποία προκύπτει, με διάφορες μεθόδους υπολογισμού, από τις μετρούμενες μεταβλητές που περιγράφουν τη βιομάζα. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, ο ρυθμός αύξησης και η απόδοση είναι μεταβλητές απόκρισης που προκύπτουν από μετρούμενες μεταβλητές, όπως το μήκος του κύριου βλαστού, το συνολικό μήκος των βλαστών, το νωπό βάρος, το ξηρό βάρος και ο αριθμός σπονδύλων.

Μετρούμενες μεταβλητές: κάθε είδους μεταβλητή που μετράται προκειμένου να εκφραστεί το τελικό σημείο της δοκιμής με χρήση μίας ή περισσότερων διαφορετικών μεταβλητών απόκρισης. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, το μήκος του κύριου βλαστού, το συνολικό μήκος των πλευρικών κλάδων· το συνολικό μήκος των βλαστών, το συνολικό μήκος των ριζών, το νωπό βάρος, το ξηρό βάρος και ο αριθμός σπονδύλων είναι μετρούμενες μεταβλητές.

Μονοκαλλιέργεια: καλλιέργεια με ένα μόνο είδος φυτού.

Νέκρωση: νεκρός (δηλ. λευκός ή βαθυκάστανος) ιστός του υπό δοκιμή οργανισμού.

Ρυθμός αύξησης (μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης): η λογαριθμική αύξηση της μετρούμενης μεταβλητής κατά την περίοδο έκθεσης. *Σημείωση*: Οι μεταβλητές απόκρισης που συνδέονται με τον ρυθμό αύξησης είναι ανεξάρτητες από τη διάρκεια της δοκιμής, εφόσον ο τύπος ανάπτυξης των οργανισμών μαρτύρων που δεν έχουν εκτεθεί είναι εκθετικός.

Στατική δοκιμή: μέθοδος δοκιμών χωρίς ανανέωση του διαλύματος δοκιμής στη διάρκεια της δοκιμής.

Συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC): η αμέσως μικρότερη από τη LOEC συγκέντρωση δοκιμής.

▼**M7**

Τελικό σημείο της δοκιμής: περιγράφει, ως στόχο της δοκιμής, τον γενικό παράγοντα που θα μεταβληθεί υπό την επίδραση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε σχέση με τον μάρτυρα. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, το τελικό σημείο της δοκιμής είναι η αναστολή της ανάπτυξης, η οποία μπορεί να εκφραστεί με διάφορες μεταβλητές απόκρισης που βασίζονται σε μία ή περισσότερες μετρούμενες μεταβλητές.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Χημική ουσία: ουσία ή μείγμα.

Χλώρωση: η αλλαγή του χρώματος του υπό δοκιμή οργανισμού, ιδίως των σπονδύλων, από πράσινο σε κίτρινο.

ECx: συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, διαλυμένης στο θρεπτικό μέσο δοκιμής, η οποία προκαλεί μείωση της ανάπτυξης κατά x % (π.χ. 50 %) του *Myriophyllum spicatum* εντός της δηλούμενης περιόδου έκθεσης (πρέπει να αναφέρεται επακριβώς, εάν διαφέρει από την πλήρη ή την κανονική διάρκεια της δοκιμής). Για να δηλώνεται σαφώς αν η τιμή EC προκύπτει από τον ρυθμό αύξησης ή από την απόδοση, χρησιμοποιούνται τα σύμβολα «E_rC» για τον ρυθμό αύξησης και «E_yC» για την απόδοση, ακολουθούμενα από τη χρησιμοποιηθείσα μετρούμενη μεταβλητή, π.χ. E_rC (μήκος κύριου βλαστού).

UVCB: ουσία άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, σύμπλοκο προϊόν αντίδρασης ή βιολογικό υλικό.

▼M7

Προσάρτημα 2

ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟ ΤΟΥ ANDREWS ΓΙΑ ΑΠΟΘΕΜΑΤΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΑΙ ΠΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Το τροποποιημένο θρεπτικό μέσο του Andrews που απαιτείται για τις αποθεματικές καλλιέργειες και τις προκαλλιέργειες παρασκευάζεται από πέντε χωριστά παρασκευασμένα θρεπτικά διαλύματα παρακαταθήκης, με προσθήκη 3 % σακχαρόζης.

Πίνακας 1

Σύνθεση του θρεπτικού διαλύματος του Andrews: (Πρότυπο ASTM E 1913-04)

Παρασκευή θρεπτικών διαλυμάτων παρακαταθήκης			Παρασκευή θρεπτικού διαλύματος
Διάλυμα παρακαταθήκης	Χημική ουσία	Αρχικό βάρος ανά 1 000 ml	ml ανά 5 l θρεπτικού διαλύματος
1	KCl	74,6 mg	50
	KNO_3	8,08 g	
	$Ca(NO_3)_2$ * 4 H_2O	18,88 g	
2	$MgSO_4$ * 7 H_2O	9,86 g	50
3	Βλ. κατωτέρω διάλυμα παρακαταθήκης 3.1		50
4	KH_2PO_4	2,72 g	50
5	$FeSO_4$ * 7 H_2O	0,278 g	50
	Na_2EDTA * 2 H_2O	0,372 g	

Τα διαλύματα παρακαταθήκης μπορούν να διατηρηθούν σε ψυγείο για 6 μήνες (στους 5-10 °C). Μόνο το διάλυμα παρακαταθήκης αριθ. 5 έχει μικρότερη διάρκεια διατήρησης (δύο μήνες).

Πίνακας 2

Παρασκευή του διαλύματος παρακαταθήκης 3.1 για την παρασκευή του διαλύματος παρακαταθήκης 3

Χημική ουσία	Αρχικό βάρος g/100 ml
$MnSO_4$ * 4 H_2O	0,223
$ZnSO_4$ * 7 H_2O	0,115
H_3BO_3	0,155
$CuSO_4$ * 5 H_2O	0,0125
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ * 4 H_2O	0,0037

Μετά την παρασκευή του διαλύματος παρακαταθήκης 3.1 (πίνακας 2), το διάλυμα αυτό καταψύχεται χωρισμένο σε κλάσματα όγκου περίπου 11 ml (στους – 18 °C τουλάχιστον). Τα κατεψυγμένα κλάσματα έχουν πενταετή διάρκεια διατήρησης.

Για να παρασκευαστεί το διάλυμα παρακαταθήκης 3, αποψύχεται το διάλυμα παρακαταθήκης 3.1, φέρονται 10 ml αυτού σε ογκομετρική φιάλη του 1 λίτρου και συμπληρώνεται ο όγκος της φιάλης μέχρι τη χαραγή με υπερκάθαρο νερό.

Για να ληφθεί το τροποποιημένο θρεπτικό μέσο του Andrews, φέρονται περίπου 2 500 ml υπερκάθαρου νερού σε ογκομετρική φιάλη των 5 λίτρων. Μετά την προσθήκη 50 ml από κάθε διάλυμα παρακαταθήκης, πληρούται κατά 90 % η ογκομετρική φιάλη με υπερκάθαρο νερό και ρυθμίζεται το pH στο 5,8.

▼M7

Στη συνέχεια, προστίθενται 150 g διαλυμένης σακχαρόζης (3 % ανά 5 λίτρα) και, κατόπιν, συμπληρώνεται ο όγκος της ογκομετρικής φιάλης μέχρι τη χαραγή με υπερκάθαρο νερό. Τέλος, το θρεπτικό διάλυμα τοποθετείται σε φιάλες Schott του 1 λίτρου και αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 20 λεπτά.

Το θρεπτικό διάλυμα που προκύπτει με τον τρόπο αυτό μπορεί να διατηρηθεί στείρο σε ψυγείο (στους 5-10 °C) για τρεις μήνες.

Τροποποιημένο θρεπτικό μέσο του Andrews για δοκιμή τοξικότητας σε σύστημα χωρίς ίζημα

Από τα πέντε θρεπτικά διαλύματα παρακαταθήκης που έχουν ήδη αναφερθεί στους πίνακες 1 και 2, παρασκευάζεται τροποποιημένο θρεπτικό μέσο του Andrews δεκαπλάσιας συγκέντρωσης, που είναι αναγκαίο για τη λήψη των διαλυμάτων δοκιμής, με την προσθήκη 30 % σακχαρόζης. Για τον σκοπό αυτό, φέρονται περίπου 100 ml υπερκάθαρου νερού σε ογκομετρική φιάλη του 1 λίτρου. Μετά την προσθήκη 100 ml από κάθε διάλυμα παρακαταθήκης, ρυθμίζεται το pH στο 5,8. Στη συνέχεια, προστίθεται 30 % διαλυμένης σακχαρόζης (300 g ανά 1 000 ml) και, κατόπιν, συμπληρώνεται ο όγκος της ογκομετρικής φιάλης μέχρι τη χαραγή με υπερκάθαρο νερό.

Τέλος, το θρεπτικό διάλυμα τοποθετείται σε φιάλες Schott του 0,5 λίτρου και αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 20 λεπτά.

Το δεκαπλάσιας συγκέντρωσης τροποποιημένο θρεπτικό διάλυμα που προκύπτει με τον τρόπο αυτό μπορεί να διατηρηθεί στείρο σε ψυγείο (στους 5-10 °C) για τρεις μήνες.

▼M7

Προσάρτημα 3

ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΑΠΟΘΕΜΑΤΙΚΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Στο παρόν προσάρτημα 3, περιγράφεται η αποθεματική καλλιέργεια *Myriophyllum spicatum L* ([1]), υφυδατικού υδρόβιου δικοτυλήδονου φυτού της οικογένειας των μυριόφυλλων. Μεταξύ Ιουνίου και Αυγούστου, δυσδιάκριτα λευκορόδινα άνθη αναδύονται από την επιφάνεια του νερού. Τα φυτά ριζώνουν στο έδαφος με ένα σύστημα ισχυρών ριζωμάτων και συναντώνται σε ολόκληρο το βόρειο ημισφαίριο σε ευτροφικά, αλλά μη ρυπασμένα και περισσότερο ασβεστοφόρα λιμνάζοντα ύδατα με λασπώδες υπόστρωμα. Το *Myriophyllum spicatum* προτιμά τα γλυκά ύδατα, αλλά συναντάται και σε υφάλμυρα.

Για αποθεματικές καλλιέργειες χωρίς ίζημα υπό εργαστηριακές συνθήκες, απαιτούνται στείρα φυτά. Στείρα φυτά διατίθενται από το εργαστήριο οικοτοξικολογίας της γερμανικής Umweltbundesamt (Ομοσπονδιακή Υπηρεσία Περιβάλλοντος της Γερμανίας).

Εναλλακτικά, οι υπό δοκιμή οργανισμοί μπορούν να δημιουργηθούν από μη στείρα φυτά σύμφωνα με το πρότυπο ASTM E 1913-04. Στην επόμενη παράγραφο –απόσπασμα από τον οδηγό ASTM Standard Guide– περιγράφεται η διαδικασία καλλιέργειας *Myriophyllum sibiricum* που έχει συλλεγεί από τη φύση:

«Εάν το αρχικό υλικό πρόκειται να είναι μη στείρα φυτά από τη φύση, συλλέγονται φύτρα (turion) του φυτού *M. sibiricum* το φθινόπωρο. Τα φύτρα τοποθετούνται σε ενυδρείο χωρητικότητας 20 λίτρων που περιέχει στείρο ίζημα πάχους 5 cm, καλυμμένο με πυριτική άμμο ή, για παράδειγμα, Turface® και 18 λίτρα νερού ποιότητας χημικού αντιδραστηρίου. Το ενυδρείο αερίζεται και διατηρείται σε θερμοκρασία 15 °C και πυκνότητα ροής 200 έως 300 μmol m^{-2} s^{-1} για 16 ώρες ημερησίως. Η φυτοκαλλιέργεια στο ενυδρείο μπορεί να διατηρηθεί ως εφεδρική πηγή φυτών σε περίπτωση καταστροφής των στείρων φυτοκαλλιεργειών λόγω μηχανικής δυσλειτουργίας στον θάλαμο ανάπτυξης, μόλυνσης ή άλλης αιτίας. Τα φυτά που καλλιεργούνται στο ενυδρείο δεν είναι στείρα και δεν είναι δυνατόν να διατηρηθούν στείρες καλλιέργειες σε σύστημα ασυνεχούς καλλιέργειας. Για την αποστείρωση της καλλιέργειας, τα φυτά απομακρύνονται από το ενυδρείο και εκπλένονται με ρέον απιονισμένο νερό για περίπου μισή ώρα. Απολυμαίνονται υπό άσηπτες συνθήκες σε απαγωγό στρωτής ροής αέρα για λιγότερο από 20 λεπτά (έως ότου λευκανθεί το μεγαλύτερο μέρος των φυτικών ιστών και παραμένει πράσινη μόνο η αναπτυσσόμενη κορυφή) σε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 3 % (κ.β.) που περιέχει 0,01 % κατάλληλης επιφανειοδραστικής ουσίας. Ανακινείται το απολυμαντικό και το φυτικό υλικό. Τμήματα με αρκετά γόνατα μεταφέρονται σε στείρους σωλήνες καλλιέργειας που περιέχουν 45 ml αποστειρωμένου τροποποιημένου θρεπτικού μέσου του Andrews και πωματίζονται με απλά πώματα σωλήνων καλλιέργειας. Σε κάθε δοκιμαστικό θάλαμο τοποθετείται μόνο ένα τμήμα φυτού. Χρησιμοποιείται εργαστηριακή πλαστική μεμβράνη (παραφίλμ) για τη σφράγιση του δοχείου καλλιέργειας. Μετά την εγκατάσταση της στείρας καλλιέργειας, τμήματα φυτού με αρκετά γόνατα θα πρέπει να μεταφέρονται σε νέους δοκιμαστικούς θαλάμους, που περιέχουν πρόσφατα παρασκευασμένο υγρό θρεπτικό μέσο, κάθε δέκα έως δώδεκα ημέρες. Τα φυτά πρέπει να είναι στείρα, γεγονός που να αποδεικνύεται με καλλιέργεια σε τρυβλία με άγαρ, και να παραμένουν στείρα επί οκτώ εβδομάδες πριν από την έναρξη της δοκιμής.»

Δεδομένου ότι το τροποποιημένο θρεπτικό μέσο του Andrews περιέχει σακχαρόζη (η οποία προάγει την ανάπτυξη μυκήτων και βακτηρίων), ο χειρισμός όλων των υλικών, διαλυμάτων και καλλιεργειών πρέπει να πραγματοποιείται υπό στείρες συνθήκες. Όλα τα υγρά καθώς και ο εξοπλισμός αποστειρώνονται πριν από τη χρήση. Η αποστείρωση επιτυγχάνεται με κατεργασία με θερμό αέρα (στους 210 °C) επί 4 ώρες ή σε αυτόκαυστο επί 20 λεπτά στους 121 °C. Επιπλέον, όλες οι φιάλες, τα τρυβλία, τα κύπελλα κ.λπ. και ο λοιπός εξοπλισμός υποβάλλονται σε κατεργασία με φλόγα στη στείρα επιφάνεια εργασίας αμέσως πριν από τη χρήση τους.

Οι αποθεματικές καλλιέργειες μπορούν να διατηρούνται σε ελαττωμένο φωτισμό και θερμοκρασία (50 μE m^{-2} s^{-1}, 20 ± 2 °C) για μεγαλύτερα διαστήματα, χωρίς να είναι αναγκαία η εκ νέου εγκατάσταση. Το θρεπτικό μέσο για το μυριόφυλλο θα πρέπει να είναι ίδιο με εκείνο που χρησιμοποιείται στη δοκιμή, αλλά για τις

([1]) Carl von Linné/Κάρολος Λινναίος (* 23 Μαΐου 1707 στο Råshult /Älmhult, † Ουψάλα, 10 Ιανουαρίου 1778).

▼M7

αποθεματικές καλλιέργειες μπορούν να χρησιμοποιούνται άλλα πλούσια σε θρεπτικά στοιχεία μέσα.

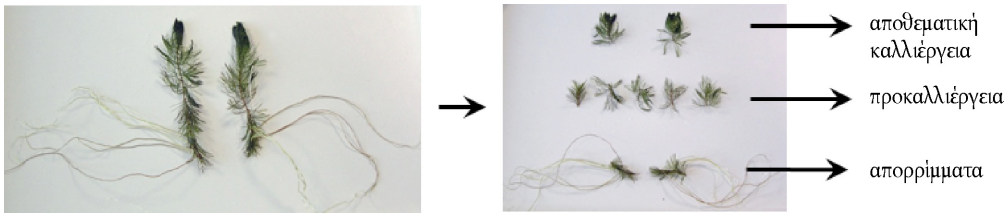
Τα τμήματα φυτών κατανέμονται αξενικά σε πολλές φιάλες Erlenmeyer των 500 ml και/ή Fernbach των 2 000 ml, καθεμία από τις οποίες πληρούται, αντίστοιχα, με περίπου 450 και 1 000 ml τροποποιημένου θρεπτικού μέσου του Andrews. Στη συνέχεια, οι φιάλες πωματίζονται αξενικά με πώματα κυτταρίνης.

Επιπλέον, είναι απολύτως αναγκαία η κατεργασία του εξοπλισμού με φλόγα στη στείρα επιφάνεια εργασίας αμέσως πριν από τη χρήση. Ανάλογα με τον αριθμό και το μέγεθος, τα φυτά πρέπει να μεταφέρονται σε πρόσφατα παρασκευασμένο θρεπτικό διάλυμα περίπου κάθε τρεις εβδομάδες.

Για αυτή την ανακαλλιέργεια μπορούν να χρησιμοποιούνται οι κορυφές, καθώς και τμήματα του μεσαίου μέρους του στελέχους. Ο αριθμός και το μέγεθος των μεταφερόμενων φυτών (ή τμημάτων φυτών) εξαρτώνται από τον αναγκαίο αριθμό φυτών. Ενδεικτικά, μπορούν να μεταφερθούν πέντε τμήματα βλαστού σε μία φιάλη Fernbach και τρία τμήματα βλαστού σε μία φιάλη Erlenmeyer, το καθένα μήκους 5 cm. Απορρίπτονται τα μέρη που φέρουν ρίζες ή άνθη, είναι νεκρά ή ξεχωρίζουν με άλλον τρόπο.

Εικόνα 1

Κοπή φυτών για την αποθεματική καλλιέργεια και την προκαλλιέργεια μετά από 3 εβδομάδες καλλιέργειας.



Τα φυτά πρέπει να καλλιεργούνται σε φιάλες Erlenmeyer των 500 ml και Fernbach των 2 000 ml σε ψυκτικό επωαστήρα στους 20 ± 2 °C με συνεχές φως περίπου 100-150 μE m^{-2} s^{-1} ή 6 000-9 000 Lux (που εκπέμπεται από φωτισμό θαλάμου με θερμοκρασία χρώματος «θερμό λευκό φως»).

Εικόνα 2

Καλλιέργεια φυτών σε ψυκτικό επωαστήρα με φωτισμό θαλάμου.



Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται χημικώς καθαρά (εκπλυμένα με οξύ) και στείρα γυάλινα δοχεία καλλιέργειας και να εφαρμόζονται άσηπτες τεχνικές για τους χειρισμούς. Σε περίπτωση μόλυνσης της αποθεματικής καλλιέργειας, π.χ. από φύκη, μύκητες και/ή βακτήρια, αυτή θα πρέπει να αντικαθίσταται με νέα καλλιέργεια ή με αποθεματική καλλιέργεια από άλλο εργαστήριο.

▼M7

Προσάρτημα 4

ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΠΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ ΓΙΑ ΤΗ ΔΟΚΙΜΗ

Για τη λήψη προκαλλιέργειας, κόβονται βλαστοί από την αποθεματική καλλιέργεια σε τμήματα με δύο σπονδύλους το καθένα. Τα τμήματα τοποθετούνται σε φιάλες Fernbach που έχουν πληρωθεί με τροποποιημένο θρεπτικό μέσο του Andrews (με 3 % σακχαρόζη). Κάθε φιάλη μπορεί να περιέχει μέχρι 50 τμήματα βλαστών. Πρέπει, ωστόσο, να υπάρχει μέριμνα ώστε τα τμήματα να είναι σφριγηλά και να μην έχουν ρίζες και πλευρικούς κλάδους ούτε τις καταβολές αυτών (βλ. εικόνα 1 στο προσάρτημα 3).

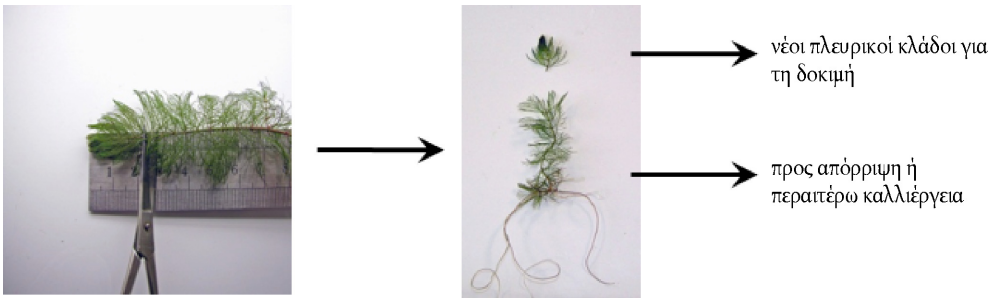
Οι οργανισμοί προκαλλιέργειας καλλιεργούνται επί 14 έως 21 ημέρες υπό στείρες συνθήκες σε θάλαμο ελεγχόμενου περιβάλλοντος με εναλλασσόμενες φάσεις φωτός/σκότους 16:8 ωρών. Η φωτεινή ένταση επιλέγεται από το εύρος 100-150 μE m^{-2} s^{-1}. Η θερμοκρασία στα δοκιμαστικά δοχεία θα πρέπει να είναι 23 ± 2 °C.

Δεδομένου ότι το τροποποιημένο θρεπτικό μέσο του Andrews περιέχει σακχαρόζη (η οποία προάγει την ανάπτυξη φυκών, μυκήτων και βακτηρίων), η παρασκευή των διαλυμάτων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και η καλλιέργεια θα πρέπει να διεξάγονται σε στείρες συνθήκες. Όλα τα υγρά καθώς και ο εξοπλισμός αποστειρώνονται πριν από τη χρήση. Η αποστείρωση επιτυγχάνεται με κατεργασία με θερμό αέρα (στους 210 °C) επί 4 ώρες ή σε αυτόκαυστο επί 20 λεπτά στους 121 °C. Επιπλέον, όλες οι φιάλες, τα τρυβλία, τα κύπελλα κ.λπ. και ο λοιπός εξοπλισμός υποβάλλονται σε κατεργασία με φλόγα στη στείρα επιφάνεια εργασίας αμέσως πριν από τη χρήση τους.

Οι βλαστοί απομακρύνονται αξενικά από τις φιάλες προκαλλιέργειας, ενώ επιλέγεται όσο το δυνατόν περισσότερο ομοιογενές υλικό. Για κάθε δοκιμή απαιτούνται τουλάχιστον 60 οργανισμοί (δοκιμή με οκτώ συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας). Για τη διεξαγωγή της δοκιμής λαμβάνονται νέοι πλευρικοί κλάδοι από προκαλλιέργειες, κόβονται σε μήκος 2,5 cm από τη βάση (μέτρηση με κανόνα) και μεταφέρονται σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει στείρο τροποποιημένο θρεπτικό μέσο του Andrews. Αυτοί οι νέοι πλευρικοί κλάδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη δοκιμή τοξικότητας σε *Myriophyllum spicatum* με σύστημα χωρίς ίζημα.

Εικόνα 2

Κοπή φυτών από την προκαλλιέργεια για τη δοκιμή τοξικότητας σε *Myriophyllum spicatum* με σύστημα χωρίς ίζημα.



▼M7

Γ. 51 ΔΟΚΙΜΉ ΤΟΞΙΚΌΤΗΤΑς ΣΕ *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* ΜΕ ΣΎΣΤΗΜΑ ΝΕΡΟΎ-ΙΖΉΜΑΤΟς

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 239 του ΟΟΣΑ (2014). Υπάρχουν μέθοδοι δοκιμών για είδη του γένους επιπλεόντων μονοκοτυλήδονων υδρόβιων φυτών *Lemna* (1) καθώς και για είδη φυκών (2). Οι μέθοδοι αυτές χρησιμοποιούνται συστηματικά για την παραγωγή δεδομένων με σκοπό την εξέταση της επικινδυνότητας των υπό δοκιμή χημικών ουσιών, ιδίως των ουσιών με ζιζανιοκτόνο δράση, για τα μη στοχευόμενα είδη υδρόβιων φυτών. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, απαιτούνται ενδεχομένως δεδομένα για επιπλέον είδη μακρόφυτων. Σύμφωνα με πρόσφατο έγγραφο καθοδήγησης, που δημοσιεύθηκε μετά από ημερίδα της επιστημονικής εταιρείας Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) με θέμα την αξιολόγηση του κινδύνου από τα φυτοφάρμακα για τα υδρόβια μακρόφυτα (Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides/AMRAP), απαιτούνται ενδεχομένως δεδομένα για είδη ριζωμένων στον πυθμένα μακρόφυτων σε περίπτωση που τα φυτά του γένους *Lemna* και τα φύκη είναι γνωστό ότι δεν έχουν ευαισθησία στον τρόπο δράσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ή η κατανομή της ουσίας στα ιζήματα δημιουργεί ανησυχίες για έκθεση μέσω πρόσληψης από τις ρίζες (3). Με βάση τις έως τώρα γνώσεις και πείρα, επιλέχθηκαν είδη του γένους *Myriophyllum* ως προτιμώμενα είδη στις περιπτώσεις κατά τις οποίες απαιτούνται δεδομένα για είδη υφυδατικών, ριζωμένων στον πυθμένα δικοτυλήδονων φυτών (4) (5) (6). Η παρούσα δοκιμή δεν αντικαθιστά άλλες δοκιμές υδατοτοξικότητας· αντίθετα, θα πρέπει να τις συμπληρώνει, ώστε να είναι εφικτή μια πιο ολοκληρωμένη εκτίμηση των κινδύνων και της επικινδυνότητας για τα υδρόβια φυτά. Η δοκιμή τοξικότητας σε *Myriophyllum spicatum* με σύστημα νερού-ιζήματος συμπληρώνει τη δοκιμή τοξικότητας σε *Myriophyllum spicatum* με σύστημα χωρίς ίζημα (7).

2. Στο παρόν έγγραφο περιγράφεται μια μέθοδος δοκιμών που επιτρέπει την αξιολόγηση των επιδράσεων των υπό δοκιμή χημικών ουσιών στο είδος ριζωμένων στον πυθμένα υδρόβιων φυτών *Myriophyllum spicatum*, καλλιεργούμενο σε σύστημα νερού-ιζήματος. Η μέθοδος δοκιμών βασίζεται εν μέρει σε υφιστάμενες μεθόδους (1) (2) (8) και λαμβάνει υπόψη την πρόσφατη έρευνα σχετικά με την εκτίμηση της επικινδυνότητας για τα υδρόβια φυτά (3). Η μέθοδος σε σύστημα νερού-ιζήματος επικυρώθηκε με διεθνή διεργαστηριακή δοκιμή τεχνικής ικανότητας, η οποία διενεργήθηκε σε είδη μυριόφυλλου που καλλιεργήθηκαν υπό στατικές συνθήκες και εκτέθηκαν στην υπό δοκιμή χημική ουσία με εφαρμογές μέσω της στήλης ύδατος (9). Ωστόσο, το σύστημα δοκιμών μπορεί εύκολα να προσαρμοστεί για να καταστεί δυνατή η έκθεση μέσω εμβολιασμένου ιζήματος ή μέσω της υδατικής φάσης σε σενάρια ημιστατικών συνθηκών ή παλμικής δόσης, μολονότι αυτά τα σενάρια δεν έχουν υποβληθεί επίσημα σε διεργαστηριακή δοκιμή. Επιπλέον, η γενική μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για άλλα είδη ριζωμένων στον πυθμένα υφυδατικών και υπερυδατικών φυτών, συμπεριλαμβανομένων άλλων ειδών μυριόφυλλου (π.χ. *Myriophyllum aquaticum*) και *Glyceria maxima* (10). Για τα εναλλακτικά είδη μπορεί να απαιτούνται τροποποιήσεις των συνθηκών, του σχεδιασμού και της διάρκειας της δοκιμής. Ειδικότερα, απαιτούνται περισσότερες προσπάθειες για τον καθορισμό κατάλληλων διαδικασιών για το *Myriophyllum aquaticum*. Οι επιλογές αυτές δεν παρουσιάζονται λεπτομερώς στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, στην οποία περιγράφεται η τυποποιημένη προσέγγιση για την έκθεση του *Myriophyllum spicatum* σε στατικό σύστημα μέσω της υδατικής φάσης.

3. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών εφαρμόζεται σε ουσίες για τις οποίες έχει επικυρωθεί [βλ. λεπτομέρειες στην έκθεση διεργαστηριακής δοκιμής (9)] ή σε σκευάσματα ή γνωστά μείγματα. Δοκιμή σε μυριόφυλλο μπορεί να διεξαχθεί για να ικανοποιηθούν απαιτήσεις για δεδομένα της βαθμίδας 1 που προκύπτουν από τη δυνητική κατανομή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στα ιζήματα ή από ζητήματα σχετικά με τον τρόπο δράσης/την επιλεκτικότητα. Ομοίως, μπορεί να απαιτείται εργαστηριακή δοκιμή σε μυριόφυλλο στο πλαίσιο στρατηγικής ανώτερης βαθμίδας για την αντιμετώπιση ανησυχιών που αφορούν τον κίνδυνο για τα υδρόβια φυτά. Ο συγκεκριμένος λόγος που υπαγορεύει τη διεξαγωγή δοκιμής καθορίζει την οδό έκθεσης (δηλ. μέσω του νερού ή του ιζήματος). Πριν από την εφαρμογή της παρούσας μεθόδου δοκιμών σε μείγμα για ρυθμιστικούς σκοπούς, θα πρέπει να εξετάζεται αν –και, εάν ναι, για ποιον λόγο– αυτή μπορεί να αποδώσει επαρκή αποτελέσματα για τον επιδιωκόμενο σκοπό. Οι εκτιμήσεις αυτές δεν είναι αναγκαίες όταν οι κανονιστικές ρυθμίσεις επιβάλλουν την υποβολή του μείγματος στη δοκιμή.

▼M7

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

4. Η δοκιμή έχει σχεδιαστεί για την αξιολόγηση των επιδράσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στη βλαστητική αύξηση μυριόφυλλων, τα οποία καλλιεργούνται σε τυποποιημένα μέσα (νερό, ιζήματα και θρεπτικά στοιχεία). Για τον σκοπό αυτό, κορυφές βλαστών υγιών φυτών που δεν ανθοφορούν φυτεύονται σε τυποποιημένο τεχνητό ίζημα, το οποίο συμπληρώνεται με πρόσθετα θρεπτικά στοιχεία, ώστε να εξασφαλιστεί επαρκής ανάπτυξη των φυτών, και, στη συνέχεια, διατηρούνται σε θρεπτικό μέσο Smart and Barko (προσάρτημα 1). Μετά από μια περίοδο εγκατάστασης για σχηματισμό των ριζών, τα φυτά εκτίθενται σε σειρά συγκεντρώσεων δοκιμής που προστίθενται στη στήλη ύδατος. Εναλλακτικά, είναι δυνατόν να προσομοιωθεί η έκθεση μέσω του ιζήματος, με εμβολιασμό του τεχνητού ιζήματος με την υπό δοκιμή χημική ουσία και μεταφύτευση των φυτών σε αυτό το εμβολιασμένο ίζημα. Και στις δύο περιπτώσεις, τα φυτά διατηρούνται στη συνέχεια σε ελεγχόμενες συνθήκες περιβάλλοντος για 14 ημέρες. Οι επιδράσεις στην ανάπτυξη προσδιορίζονται από ποσοτικές εκτιμήσεις του μήκους του βλαστού, του νωπού βάρους και του ξηρού βάρους, καθώς και από ποιοτικές παρατηρήσεις συμπτωμάτων όπως η χλώρωση, η νέκρωση ή οι δυσμορφίες της ανάπτυξης.

5. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιδράσεων της χημικής ουσίας, συγκρίνεται η ανάπτυξη στα διαλύματα δοκιμής με την ανάπτυξη των μαρτύρων και προσδιορίζεται η συγκέντρωση που προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης κατά συγκεκριμένο ποσοστό x %, η οποία εκφράζεται ως ECx, όπου ο δείκτης x μπορεί να λάβει οποιαδήποτε τιμή, ανάλογα με τις απαιτήσεις των κανονιστικών ρυθμίσεων, π.χ. EC_{10}, EC_{20}, EC_{50}. Επισημαίνεται ότι οι εκτιμήσεις των τιμών EC_{10} και EC_{20} είναι αξιόπιστες και κατάλληλες μόνο σε δοκιμές στις οποίες οι συντελεστές μεταβλητότητας στα φυτά-μάρτυρες είναι χαμηλότεροι από το εκτιμώμενο επίπεδο επίδρασης, δηλ. οι συντελεστές μεταβλητότητας θα πρέπει να είναι < 20 % για να είναι εύρωστη η εκτίμηση της EC_{20}.

6. Θα πρέπει να προσδιορίζονται τόσο ο μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης (που υπολογίζεται από εκτιμήσεις του μήκους, του νωπού βάρους και του ξηρού βάρους του βλαστού) όσο και η απόδοση (που υπολογίζεται από την αύξηση του μήκους, του νωπού βάρους και του ξηρού βάρους του κύριου βλαστού) των φυτών χωρίς μεταχείριση και των φυτών υπό μεταχείριση. Στη συνέχεια ο ειδικός ρυθμός αύξησης (r) και η απόδοση (y) χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των τιμών E_rC_x (π.χ. E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) και E_yC_x (π.χ. E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}) αντίστοιχα.

7. Εάν είναι απαραίτητο, είναι δυνατόν να προσδιοριστούν στατιστικά η κατώτατη συγκέντρωση στην οποία παρατηρούνται επιπτώσεις (LOEC) και η συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC) με βάση τις εκτιμήσεις των μέσων ειδικών ρυθμών αύξησης και της απόδοσης.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

8. Θα πρέπει να υπάρχει αναλυτική μέθοδος επαρκούς ευαισθησίας για τον ποσοτικό προσδιορισμό των χημικών ουσιών στο θρεπτικό μέσο δοκιμής.

9. Οι πληροφορίες σχετικά με την υπό δοκιμή χημική ουσία που μπορεί να είναι χρήσιμες για τον καθορισμό των συνθηκών δοκιμής περιλαμβάνουν τον συντακτικό τύπο, τη σύνθεση στην περίπτωση πολυσυστατικών ουσιών, UVCB, μειγμάτων ή σκευασμάτων, την καθαρότητα, την υδατοδιαλυτότητα, τη σταθερότητα στο νερό και στο φως, τη σταθερά διάστασης οξέος (pK_a), τον συντελεστή κατανομής σε μείγμα οκτανόλης-νερού (K_{ow}), τη σταθερά K_d σε ιζήματα (εάν είναι διαθέσιμη), την τάση ατμών και τη βιοαποδομησιμότητα. Η υδατοδιαλυτότητα και η τάση ατμών μπορούν να χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της σταθεράς του νόμου του Henry, η οποία δείχνει αν είναι πιθανόν να σημειωθούν σημαντικές απώλειες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στη διάρκεια της δοκιμής. Εάν υπάρχει πιθανότητα απωλειών των υπό δοκιμή χημικών ουσιών, θα πρέπει να προσδιορίζονται ποσοτικά οι απώλειες και να τεκμηριώνονται τα μέτρα που λαμβάνονται κατόπιν για τον περιορισμό των εν λόγω απωλειών. Σε περίπτωση που οι πληροφορίες για τη διαλυτότητα και τη σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας είναι αβέβαιες, συνιστάται να αξιολογούνται οι ιδιότητες αυτές στις συνθήκες δοκιμής, δηλ. με το θρεπτικό μέσο και στις συνθήκες θερμοκρασίας και φωτισμού που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή. *Σημείωση*: όταν υποβάλλονται σε δοκιμή ζιζανιοκτόνα με φωτοεξαρτώμενη υπεροξειδωτική δράση, ο χρησιμοποιούμενος εργαστηριακός φωτισμός θα πρέπει να εκπέμπει υπεριώδη ακτινοβολία ισοδύναμη με εκείνη του φυσικού ηλιακού φωτός.

▼M7

10. Το pH του θρεπτικού μέσου δοκιμής θα πρέπει να μετράται και να ρυθμίζεται, κατά περίπτωση. Ο έλεγχος του pH του θρεπτικού μέσου δοκιμής έχει ιδιαίτερη σημασία, π.χ. στις δοκιμές μετάλλων ή ασταθών στην υδρόλυση ουσιών. Περαιτέρω καθοδήγηση για τον έλεγχο χημικών ουσιών που οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες δυσχεραίνουν τη δοκιμή τους παρέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ (11).

ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

11. Για να είναι έγκυρα τα αποτελέσματα της δοκιμής, οι μέσες τιμές συνολικού μήκους των βλαστών και συνολικού νωπού βάρους των βλαστών στα φυτά-μάρτυρες πρέπει να έχουν τουλάχιστον διπλασιαστεί κατά τη φάση έκθεσης της δοκιμής. Επιπλέον, τα φυτά-μάρτυρες δεν πρέπει να εμφανίζουν μακροσκοπικά συμπτώματα χλώρωσης και θα πρέπει να είναι εμφανώς απαλλαγμένα από μόλυνση από άλλους οργανισμούς, όπως φύκη και/ή βιοϋμένια στα φυτά, στην επιφάνεια του ιζήματος και στο θρεπτικό μέσο δοκιμής.

12. Η μέση τιμή του συντελεστή μεταβλητότητας της απόδοσης με βάση μετρήσεις του νωπού βάρους των βλαστών (δηλ. από την έναρξη έως τον τερματισμό της δοκιμής) στις καλλιέργειες μαρτύρων δεν υπερβαίνει το 35 % μεταξύ των επαναλήψεων.

ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

13. Θα πρέπει να υποβάλλονται περιοδικά σε δοκιμή μια ή περισσότερες χημικές ουσίες αναφοράς, όπως η 3,5-διχλωροφαινόλη που χρησιμοποιήθηκε στη διεργαστηρική δοκιμή (9), ώστε να ελέγχονται οι επιδόσεις της διαδικασίας δοκιμής με την πάροδο του χρόνου. Από τα δεδομένα της διεργαστηριακής δοκιμής συνάγεται ότι οι μέσες τιμές EC_{50} της 3,5-διχλωροφαινόλης για τις διάφορες μεταβλητές απόκρισης κυμαίνονταν μεταξύ 4,7 και 6,1 mg/l (για λεπτομέρειες σχετικά με τα προβλεπόμενα διαστήματα εμπιστοσύνης αυτών των τιμών, βλ. έκθεση διεργαστηριακής δοκιμής). Είναι σκόπιμο να πραγματοποιείται δοκιμή με μια χημική ουσία αναφοράς τουλάχιστον ανά εξάμηνο ή, εάν οι οριστικές δοκιμές τοξικότητας εκτελούνται σποραδικά, παράλληλα με τις δοκιμές αυτές. Οδηγός για τις αναμενόμενες τιμές EC50 της 3,5-διχλωροφαινόλης περιλαμβάνεται στη στατιστική έκθεση της διεθνούς διεργαστηριακής δοκιμής (9).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Εξοπλισμός δοκιμής

14. Η δοκιμή θα πρέπει να διεξάγεται υπό ελεγχόμενες συνθήκες περιβάλλοντος, δηλ. σε θάλαμο ανάπτυξης, αίθουσα ανάπτυξης ή εργαστήριο με ελεγχόμενη διάρκεια ημέρας, φωτισμό και θερμοκρασία (βλ. ενότητα «Συνθήκες δοκιμής», παράγραφοι 56-58). Οι αποθεματικές καλλιέργειες θα πρέπει να διατηρούνται χωριστά από τα δοκιμαστικά δοχεία.

15. Η μελέτη θα πρέπει να διεξάγεται με τη χρήση γυάλινων δοκιμαστικών δοχείων, όπως τα ενυδρεία ή ποτήρια ζέσεως· χρησιμοποιούνται ευρέως γυάλινα ποτήρια ζέσεως των 2 λίτρων (ύψους 24 cm και διαμέτρου 11 cm περίπου). Ωστόσο, κατάλληλα μπορεί να είναι και άλλα (δηλ. μεγαλύτερα) δοχεία, με την προϋπόθεση ότι το βάθος του νερού επαρκεί ώστε τα φυτά να μπορούν να αναπτυχθούν απεριόριστα και να παραμένουν βυθισμένα στο νερό σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής.

16. Για τη φύτευση των φυτών στο ίζημα μπορούν να χρησιμοποιούνται πλαστικές ή γυάλινες γλάστρες (διαμέτρου 9 cm, ύψους 8 cm και χωρητικότητας 500 ml περίπου). Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιούνται γυάλινα ποτήρια ζέσεως, που σε ορισμένες περιπτώσεις προτιμώνται (π.χ. για τη δοκιμή υδρόφοβων χημικών ουσιών ή χημικών ουσιών με υψηλό K_{ow}).

17. Η επιλογή μεγέθους των γλαστρών/ποτηριών ζέσεως πρέπει να συνδυάζεται με την επιλογή δοκιμαστικών δοχείων και τον προτιμώμενο σχεδιασμό δοκιμής (βλ. κατωτέρω). Εάν χρησιμοποιείται σχεδιασμός δοκιμής Α (ένας βλαστός ανά γλάστρα και τρεις γλάστρες ανά δοχείο), χρειάζονται ενδεχομένως μικρότερες γλάστρες ή μεγαλύτερα δοχεία. Εάν χρησιμοποιείται σχεδιασμός δοκιμής Β (τρεις βλαστοί ανά γλάστρα και μία γλάστρα ανά δοχείο), τα υποδεικνυόμενα μεγέθη γλαστρών και δοχείων αναμένεται να είναι επαρκή. Σε όλες τις περιπτώσεις, το ελάχιστο βάθος του υπερκείμενου νερού θα πρέπει να είναι 12 cm επάνω από την κορυφή του ιζήματος και ο λόγος της επιφάνειας/του όγκου του ιζήματος προς την επιφάνεια/τον όγκο του νερού θα πρέπει να καταγράφεται.

▼M7

Υπό δοκιμή οργανισμός

18. Οι γενικές προσεγγίσεις που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διεξαγωγή δοκιμών σε ποικιλία υδρόβιων φυτών. Ωστόσο, οι συνθήκες που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών έχουν προσαρμοστεί για τις δοκιμές στο είδος υδρόβιου μυριόφυλλου *Myriophyllum spicatum*. Το είδος αυτό ανήκει στην οικογένεια δικοτυλήδονων Haloragaceae (αλοραγίδες).

19. Το *Myriophyllum spicatum* (ευρασιατικό υδρόβιο μυριόφυλλο) είναι ένα είδος υφυδατικού, ριζωμένου στον πυθμένα φυτού, με ανοχή σε ευρύ φάσμα συνθηκών, και συναντάται τόσο σε στάσιμα όσο και ρέοντα ύδατα. Το *M. spicatum* είναι πολυετές φυτό που φθίνει μέχρι τις ρίζες κατά τη διάρκεια του χειμώνα. Τα φυτά συνήθως ανθοφορούν και αποβάλλουν ελεύθερα σπόρους, αν και η κύρια μέθοδος αποικισμού είναι συχνά ο αγενής πολλαπλασιασμός από μασχαλιαίους οφθαλμούς ή τεμάχια βλαστού που αποσπώνται με φυσικό τρόπο ή μετά από διατάραξη.

Καλλιέργεια του υπό δοκιμή οργανισμού

20. Τα φυτά μπορούν να λαμβάνονται από φυσικούς πληθυσμούς ή από προμηθευτές υδρόβιων φυτών. Και στις δύο περιπτώσεις, θα πρέπει να τεκμηριώνεται η πηγή των φυτών και να επαληθεύεται η ταυτότητα του είδους. Θα πρέπει να λαμβάνεται ιδιαίτερη μέριμνα κατά τη συλλογή του *Myriophyllum spicatum* από τη φύση, ώστε να διασφαλίζεται η λήψη του σωστού είδους, ιδίως σε περιοχές όπου μπορεί να διασταυρωθεί στη φύση με άλλα είδη μυριόφυλλου. Σε περίπτωση αμφιβολίας, συνιστάται η χρήση ελεγμένων εργαστηριακών καλλιεργειών από γνωστές πηγές. Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται στην παρούσα δοκιμή φυτά που έχουν εκτεθεί σε χημικούς μολυντές ή έχουν συλλεχθεί από τοποθεσίες που είναι γνωστό ότι έχουν μολυνθεί.

21. Σε περιοχές όπου το *M. spicatum* δεν είναι άμεσα διαθέσιμο τους χειμερινούς μήνες, μπορεί να είναι αναγκαία η μακροχρόνια διατήρηση αποθεματικών καλλιεργειών σε θερμοκήπια ή σε εργαστηριακές συνθήκες. Οι αποθεματικές καλλιέργειες θα πρέπει να διατηρούνται υπό συνθήκες παρόμοιες με εκείνες της δοκιμής, ενδεχομένως όμως με ελαττωμένη ροή φωτεινής ακτινοβολίας και θερμοκρασία, ώστε να μειώνεται η συχνότητα συντήρησης των καλλιεργειών (π.χ. όταν δεν έχει προγραμματιστεί η διεξαγωγή δοκιμών σε μυριόφυλλο για κάποιο διάστημα). Συνιστάται η χρήση μεγαλύτερων ενυδρείων και γλαστρών από εκείνα που προβλέπεται να χρησιμοποιηθούν στις δοκιμές, ώστε να υπάρχει χώρος για πολλαπλασιασμό. Η σύνθεση των ιζημάτων και των υδατικών θρεπτικών μέσων θα πρέπει να είναι η ίδια με εκείνη που προβλέπεται να χρησιμοποιηθεί στις δοκιμές, αν και επιτρέπεται η εφαρμογή εναλλακτικών μεθόδων για τη λίπανση του ιζήματος (π.χ. χρήση εμπορικών σκευασμάτων λιπασμάτων βραδείας αποδέσμευσης).

22. Τα απόθεμα φυτών θα πρέπει να είναι εμφανώς απαλλαγμένο από μόλυνση από άλλους οργανισμούς, όπως τα σαλιγκάρια, τα νηματοειδή φύκη, οι μύκητες και τα έντομα, π.χ. αυγά ή προνύμφες του σκόρου *Paraponyx stratiotata* και προνύμφες ή ενήλικα άτομα του εντόμου *Eubrychius velutus* της οικογένειας των κουρκουλιονιδών. Μπορεί να είναι αναγκαία η έκπλυση του φυτικού υλικού με γλυκό νερό για την εξάλειψη της ορατής μόλυνσης. Επιπροσθέτως, θα πρέπει να καταβάλλονται προσπάθειες για την ελαχιστοποίηση της ανάπτυξης μονοκύτταρων φυκών και της βακτηριδιακής μόλυνσης, αν και δεν είναι απαραίτητη η πλήρης στειρότητα του φυτικού υλικού. Οι αποθεματικές καλλιέργειες θα πρέπει να παρακολουθούνται και να μεταφυτεύονται, εάν είναι αναγκαίο, για την αποφυγή της μόλυνσης από φύκη και βακτηρίδια. Ο αερισμός των αποθεματικών καλλιεργειών μπορεί να είναι επωφελής σε περίπτωση προβλημάτων λόγω μόλυνσης από φύκη ή βακτηρίδια.

23. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα φυτά καλλιεργούνται/εγκλιματίζονται υπό συνθήκες παρόμοιες, αλλά όχι κατ' ανάγκη πανομοιότυπες με εκείνες που χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια της δοκιμής, για επαρκές χρονικό διάστημα (δηλ. > 2 εβδομάδων) πριν από τη χρήση τους σε δοκιμή.

24. Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε δοκιμή αποθεματικές καλλιέργειες σε ανθοφορία, διότι οι ρυθμοί βλαστικής αύξησης κατά κανόνα μειώνονται κατά τη διάρκεια της ανθοφορίας και μετά από αυτήν.

▼M7

Ίζημα

25. Συνιστάται να χρησιμοποιείται στην παρούσα δοκιμή το ακόλουθο μορφοποιημένο ίζημα, το οποίο έχει ως βάση το τεχνητό ίζημα που χρησιμοποιείται στο κεφάλαιο Γ.28 του παρόντος παραρτήματος (8): Το ίζημα παρασκευάζεται όπως περιγράφεται στη μέθοδο δοκιμών Γ.28, εκτός από την προσθήκη θρεπτικών στοιχείων όπως περιγράφεται κατωτέρω:

α) 4-5 % τύρφης (ξηρό βάρος, που ισοδυναμεί με με 2 ± 0,5 % οργανικού άνθρακα) με τιμή pH όσο το δυνατόν πλησιέστερη στο 5,5 έως 6,0· είναι σημαντικό να χρησιμοποιείται σκόνη τύρφης, λεπτόκοκκη (με μέγεθος σωματιδίων ≤ 1 mm κατά προτίμηση) και μόνο αερόξηρη.

β) 20 % (ξηρό βάρος) καολίνη (περιεκτικότητα σε καολινίτη κατά προτίμηση άνω του 30 %).

γ) 75-76 % (ξηρό βάρος) χαλαζιακής άμμου (θα πρέπει να επικρατεί η λεπτή άμμος, με ποσοστό σωματιδίων μεγέθους μεταξύ 50 και 200 μm άνω του 50 %).

δ) Προστίθεται υδατικό θρεπτικό μέσο, έτσι ώστε η τελική παρτίδα ιζήματος να περιέχει χλωριούχο αμμώνιο και φωσφορικό νάτριο σε συγκέντρωση 200 mg/kg ξηρού ιζήματος το καθένα και η υγρασία του τελικού μείγματος να είναι της τάξης του 30-50 %.

ε) Προστίθεται χημικώς καθαρό ανθρακικό ασβέστιο ($CaCO_3$) για τη ρύθμιση του pH του τελικού μείγματος του ιζήματος στην τιμή 7,0 ± 0,5.

26. Η πηγή της τύρφης, του καολίνη και της άμμου θα πρέπει να είναι γνωστή και τεκμηριωμένη. Εάν η προέλευση είναι άγνωστη ή προκαλεί ανησυχία, θα πρέπει να ελέγχονται τα αντίστοιχα συστατικά για απουσία χημικής μόλυνσης (π.χ. από βαρέα μέταλλα, οργανοχλωριούχες ενώσεις, οργανοφωσφορικές ενώσεις).

27. Τα ξηρά συστατικά του ιζήματος θα πρέπει να αναμειγνύονται ομοιογενώς πριν από την πλήρη ανάμειξη του υδατικού θρεπτικού διαλύματος με το ίζημα. Το νωπό ίζημα θα πρέπει να παρασκευάζεται τουλάχιστον δύο ημέρες πριν από τη χρήση, ώστε να είναι δυνατή η πλήρης διαβροχή της τύρφης και να αποτρέπεται η επίπλευση υδρόφοβων σωματιδίων τύρφης στην επιφάνεια, όταν το ίζημα επικαλύπτεται με το θρεπτικό μέσο. Πριν από τη χρήση, το νωπό ίζημα μπορεί να φυλάσσεται στο σκοτάδι.

28. Για τη διεξαγωγή της δοκιμής, το ίζημα μεταφέρεται σε περιέκτες κατάλληλου μεγέθους, όπως γλάστρες με διάμετρο που ταιριάζει με τα γυάλινα δοχεία (η επιφάνεια του ιζήματος θα πρέπει να καλύπτει περίπου το 70 % ή μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας του δοχείου). Στις περιπτώσεις που υπάρχουν οπές στη βάση του περιέκτη, η τοποθέτηση διηθητικού χαρτιού στον πυθμένα του διευκολύνει τη συγκράτηση του ιζήματος μέσα στον περιέκτη. Οι γλάστρες πληρούνται με το ίζημα κατά τρόπο ώστε η επιφάνειά του να είναι επίπεδη, πριν αυτό καλυφθεί με λεπτή στρώση (~ 2 έως 3 mm) αδρανούς υλικού, π.χ. άμμο, ψιλό χαλίκι κήπου (ή θραύσματα κοραλλιών), για να παραμένει στη θέση του.

Θρεπτικό μέσο δοκιμής

29. Για την καλλιέργεια *Myriophyllum spicatum* και τη διεξαγωγή των σχετικών δοκιμών συνιστάται το θρεπτικό μέσο Smart and Barko (12). Η παρασκευή αυτού του θρεπτικού μέσου περιγράφεται στο προσάρτημα 1. Το pH των θρεπτικών μέσων (υδατική φάση) κατά την έναρξη της δοκιμής θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 7,5 και 8,0 για να επιτυγχάνεται η άριστη ανάπτυξη των φυτών.

Σχεδιασμός του πειράματος

30. Η δοκιμή θα πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον έξι δοκιμαστικά δοχεία επαναλήψεων για τον μάρτυρα που δεν υποβάλλεται σε μεταχείριση και τουλάχιστον τέσσερα δοκιμαστικά δοχεία επαναλήψεων για το καθένα από τουλάχιστον πέντε επίπεδα συγκέντρωσης.

31. Εάν δεν απαιτείται προσδιορισμός της NOEC, ο σχεδιασμός της δοκιμής είναι δυνατόν να τροποποιηθεί, ώστε να αυξηθεί ο αριθμός των συγκεντρώσεων και να μειωθεί ο αριθμός των επαναλήψεων ανά συγκέντρωση.

▼M7

32. Κάθε δοκιμαστικό δοχείο αντιπροσωπεύει επανάληψη που περιέχει τρεις βλαστούς. Υπάρχουν δύο επιλογές για την καλλιέργεια τριών βλαστών σε κάθε δοκιμαστικό δοχείο:

— Σχεδιασμός δοκιμής Α: ένας βλαστός ανά γλάστρα και τρεις γλάστρες ανά δοχείο.

— Σχεδιασμός δοκιμής Β: τρεις βλαστοί ανά γλάστρα και μία γλάστρα ανά δοχείο.

— Εναλλακτικοί σχεδιασμοί δοκιμής με έναν βλαστό ανά γλάστρα ανά δοκιμαστικό δοχείο είναι αποδεκτοί υπό την προϋπόθεση ότι η επανάληψη προσαρμόζεται όπως απαιτείται για την εκπλήρωση των απαιτούμενων κριτηρίων εγκυρότητας.

33. Τα επιμέρους δοκιμαστικά δοχεία θα πρέπει να εντάσσονται με τυχαίο τρόπο στις ομάδες μεταχείρισης. Απαιτείται τυχαιοποιημένος σχεδιασμός για τη θέση των δοκιμαστικών δοχείων στον χώρο δοκιμής, ώστε να ελαχιστοποιείται η επιρροή των χωρικών διαφορών ως προς τη φωτεινή ένταση ή τη θερμοκρασία.

Συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και ομάδες μαρτύρων

34. Οι συγκεντρώσεις θα πρέπει κατά κανόνα να ακολουθούν γεωμετρική σειρά· ο λόγος προόδου δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 3,2. Η προηγούμενη γνώση της τοξικότητας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μέσω δοκιμής προσδιορισμού περιοχής συγκεντρώσεων διευκολύνει την επιλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων δοκιμής.

35. Για τον προσδιορισμό μιας EC_x, η τιμή της θα πρέπει να περικλείεται από τις συγκεντρώσεις δοκιμής, ώστε να εξασφαλίζεται το ενδεδειγμένο επίπεδο εμπιστοσύνης. Για παράδειγμα, εάν πρόκειται να εκτιμηθεί η EC_{50}, η υψηλότερη συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να υπερβαίνει την τιμή της EC_{50}. Εάν η τιμή της EC_{50} βρίσκεται εκτός του εύρους των συγκεντρώσεων δοκιμής, τα σχετικά διαστήματα εμπιστοσύνης θα είναι μεγάλα, με αποτέλεσμα να καθίσταται ενδεχομένως αδύνατη η ορθή αξιολόγηση της στατιστικής προσαρμογής του μοντέλου. Η χρήση περισσότερων συγκεντρώσεων δοκιμής βελτιώνει το διάστημα εμπιστοσύνης που περιβάλλει την προκύπτουσα τιμή EC_x.

36. Για τον προσδιορισμό της LOEC/NOEC (προαιρετικό τελικό σημείο), η χαμηλότερη συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να είναι αρκούντως χαμηλή, ώστε η αύξηση να μη διαφέρει σημαντικά από την αύξηση των φυτών-μαρτύρων. Επιπλέον, η υψηλότερη συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να είναι αρκούντως υψηλή, ώστε η αύξηση να είναι σημαντικά μικρότερη από την αύξηση του μάρτυρα. Η χρήση περισσότερων επαναλήψεων ενισχύει τη στατιστική ισχύ του σχεδιασμού με βάση τη συγκέντρωση χωρίς επίδραση/ANOVA.

Οριακή δοκιμή

37. Όταν από δοκιμή προσδιορισμού περιοχής συγκεντρώσεων συνάγεται ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν έχει δυσμενή επίδραση σε συγκεντρώσεις έως 100 mg/l ή έως το όριο διαλυτότητάς της στο θρεπτικό μέσο δοκιμής ή, σε περίπτωση σκευάσματος, έως το όριο διασπαρσιμότητάς του, είναι δυνατόν να διεξαχθεί οριακή δοκιμή για να διευκολυνθεί η σύγκριση των αποκρίσεων μιας ομάδας μαρτύρων και μιας ομάδας μεταχείρισης — 100 mg/l ή συγκέντρωση ίση με το όριο διαλυτότητας ή 1 000 mg/kg ξηρού ιζήματος. Στη δοκιμή αυτή θα πρέπει να τηρούνται οι γενικές αρχές των τυπικών δοκιμών δόσης-απόκρισης, με εξαίρεση το ότι συνιστάται η αύξηση του ελάχιστου αριθμού επαναλήψεων σε έξι δοκιμαστικά δοχεία ανά μάρτυρα και συγκέντρωση. Η αύξηση των φυτών στην ομάδα μαρτύρων και στην ομάδα μεταχείρισης μπορεί να αναλυθεί με στατιστικό έλεγχο σύγκρισης μέσων τιμών, π.χ. έλεγχο t του Student.

Διαλύματα δοκιμής

38. Τα διαλύματα δοκιμής παρασκευάζονται συνήθως με αραίωση διαλύματος παρακαταθήκης, που παρασκευάζεται με διάλυση ή διασπορά της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο θρεπτικό μέσο Smart and Barko, με τη χρήση απιονισμένου ή απεσταγμένου νερού (βλ. προσάρτημα 1).

▼M7

39. Η ανώτατη συγκέντρωση δοκιμής δεν θα πρέπει κανονικά να υπερβαίνει την υδατοδιαλυτότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ή, στην περίπτωση των σκευασμάτων, τη διασπαρσιμότητα υπό τις συνθήκες δοκιμής.

40. Σε περίπτωση υπό δοκιμή χημικών ουσιών χαμηλής υδατοδιαλυτότητας, ενδέχεται να είναι απαραίτητο να παρασκευαστεί πυκνό διάλυμα ή διασπορά παρακαταθήκης της χημικής ουσίας με τη βοήθεια οργανικού διαλύτη ή μέσου διασποράς, ώστε να διευκολυνθεί η προσθήκη επακριβών ποσοτήτων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο θρεπτικό μέσο δοκιμής και να υποβοηθηθεί η διασπορά ή η διάλυσή της. Θα πρέπει να καταβάλλεται κάθε δυνατή προσπάθεια για την αποφυγή της χρήσης τέτοιων διαλυτών ή μέσων διασποράς. Η χρήση βοηθητικών διαλυτών ή μέσων διασποράς δεν θα πρέπει να προκαλεί φυτοτοξικότητα. Παραδείγματα διαλυτών ευρείας χρήσης που δεν προκαλούν φυτοτοξικότητα σε συγκεντρώσεις έως 100 μl/l είναι η ακετόνη και το διμεθυλοφορμαμίδιο. Σε περίπτωση χρήσης διαλύτη ή μέσου διασποράς, η τελική του συγκέντρωση θα πρέπει να αναφέρεται και να διατηρείται σε ελάχιστα επίπεδα (≤ 100 μl/l). Υπό αυτές τις συνθήκες, όλες οι ομάδες μεταχείρισης και οι ομάδες μαρτύρων (με διαλύτη) θα πρέπει να περιέχουν την ίδια συγκέντρωση διαλύτη ή μέσου διασποράς. Στον σχεδιασμό της δοκιμής ενσωματώνονται επίσης επαναλήψεις με μάρτυρες που δεν υποβάλλονται σε μεταχείριση και δεν περιέχουν διαλύτη ή μέσο διασποράς. Περαιτέρω καθοδήγηση για τη χρήση μέσων διασποράς παρέχεται στο έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ (11).

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

41. Η διαδικασία δοκιμής ποικίλλει ανάλογα με την οδό εφαρμογής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (δηλ. μέσω της υδατικής ή της ιζηματικής φάσης). Θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η πιθανή συμπεριφορά της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο σύστημα νερού-ιζήματος για την τροφοδότηση της επιλογής του συστήματος έκθεσης που χρησιμοποιείται στη δοκιμή (δηλ. στατικό ή στατικό με ανανέωση, εμβολιασμένου νερού ή εμβολιασμένου ιζήματος). Οι δοκιμές με εμβολιασμένο ίζημα μπορεί να είναι προτιμότερες σε ορισμένες περιπτώσεις χημικών ουσιών για τις οποίες προβλέπεται σημαντική κατανομή στο ίζημα.

Φάση εγκατάστασης

42. Υγιείς κορυφές/άκρες βλαστών, δηλ. χωρίς πλευρικούς βλαστούς, κόβονται από τα φυτά καλλιέργειας για να ληφθούν βλαστοί μήκους 6 cm (± 1 cm). Για τον σχεδιασμό δοκιμής Α (ένας βλαστός ανά γλάστρα και τρεις γλάστρες ανά δοχείο), φυτεύεται σε κάθε γλάστρα μία μόνο άκρη βλαστού. Για τον σχεδιασμό δοκιμής Β (τρεις βλαστοί ανά γλάστρα και μία γλάστρα ανά δοχείο), φυτεύονται σε κάθε γλάστρα που περιέχει το ίζημα τέσσερις έως πέντε κορυφές βλαστού.

43. Και στις δύο περιπτώσεις θα πρέπει να γίνονται φυτεύσεις σε περίσσεια γλαστρών, ώστε να υπάρχει δυνατότητα επιλογής ομοιόμορφων φυτών κατά την έναρξη της δοκιμής και να εξασφαλίζονται εφεδρικά φυτά με σκοπό, αφενός, να χρησιμοποιηθούν για την εξέταση της αύξησης των ριζών αμέσως πριν από τη μεταχείριση και, αφετέρου, να συγκομιστούν για μετρήσεις της βιομάζας και του μήκους των βλαστών την ημέρα 0.

44. Οι βλαστοί εισάγονται κατά τρόπον ώστε περίπου τρία εκατοστά τους, με δύο τουλάχιστον γόνατα, να βρίσκονται κάτω από την επιφάνεια του ιζήματος.

45. Στη συνέχεια οι γλάστρες μεταφέρονται σε δοκιμαστικά δοχεία υπό τις ίδιες συνθήκες περιβάλλοντος με αυτές της φάσης έκθεσης και διατηρούνται επί επτά ημέρες σε θρεπτικό μέσο Smart and Barko για την επαγωγή της ανάπτυξης των ριζών.

46. Μετά την παρέλευση αυτού του διαστήματος, θα πρέπει να εξάγονται αρκετά φυτά από τις εφεδρικές γλάστρες για την εξέταση της αύξησης των ριζών. Εάν δεν παρατηρείται αύξηση ριζών (δηλ. δεν φαίνονται άκρες ριζών), η φάση εγκατάστασης θα πρέπει να παρατείνεται μέχρι να είναι ορατή η αύξηση των ριζών. Το στάδιο αυτό συνιστάται για να εξασφαλίζεται ότι τα φυτά αναπτύσσονται ζωηρά κατά την έναρξη της δοκιμής.

▼M7

Επιλογή ομοιόμορφου φυτικού υλικού

47. Για τον σχεδιασμό δοκιμής Α (ένας βλαστός ανά γλάστρα και τρεις γλάστρες ανά δοχείο) επιλέγονται γλάστρες με κριτήριο την ομοιομορφία πριν από την έναρξη της δοκιμής. Για τον σχεδιασμό δοκιμής Β (τρεις βλαστοί ανά γλάστρα και μια γλάστρα ανά δοχείο), αφαιρούνται πλεονάζοντα φυτά για να απομείνουν τρία ομοιόμορφα φυτά ως προς το μέγεθος και την εμφάνιση.

Έκθεση μέσω της υδατικής φάσης

48. Οι γλάστρες, που έχουν επιλεγεί με κριτήριο την ομοιομορφία, τοποθετούνται στα δοκιμαστικά δοχεία, όπως απαιτείται σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό. Στη συνέχεια, προστίθεται στα δοκιμαστικά δοχεία θρεπτικό μέσο Smart and Barko. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγεται η διατάραξη του ιζήματος. Για τον σκοπό αυτό, τα θρεπτικά μέσα μπορούν να προστίθενται με τη βοήθεια χοάνης ή μετά την τοποθέτηση πλαστικού δίσκου για να καλύπτεται το ίζημα καθώς το θρεπτικό μέσο μεταγγίζεται στα δοκιμαστικά δοχεία, υπό τον όρο ότι ο δίσκος απομακρύνεται αμέσως μετά. Εναλλακτικά, οι γλάστρες μπορούν να τοποθετηθούν στα δοκιμαστικά δοχεία μετά την προσθήκη των θρεπτικών μέσων. Και στις δύο περιπτώσεις, μπορούν να χρησιμοποιούνται πρόσφατα παρασκευασμένα θρεπτικά μέσα στην αρχή της φάσης έκθεσης, εάν αυτό είναι απαραίτητο για να ελαχιστοποιηθεί η δυνητική συσσώρευση φυκών και βακτηριδίων ή για την παρασκευή μεμονωμένων παρτίδων του διαλύματος δοκιμής σε επαναλήψεις.

49. Μετράται το μήκος των βλαστών που προεξέχει από το ίζημα, είτε πριν είτε μετά την προσθήκη του θρεπτικού μέσου.

50. Οι αντίστοιχες ποσότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μπορούν να προστεθούν στο θρεπτικό μέσο δοκιμής πριν από την προσθήκη του στα δοκιμαστικά δοχεία. Εναλλακτικά, η υπό δοκιμή χημική ουσία μπορεί να εισαχθεί στο θρεπτικό μέσο μετά την προσθήκη του στα δοκιμαστικά δοχεία. Σε αυτή την περίπτωση, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να εξασφαλίζεται ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία κατανέμεται ομοιόμορφα σε όλο το σύστημα δοκιμής χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα.

51. Σε όλες τις περιπτώσεις, καταγράφεται η εμφάνιση (π.χ. διαύγεια, θολότητα κ.λπ.) του θρεπτικού μέσου δοκιμής κατά την έναρξη της δοκιμής.

Έκθεση μέσω ιζήματος

52. Παρασκευάζονται ιζήματα εμβολιασμένα με την επιλεγμένη συγκέντρωση, με την απευθείας προσθήκη διαλύματος της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε πρόσφατα παρασκευασμένο ίζημα. Διάλυμα παρακαταθήκης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε απιονισμένο νερό αναμειγνύεται με το μορφοποιημένο ίζημα με τη βοήθεια πρέσας, αναμείκτη τροφών ή χειρωνακτικά. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι δυσδιάλυτη στο νερό, μπορεί να διαλυθεί σε όσο το δυνατό μικρότερο όγκο κατάλληλου οργανικού διαλύτη (π.χ. εξάνιο, ακετόνη ή χλωροφόρμιο). Στη συνέχεια το διάλυμα αυτό αναμειγνύεται με περίπου 10 γρ. λεπτής χαλαζιακής άμμου ανά δοκιμαστικό δοχείο. Ο διαλύτης αφήνεται να εξατμιστεί και η άμμος αναμιγνύεται στη συνέχεια με την κατάλληλη για ένα ποτήρι ζέσεως ποσότητα ιζήματος. Για τη διαλυτοποίηση, τη διασπορά ή τη γαλακτωματοποίηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μπορούν να χρησιμοποιούνται μόνο μέσα που εξατμίζονται εύκολα. Υπενθυμίζεται ότι, στο τελικό παρασκεύασμα του ιζήματος, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ο όγκος/το βάρος της άμμου που εμβολιάζεται με την υπό δοκιμή χημική ουσία (δηλ. το ίζημα θα πρέπει επομένως να παρασκευάζεται με λιγότερη άμμο). Πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να εξασφαλίζεται ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία που προστίθεται στο ίζημα κατανέμεται πλήρως και ομοιογενώς μέσα στο ίζημα.

53. Το εμβολιασμένο ίζημα τοποθετείται στις γλάστρες (όπως περιγράφεται ανωτέρω). Τα φυτά, τα οποία έχουν επιλεγεί με κριτήριο την ομοιομορφία και ένα επαρκές ριζικό σύστημα, εξάγονται από τις γλάστρες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη φάση της εγκατάστασης και μεταφυτεύονται στο εμβολιασμένο ίζημα, όπως περιγράφεται ανωτέρω.

54. Οι γλάστρες τοποθετούνται μέσα στα δοκιμαστικά δοχεία, όπως απαιτείται σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό. Στη συνέχεια, προστίθεται θρεπτικό μέσο Smart and Barko προσεκτικά (δηλ. με τη βοήθεια χοάνης) για να αποφευχθεί η διατάραξη του ιζήματος. Μετράται το μήκος των βλαστών που προεξέχει από το ίζημα, είτε πριν είτε μετά την προσθήκη του θρεπτικού μέσου.

▼M7

Διατήρηση της στάθμης του νερού κατά τη διάρκεια της δοκιμής

55. Πρέπει να καταγράφεται ο τελικός όγκος νερού και να σημειώνεται η στάθμη του νερού σε κάθε δοκιμαστικό δοχείο. Εάν εξατμιστεί περισσότερο από το 10 % του νερού κατά τη διάρκεια της δοκιμής, η στάθμη του θα πρέπει να ρυθμιστεί με απεσταγμένο νερό. Εάν είναι απαραίτητο, τα ποτήρια ζέσεως επιτρέπεται να καλύπτονται με χαλαρό διαφανές κάλυμμα, π.χ. από διαφανές πλαστικό, ώστε να ελαχιστοποιούνται η εξάτμιση και η μόλυνση με σπόρια φυκών.

Συνθήκες δοκιμής

56. Χρησιμοποιείται φωτισμός με θερμό και/ή ψυχρό λευκό φως φθορισμού, ώστε να εξασφαλίζεται ροή φωτεινής ακτινοβολίας της τάξεως των 140 (± 20) $\mu E \cdot m^{-2} s^{-1}$ μετρούμενη ως φωτοσυνθετικά ενεργός ακτινοβολία (μήκος κύματος 400-700 nm) στην επιφάνεια του νερού και με κύκλο φωτός-σκότους 16:8 ωρών. Οποιαδήποτε απόκλιση από την επιλεγείσα ροή φωτεινής ακτινοβολία στον χώρο της δοκιμής δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το εύρος ± 15 %.

57. Η θερμοκρασία στα δοκιμαστικά δοχεία θα πρέπει να είναι 20 ± 2 °C.

58. Το pH του θρεπτικού μέσου μάρτυρα δεν θα πρέπει να αυξάνεται κατά περισσότερο από 1,5 μονάδες στη διάρκεια της δοκιμής. Ωστόσο, αποκλίσεις άνω των 1,5 μονάδων δεν ακυρώνουν τη δοκιμή, εάν είναι δυνατόν να αποδειχθεί ότι πληρούνται τα κριτήρια εγκυρότητας που προσδιορίζονται ανωτέρω.

Διάρκεια της δοκιμής

59. Η διάρκεια της δοκιμής είναι 14 ημέρες.

Μετρήσεις και αναλυτικοί προσδιορισμοί

60. Μετά τη φάση εγκατάστασης και αμέσως πριν από τη μεταχείριση (δηλ. την ημέρα 0), συγκομίζονται εφεδρικά φυτά από πέντε τυχαία επιλεγόμενες γλάστρες για τον σχεδιασμό που προβλέπει τρία φυτά ανά γλάστρα ή από 15 γλάστρες για τον σχεδιασμό που προβλέπει ένα φυτό ανά γλάστρα, με σκοπό την αξιολόγηση του μήκους και του νωπού και ξηρού βάρους των βλαστών, όπως περιγράφεται κατωτέρω.

61. Για τα φυτά που μεταφέρονται στη φάση έκθεσης, γίνονται οι ακόλουθες αξιολογήσεις, όπως φαίνεται στον πίνακα 1:

— Αξιολογήσεις του μήκους του κύριου βλαστού, του αριθμού των πλευρικών βλαστών και του μήκους των πλευρικών βλαστών, οι οποίες καταγράφονται τουλάχιστον στο τέλος της περιόδου έκθεσης (π.χ. την ημέρα 14).

— Μακροσκοπικές αξιολογήσεις της υγείας των φυτών, οι οποίες καταγράφονται τουλάχιστον τρεις φορές κατά τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης (πχ. τις ημέρες 0, 7 και 14).

— Αξιολογήσεις του νωπού και του ξηρού βάρους των βλαστών, οι οποίες πραγματοποιούνται στο τέλος της δοκιμής (δηλ. την ημέρα 14).

62. Το μήκος των βλαστών προσδιορίζεται με τη χρήση κανόνα. Εάν υπάρχουν πλευρικοί βλαστοί, θα πρέπει επίσης να μετρούνται ο αριθμός και το μήκος τους.

63. Οι μακροσκοπικές αξιολογήσεις της υγείας των φυτών διενεργούνται με καταγραφή της εμφάνισης των φυτών και της γενικής κατάστασης του θρεπτικού μέσου δοκιμής. Στις παρατηρήσεις που πρέπει να σημειώνονται περιλαμβάνονται τα εξής:

— Νέκρωση, χλώρωση ή άλλα προβλήματα αποχρωματισμού, όπως η υπερβολική ερυθρότητα σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες.

— Μόλυνση από βακτηρίδια ή από φύκη.

— Ανωμαλίες ανάπτυξης, όπως νανισμός, μεταβολή του μήκους μεσογονάτιων διαστημάτων, παραμόρφωση βλαστών/φύλλων, πολλαπλασιασμός πλευρικών βλαστών, απώλεια φύλλων, απώλεια σπαργής και κατακερματισμός μίσχων.

▼M7

— Μακροσκοπικές αξιολογήσεις της υγείας των ριζών κατά τον τερματισμό της δοκιμής, με προσεκτική απομάκρυνση του ιζήματος από τις ρίζες με έκπλυση, ώστε να είναι δυνατή η παρατήρηση του ριζικού συστήματος. Προτείνεται η ακόλουθη κλίμακα αξιολόγησης σε σχέση με τα φυτάμάρτυρες:

1) απουσία ριζών

2) ελάχιστες ρίζες

3) μέτρια ανάπτυξη ριζών

4) πολύ καλή ανάπτυξη ριζών, παρόμοια με αυτή των μαρτύρων

64. Οι αξιολογήσεις του νωπού βάρους πραγματοποιούνται στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής με κοπή του βλαστού στο επίπεδο του ιζήματος και στέγνωμα πριν από τη ζύγιση. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για την απομάκρυνση των σωματιδίων ιζήματος που μπορεί να προσκολληθούν στη βάση των βλαστών. Στη συνέχεια, το υλικό βλαστών τοποθετείται σε κλίβανο ξήρανσης σε θερμοκρασία περίπου 60 °C και ξηραίνεται μέχρι σταθερού βάρους, πριν από τη νέα ζύγιση και την καταγραφή του ξηρού βάρους.

65. Σύνοψη των ελάχιστων βιολογικών αξιολογήσεων που απαιτούνται κατά τη διάρκεια της δοκιμής παρατίθεται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1

Χρονοδιάγραμμα αξιολόγησης

Ημέρα μετά τη μεταχείριση (ΗΜΑ)	*Myriophyllum spicatum*			
	Μήκος βλαστών, μήκος και αριθμός πλευρικών βλαστών	Μακροσκοπική αξιολόγηση των βλαστών	Νωπό και ξηρό βάρος βλαστών, μακροσκοπική αξιολόγηση των ριζών	pH O_2
0	A	A	A	A
4	—	—	—	—
7	—	A	—	A
14	A	A	A	A

A: δηλώνει ότι απαιτούνται αξιολογήσεις κατά τον συγκεκριμένο χρόνο
—: δηλώνει ότι δεν απαιτούνται μετρήσεις

Συχνότητα των μετρήσεων και των αναλυτικών προσδιορισμών

66. Θα πρέπει να καταγράφεται, τουλάχιστον ημερησίως (ή αδιαλείπτως με καταγραφέα δεδομένων), η θερμοκρασία του θρεπτικού μέσου σε υποκατάστατο δοχείο, το οποίο διατηρείται υπό τις ίδιες συνθήκες στον θάλαμο, τον επωαστήρα ή την αίθουσα ανάπτυξης.

67. Το pH και η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου του θρεπτικού μέσου δοκιμής θα πρέπει να ελέγχονται κατά την έναρξη της δοκιμής, τουλάχιστον μία φορά κατά τη διάρκεια της μελέτης και κατά τη λήξη της μελέτης σε όλα τα δοχεία επανάληψης. Κάθε φορά, οι μετρήσεις θα πρέπει να εκτελούνται την ίδια ώρα της ημέρας. Εάν χρησιμοποιούνται διαλύματα μεγάλου όγκου για την πλήρωση όλων των δοχείων επανάληψης με κάθε συγκέντρωση δοκιμής, είναι αποδεκτή μία μόνο μέτρηση σε κάθε διάλυμα μεγάλου όγκου την ημέρα 0.

68. Η ροή φωτεινής ακτινοβολίας θα πρέπει να μετράται στον θάλαμο, τον επωαστήρα ή την αίθουσα ανάπτυξης, σε σημεία που βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο με τη στάθμη του νερού. Οι μετρήσεις θα πρέπει να εκτελούνται τουλάχιστον μία φορά κατά την έναρξη ή κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Η μέθοδος ανίχνευσης και μέτρησης του φωτός, ιδίως δε ο τύπος του αισθητήρα, επηρεάζουν τη μετρούμενη τιμή. Οι σφαιρικοί αισθητήρες (που αποκρίνονται στο φως το οποίο εκπέμπεται από όλες τις γωνίες επάνω και κάτω

▼M7

από το επίπεδο μέτρησης) και οι αισθητήρες συνημιτόνου (που αποκρίνονται στο φως το οποίο εκπέμπεται από όλες τις γωνίες επάνω από το επίπεδο μέτρησης) προτιμώνται έναντι των αισθητήρων μονής κατεύθυνσης και παρέχουν μεγαλύτερες ενδείξεις για τις πολυσημειακές φωτεινές πηγές του είδους που περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο.

Αναλυτικές μετρήσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας

69. Η ορθή εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να υποστηρίζεται από αναλυτικές μετρήσεις των συγκεντρώσεών της.

70. Θα πρέπει να συλλέγονται δείγματα νερού για ανάλυση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας λίγο μετά την έναρξη της δοκιμής (δηλ. την ημέρα εφαρμογής για σταθερές υπό δοκιμή χημικές ουσίες ή μία ώρα μετά την εφαρμογή για χημικές ουσίες που δεν είναι σταθερές) και στο τέλος της δοκιμής για όλες τις συγκεντρώσεις δοκιμής.

71. Οι συγκεντρώσεις στο ίζημα και στο ενδοπορικό νερό θα πρέπει να προσδιορίζονται κατά την έναρξη και στο τέλος της δοκιμής, τουλάχιστον στην υψηλότερη συγκέντρωση δοκιμής, εκτός εάν είναι γνωστή η σταθερότητα των υπό δοκιμή χημικών ουσιών στο νερό (> 80 % της ονομαστικής). Οι μετρήσεις στο ίζημα και το ενδοπορικό νερό μπορεί να μην είναι απαραίτητες, εάν η κατανομή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μεταξύ νερού και ιζήματος έχει προσδιοριστεί σαφώς σε μελέτη με σύστημα νερού/ιζήματος υπό ανάλογες συνθήκες (π.χ. αναλογία ιζήματος προς νερό, μέθοδος εφαρμογής, τύπος ιζήματος).

72. Η δειγματοληψία ιζήματος κατά την έναρξη της δοκιμής μπορεί να διαταράξει το σύστημα δοκιμής. Ως εκ τούτου, μπορεί να απαιτηθεί η υποβολή πρόσθετων δοκιμαστικών δοχείων σε μεταχείριση για τη διευκόλυνση των αναλυτικών προσδιορισμών κατά την έναρξη και τον τερματισμό της δοκιμής. Ομοίως, όταν κρίνεται αναγκαία η διενέργεια ενδιάμεσων αξιολογήσεων, δηλ. την ημέρα 7, και οι αναλύσεις απαιτούν μεγάλα δείγματα ιζήματος που δεν είναι δυνατόν να αφαιρεθούν εύκολα από το σύστημα δοκιμής, οι αναλυτικοί προσδιορισμοί θα πρέπει να εκτελούνται με τη χρήση πρόσθετων δοκιμαστικών δοχείων, τα οποία υποβάλλονται στην ίδια μεταχείριση όπως και εκείνα που χρησιμοποιούνται για τις βιολογικές αξιολογήσεις.

73. Για την απομόνωση του ενδοπορικού νερού συνιστάται φυγοκέντρηση, π.χ. σε 10.000 g και 4°C για 30 λεπτά. Ωστόσο, εάν καταδεικνύεται ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν προσροφάται στους ηθμούς, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της διήθησης. Σε ορισμένες περιπτώσεις ενδέχεται να είναι αδύνατη η αναλυτική μέτρηση των συγκεντρώσεων στο ενδοπορικό νερό, εάν το μέγεθος δείγματος είναι υπερβολικά μικρό.

74. Στις ημιστατικές δοκιμές (δηλ. έκθεση μέσω της υδατικής φάσης), όταν αναμένεται ότι, χωρίς ανανέωση των διαλυμάτων δοκιμής, η συγκέντρωση των υπό δοκιμή χημικών ουσιών δεν θα παραμείνει εντός των ορίων της ονομαστικής συγκέντρωσης ± 20 % κατά τη διάρκεια της δοκιμής, θα πρέπει να λαμβάνονται δείγματα από χρησιμοποιημένα και πρόσφατα παρασκευασμένα διαλύματα δοκιμής για αναλυτικές μετρήσεις της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε κάθε ανανέωση.

75. Όταν η μετρηθείσα αρχική συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας δεν είναι εντός των ορίων της ονομαστικής συγκέντρωσης ± 20 %, αλλά μπορούν να προσκομιστούν επαρκή στοιχεία που αποδεικνύουν ότι οι αρχικές συγκεντρώσεις είναι επαναλήψιμες και σταθερές (δηλ. εντός εύρους τιμών από 80 έως 120 % της αρχικής συγκέντρωσης), επιτρέπεται να εκτελείται χημικός προσδιορισμός μόνο για την ανώτατη και την κατώτατη συγκέντρωση δοκιμής.

76. Σε όλες τις περιπτώσεις, ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας πρέπει να γίνεται μόνο σε ένα δοχείο επανάληψης σε κάθε συγκέντρωση δοκιμής. Εναλλακτικά, τα διαλύματα δοκιμής από όλες τις επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση μπορούν να συνενώνονται για ανάλυση.

77. Εάν υπάρχουν στοιχεία που αποδεικνύουν ότι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας έχει διατηρηθεί εντός των ορίων της ονομαστικής ή μετρηθείσας αρχικής συγκέντρωσης ± 20 % σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής, η ανάλυση των αποτελεσμάτων και η μετέπειτα συναγωγή των τελικών σημείων μπορούν να βασίζονται στις ονομαστικές ή τις μετρηθείσες αρχικές τιμές.

▼M7

78. Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι συγκεντρώσεις με επίδραση θα πρέπει να βασίζονται στις ονομαστικές ή τις μετρηθείσες συγκεντρώσεις στο νερό στην αρχή της δοκιμής.

79. Εντούτοις, εάν υπάρχουν στοιχεία που αποδεικνύουν ότι η συγκέντρωση μειώθηκε (δηλ. δεν διατηρήθηκε εντός ορίου 20 % σε σχέση με την ονομαστική ή την αρχικώς μετρηθείσα συγκέντρωση στο διαμέρισμα που υποβλήθηκε σε μεταχείριση) καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής, η ανάλυση των αποτελεσμάτων θα πρέπει να βασίζεται στον γεωμετρικό μέσο των συγκεντρώσεων κατά τη διάρκεια της έκθεσης ή σε μοντέλα που περιγράφουν τη μείωση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο διαμέρισμα που υποβλήθηκε σε μεταχείριση (11).

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

80. Όταν απαιτείται η χρήση διαλύτη / μέσου διασποράς, τα δεδομένα από τους μάρτυρες με διαλύτη και τους μη υποβληθέντες σε μεταχείριση μάρτυρες επιτρέπεται να συνενώνονται για τους σκοπούς των στατιστικών αναλύσεων, υπό την προϋπόθεση ότι οι αποκρίσεις των μαρτύρων με διαλύτη και των μη υποβληθέντων σε μεταχείριση μαρτύρων δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Μεταβλητές απόκρισης

81. Σκοπός της δοκιμής είναι ο προσδιορισμός των επιδράσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στη βλαστητική ανάπτυξη του υπό δοκιμή είδους, με τη χρήση δύο μεταβλητών απόκρισης, συγκεκριμένα του μέσου ειδικού ρυθμού αύξησης και της απόδοσης, ως εξής:

Μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης

82. Αυτή η μεταβλητή απόκρισης βασίζεται στις μεταβολές των λογαρίθμων του συνολικού μήκους των βλαστών, του συνολικού νωπού βάρους και του συνολικού ξηρού βάρους των βλαστών με την πάροδο του χρόνου στους μάρτυρες και σε κάθε ομάδα μεταχείρισης. Υπολογίζεται για κάθε επανάληψη κάθε ομάδας μαρτύρων και ομάδας μεταχείρισης. Το μέσο μήκος και βάρος των τριών φυτών ανά δοκιμαστικό δοχείο (επανάληψη) και, εν συνεχεία, ο ρυθμός αύξησης για κάθε επανάληψη θα πρέπει να υπολογίζονται σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

όπου:

μ_{i-j}: ο μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης κατά το χρονικό διάστημα i έως j,

N_i: η μετρούμενη μεταβλητή στο δοχείο δοκιμής ή μάρτυρα κατά τη χρονική στιγμή i,

N_j: η μετρούμενη μεταβλητή στο δοχείο δοκιμής ή μάρτυρα κατά τη χρονική στιγμή j,

t: το χρονικό διάστημα i έως j.

83. Από τις αποκρίσεις των επαναλήψεων, θα πρέπει να υπολογίζεται η μέση τιμή του ρυθμού αύξησης, συνοδευόμενη από εκτιμήσεις της διασποράς, για κάθε ομάδα μεταχείρισης και ομάδα μαρτύρων.

84. Ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης θα πρέπει να υπολογίζεται για τη συνολική διάρκεια της δοκιμής (η χρονική στιγμή «i» στον ανωτέρω τύπο είναι η αρχή της δοκιμής και η χρονική στιγμή «j» το τέλος της). Για κάθε συγκέντρωση δοκιμής και κάθε μάρτυρα, υπολογίζεται η μέση τιμή του μέσου ειδικού ρυθμού αύξησης, συνοδευόμενη από εκτίμηση της διασποράς.

▼M7

85. Στη συνέχεια, είναι δυνατόν να υπολογιστεί η εκατοστιαία αναστολή του ρυθμού αύξησης (I_r) για κάθε συγκέντρωση δοκιμής (ομάδα μεταχείρισης) σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

όπου:

% Ir: η εκατοστιαία αναστολή του μέσου ειδικού ρυθμού αύξησης

μC: η μέση τιμή του μ στον μάρτυρα

μT: η μέση τιμή του μ στην ομάδα μεταχείρισης

Απόδοση

86. Αυτή η μεταβλητή απόκρισης βασίζεται στις μεταβολές του συνολικού μήκους των βλαστών, του συνολικού νωπού βάρους και του συνολικού ξηρού βάρους των βλαστών με την πάροδο του χρόνου στους μάρτυρες και σε κάθε ομάδα μεταχείρισης. Η μέση εκατοστιαία αναστολή της απόδοσης (% Iy) μπορεί να υπολογιστεί για κάθε ομάδα μεταχείρισης με τον ακόλουθο τύπο:

$$\%I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C}$$

όπου:

% I_y: η εκατοστιαία μείωση της απόδοσης

b_C: η τελική βιομάζα μείον την αρχική βιομάζα στην ομάδα μάρτυρα

b_T: η τελική βιομάζα μείον την αρχική βιομάζα στην ομάδα μεταχείρισης.

Χάραξη των καμπυλών συγκέντρωσης-απόκρισης

87. Θα πρέπει να χαράσσονται καμπύλες συγκέντρωσης-απόκρισης που να συνδέουν τη μέση εκατοστιαία αναστολή της μεταβλητής της απόκρισης (I_r, or I_y), υπολογιζόμενη όπως υποδεικνύεται ανωτέρω, με τον λογάριθμο της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Εκτίμηση της EC_x

88. Οι εκτιμήσεις της EC_x (π.χ. EC_{50}) θα πρέπει να βασίζονται τόσο στον μέσο ειδικό ρυθμό αύξησης (E_rC_x) όσο και στην απόδοση (E_yC_x), ενώ καθεμία από τις τιμές αυτές θα πρέπει με τη σειρά της να βασίζεται στο συνολικό νωπό βάρος των βλαστών, στο συνολικό ξηρό βάρος τους και στο συνολικό μήκος τους.

89. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι τιμές EC_x που υπολογίζονται με τη χρήση των ανωτέρω δύο μεταβλητών απόκρισης δεν είναι συγκρίσιμες και η διαφορά αυτή αναγνωρίζεται όταν χρησιμοποιούνται τα αποτελέσματα της δοκιμής. Εφόσον τηρούνται οι συνθήκες δοκιμής που καθορίζονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, οι τιμές ECx που βασίζονται στον μέσο ειδικό ρυθμό αύξησης (E_rC_x) είναι στις περισσότερες περιπτώσεις υψηλότερες από τα αποτελέσματα που βασίζονται στην απόδοση (E_yC_x), λόγω της μαθηματικής βάσης της αντίστοιχης προσέγγισης. Αυτή η διαφορά δεν θα πρέπει να ερμηνεύεται ως διαφορά ευαισθησίας μεταξύ των δύο μεταβλητών απόκρισης· πρόκειται απλώς για μαθηματική διαφορά τιμών.

Στατιστικές διαδικασίες

90. Το ζητούμενο είναι να ληφθεί ποσοτική σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης με ανάλυση παλινδρόμησης. Είναι δυνατόν να εφαρμοστεί σταθμισμένη γραμμική παλινδρόμηση, μετά από γραμμικό μετασχηματισμό των δεδομένων απόκρισης, π.χ. σε μονάδες probit ή logit ή Weibull (13), αλλά προτιμώνται οι τεχνικές μη γραμμικής παλινδρόμησης, με τις οποίες αντιμετωπίζονται καλύτερα οι αναπόφευκτες ανωμαλίες των δεδομένων και οι αποκλίσεις τους από τις ομαλές κατανομές. Κοντά στις περιοχές είτε της μηδενικής

▼M7

είτε της πλήρους αναστολής, οι ανωμαλίες αυτές ενδέχεται να μεγεθυνθούν από τον μετασχηματισμό και να αλλοιώσουν την ανάλυση (13). Σημειωτέον ότι οι συνήθεις μέθοδοι ανάλυσης με χρήση αποτελεσμάτων μετασχηματισμού probit, logit ή Weibull προορίζονται για δεδομένα που δέχονται μόνο δύο τιμές (π.χ. θνησιμότητα ή επιβίωση) και θα πρέπει να τροποποιούνται για να καλύψουν δεδομένα ρυθμού αύξησης ή δεδομένα απόδοσης. Ειδικές διαδικασίες για τον προσδιορισμό των τιμών EC_x από συνεχή δεδομένα παρατίθενται στα έγγραφα (14) (15) (16) και (17).

91. Για κάθε μεταβλητή απόκρισης που πρόκειται να αναλυθεί, χρησιμοποιείται η σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης για να υπολογιστούν σημειακές εκτιμήσεις των τιμών EC_x. Προσδιορίζονται τα όρια εμπιστοσύνης 95 % για κάθε εκτίμηση, ενώ η ποιότητα προσαρμογής των δεδομένων απόκρισης στο μοντέλο παλινδρόμησης θα πρέπει να αξιολογείται με γραφική ή στατιστική μέθοδο. Η ανάλυση παλινδρόμησης θα πρέπει να εκτελείται με τη χρήση των αποκρίσεων της κάθε επανάληψης και όχι των μέσων όρων των ομάδων μεταχείρισης.

92. Εάν τα διαθέσιμα μοντέλα/μέθοδοι παλινδρόμησης είναι ακατάλληλα για τα δεδομένα, μπορούν επίσης να λαμβάνονται εκτιμήσεις και όρια εμπιστοσύνης για την EC_{50} με γραμμική παρεμβολή με τη μέθοδο bootstrap (18).

93. Για την εκτίμηση της LOEC και, κατ' επέκταση, της NOEC, είναι αναγκαία η σύγκριση των μέσων όρων των ομάδων μεταχείρισης με την εφαρμογή τεχνικών ανάλυσης της διασποράς (ANOVA). Στη συνέχεια, ο μέσος όρος για κάθε συγκέντρωση συγκρίνεται με τον μέσο όρο του μάρτυρα με κατάλληλο έλεγχο (π.χ. έλεγχο Dunnett ή Williams) (19) (20) (21) (22). Είναι απαραίτητο να κρίνεται αν ευσταθεί η παραδοχή της ANOVA για κανονική κατανομή και ομοιογενή διασπορά. Η κρίση αυτή θα πρέπει να βασίζεται στον έλεγχο Shapiro-Wilks και τον έλεγχο Levene αντίστοιχα. Εάν δεν ισχύει η παραδοχή κανονικής κατανομής και ομοιογενούς διασποράς, αυτό είναι μερικές φορές δυνατόν να διορθωθεί με λογαριθμικό μετασχηματισμό των δεδομένων. Στις περιπτώσεις ακραίας ετερογένειας της διασποράς και/ή απόκλισης από την κανονική κατανομή, η οποία δεν είναι δυνατόν να διορθωθεί με μετασχηματισμό, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο ανάλυσης με μεθόδους όπως ο έλεγχος t των Bonferroni-Welch, ο έλεγχος τάσης κατά Jonckheere Terpstra με αποκλιμάκωση και ο έλεγχος διάμεσης τιμής με διόρθωση Bonferroni. Πρόσθετη καθοδήγηση για τον προσδιορισμό της NOEC παρέχεται στο έγγραφο (16).

ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

94. Η έκθεση δοκιμής περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία

Μονοσυστατική ουσία:

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες·

— στοιχεία ταυτοποίησης της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμίξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.

Πολυσυστατική ουσία, UVCB ή μείγμα:

— περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Υπό δοκιμή είδος

— επιστημονική ονομασία και πηγή.

Συνθήκες δοκιμής

— διάρκεια και συνθήκες της φάσης εγκατάστασης·

— εφαρμοζόμενη διαδικασία δοκιμής (στατική, ημιστατική ή κατά ώσεις)·

▼M7

— ημερομηνία έναρξης και διάρκεια της δοκιμής·

— θρεπτικό μέσο δοκιμής, δηλ. ίζημα και υγρό θρεπτικό μέσο·

— περιγραφή του πειραματικού σχεδιασμού: θάλαμος/αίθουσα ανάπτυξης ή εργαστήριο, δοκιμαστικά δοχεία και καλύμματα, όγκοι διαλυμάτων, μήκος και βάρος των υπό δοκιμή φυτών ανά δοκιμαστικό δοχείο στην αρχή της δοκιμής, λόγος της επιφάνειας του ιζήματος προς την επιφάνεια του νερού, αναλογία όγκων ιζήματος και νερού·

— συγκεντρώσεις δοκιμής (ονομαστικές και μετρηθείσες, κατά περίπτωση) και αριθμός επαναλήψεων ανά συγκέντρωση·

— μέθοδοι παρασκευής των διαλυμάτων παρακαταθήκης και των διαλυμάτων δοκιμής, συμπεριλαμβανομένης τυχόν χρήσης διαλυτών ή μέσων διασποράς·

— θερμοκρασία κατά τη δοκιμή·

— φωτεινή πηγή, ροή φωτεινής ακτινοβολίας ($\mu E \cdot m^{-2}\ s^{-1}$)

— τιμές pH των θρεπτικών μέσων δοκιμής και μαρτύρων καθώς και εμφάνιση του θρεπτικού μέσου δοκιμής κατά την έναρξη της δοκιμής και στο τέλος της·

— συγκεντρώσεις οξυγόνου·

— μέθοδος ανάλυσης με τα κατάλληλα δεδομένα αξιολόγησης της ποιότητας (μελέτες επικύρωσης, τυπικές αποκλίσεις ή όρια εμπιστοσύνης των αναλύσεων)·

— μέθοδοι προσδιορισμού των μετρούμενων μεταβλητών, π.χ. μήκους, ξηρού βάρους, νωπού βάρους·

— όλες οι παρεκκλίσεις από την παρούσα μέθοδο δοκιμών·

Αποτελέσματα

— ανεπεξέργαστα δεδομένα: μήκος και βάρος των βλαστών των φυτών/γλαστρών και άλλες μετρούμενες μεταβλητές για κάθε δοκιμαστικό δοχείο και δοχείο μάρτυρα σε κάθε παρατήρηση και χρόνο ανάλυσης σύμφωνα με το χρονοδιάγραμμα αξιολόγησης που παρατίθεται στον πίνακα 1·

— μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις για κάθε μετρούμενη μεταβλητή·

— καμπύλες αύξησης για κάθε συγκέντρωση·

— χρόνος διπλασιασμού/ρυθμός αύξησης στον μάρτυρα, με βάση το μήκος και το νωπό βάρος των βλαστών, συμπεριλαμβανομένου του συντελεστή μεταβλητότητας για την απόδοση με βάση το νωπό βάρος·

— υπολογισθείσες μεταβλητές απόκρισης για κάθε επανάληψη μεταχείρισης, συνοδευόμενες από τις μέσες τιμές και τον συντελεστή μεταβλητότητας για τις επαναλήψεις·

— γραφική παράσταση της σχέσης συγκέντρωσης-επίδρασης·

— εκτιμήσεις των τοξικών τελικών σημείων για τις μεταβλητές απόκρισης π.χ. EC_{50} και τα αντίστοιχα διαστήματα εμπιστοσύνης. Τιμές LOEC και/ή NOEC, εάν έχουν υπολογιστεί, και στατιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό τους·

— εάν έχει χρησιμοποιηθεί τεχνική ANOVA, το ανιχνεύσιμο μέγεθος της επίδρασης (π.χ. η ελάχιστη σημαντική διαφορά)·

— διέγερση της ανάπτυξης που ενδεχομένως διαπιστώθηκε σε οποιοδήποτε δοχείο μεταχείρισης·

▼M7

— τυχόν ορατά σημεία φυτοτοξικότητας, καθώς και παρατηρήσεις των διαλυμάτων δοκιμής·

— συζήτηση των αποτελεσμάτων, που περιλαμβάνει τυχόν επίδραση παρεκκλίσεων από την παρούσα μέθοδο δοκιμών στην έκβαση της δοκιμής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) *Κεφάλαιο Γ.26 του παρόντος παραρτήματος*: Δοκιμή αναστολής της ανάπτυξης του είδους Lemna.

(2) Κεφάλαιο Γ.3 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμή αναστολής της ανάπτυξης σε φύκη (άλγες) και κυανοβακτηρίδια των γλυκών υδάτων

(3) Maltby, L. et al. (2010), Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, Guidance from the AMRAP Workshop in Wageningen (NL), 14-16 January 2008.

(4) Arts, G.H.P. et al. (2008), Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests, Environmental Pollution, Vol. 153, pp. 199-206.

(5) ISO 16191: 2013. Ποιότητα νερού — Προσδιορισμός της τοξικής επίδρασης του ιζήματος στη συμπεριφορά ως προς την ανάπτυξη του Myriophyllum aquaticum.

(6) Knauer, K. et al. (2006), Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants, Pest Management Science, Vol. 62/8, pp. 715-722.

(7) Κεφάλαιο Γ.50 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμή τοξικότητας σε *Myriophyllum spicatum* σε σύστημα χωρίς ίζημα.

(8) Κεφάλαιο Γ.28 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμή τοξικότητας σε χειρονομίδες σε σύστημα ιζήματος-νερού με τη χρήση εμβολιασμένου ιζήματος.

(9) Ratte, M., H. Ratte (2014), «Myriophyllum Toxicity Test: Result of a ring test using *M. aquaticum* and *M. spicatum* grown in a water-sediment system», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 206, OECD Publishing, Paris.

(10) Davies, J.και συν. (2003), Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron — a case study, Pest Management Science, Vol. 59/2, pp. 231 - 237.

(11) OECD (2000), «Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.

(12) Smart, R.M., J.W. Barko (1985), Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments, Aquatic Botany, Vol. 21/3, pp. 251-263.

(13) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, Environmental Science Technology, Vol. 18/9, pp. 713-718.

(14) Nyholm, N. και συν. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/2, pp. 157-167.

(15) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/10, 1485-1494.

(16) OECD (2006), «Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.

(17) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, Weed Research, Vol. 29/2, pp/ 93-96.

▼**M7**

(18) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

(19) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of the American Statistical Association, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.

(20) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, Vol. 20/3, pp. 482-491.

(21) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics, Vol. 27/1, pp. 103-117.

(22) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics, Vol. 28/2, pp. 519-531.

▼**M7**

Προσάρτημα 1

ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΜΕΣΟΥ SMART AND BARKO

Συστατικό	Ποσότητα αντιδραστηρίου που προστίθεται σε νερό (*) (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	91,7
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	69,0
$NaHCO_3$	58,4
$KHCO_3$	15,4
pH (σε ισορροπία με τον αέρα)	7,9

(*) απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό

▼M7

Προσάρτημα 2

ΟΡΙΣΜΟΙ

Απόδοση: τιμή μετρούμενης μεταβλητής που εκφράζει τη βιομάζα στο τέλος της περιόδου έκθεσης μείον την τιμή της ίδιας μεταβλητής στην αρχή της περιόδου έκθεσης. Σημείωση: Όταν ο τύπος ανάπτυξης των οργανισμών που δεν έχουν εκτεθεί είναι εκθετικός, οι μεταβλητές απόκρισης που βασίζονται στην απόδοση μειώνονται όσο αυξάνεται η διάρκεια της δοκιμής.

Αύξηση: αύξηση της μετρούμενης μεταβλητής, π.χ. μήκος του κύριου βλαστού, συνολικό μήκος πλευρικών κλάδων, συνολικό μήκος βλαστών, συνολικό μήκος ριζών, νωπό βάρος, ξηρό βάρος ή αριθμός σπονδύλων, κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

Βιομάζα: το νωπό και/ή ξηρό βάρος της ζώσας ύλης την οποία περιέχει ένας πληθυσμός. Στην παρούσα δοκιμή η βιομάζα είναι το άθροισμα του κύριου βλαστού, όλων των πλευρικών κλάδων και όλων των ριζών.

Ημιστατική δοκιμή (με ανανέωση): δοκιμή στη διάρκεια της οποίας το διάλυμα δοκιμής αντικαθίσταται περιοδικά σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα.

Θρεπτικό μέσο δοκιμής: το πλήρες συνθετικό θρεπτικό μέσο, στο οποίο αναπτύσσονται τα υπό δοκιμή φυτά όταν εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία. Η υπό δοκιμή χημική ουσία διαλύεται, κατά κανόνα, στο θρεπτικό μέσο δοκιμής.

Κατώτατη συγκέντρωση στην οποία παρατηρούνται επιπτώσεις (LOEC): η χαμηλότερη ελεγχθείσα συγκέντρωση στην οποία παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της ανάπτυξης (με $p < 0,05$) υπό την επίδραση της χημικής ουσίας, σε σύγκριση με τον μάρτυρα, εντός δεδομένου χρόνου έκθεσης. Ωστόσο, όλες οι συγκεντρώσεις δοκιμής που υπερβαίνουν τη LOEC αναμένεται να έχουν βλαβερή επίδραση ίση ή μεγαλύτερη από εκείνη που παρατηρείται στη LOEC. Σε περίπτωση που δεν είναι δυνατόν να πληρούνται οι δύο αυτοί όροι, θα πρέπει να εξηγείται πλήρως ο τρόπος επιλογής της LOEC (και, κατ' επέκταση, της NOEC).

Μεταβλητή απόκρισης: μεταβλητή για την εκτίμηση της τοξικότητας, η οποία προκύπτει, με διάφορες μεθόδους υπολογισμού, από τις μετρούμενες μεταβλητές που περιγράφουν τη βιομάζα. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, ο ρυθμός αύξησης και η απόδοση είναι μεταβλητές απόκρισης που προκύπτουν από μετρούμενες μεταβλητές, όπως το μήκος του κύριου βλαστού, το συνολικό μήκος των βλαστών, το νωπό βάρος, το ξηρό βάρος και ο αριθμός σπονδύλων.

Μετρούμενες μεταβλητές: κάθε είδους μεταβλητή που μετράται προκειμένου να εκφραστεί το τελικό σημείο της δοκιμής με χρήση μίας ή περισσότερων διαφορετικών μεταβλητών απόκρισης. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, το μήκος του κύριου βλαστού, το συνολικό μήκος των πλευρικών κλάδων· το συνολικό μήκος των βλαστών, το συνολικό μήκος των ριζών, το νωπό βάρος, το ξηρό βάρος και ο αριθμός σπονδύλων είναι μετρούμενες μεταβλητές.

Μονοκαλλιέργεια: καλλιέργεια με ένα μόνο είδος φυτού.

Νέκρωση: νεκρός (δηλ. λευκός ή βαθυκάστανος) ιστός του υπό δοκιμή οργανισμού.

Ρυθμός αύξησης (μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης): η λογαριθμική αύξηση της μετρούμενης μεταβλητής κατά την περίοδο έκθεσης. *Σημείωση*: Οι μεταβλητές απόκρισης που συνδέονται με τον ρυθμό αύξησης είναι ανεξάρτητες από τη διάρκεια της δοκιμής, εφόσον ο τύπος ανάπτυξης των οργανισμών μαρτύρων που δεν έχουν εκτεθεί είναι εκθετικός.

Στατική δοκιμή: μέθοδος δοκιμών χωρίς ανανέωση του διαλύματος δοκιμής στη διάρκεια της δοκιμής.

Συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC): η αμέσως μικρότερη από τη LOEC συγκέντρωση δοκιμής.

Τελικό σημείο της δοκιμής: περιγράφει, ως στόχο της δοκιμής, τον γενικό παράγοντα που θα μεταβληθεί υπό την επίδραση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε σχέση με τον μάρτυρα. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, το τελικό σημείο της δοκιμής είναι η αναστολή της ανάπτυξης, η οποία μπορεί να εκφραστεί με διάφορες μεταβλητές απόκρισης που βασίζονται σε μία ή περισσότερες μετρούμενες μεταβλητές.

▼**M7**

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Χημική ουσία: ουσία ή μείγμα.

Χλώρωση: η αλλαγή του χρώματος του υπό δοκιμή οργανισμού και ιδίως των σπονδύλων από πράσινο σε κίτρινο.

ECx: συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, διαλυμένης στο θρεπτικό μέσο δοκιμής, η οποία προκαλεί μείωση της ανάπτυξης κατά x % (π.χ. 50 %) του *Myriophyllum spicatum* εντός της δηλούμενης περιόδου έκθεσης (πρέπει να αναφέρεται επακριβώς, εάν διαφέρει από την πλήρη ή την κανονική διάρκεια της δοκιμής). Για να δηλώνεται σαφώς αν η τιμή EC προκύπτει από τον ρυθμό αύξησης ή από την απόδοση, χρησιμοποιούνται τα σύμβολα «E_rC» για τον ρυθμό αύξησης και «E_yC» για την απόδοση, ακολουθούμενα από τη χρησιμοποιηθείσα μετρούμενη μεταβλητή, π.χ. E_rC (μήκος κύριου βλαστού).

UVCB: ουσία άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, σύμπλοκο προϊόν αντίδρασης ή βιολογικό υλικό.

▼M8

Γ.52 ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΗ ΔΟΚΙΜΗ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΙΑΣ ΓΕΝΕΑΣ ΣΤΟ ΡΥΖΟΨΑΡΟ (MEOGRT)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 240 του ΟΟΣΑ (2015). Στην εκτεταμένη δοκιμή στην αναπαραγωγή μίας γενεάς στο ρυζόψαρο (MEOGRT) περιγράφεται μια ολοκληρωμένη μέθοδος δοκιμών που βασίζεται στην έκθεση πολλών γενεών με σκοπό τη συλλογή δεδομένων σχετικά με την επικινδυνότητα για το περιβάλλον και την αξιολόγηση του κινδύνου των χημικών ουσιών, περιλαμβανομένων των χημικών ουσιών για τις οποίες υπάρχουν υπόνοιες ότι αποτελούν ενδοκρινικούς διαταράκτες (EDC). Στο πλαίσιο της MEOGRT, η έκθεση συνεχίζεται μέχρι την εκκόλαψη (έως δύο εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση) στη δεύτερη (F2) γενεά. Για να αιτιολογηθεί η σκοπιμότητα της παράτασης της γενεάς F2 πέραν της εκκόλαψης, θα χρειαστούν περαιτέρω διερευνήσεις· επί του παρόντος, δεν υπάρχουν επαρκείς διαθέσιμες πληροφορίες αναφορικά με τις σχετικές συνθήκες ή τα κριτήρια που δικαιολογούν την παράταση της F2. Ωστόσο, η παρούσα μέθοδος δοκιμών μπορεί να επικαιροποιηθεί βάσει νέων στοιχείων και δεδομένων. Για παράδειγμα, η καθοδήγηση σχετικά με την παράταση της γενεάς F2 μέσω αναπαραγωγής μπορεί να είναι χρήσιμη υπό ορισμένες συνθήκες (π.χ. χημικές ουσίες με υψηλό δυναμικό βιοσυγκέντρωσης ή ενδείξεις διαγενεακών επιδράσεων σε άλλες ταξινομικές ομάδες). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση των δυνητικών χρόνιων επιδράσεων χημικών ουσιών, περιλαμβανομένων των χημικών ουσιών που είναι ενδοκρινικοί διαταράκτες, στα ψάρια. Στο πλαίσιο της μεθόδου δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στις δυνητικές επιδράσεις που αφορούν τον πληθυσμό (δυσμενείς επιδράσεις στην επιβίωση, την ανάπτυξη, τη σωματική αύξηση και την αναπαραγωγή) με σκοπό τον υπολογισμό μιας συγκέντρωσης μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC) ή μιας συγκέντρωσης επίδρασης (ECx), αν και πρέπει να επισημανθεί ότι οι προσεγγίσεις ECx σπάνια είναι κατάλληλες για μεγάλες μελέτες αυτού του τύπου στο πλαίσιο των οποίων η αύξηση του αριθμού των συγκεντρώσεων δοκιμής για να καταστεί εφικτός ο προσδιορισμός της επιθυμητής ECx μπορεί να είναι πρακτικά δυσχερής, γεγονός που ενδέχεται επίσης να εγείρει σημαντικές ανησυχίες σχετικά με την καλή μεταχείριση των ζώων λόγω του μεγάλου αριθμού των χρησιμοποιούμενων ζώων. Για χημικές ουσίες που δεν επιβάλλεται να αξιολογηθούν σε «πολλές γενεές» ή χημικές ουσίες που δεν είναι δυνητικοί ενδοκρινικοί διαταράκτες, ενδέχεται να υπάρχουν άλλες καταλληλότερες μέθοδοι δοκιμών (1). Το ιαπωνικό ρυζόψαρο είναι το κατάλληλο είδος για χρήση στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, λόγω του σύντομου κύκλου ζωής του και της δυνατότητας προσδιορισμού του γενετικού φύλου του (2), στοιχείο κρίσιμης σημασίας στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών. Οι συγκεκριμένες μέθοδοι και παράμετροι παρατήρησης που περιγράφονται αναλυτικά στην παρούσα μέθοδο αφορούν μόνο το ιαπωνικό ρυζόψαρο. Για άλλα μικρά είδη ψαριών (π.χ. το ζεβρόψαρο), μπορούν να προσαρμοστούν παρεμφερή πρωτόκολλα δοκιμής.

2. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών μετρώνται διάφορες βιολογικές παράμετροι. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στις δυνητικές επιδράσεις σε σχετικές με τον πληθυσμό παραμέτρους, περιλαμβανομένης της επιβίωσης, της αδρής ανάπτυξης, της σωματικής αύξησης και της αναπαραγωγής. Δευτερευόντως, προκειμένου να συλλεχθούν στοιχεία σχετικά με τον μηχανισμό δράσης αλλά και να καταστεί εφικτή η συσχέτιση με αποτελέσματα από άλλα είδη επιτόπιων και εργαστηριακών μελετών, όταν υπάρχουν εκ των υστέρων στοιχεία που δείχνουν ότι κάποια χημική ουσία δρα ως ενδοκρινικός διαταράκτης (π.χ. ανδρογόνος ή οιστρογόνος δράση σε άλλες δοκιμές και δοκιμασίες), τότε συλλέγονται άλλες χρήσιμες πληροφορίες μέσω μέτρησης του mRNA της λεκιθογενίνης (*vtg)* (ή της πρωτεΐνης της λεκιθογενίνης, VTG), μέσω των φαινοτυπικών δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου (SSC) που σχετίζονται με το γενετικό φύλο, και μέσω αξιολόγησης της ιστοπαθολογικής εικόνας. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι, εάν για μια υπό δοκιμή χημική ουσία ή τους μεταβολίτες της δεν υπάρχουν υπόνοιες ότι είναι ενδοκρινικοί διαταράκτες, μπορεί να μην είναι απαραίτητη η μέτρηση των εν λόγω δευτερευουσών παραμέτρων και να είναι σκόπιμο να διεξάγονται μελέτες με λιγότερες απαιτήσεις από άποψη πόρων και ζώων (1). Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

▼**M8**

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

3. Λόγω του περιορισμένου αριθμού των χημικών ουσιών που υποβάλλονται σε δοκιμές και των εργαστηρίων που συμμετέχουν στη διαδικασία επικύρωσης αυτής της μάλλον πολύπλοκης δοκιμασίας, αναμένεται ότι όταν θα καταστεί διαθέσιμος επαρκής αριθμός μελετών για την εξακρίβωση του αντικτύπου αυτού του νέου σχεδιασμού μελετών, η μέθοδος δοκιμών θα επανεξεταστεί και, εφόσον απαιτείται, θα αναθεωρηθεί υπό το πρίσμα της αποκτηθείσας εμπειρίας. Τα δεδομένα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο επίπεδο 5 του εννοιολογικού πλαισίου του ΟΟΣΑ για τον έλεγχο και την αξιολόγηση ενδοκρινικών διαταρακτών (3). Η μέθοδος δοκιμών ξεκινά με έκθεση ενήλικων ψαριών (η γενεά F0) στην υπό δοκιμή χημική ουσία κατά τη φάση της αναπαραγωγής. Η έκθεση συνεχίζεται κατά τη φάση της ανάπτυξης και της αναπαραγωγής της γενεάς F1 και κατά τη φάση της εκκόλαψης της γενεάς F2· ως εκ τούτου, η δοκιμασία επιτρέπει την αξιολόγηση τόσο των δομικών ενδοκρινικών οδών όσο και των οδών ενδοκρινικής ενεργοποίησης. Για την ερμηνεία των σχετικών με το ενδοκρινικό σύστημα παραμέτρων, μπορεί να εφαρμόζεται προσέγγιση βάρους της απόδειξης.

4. Η δοκιμή θα πρέπει να περιλαμβάνει επαρκή αριθμό ατόμων ώστε να διασφαλίζεται επαρκής ικανότητα αξιολόγησης των σχετικών με την αναπαραγωγή παραμέτρων (βλ. προσάρτημα 3) αλλά ταυτόχρονα να χρησιμοποιείται ο ελάχιστος απαιτούμενος αριθμός ζώων, για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων. Δεδομένων των μεγάλων αριθμών χρησιμοποιούμενων ζώων, είναι σημαντικό να αξιολογείται ενδελεχώς η ανάγκη διεξαγωγής της δοκιμής σε σχέση με τα υπάρχοντα δεδομένα, τα οποία ενδέχεται να περιλαμβάνουν ήδη συναφείς πληροφορίες σχετικά με πολλές από τις παραμέτρους που εξετάζονται με τη MEOGRT. Ως προς αυτό το θέμα, μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμο το πλαίσιο δοκιμών τοξικότητας στα ψάρια (Fish Toxicity Testing Framework) του ΟΟΣΑ (1).

5. Η μέθοδος δοκιμών έχει σχεδιαστεί πρωτίστως με σκοπό τη διάκριση των επιδράσεων μιας μεμονωμένης ουσίας. Ωστόσο, εάν απαιτείται η διεξαγωγή δοκιμής σε μείγμα, θα πρέπει να εξετάζεται κατά πόσον η δοκιμή θα δώσει αποδεκτά αποτελέσματα για τον επιδιωκόμενο κανονιστικό σκοπό.

6. Πριν από την έναρξη της δοκιμής, είναι σημαντικό να υπάρχουν πληροφορίες για τις φυσικοχημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, ιδίως προκειμένου να παρασκευάζονται σταθερά διαλύματα. Επίσης, είναι απαραίτητη η ύπαρξη αναλυτικής μεθόδου επαρκούς ευαισθησίας για την επαλήθευση των συγκεντρώσεων των υπό δοκιμή χημικών ουσιών.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

7. Η δοκιμή ξεκινά με την έκθεση σεξουαλικώς ώριμων αρσενικών και θηλυκών (τουλάχιστον 12 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση) σε ζεύγη αναπαραγωγής επί 3 εβδομάδες, στη διάρκεια των οποίων η υπό δοκιμή χημική ουσία κατανέμεται στον οργανισμό της γονικής γενεάς (F0) ανάλογα με την τοξικοκινητική συμπεριφορά της. Όσο το δυνατόν πιο κοντά στην πρώτη ημέρα της τέταρτης εβδομάδας, τα αυγά συλλέγονται για να ξεκινήσει η γενεά F1. Κατά τη φάση της εκτροφής της γενεάς F1 (διάρκειας 15 εβδομάδων συνολικά), αξιολογείται η εκκολαψιμότητα και η επιβίωση. Επιπλέον, πραγματοποιείται δειγματοληψία ψαριών στις 9-10 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση με σκοπό την ανάλυση αναπτυξιακών παραμέτρων και αξιολογείται η ωοτοκία επί τρεις εβδομάδες, από τη 12η μέχρι τη 14η εβδομάδα μετά τη γονιμοποίηση. Μετά την τρίτη εβδομάδα αξιολόγησης της αναπαραγωγής δημιουργείται γενεά F2, η οποία και εκτρέφεται μέχρι την ολοκλήρωση της εκκόλαψης.

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

8. Ακολούθως παρατίθενται τα κριτήρια που εφαρμόζονται όσον αφορά την εγκυρότητα της δοκιμής:

— η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου θα πρέπει να είναι ≥ 60 % της τιμής κορεσμού με αέρα σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής,

— η μέση θερμοκρασία του νερού σε όλη τη διάρκεια της μελέτης θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 24 και 26 °C. Τυχόν σύντομες αποκλίσεις από τον μέσο όρο σε μεμονωμένα ενυδρεία δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν τους 2 °C,

▼M8

— η μέση γεννητικότητα των μαρτύρων σε καθεμία από τις γενεές (F0 και F1) θα πρέπει να υπερβαίνει τα 20 αυγά ανά ζεύγος ανά ημέρα. Η γονιμότητα του συνόλου των αυγών που παράγονται στη διάρκεια της αξιολόγησης θα πρέπει να υπερβαίνει το 80 %. Επιπλέον, 16 από τα συνιστώμενα 24 ζεύγη αναπαραγωγής μάρτυρες (> 65 %) θα πρέπει να παράγουν πάνω από 20 αυγά ανά ζεύγος ανά ημέρα,

— η εκκολαψιμότητα των αυγών θα πρέπει να είναι ≥ 80 % (κατά μέσο όρο) στους μάρτυρες (σε καθεμία από τις γενεές F1 και F2),

— η επιβίωση μετά την εκκόλαψη μέχρι την 3η εβδομάδα μετά τη γονιμοποίηση και από την 3η εβδομάδα μετά τη γονιμοποίηση μέχρι τη λήξη της δοκιμής για τη γενεά F1 (δηλ. τη 15η εβδομάδα μετά τη γονιμοποίηση) θα πρέπει να είναι ≥ 80 % (κατά μέσο όρο) και να είναι ≥ 90 % (κατά μέσο όρο) αντίστοιχα στους μάρτυρες (F1),

— θα πρέπει να υπάρχουν στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο διάλυμα διατηρήθηκαν ικανοποιητικά στα όρια του ± 20 % του μέσου όρου των τιμών που μετρήθηκαν.

Όσον αφορά τη θερμοκρασία του νερού, παρότι δεν αποτελεί κριτήριο εγκυρότητας, τα πανομοιότυπα δείγματα εντός μιας ορισμένης αγωγής δεν θα πρέπει να παρουσιάζουν στατιστικές αποκλίσεις μεταξύ τους, και οι ομάδες αγωγής στο πλαίσιο της δοκιμής δεν θα πρέπει να παρουσιάζουν στατιστικές αποκλίσεις μεταξύ τους (με βάση τις καθημερινές μετρήσεις της θερμοκρασίας, και χωρίς να λαμβάνονται υπόψη οι σύντομες αποκλίσεις).

9. Παρότι μπορεί να παρατηρηθεί μείωση της αναπαραγωγής στις ομάδες υψηλότερης έκθεσης, η αναπαραγωγή τουλάχιστον στην ομάδα με την τρίτη υψηλότερη έκθεση και σε όλες τις ομάδες χαμηλής έκθεσης της F0 θα πρέπει να επαρκεί για την πλήρωση των επωαστήρων εκκόλαψης. Επιπλέον, η επιβίωση των εμβρύων στην ομάδα με την τρίτη υψηλότερη έκθεση και στις ομάδες χαμηλής έκθεσης στην F1 θα πρέπει να επαρκεί για την αξιολόγηση των παραμέτρων κατά τη δειγματοληψία ατόμων πριν την ενηλικίωση (βλ. παραγράφους 36 και 38 και προσάρτημα 9). Επίσης, θα πρέπει να επιτυγχάνεται τουλάχιστον το ελάχιστο ποσοστό επιβίωσης μετά την εκκόλαψη (~20 %) στην ομάδα της F1 με τη δεύτερη υψηλότερη έκθεση. Τα παραπάνω δεν αποτελούν κριτήρια εγκυρότητας καθαυτά αλλά συστάσεις που βοηθούν στον υπολογισμό αξιόπιστων NOEC.

10. Εάν παρατηρηθεί απόκλιση από τα κριτήρια εγκυρότητας της δοκιμής, οι συνέπειες θα πρέπει να εκτιμώνται σε σχέση με την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων της δοκιμής και οι εν λόγω αποκλίσεις και εκτιμήσεις θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται στην έκθεση δοκιμής.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Εργαστηριακός εξοπλισμός

11. Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός και, ειδικότερα, τα ακόλουθα:

α) οξυγονόμετρα και pHμετρα,

β) εξοπλισμός για τον προσδιορισμό της σκληρότητας και αλκαλικότητας του νερού,

γ) κατάλληλη συσκευή για τον έλεγχο της θερμοκρασίας με δυνατότητα συνεχούς, κατά προτίμηση, παρακολούθησης,

δ) δεξαμενές κατασκευασμένες από χημικώς αδρανές υλικό και κατάλληλης χωρητικότητας ανάλογα με τον συνιστώμενο πληθυσμιακό φόρτο και την πληθυσμιακή πυκνότητα (βλ. προσάρτημα 3),

ε) ζυγός κατάλληλης ακρίβειας (δηλαδή ακρίβεια έως ± 0,5 mg).

▼M8

Νερό

12. Ως νερό δοκιμής μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε νερό στο οποίο το υπό δοκιμή είδος εμφανίζει την ενδεδειγμένη μακροπρόθεσμη επιβίωση και σωματική αύξηση. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής το νερό θα πρέπει να είναι σταθερής ποιότητας. Για να είναι βέβαιο ότι το νερό αραίωσης δεν θα επηρεάσει δυσμενώς το αποτέλεσμα της δοκιμής (π.χ. σχηματίζοντας σύμπλοκα με την υπό δοκιμή χημική ουσία) ούτε τις επιδόσεις των γεννητόρων, θα πρέπει κατά διαστήματα να λαμβάνονται δείγματα για ανάλυση. Όταν είναι γνωστό ότι η ποιότητα του νερού αραίωσης είναι σχετικά σταθερή, θα πρέπει, π.χ. κάθε έξι μήνες, να γίνονται μετρήσεις βαρέων μετάλλων (π.χ. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), σημαντικών ανιόντων και κατιόντων (π.χ. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), φυτοφαρμάκων, ολικού οργανικού άνθρακα και αιωρούμενων στερεών. Μερικά χημικά χαρακτηριστικά αποδεκτού νερού αραίωσης απαριθμούνται στο προσάρτημα 2. Το pH του νερού θα πρέπει να είναι της τάξεως του 6,5 έως 8,5, κατά τη διάρκεια όμως μιας δεδομένης δοκιμής δεν θα πρέπει να αποκλίνει πέραν των ± 0,5 μονάδων pH.

Σύστημα έκθεσης

13. Ο σχεδιασμός και τα υλικά που χρησιμοποιούνται για το σύστημα έκθεσης δεν προσδιορίζονται. Για την κατασκευή του συστήματος δοκιμής θα πρέπει να χρησιμοποιείται γυαλί, ανοξείδωτος χάλυβας ή άλλο χημικώς αδρανές υλικό, το οποίο δεν έχει μολυνθεί στη διάρκεια προηγούμενων δοκιμών. Για τους σκοπούς της δοκιμής, ένα κατάλληλο σύστημα έκθεσης μπορεί να αποτελείται από ένα σύστημα συνεχούς ροής (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13).

Διαλύματα δοκιμής

14. Το αποθεματικό διάλυμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να διοχετεύεται στο σύστημα έκθεσης μέσω κατάλληλης αντλίας. Ο ρυθμός ροής του αποθεματικού διαλύματος θα πρέπει να βαθμονομείται σύμφωνα με την ανάλυση επιβεβαίωσης για τα διαλύματα της δοκιμής πριν από την έναρξη της έκθεσης, και να ελέγχεται ογκομετρικά κατά διαστήματα στη διάρκεια της δοκιμής. Το διάλυμα της δοκιμής σε κάθε θάλαμο ανανεώνεται επαρκώς (π.χ. τουλάχιστον 5 ανανεώσεις του όγκου/ημέρα έως 16 ανανεώσεις του όγκου/ημέρα ή ροή έως 20 ml/λεπτό), ανάλογα με τη σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και την ποιότητα του νερού.

15. Τα διαλύματα δοκιμής με τις επιθυμητές συγκεντρώσεις παρασκευάζονται συνήθως με αραίωση αποθεματικού διαλύματος. Το αποθεματικά διαλύματα θα πρέπει κατά προτίμηση να παρασκευάζονται με απλή ανάμειξη ή ανακίνηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο νερό αραίωσης με μηχανικά μέσα (π.χ. ανάδευση και/ή υπερήχους). Για να επιτευχθεί κατάλληλα πυκνό αποθεματικό διάλυμα, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν στήλες/συστήματα κορεσμού ή παθητικές δοσιμετρικές μέθοδοι (14). Θα πρέπει να καταβάλλεται κάθε προσπάθεια ώστε να αποφεύγεται η χρήση διαλυτών ή φορέων, για τους ακόλουθους λόγους: 1) ορισμένοι διαλύτες ενδέχεται να συνεπάγονται οι ίδιοι τοξικότητα και/ή ανεπιθύμητες ή απρόβλεπτες αποκρίσεις, 2) η διεξαγωγή δοκιμών με χημικές ουσίες σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από την υδατοδιαλυτότητά τους (όπως συμβαίνει συχνά όταν χρησιμοποιούνται διαλύτες) μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα ανακριβείς προσδιορισμούς των αποτελεσματικών συγκεντρώσεων, 3) η χρήση διαλυτών σε μακροπρόθεσμες δοκιμές μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τον σημαντικό σχηματισμό βιοϋμένων, ο οποίος σχετίζεται με μικροβιακή δραστηριότητα που μπορεί να επηρεάσει τις περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς και την ικανότητα διατήρησης των συγκεντρώσεων έκθεσης, και 4) ελλείψει ιστορικών δεδομένων που να καταδεικνύουν ότι ο διαλύτης δεν επηρεάζει την έκβαση της μελέτης, η χρήση διαλυτών απαιτεί αγωγή μάρτυρα με διαλύτη η οποία έχει επιπτώσεις στην καλή μεταχείριση των ζώων, δεδομένου ότι απαιτείται πρόσθετος αριθμός ζώων για τη διεξαγωγή της δοκιμής. Για χημικές ουσίες που παρουσιάζουν δυσκολίες στη δοκιμή, μπορεί να χρησιμοποιείται διαλύτης ως έσχατη λύση· συμβουλευτείτε το έγγραφο κατευθυντήριων γραμμών του ΟΟΣΑ σχετικά με τις δοκιμές υδατικής τοξικότητας δύσκολων ουσιών και μειγμάτων (OECD Guidance Document 23 on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures) (15) για την επιλογή της βέλτιστης μεθόδου. Η επιλογή του διαλύτη θα καθορίζεται από τις χημικές ιδιότητες της υπό

▼M8

δοκιμή χημικής ουσίας και τη διαθεσιμότητα ιστορικών δεδομένων για τους μάρτυρες σχετικά με τη χρήση του διαλύτη. Σε περίπτωση που χρησιμοποιούνται διαλύτες, πέραν των (αρνητικών) μαρτύρων που δεν είναι διαλύτες (μόνο νερό αραίωσης), θα πρέπει να αξιολογούνται και οι κατάλληλοι μάρτυρες με διαλύτη. Εάν δεν μπορεί να αποφευχθεί η χρήση διαλύτη και προκύψει μικροβιακή δραστηριότητα (σχηματισμός βιοϋμένων), συνιστάται η καταγραφή και η αναφορά του σχηματισμού βιοϋμένων ανά δεξαμενή (τουλάχιστον σε εβδομαδιαία βάση) σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Ιδανικά, η συγκέντρωση του διαλύτη θα πρέπει να διατηρείται σταθερή στον μάρτυρα με διαλύτη και σε όλες τις αγωγές της δοκιμής. Εάν η συγκέντρωση του διαλύτη δεν διατηρηθεί σταθερή, στον μάρτυρα με διαλύτη θα πρέπει να χρησιμοποιείται η υψηλότερη συγκέντρωση διαλύτη στην αγωγή της δοκιμής. Σε περίπτωση που χρησιμοποιείται διαλύτης ως φορέας, οι μέγιστες συγκεντρώσεις του διαλύτη δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν τα 100 μl/l ή τα 100 mg/l (15), και συνιστάται η συγκέντρωση του διαλύτη να είναι όσον το δυνατόν πιο χαμηλή (π.χ. < 20 μl/l) για να αποφεύγονται πιθανές επιδράσεις του διαλύτη στις μετρούμενες παραμέτρους (16).

Πειραματόζωα

Επιλογή και διατήρηση ψαριών

16. Το επιλεγμένο είδος δοκιμής είναι το ιαπωνικό ρυζόψαρο *Oryzias latipes*, λόγω του σύντομου κύκλου ζωής του και της δυνατότητας προσδιορισμού του γενετικού φύλου. Παρότι για άλλα μικρά είδη ψαριών μπορούν να προσαρμοστούν παρεμφερή πρωτόκολλα δοκιμής, οι συγκεκριμένες μέθοδοι και οι παράμετροι παρατήρησης που περιγράφονται αναλυτικά στην παρούσα μέθοδο δοκιμών αφορούν μόνο το ιαπωνικό ρυζόψαρο (βλ. παράγραφο 1). Το ρυζόψαρο αναπαράγεται εύκολα σε συνθήκες αιχμαλωσίας· υπάρχουν δημοσιευμένες μέθοδοι για την εκτροφή του (17) (18) (19), καθώς και δεδομένα από δοκιμές βραχυπρόθεσμης θνησιμότητας, πρώιμων σταδίων ζωής και πλήρους κύκλου ζωής (5) (6) (8) (9) (20). Όλα τα ψάρια διατηρούνται σε φωτοπερίοδο 16 ωρών φωτός/8 ωρών σκοταδιού. Τα ψάρια τρέφονται με ζωντανές γαρίδες της άλμης, ναύπλιους από *Artemia* spp., οι οποίες μπορούν να συμπληρώνονται με τροφή του εμπορίου σε νιφάδες. Η τροφή του εμπορίου σε νιφάδες θα πρέπει να αναλύεται για τυχόν ύπαρξη ρύπων.

17. Εφόσον ακολουθούνται οι κατάλληλες πρακτικές εκτροφής, δεν απαιτείται ειδικό πρωτόκολλο καλλιέργειας. Για παράδειγμα, το ρυζόψαρο μπορεί να εκτρέφεται σε δεξαμενές 2 l, με 240 προνύμφες ανά δεξαμενή μέχρι την 4η εβδομάδα μετά τη γονιμοποίηση, και, στη συνέχεια, μπορεί να εκτρέφεται σε δεξαμενές 2 l, με 10 ψάρια ανά δεξαμενή μέχρι την 8η εβδομάδα μετά τη γονιμοποίηση, οπότε μεταφέρονται σε δεξαμενές 2 l ως ζεύγη αναπαραγωγής.

Εγκλιματισμός και επιλογή ψαριών

18. Τα ζώα της δοκιμής θα πρέπει να επιλέγονται από ένα μοναδικό εργαστηριακό απόθεμα, το οποίο έχει εγκλιματιστεί για τουλάχιστον δύο εβδομάδες πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμής υπό συνθήκες ποιότητας του νερού και φωτισμού παρόμοιες με εκείνες που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή (σημείωση: αυτή η περίοδος εγκλιματισμού δεν είναι περίοδος *in situ* προέκθεσης). Συνιστάται τα ψάρια της δοκιμής να λαμβάνονται από εργαστηριακή καλλιέργεια, δεδομένου ότι η αποστολή ενήλικων ψαριών είναι αγχογόνος και μπορεί να παρεμποδίσει την αξιόπιστη ωοτοκία. Τα ψάρια θα πρέπει να σιτίζονται με ναύπλιους γαρίδας της άλμης δύο φορές την ημέρα σε όλη τη διάρκεια της περιόδου διατήρησης και κατά τη φάση έκθεσης, και, συμπληρωματικά, με τροφή του εμπορίου σε νιφάδες, εάν χρειάζεται. Για να εξασφαλιστούν αρκετά πανομοιότυπα δείγματα (replicates), η δοκιμή πρέπει να ξεκινά με τουλάχιστον 42 ζεύγη αναπαραγωγής (54 ζεύγη αναπαραγωγής εάν απαιτείται χρήση μάρτυρα με διαλύτη λόγω, εν μέρει, έλλειψης ιστορικών δεδομένων που να υποστηρίζουν τη χρήση μόνο του μάρτυρα χωρίς διαλύτη). Επιπλέον, θα πρέπει να επαληθεύεται ότι κάθε ζεύγος αναπαραγωγής της F0 είναι XX-XY (δηλ. το φυσιολογικό σύνολο των χρωμοσωμάτων φύλου σε κάθε φύλο) προκειμένου να αποφεύγεται η πιθανή συμπερίληψη αυθόρμητων αρσενικών XX (βλ. παράγραφο 39).

▼M8

19. Κατά τη φάση του εγκλιματισμού, θα πρέπει να καταγράφονται οι τιμές θνησιμότητας στα ψάρια της καλλιέργειας και να εφαρμόζονται τα ακόλουθα κριτήρια μετά από μία πρώτη περίοδο 48 ωρών:

— θνησιμότητες άνω του 10 % επί του πληθυσμού καλλιέργειας κατά τις επτά ημέρες που προηγούνται της μεταφοράς στο σύστημα δοκιμής: απορρίπτεται ολόκληρη η παρτίδα,

— θνησιμότητες μεταξύ 5 % και 10 % επί του πληθυσμού κατά τις επτά ημέρες που προηγούνται της μεταφοράς στο σύστημα δοκιμής: εγκλιματισμός επί επτά ημέρες επιπλέον της περιόδου εγκλιματισμού 2 εβδομάδων· εάν, κατά τη διάρκεια του δεύτερου επταημέρου, καταγραφεί ποσοστό θνησιμότητας άνω του 5 %, απορρίπτεται ολόκληρη η παρτίδα,

— θνησιμότητες κάτω του 5 % επί του πληθυσμού κατά τις επτά ημέρες που προηγούνται της μεταφοράς στο σύστημα δοκιμής: η παρτίδα γίνεται αποδεκτή.

20. Τα ψάρια δεν θα πρέπει να λαμβάνουν αγωγή για ασθένεια κατά τη διάρκεια της περιόδου εγκλιματισμού δύο εβδομάδων που προηγείται της δοκιμής και κατά τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης, και, ει δυνατόν, η αγωγή για ασθένεια θα πρέπει να αποφεύγεται τελείως. Τα ψάρια με κλινικά σημεία ασθένειας δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται στη μελέτη. Θα πρέπει να τηρείται αρχείο παρατηρήσεων και τυχόν προφυλακτικών και θεραπευτικών αγωγών για ασθένειες κατά την περίοδο της καλλιέργειας που προηγείται της δοκιμής.

21. Η φάση της έκθεσης θα πρέπει να ξεκινά με γενετικά φυλοκαθορισμένα ενήλικα ψάρια με φυλετικό διμορφισμό, προερχόμενα από εργαστηριακή πηγή αναπαραγωγικά ώριμων ζώων καλλιεργηθέντων σε 25 ± 2 °C. Τα ψάρια θα πρέπει να είναι αποδεδειγμένοι γεννήτορες (δηλ. να έχουν παράξει βιώσιμους απογόνους) στη διάρκεια της εβδομάδας που προηγείται της έκθεσης. Για το σύνολο της παρτίδας ψαριών που χρησιμοποιείται στη δοκιμή, το εύρος βάρους σώματος ανά άτομο για αρσενικά και θηλυκά ψάρια στην έναρξη της δοκιμής θα πρέπει να διατηρείται εντός του ± 20 % του αριθμητικού μέσου βάρους του ιδίου φύλου. Πριν από τη δοκιμή συνιστάται να ζυγίζεται ένα μερικό δείγμα των ψαριών, για να εκτιμάται το μέσο βάρος. Τα ψάρια που επιλέγονται θα πρέπει να είναι ηλικίας τουλάχιστον 12 εβδομάδων μετά τη γονιμοποίηση και βάρους ≥ 300 mg για τα θηλυκά και ≥ 250 mg για τα αρσενικά.

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Συγκεντρώσεις δοκιμής

22. Συνιστάται να χρησιμοποιούνται πέντε συγκεντρώσεις της χημικής ουσίας, συν τον μάρτυρα/-ες. Κατά την επιλογή του εύρους συγκεντρώσεων δοκιμής, θα πρέπει να εξετάζονται όλες οι πηγές πληροφοριών, συμπεριλαμβανομένων των ποσοτικών σχέσεων δομής-δραστικότητας (QSAR), των συγκρίσεων με στοιχεία για ουσίες ανάλογης χημικής δομής, των αποτελεσμάτων δοκιμών σε ψάρια όπως δοκιμασίες οξείας τοξικότητας (κεφάλαιο Γ.1 του παρόντος παραρτήματος), της βραχυπρόθεσμης δοκιμασίας αναπαραγωγής σε ψάρια (κεφάλαιο Γ.48 του παρόντος παραρτήματος) και άλλων μεθόδων δοκιμών, π.χ. κεφάλαια Γ.15, Γ.37, Γ.41, Γ.47 ή Γ.49 του παρόντος παραρτήματος (21) (22) (23) (24) (25) (26), εάν υπάρχουν, ή, εφόσον απαιτείται, οι πληροφορίες από δοκιμή προσδιορισμού του εύρους, που να περιλαμβάνει ενδεχομένως και μια φάση αναπαραγωγής. Εφόσον απαιτείται, η δοκιμή προσδιορισμού του εύρους μπορεί να διεξάγεται υπό συνθήκες (υδατοδιαλυτότητα, σύστημα δοκιμής, πληθυσμιακός φόρτος ζώων) παρόμοιες με εκείνες που χρησιμοποιούνται για την οριστική δοκιμή. Εάν είναι απαραίτητη η χρήση διαλύτη και δεν υπάρχουν διαθέσιμα ιστορικά δεδομένα, η δοκιμή προσδιορισμού του εύρους μπορεί να χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της καταλληλότητας του διαλύτη. Η υψηλότερη συγκέντρωση δοκιμής δεν θα πρέπει να υπερβαίνει την τιμή υδατοδιαλυτότητας, 10 mg/l ή 1/10ο της 96h-LC50 (27). Η χαμηλότερη συγκέντρωση θα πρέπει να είναι χαμηλότερη από την υψηλότερη συγκέντρωση κατά 10 έως 100 φορές. Η χρήση πέντε συγκεντρώσεων στην παρούσα δοκιμή επιτρέπει όχι μόνο τη μέτρηση των

▼M8

σχέσεων δόσης-απόκρισης, αλλά και τον υπολογισμό της κατώτατης συγκέντρωσης στην οποία παρατηρούνται επιπτώσεις (LOEC) και της NOEC, οι οποίες είναι απαραίτητες για την εκτίμηση του κινδύνου σε ορισμένα κανονιστικά προγράμματα ή δικαιοδοσίες. Γενικά, ο συντελεστής απόστασης μεταξύ των ονομαστικών συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μεταξύ γειτονικών επιπέδων αγωγής είναι ≤ 3,2.

Πανομοιότυπα δείγματα εντός των ομάδων αγωγής και των μαρτύρων

23. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον έξι θάλαμοι δοκιμής πανομοιότυπου δείγματος ανά συγκέντρωση δοκιμής (βλ. προσάρτημα 7). Κατά τη φάση αναπαραγωγής (εκτός της γενεάς F0), η δομή πανομοιότυπων δειγμάτων διπλασιάζεται με σκοπό την αξιολόγηση της γεννητικότητας και κάθε πανομοιότυπο δείγμα περιλαμβάνει ένα μόνο ζεύγος αναπαραγωγής (βλ. παράγραφο 42).

24. Εκτός από τις συγκεντρώσεις δοκιμής, θα πρέπει να ελέγχεται μάρτυρας νερού αραίωσης και, εφόσον απαιτείται, μάρτυρας με διαλύτη. Προκειμένου να διασφαλίζεται επαρκής στατιστική ισχύς, θα πρέπει να χρησιμοποιείται διπλάσιος αριθμός θαλάμων πανομοιότυπων δειγμάτων για τους μάρτυρες (θα πρέπει δηλαδή να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον δώδεκα πανομοιότυπα δείγματα για τους μάρτυρες). Κατά τη φάση της αναπαραγωγής, ο αριθμός των πανομοιότυπων δειγμάτων στους μάρτυρες διπλασιάζεται (δηλαδή τουλάχιστον 24 πανομοιότυπα δείγματα, με ένα μόνο ζεύγος ζευγαρώματος σε κάθε πανομοιότυπο δείγμα). Μετά την αναπαραγωγή, τα πανομοιότυπα δείγματα μαρτύρων δεν θα πρέπει να περιλαμβάνουν πάνω από 20 έμβρυα (ψάρια).

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Έναρξη της δοκιμής

25. Τα αναπαραγωγικώς ενεργά ενήλικα ψάρια που χρησιμοποιούνται για το ξεκίνημα της γενεάς F0 της δοκιμής επιλέγονται με βάση τα ακόλουθα δύο κριτήρια: ηλικία (συνήθως άνω των 12 εβδομάδων μετά τη γονιμοποίηση, αλλά όχι άνω των 16 εβδομάδων μετά τη γονιμοποίηση) και βάρος (τα θηλυκά θα πρέπει να είναι ≥ 300 mg και τα αρσενικά ≥ 250 mg).

26. Ζεύγη θηλυκών-αρσενικών που πληρούν τις ανωτέρω προδιαγραφές μετακινούνται ως μεμονωμένα ζεύγη σε κάθε δεξαμενή πανομοιότυπου δείγματος, δηλαδή δώδεκα δείγματα στους μάρτυρες και έξι δείγματα στις αγωγές με τη χημική ουσία κατά την έναρξη της δοκιμής. Στις εν λόγω δεξαμενές αντιστοιχίζεται τυχαία μια αγωγή (π.χ. T1-T5 και μάρτυρας) και ένα πανομοιότυπο δείγμα (π.χ. A-L στους μάρτυρες και A-F στην αγωγή) και, στη συνέχεια, οι δεξαμενές τοποθετούνται στο σύστημα έκθεσης με την κατάλληλη ροή σε κάθε δεξαμενή.

Συνθήκες έκθεσης

27. Πλήρης σύνοψη των παραμέτρων και των συνθηκών της δοκιμής παρέχεται στο προσάρτημα 3. Η τήρηση των εν λόγω προδιαγραφών αναμένεται να έχει ως αποτέλεσμα ψάρια μάρτυρες με τιμές παραμέτρων παρεμφερείς με εκείνες που παρατίθενται στο προσάρτημα 4.

28. Στη διάρκεια της δοκιμής, θα πρέπει να μετράται το διαλυμένο οξυγόνο, το pH και η θερμοκρασία σε τουλάχιστον ένα δοχείο δοκιμής κάθε ομάδας αγωγής και του μάρτυρα. Οι εν λόγω μετρήσεις, εκτός της μέτρησης της θερμοκρασίας, θα πρέπει να πραγματοποιούνται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα στη διάρκεια της περιόδου έκθεσης. Η μέση θερμοκρασία του νερού σε όλη τη διάρκεια της μελέτης θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 24 και 26 °C. Η θερμοκρασία θα πρέπει να μετράται κάθε ημέρα, σε όλη τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης. Το pH του νερού θα πρέπει να είναι της τάξεως του 6,5 έως 8,5, κατά τη διάρκεια όμως μιας δεδομένης δοκιμής δεν θα πρέπει να αποκλίνει πέραν των ± 0,5 μονάδων pH. Τα πανομοιότυπα δείγματα εντός μιας ορισμένης αγωγής δεν θα πρέπει να διαφέρουν μεταξύ τους από στατιστικής άποψης, και οι ομάδες αγωγής δεν θα πρέπει να διαφέρουν μεταξύ τους από στατιστικής άποψης (με βάση τις καθημερινές μετρήσεις της θερμοκρασίας, και χωρίς να λαμβάνονται υπόψη τυχόν σύντομες αποκλίσεις).

▼M8

Διάρκεια της έκθεσης

29. Κατά τη δοκιμή εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία ώριμα για αναπαραγωγή ψάρια της γενεάς F0 επί τρεις εβδομάδες. Την 4η εβδομάδα και την 24η περίπου ημέρα δοκιμής δημιουργείται η F1, τα ζεύγη αναπαραγωγής της F0 θανατώνονται με ευθανασία, και το βάρος και το μήκος τους καταγράφονται (βλ. παράγραφο 34). Στη συνέχεια, ξεκινά η έκθεση της γενεάς F1 επί 14 επιπλέον εβδομάδες (συνολικά 15 εβδομάδες για την F1) και της γενεάς F2 επί δύο εβδομάδες μέχρι την εκκόλαψη. Η συνολική διάρκεια της δοκιμής είναι κατά κανόνα 19 εβδομάδες (δηλ. μέχρι την εκκόλαψη της F2). Τα χρονοδιαγράμματα της δοκιμής φαίνονται στον πίνακα 2 και επεξηγούνται διεξοδικά στο προσάρτημα 9.

Πρόγραμμα σίτισης

30. Τα ψάρια μπορούν να σιτίζονται με γαρίδες της άλμης *Artemia* spp. (ναύπλιοι ηλικίας 24 ωρών) κατά βούληση, και, συμπληρωματικά, με τροφή του εμπορίου σε νιφάδες, εάν χρειάζεται. Η τροφή σε νιφάδες θα πρέπει να αναλύεται τακτικά για τυχόν ύπαρξη ρύπων όπως οργανοχλωριούχα φυτοφάρμακα, πολυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (ΠΑΥ) και πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCB). Θα πρέπει να αποφεύγονται τροφές με αυξημένα επίπεδα ουσιών που επιδρούν στο ενδοκρινικό σύστημα (φυτοοιστρογόνα), οι οποίες θα μπορούσαν να υπονομεύσουν την απόκριση της δοκιμής. Τα υπολείμματα των τροφών και τα περιττώματα θα πρέπει να απομακρύνονται από τα δοχεία δοκιμής όπως απαιτείται, π.χ. με προσεκτικό καθαρισμό του πυθμένα κάθε δεξαμενής με σιφώνιο. Επίσης, θα πρέπει να καθαρίζονται μία ή δύο φορές την εβδομάδα οι πλευρές και ο πυθμένας κάθε δεξαμενής (π.χ. μέσω ξέσης με σπάτουλα). Παράδειγμα προγράμματος σίτισης παρέχεται στο προσάρτημα 5. Ο ρυθμός σίτισης βασίζεται στον αριθμό ψαριών ανά πανομοιότυπο δείγμα. Ως εκ τούτου, εάν παρατηρηθούν θάνατοι σε ένα πανομοιότυπο δείγμα, ο ρυθμός σίτισης μειώνεται.

Αναλυτικός προσδιορισμός και μετρήσεις

31. Πριν από την έναρξη της περιόδου έκθεσης, θα πρέπει να διασφαλίζεται η ορθή λειτουργία του συστήματος παροχής της χημικής ουσίας. Όλες οι αναλυτικές μέθοδοι που απαιτούνται θα πρέπει να είναι καθιερωμένες και θα πρέπει να υπάρχουν επαρκείς γνώσεις σχετικά με τη χημική σταθερότητα στο σύστημα δοκιμής. Στη διάρκεια της δοκιμής, οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας προσδιορίζονται ανά κατάλληλα χρονικά διαστήματα, κατά προτίμηση τουλάχιστον κάθε εβδομάδα σε ένα πανομοιότυπο δείγμα για κάθε ομάδα αγωγής, με κυκλική εναλλαγή μεταξύ των δειγμάτων της ίδιας ομάδας αγωγής κάθε εβδομάδα.

32. Στη διάρκεια της δοκιμής, οι ρυθμοί ροής του αραιωτικού μέσου και του αποθεματικού διαλύματος θα πρέπει να ελέγχονται σε αντίστοιχα χρονικά διαστήματα (π.χ. τουλάχιστον τρεις φορές την εβδομάδα). Συνιστάται τα αποτελέσματα να βασίζονται σε μετρηθείσες συγκεντρώσεις. Ωστόσο, εάν η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο διάλυμα έχει διατηρηθεί ικανοποιητικά εντός του ±20 % των μέσων μετρηθεισών τιμών καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής, τα αποτελέσματα μπορούν να βασίζονται είτε στις ονομαστικές είτε στις μετρηθείσες τιμές. Σε περίπτωση χημικών ουσιών που εμφανίζουν σημαντική συσσώρευση στα ψάρια, οι συγκεντρώσεις δοκιμής μπορούν να μειώνονται καθώς αναπτύσσονται τα ψάρια. Σε αυτές τις περιπτώσεις, συνιστάται ο ρυθμός ανανέωσης του διαλύματος δοκιμής σε κάθε θάλαμο να προσαρμόζεται ώστε να διατηρείται όσο το δυνατόν περισσότερο η σταθερότητα των συγκεντρώσεων δοκιμής.

Παρατηρήσεις και μετρούμενες παράμετροι

33. Οι μετρούμενες παράμετροι είναι η γεννητικότητα, η γονιμότητα, η εκκόλαψη, η σωματική αύξηση και η επιβίωση με σκοπό την αξιολόγηση των δυνητικών επιδράσεων στο επίπεδο του πληθυσμού. Επίσης, θα πρέπει να παρατηρείται καθημερινά η συμπεριφορά και να καταγράφεται τυχόν ασυνήθης συμπεριφορά. Άλλες παράμετροι που σχετίζονται με τον μηχανισμό δράσης είναι τα ηπατικά επίπεδα mRNA του γονιδίου *vtg* ή τα επίπεδα της πρωτεΐνης VTG που προσδιορίζονται μέσω ανοσοδοκιμασίας (28), οι φαινοτυπικοί δείκτες φύλου όπως οι χαρακτηριστικές θηλοειδείς αποφύσεις του εδρικού πτερυγίου των αρσενικών, η ιστολογική αξιολόγηση του γοναδικού φύλου, και η αξιολόγηση της ιστοπαθολογικής εικόνας του νεφρού, του ήπατος και της γονάδας (βλ. κατάλογο παραμέτρων στον πίνακα 1). Όλες

▼M8

οι ειδικές παράμετροι αξιολογούνται στο πλαίσιο προσδιορισμού του γενετικού φύλου του ατόμου, βάσει της παρουσίας ή απουσίας του γονιδίου *dmy* που καθορίζει το φύλο των αρσενικών ρυζόψαρων (βλ. παράγραφο 41). Επιπλέον, αξιολογείται ο χρόνος μέχρι την ωοτοκία. Επίσης, μπορούν να εξαχθούν απλές αναλογίες των φαινοτυπικών φύλων βάσει των στοιχείων μετρήσεων των θηλοειδών αποφύσεων εδρικού πτερυγίου με σκοπό να προσδιοριστούν μεμονωμένα άτομα ρυζόψαρων ως φαινοτυπικώς αρσενικά ή θηλυκά. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν προορίζεται για την ανίχνευση μικρών αποκλίσεων από την αναμενόμενη αναλογία των φύλων, διότι οι σχετικά μικροί αριθμοί ψαριών ανά πανομοιότυπο δείγμα δεν παρέχουν επαρκή στατιστική ισχύ. Επίσης, στη διάρκεια της ιστοπαθολογικής αξιολόγησης, αξιολογείται η γονάδα και διεξάγονται πολύ πιο ισχυρές στατιστικά αναλύσεις για την αξιολόγηση του γοναδικού φαινοτύπου στο πλαίσιο του γενετικού φύλου.

34. Ο κύριος σκοπός της παρούσας μεθόδου δοκιμών είναι η αξιολόγηση των δυνητικών επιδράσεων μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας που σχετίζονται με τον πληθυσμό. Οι παράμετροι που σχετίζονται με τον μηχανισμό δράσης (VTG, SSC και ορισμένες επιδράσεις στην ιστοπαθολογία των γονάδων) μπορούν επίσης να συμβάλουν στον προσδιορισμό του κατά πόσον κάποια επίδραση μεσολαβείται από ενδοκρινική δραστικότητα. Ωστόσο, οι εν λόγω παράμετροι μπορούν επίσης να επηρεάζονται από συστηματικές και άλλες τοξικότητες. Κατά συνέπεια, μπορεί επίσης να αξιολογείται διεξοδικά η ιστοπαθολογία του ήπατος και των νεφρών με σκοπό την καλύτερη κατανόηση τυχόν αποκρίσεων στις μηχανιστικές παραμέτρους. Εντούτοις, ακόμη κι αν δεν διεξαχθούν αυτές οι αναλυτικές αξιολογήσεις, τυχόν μακροσκοπικές ανωμαλίες που παρατηρούνται περιστασιακά κατά την ιστοπαθολογική αξιολόγηση θα πρέπει να καταγράφονται και να περιλαμβάνονται στην έκθεση δοκιμής.

Θανάτωση των ψαριών με ευθανασία

35. Κατά τη λήξη της έκθεσης των γενεών F0 και F1, και όταν πραγματοποιείται μερική δειγματοληψία των ψαριών που βρίσκονται πριν την ενηλικίωση, τα ψάρια θα πρέπει να θανατώνονται με ευθανασία με κατάλληλες ποσότητες αναισθητικού διαλύματος [π.χ. μεθανοσουλφονικής τρικαΐνης, MS-222 (CAS.886-86-2), 100-500 mg/l] στο οποίο έχει προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα $NaHCO_3$ (διττανθρακικό νάτριο, CAS.144-55-8) 300 mg/l για τον περιορισμό του ερεθισμού του βλεννογόνου. Εάν τα ψάρια εμφανίζουν συμπτώματα έντονης οδύνης (μπορεί να προβλεφθεί με ασφάλεια η πρόκληση ιδιαίτερα έντονης οδύνης και θανάτου) και θεωρούνται ετοιμοθάνατα, πρέπει να αναισθητοποιούνται και να θανατώνονται με ευθανασία, και να συγκαταλέγονται στην παράμετρο της θνησιμότητας στο πλαίσιο της ανάλυσης δεδομένων. Όταν ένα ψάρι θανατώνεται με ευθανασία λόγω νοσηρότητας, αυτό θα πρέπει να καταγράφεται και να περιλαμβάνεται στην έκθεση δοκιμής. Ανάλογα με τη χρονική στιγμή στη διάρκεια της μελέτης κατά την οποία θανατώνεται το ψάρι, μπορεί να διατηρείται με σκοπό τη διεξαγωγή ιστοπαθολογικής ανάλυσης (μονιμοποίηση του ψαριού για την πιθανή διενέργεια ιστοπαθολογικής ανάλυσης).

Χειρισμός των αυγών και των προνυμφών

Συλλογή των αυγών από τα ζεύγη ζευγαρώματος για τον πολλαπλασιασμό της επόμενης γενεάς

36. Η συλλογή των αυγών πραγματοποιείται την πρώτη ημέρα (ή τις πρώτες δύο ημέρες, εφόσον απαιτείται) της 4ης εβδομάδας δοκιμής για τη μετάβαση από την F0 στην F1, και της 18ης εβδομάδας δοκιμής για τη μετάβαση από την F1 στην F2. Η 18η εβδομάδα δοκιμής αντιστοιχεί σε ενήλικα ψάρια F1, ηλικίας 15 εβδομάδων μετά τη γονιμοποίηση. Είναι σημαντικό, πριν από την ημέρα έναρξης συλλογής των αυγών, να απομακρύνονται όλα τα αυγά από κάθε δεξαμενή, προκειμένου να διασφαλίζεται ότι όλα τα αυγά που συλλέγονται από ένα ζεύγος ζευγαρώματος προέρχονται από την ίδια ωοτοκία. Μετά την ωοτοκία, το θηλυκό ρυζόψαρο κρατά μερικές φορές τα αυγά του προσκολλημένα κοντά στον ουρογεννητικό πόρο μέχρι να τα αποθέσει σε υπόστρωμα. Εάν δεν υπάρχει υπόστρωμα στη δεξαμενή, τα αυγά βρίσκονται είτε επάνω στο θηλυκό είτε στον πυθμένα της δεξαμενής. Ανάλογα με το σημείο στο οποίο βρίσκονται, τα αυγά είτε αποσπώνται προσεκτικά από το θηλυκό είτε απομακρύνονται με σιφωνισμό από τον πυθμένα την 4η εβδομάδα δοκιμής για την F0 και τη 18η εβδομάδα δοκιμής για την F1. Όλα τα αυγά που συλλέγονται στο πλαίσιο μιας αγωγής συγχωνεύονται πριν από την κατανομή σε θαλάμους επώασης.

▼M8

37. Τα νημάτια αυγών, που συγκρατούν τα αυγά της ωοτοκίας μαζί, θα πρέπει να απομακρύνονται. Τα γονιμοποιημένα αυγά (έως 20) συλλέγονται από κάθε ζεύγος ζευγαρώματος (1 ζεύγος ανά πανομοιότυπο δείγμα), συγχωνεύονται ανά αγωγή και κατανέμονται συστηματικά σε κατάλληλους θαλάμους επώασης (προσάρτημα 6, 7). Με χρήση στερεοσκοπίου καλής ποιότητας, μπορούν να διαπιστωθούν τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα της πρώιμης γονιμοποίησης/ανάπτυξης όπως η ανύψωση της μεμβράνης γονιμοποίησης (χόριο), η εξελισσόμενη διαίρεση των κυττάρων, ή ο σχηματισμός του βλαστιδίου. Οι θάλαμοι επώασης μπορούν να τοποθετούνται σε χωριστά «ενυδρεία επώασης» που διαμορφώνονται για κάθε αγωγή (στα οποία θα πρέπει να μετρώνται οι παράμετροι ποιότητας του νερού και οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας), ή στο ενυδρείο στο οποίο θα τοποθετηθούν οι εκκολαφθείσες προνύμφες (λεκιθοφόρα ιχθύδια). Σε περίπτωση που η συλλογή πρέπει να συνεχιστεί και για δεύτερη ημέρα (ημέρα δοκιμής 23), όλα τα αυγά και από τις δύο ημέρες θα πρέπει να συγχωνεύονται και, στη συνέχεια, να κατανέμονται συστηματικά σε όλα τα πανομοιότυπα δείγματα της αγωγής.

Εκτροφή των αυγών μέχρι την εκκόλαψη

38. Τα γονιμοποιημένα αυγά ανακινούνται διαρκώς, π.χ. μέσα στον επωαστήρα αυγών με φυσαλίδες αέρα ή μέσω κατακόρυφης ταλάντωσης του επωαστήρα αυγών. Οι θνησιμότητες των γονιμοποιημένων αυγών (εμβρύων) ελέγχονται και καταγράφονται καθημερινά. Τα νεκρά αυγά απομακρύνονται από τους επωαστήρες (προσάρτημα 9). Την 7η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση, η ανακίνηση διακόπτεται ή μειώνεται, ούτως ώστε τα γονιμοποιημένα αυγά να κατακαθίσουν στον πυθμένα του επωαστήρα. Κατ' αυτόν τον τρόπο υποστηρίζεται η εκκόλαψη, συνήθως τις επόμενες μία ή δύο ημέρες. Οι νεαρές προνύμφες (λεκιθοφόρα ιχθύδια) καταγράφονται (συγχωνευμένα για κάθε πανομοιότυπο δείγμα) για κάθε αγωγή και μάρτυρα. Τα γονιμοποιημένα αυγά που δεν έχουν εκκολαφθεί σε χρονικό διάστημα διπλάσιο αυτού της διάμεσης ημέρας εκκόλαψης στον μάρτυρα (συνήθως η 16η ή η 18η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση) θεωρούνται μη βιώσιμα και απορρίπτονται.

39. Σε κάθε δεξαμενή πανομοιότυπου δείγματος μεταφέρονται δώδεκα ιχθύδια. Τα ιχθύδια από τους θαλάμους επώασης συγχωνεύονται και κατανέμονται συστηματικά σε δεξαμενές πανομοιότυπων δειγμάτων (προσάρτημα 7). Αυτό μπορεί να πραγματοποιείται μέσω τυχαίας επιλογής ενός ιχθυδίου από τον πληθυσμό αγωγής και μέσω της διαδοχικής προσθήκης σε ένα ενυδρείο ενός ιχθυδίου τη φορά, χωρίς να γίνεται διάκριση ως προς τα χαρακτηριστικά του. Καθεμία από τις δεξαμενές θα πρέπει να περιέχει ίσο αριθμό (n=12) εκκολαφθεισών προνυμφών (20 προνύμφες σε κάθε δεξαμενή κατά μέγιστο). Εάν ο αριθμός των ιχθυδίων δεν επαρκεί για την πλήρωση όλων των πανομοιότυπων δειγμάτων της αγωγής, συνιστάται να διασφαλίζεται η πλήρωση όσο το δυνατόν περισσότερων επαναλήψεων με 12 ιχθύδια. Ο χειρισμός των ιχθυδίων μπορεί να γίνει με ασφάλεια με γυάλινες πιπέτες μεγάλης διαμέτρου. Τυχόν πλεονάζοντα ιχθύδια θανατώνονται με ευθανασία με αναισθητικό. Στη διάρκεια των λίγων εβδομάδων πριν από τη διαμόρφωση των ζευγών ζευγαρώματος, θα πρέπει να καταγράφεται η ημέρα κατά την οποία παρατηρείται το πρώτο συμβάν ωοτοκίας σε κάθε πανομοιότυπο δείγμα.

Διαμόρφωση των ζευγών ζευγαρώματος

Αποκοπή πτερυγίου και προσδιορισμός του γονοτυπικού φύλου

40. Ο προσδιορισμός του γονοτυπικού φύλου μέσω αποκοπών πτερυγίου πραγματοποιείται την 9η-10η εβδομάδα μετά τη γονιμοποίηση (δηλαδή τη 12η-13η εβδομάδα δοκιμής για τη γενεά F1). Όλα τα ψάρια σε μία δεξαμενή αναισθητοποιούνται (με χρήση εγκεκριμένων μεθόδων, π.χ. IACUC) και λαμβάνεται ένα μικρό δείγμα ιστού είτε από το ραχιαίο είτε από το κοιλιακό άκρο του ουραίου πτερυγίου κάθε ψαριού, προκειμένου να προσδιοριστεί το γονοτυπικό φύλο του ατόμου (29). Τα ψάρια ενός πανομοιότυπου δείγματος μπορούν να στεγάζονται σε μικρούς κλωβούς, κατά προτίμηση ένα ανά κλωβό, στη δεξαμενή. Εναλλακτικά, μπορούν να διατηρούνται δύο ψάρια σε κάθε κλωβό, εφόσον διακρίνονται μεταξύ τους. Μία μέθοδος είναι η διαφοροποίηση του σημείου αποκοπής στο ουραίο πτερύγιο (π.χ. ραχιαίου έναντι κοιλιακού άκρου) κατά τη λήψη του δείγματος ιστού.

▼M8

41. Το γονοτυπικό φύλο του ρυζόψαρου καθορίζεται από ένα αναγνωρισμένο και αλληλουχημένο γονίδιο (*dmy*), το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα Y. Η παρουσία του *dmy* υποδεικνύει άτομο XY ανεξάρτητα από τον φαινότυπο, ενώ η απουσία του *dmy* υποδεικνύει άτομο XX ανεξάρτητα από τον φαινότυπο (30), (31). Από κάθε πτερύγιο εξάγεται το δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) και η παρουσία ή η απουσία του *dmy* μπορεί να προσδιοριστεί με μεθόδους αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) [ανατρέξτε στο προσάρτημα 9 του κεφαλαίου Γ.41 του παρόντος παραρτήματος, ή στο προσάρτημα 3 και 4 στην παράγραφο (29)].

Δημιουργία των ζευγών ζευγαρώματος

42. Οι πληροφορίες για το γονοτυπικό φύλο χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία ζευγών ζευγαρώματος XX-XY ανεξάρτητα από τον εξωτερικό φαινότυπο, οποίος μπορεί να έχει αλλοιωθεί λόγω της έκθεσης σε υπό δοκιμή χημική ουσία. Την ημέρα μετά τον προσδιορισμό του γονοτυπικού φύλου κάθε ψαριού, επιλέγονται τυχαία δύο ψάρια XX και δύο ψάρια XY από κάθε πανομοιότυπο δείγμα και δημιουργούνται δύο ζεύγη ζευγαρώματος XX-XY. Εάν ένα πανομοιότυπο δείγμα δεν διαθέτει είτε δύο ψάρια XX είτε δύο ψάρια XY, τα κατάλληλα ψάρια θα πρέπει να λαμβάνονται από άλλα πανομοιότυπα δείγματα της ίδιας αγωγής. Αυτό που έχει σημασία είναι σε κάθε αγωγή και στους μάρτυρες (24) να υπάρχει ο συνιστώμενος αριθμός ζευγών ζευγαρώματος ανά πανομοιότυπο δείγμα (12). Κατά τη δημιουργία των ζευγών ζευγαρώματος αποκλείονται τα ψάρια με εμφανείς ανωμαλίες (προβλήματα νυκτικής κύστης, παραμορφώσεις της σπονδυλικής στήλης, ακραίες διακυμάνσεις μεγέθους κ.λπ.). Κατά την αναπαραγωγική φάση της F1, κάθε δεξαμενή πανομοιότυπου δείγματος θα πρέπει να περιέχει ένα μόνο ζεύγος ζευγαρώματος.

Δειγματοληψία ψαριών πριν την ενηλικίωση και αξιολόγηση παραμέτρων

Δειγματοληψία ψαριών που δεν ανήκουν στα ζεύγη ζευγαρώματος

43. Μετά τη διαμόρφωση των ζευγών ζευγαρώματος, τα ψάρια που δεν έχουν επιλεγεί για περαιτέρω αναπαραγωγή θανατώνονται με ευθανασία προκειμένου να μετρηθούν οι παράμετροι πριν την ενηλικίωση, τη 12η-13η εβδομάδα δοκιμής (F1). Είναι εξαιρετικά σημαντικό ο χειρισμός των ψαριών να πραγματοποιείται με τέτοιο τρόπο ώστε να εξακολουθεί να είναι γνωστό το γονοτυπικό φύλο που είχε προσδιοριστεί για κάθε άτομο κατά την επιλογή των ζευγών ζευγαρώματος. Όλα τα δεδομένα που συλλέχθηκαν αναλύονται στο πλαίσιο του γονοτυπικού φύλου του συγκεκριμένου ψαριού. Κάθε ψάρι χρησιμοποιείται για διάφορες μετρήσεις παραμέτρων, όπως οι ακόλουθες: προσδιορισμός των ποσοστών επιβίωσης ιχθυδίων/ψαριών πριντην ενηλικίωση [εβδομάδες δοκιμής 7-12/13 (F1)], της αύξησης σε μήκος (σε περίπτωση αποκοπής του ουραίου πτερυγίου λόγω δειγματοληψίας για ανάλυση του γενετικού φύλου, μπορεί να μετράται το κανονικό μήκος. Το ολικό μήκος μπορεί να μετράται εφόσον είχε ληφθεί μόνο ένα τμήμα –ραχιαίο ή κοιλιακό– του ουραίου πτερυγίου για τον προσδιορισμό του *dmy*), της μάζας σώματος (δηλ. νωπό βάρος, στέγνωμα με απορροφητικό χαρτί), του ηπατικού v*tg* mRNA (ή της VTG) και των θηλοειδών αποφύσεων εδρικού πτερυγίου (βλ. πίνακες 1 και 2). Επισημαίνεται ότι τα βάρη και τα μήκη των ζευγών ζευγαρώματος είναι επίσης απαραίτητα για τον υπολογισμό της μέσης σωματικής αύξησης της ομάδας αγωγής.

Δειγματοληψία ιστών και μέτρηση λεκιθογενίνης

44. Το ήπαρ ανατέμνεται και φυλάσσεται στους ≤ –70 °C μέχρι να πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις του *vtg* mRNA (ή της VTG). Η ουρά του ψαριού, περιλαμβανομένου του εδρικού πτερυγίου, διατηρείται σε κατάλληλο μέσο μονιμοποίησης (π.χ. Davidson) ή φωτογραφίζεται ώστε να είναι εφικτή η μέτρηση των θηλοειδών αποφύσεων εδρικού πτερυγίου αργότερα. Εφόσον είναι επιθυμητό, σε αυτό το στάδιο μπορεί να πραγματοποιείται δειγματοληψία και διατήρηση άλλων ιστών (δηλ. γονάδας) σε μέσο μονιμοποίησης. Θα πρέπει να προσδιορίζεται ποσοτικά η συγκέντρωση της ηπατικής VTG με ομόλογη τεχνική ELISA (βλ. τις συνιστώμενες διαδικασίες για το ρυζόψαρο στο προσάρτημα 6 του κεφαλαίου Γ.48 του παρόντος παραρτήματος). Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιούνται οι μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού του vtg mRNA που ανέπτυξε ο Οργανισμός Προστασίας

▼M8

Περιβάλλοντος (EPA) των ΗΠΑ, δηλαδή εκχύλιση του mRNA του γονιδίου *vtg I* από δείγμα ήπατος και ποσοτικός προσδιορισμός του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου *vtg I* (ανά ng συνολικού mRNA) μέσω ποσοτικής PCR (29). Αντί του προσδιορισμού του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου *vtg* στις ομάδες μαρτύρων και αγωγής, μια λιγότερο δύσκολη τεχνικά μέθοδος με χρήση λιγότερων πόρων είναι ο προσδιορισμός της σχετικής (πολλαπλάσιας) μεταβολής της έκφρασης του vtg I στις ομάδες μαρτύρων και αγωγής.

Δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου

45. Υπό κανονικές συνθήκες, μόνο τα σεξουαλικώς ώριμα αρσενικά ρυζόψαρα διαθέτουν θηλοειδείς αποφύσεις, οι οποίες αναπτύσσονται στις αρθρικές πλάκες ορισμένων ακτίνων του εδρικού πτερυγίου ως δευτερογενές σεξουαλικό χαρακτηριστικό, και αποτελούν δυνητικό βιοδείκτη επιδράσεων ενδοκρινικών διαταρακτών. Η μέθοδος καταμέτρησης των θηλοειδών αποφύσεων εδρικού πτερυγίου (ο αριθμός των ενωτικών μεμβρανών με θηλοειδείς αποφύσεις) παρατίθεται στο προσάρτημα 8. Επίσης, ο αριθμός των θηλοειδών αποφύσεων του εδρικού πτερυγίου ανά άτομο χρησιμοποιείται για την κατηγοριοποίηση του συγκεκριμένου ατόμου ως εξωτερικά φαινοτυπικού αρσενικού ή θηλυκού με σκοπό τον υπολογισμό μιας απλής αναλογίας φύλων ανά πανομοιότυπο δείγμα. Ένα ρυζόψαρο με αριθμό μεγαλύτερου του 0 ορίζεται ως αρσενικό· ένα ρυζόψαρο με 0 θηλοειδείς αποφύσεις εδρικού πτερυγίου ορίζεται ως θηλυκό.

Αξιολόγηση της γεννητικότητας και της γονιμότητας

46. Η γεννητικότητα και η γονιμότητα αξιολογούνται τις εβδομάδες δοκιμής 1 έως 3 στη γενεά F0 και τις εβδομάδες 15 έως 17 στη γενεά F1. Τα αυγά συλλέγονται καθημερινά από κάθε ζεύγος ζευγαρώματος επί 21 διαδοχικές ημέρες. Τα αυγά απομακρύνονται προσεκτικά από τα θηλυκά, αφού αυτά παγιδευτούν με απόχη, και/ή αναρροφούνται με σιφώνιο από τον πυθμένα του ενυδρείου κάθε πρωί. Η γεννητικότητα και η γονιμότητα καταγράφονται καθημερινά για κάθε ζεύγος ζευγαρώματος πανομοιότυπου δείγματος. Η γεννητικότητα ορίζεται ως ο αριθμός των αυγών ωοτοκίας, ενώ η γονιμότητα ορίζεται λειτουργικά ως ο αριθμός των γονιμοποιημένων και βιώσιμων αυγών κατά την καταμέτρηση. Η καταμέτρηση θα πρέπει να πραγματοποιείται το συντομότερο δυνατόν μετά τη συλλογή των αυγών.

47. Η γεννητικότητα πανομοιότυπου δείγματος καταγράφεται καθημερινά ως ο αριθμός των αυγών ανά ζεύγος ζευγαρώματος που αναλύεται με τις συνιστώμενες στατιστικές διαδικασίες και με χρήση των μέσων όρων των πανομοιότυπων δειγμάτων. Η γονιμότητα πανομοιότυπου δείγματος είναι το άθροισμα του αριθμού των γόνιμων αυγών που παράγει κάθε ζεύγος ζευγαρώματος διαιρούμενο διά του αθροίσματος του αριθμού των αυγών που παράγει το συγκεκριμένο ζεύγος. Στατιστικά, η γονιμότητα αναλύεται ως αναλογία ανά πανομοιότυπο δείγμα. Η εκκολαψιμότητα πανομοιότυπου δείγματος είναι ο αριθμός των εκκολαφθέντων ιχθυδίων διαιρούμενος διά του πληθυσμιακού φόρτου εμβρύων (συνήθως 20). Στατιστικά, η εκκολαψιμότητα αναλύεται ως αναλογία ανά πανομοιότυπο δείγμα.

Δειγματοληψία ενήλικων ψαριών και αξιολόγηση παραμέτρων

Δειγματοληψία ψαριών ζευγών ζευγαρώματος

48. Μετά τη 17η εβδομάδα δοκιμής (δηλ. μετά την επιτυχή έναρξη της γενεάς F2), τα ενήλικα ψάρια της γενεάς F1 θανατώνονται με ευθανασία και αξιολογούνται διάφορες παράμετροι (βλ. πίνακες 1 και 2). Λαμβάνεται εικόνα του εδρικού πτερυγίου για την αξιολόγηση των θηλοειδών αποφύσεων εδρικού πτερυγίου (βλ. προσάρτημα 8), και/ή η ουρά, ακριβώς πίσω από την αμάρα, αφαιρείται και διατηρείται σε μέσο μονιμοποίησης για καταμέτρηση των θηλοειδών αποφύσεων αργότερα. Μπορεί να πραγματοποιηθεί δειγματοληψία τμήματος του ουραίου πτερυγίου, το οποίο αρχειοθετείται σε αυτό το στάδιο για επαλήθευση του γενετικού φύλου (*dmy*), εφόσον είναι επιθυμητό. Εφόσον απαιτείται, μπορεί να λαμβάνεται δείγμα ιστού με σκοπό την επανάληψη της ανάλυσης *dmy* με σκοπό την επαλήθευση του γενετικού φύλου συγκεκριμένου ψαριού. Ανοίγεται η σωματική κοιλότητα ώστε να επιτραπεί η διαβροχή με κατάλληλα μέσα μονιμοποίησης (π.χ. Davidson), πριν από την εμβύθιση ολόκληρου του σώματος στο μέσο μονιμοποίησης. Εντούτοις, εάν έχει προηγηθεί εκτέλεση κατάλληλου σταδίου αύξησης της διαπερατότητας, δεν είναι απαραίτητο να ανοιχθεί η σωματική κοιλότητα.

▼**M8**

Ιστοπαθολογία

49. Αξιολογείται η ιστοπαθολογική εικόνα κάθε ψαριού για τον εντοπισμό παθολογικών καταστάσεων στον γοναδικό ιστό (30), (29). Όπως αναφέρεται στην παράγραφο 33, άλλες σχετιζόμενες με τον μηχανισμό δράσης παράμετροι που αξιολογούνται στην παρούσα δοκιμασία (δηλ. VTG, SSC και ορισμένες επιδράσεις στην ιστοπαθολογία των γονάδων) ενδέχεται να επηρεάζονται από συστηματικές ή άλλες τοξικότητες. Κατά συνέπεια, μπορεί επίσης να αξιολογείται διεξοδικά η ιστοπαθολογία του ήπατος και των νεφρών με σκοπό την καλύτερη κατανόηση τυχόν αποκρίσεων στις μηχανιστικές παραμέτρους. Εντούτοις, ακόμη κι αν δεν διεξαχθούν αυτές οι αναλυτικές αξιολογήσεις, τυχόν μακροσκοπικές ανωμαλίες που παρατηρούνται περιστασιακά κατά την ιστοπαθολογική αξιολόγηση θα πρέπει να καταγράφονται και να περιλαμβάνονται στην έκθεση δοκιμής. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια προσέγγιση «καθοδικής ανάγνωσης» από την ομάδα υψηλότερης δόσης αγωγής (σε σύγκριση με τον μάρτυρα) μέχρι τη δόση που δεν εμφανίζει επίδραση, ωστόσο καλό είναι να ανατρέχετε στο υλικό καθοδήγησης για την ιστοπαθολογία (29). Συνήθως, όλα τα δείγματα υποβάλλονται σε επεξεργασία/ανατέμνονται και κατόπιν αξιολογούνται από τον ιστοπαθολόγο. Εάν χρησιμοποιείται προσέγγιση καθοδικής ανάγνωσης, επισημαίνεται ότι η διαδικασία Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS) βασίζεται στην προσδοκία ότι η αύξηση των επιπέδων δόσης θα συνοδεύεται επίσης από αύξηση των βιολογικών επιπτώσεων (της παθολογικής κατάστασης). Ως εκ τούτου, η στατιστική ισχύς θα μειωθεί εάν εξετάζεται μόνο μία υψηλή δόση, χωρίς ενδιάμεσες δόσεις. Σε περίπτωση που δεν είναι απαραίτητη η διενέργεια στατιστικής ανάλυσης προκειμένου να διαπιστωθεί ότι η υψηλή δόση δεν έχει καμία επίδραση, η προσέγγιση αυτή μπορεί να είναι αποδεκτή. Από την αξιολόγηση αυτή προκύπτει επίσης ο γοναδικός φαινότυπος.

Άλλες παρατηρήσεις

50. Η δοκιμή MEOGRT παρέχει δεδομένα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν (στο πλαίσιο προσέγγισης βάρους της απόδειξης) για την ταυτόχρονη αξιολόγηση τουλάχιστον δύο τύπων οδών δυσμενούς έκβασης (AOP) που έχουν ως αποτέλεσμα εξασθένιση του αναπαραγωγικού συστήματος: α) οδοί μέσω του ενδοκρινικού συστήματος που περιλαμβάνουν τη διατάραξη του ενδοκρινικού άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων (HPG)· και β) οδοί που προκαλούν μείωση της επιβίωσης, της σωματικής αύξησης (μήκος και βάρος) και της αναπαραγωγής μέσω τοξικότητας που δεν διαμεσολαβείται από το ενδοκρινικό σύστημα. Παράμετροι που μετρώνται συνήθως στις δοκιμές χρόνιας τοξικότητας, όπως η δοκιμή πλήρους κύκλου ζωής και η δοκιμή πρώιμων σταδίων ζωής, περιλαμβάνονται και στην παρούσα δοκιμή, και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση των κινδύνων που ενέχουν τόσο οι τρόποι δράσης που δεν διαμεσολαβούνται από το ενδοκρινικό σύστημα όσο και οι οδοί τοξικότητας που διαμεσολαβούνται από το ενδοκρινικό σύστημα. Στη διάρκεια της δοκιμής, θα πρέπει να παρατηρείται καθημερινά η συμπεριφορά και να καταγράφεται τυχόν ασυνήθης συμπεριφορά. Επιπλέον, τυχόν θνησιμότητα θα πρέπει να καταγράφεται, και θα πρέπει να υπολογίζεται η επιβίωση μέχρι την απομάκρυνση των ψαριών (εβδομάδα δοκιμής 6/7), η επιβίωση μετά την απομάκρυνση μέχρι τη δειγματοληψία ψαριών πριν την ενηλικίωση (εβδομάδα μετά τη γονιμοποίηση 9-10), και η επιβίωση από το ζευγάρωμα μέχρι τη δειγματοληψία των ενήλικων ψαριών.

Πίνακας 1

Επισκόπηση παραμέτρων της MEOGRT (*)

Στάδιο κύκλου ζωής	Παράμετρος	Γενεά
Έμβρυα (2 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση)	Εκκόλαψη (% και χρόνος μέχρι την εκκόλαψη)	F1, F2
Ιχθύδια (4 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση)	Επιβίωση	F1
Πριν την ενηλικίωση (9 ή 10 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση)	Επιβίωση	F1
	Σωματική αύξηση (μήκος και βάρος)	

▼**M8**

Στάδιο κύκλου ζωής	Παράμετρος	Γενεά
	Λεκιθογενίνη (mRNA ή πρωτεΐνη)	
	Δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου (θηλοειδείς αποφύσεις εδρικού πτερυγίου)	
	Αναλογία εξωτερικών σεξουαλικών χαρακτηριστικών	
	Χρόνος μέχρι την 1η ωοτοκία	
Ενήλικα άτομα (12-14 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση)	Αναπαραγωγή (γεννητικότητα και γονιμότητα)	F0, F1
Ενήλικα άτομα (15 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση)	Επιβίωση	F1
	Σωματική αύξηση (μήκος και βάρος)	
	Δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου (θηλοειδείς αποφύσεις εδρικού πτερυγίου)	
	Ιστοπαθολογία (γονάδα, ήπαρ, νεφρός)	

(*) Αυτές οι παράμετροι πρέπει να αναλύονται στατιστικά

ΧΡΟΝΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑ

51. Στον πίνακα 2 φαίνεται το χρονοδιάγραμμα της δοκιμής MEOGRT. Η δοκιμή MEOGRT περιλαμβάνει 4 εβδομάδες έκθεσης ενήλικων ατόμων της γενεάς F0 και 15 εβδομάδες έκθεσης της γενεάς F1, και περίοδο έκθεσης για τη δεύτερη γενεά (F2), μέχρι την εκκόλαψη (2 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση). Όλες οι δραστηριότητες της MEOGRT συνοψίζονται στο προσάρτημα 9.

Πίνακας 2

Χρονοδιαγράμματα της δοκιμής MEOGRT για τις παραμέτρους της έκθεσης και της μέτρησης

Χρονοδιάγραμμα της δοκιμής MEOGRT για τις παραμέτρους της έκθεσης και της μέτρησης

F0	1	2	3	4																
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
F2																		1	2	
Εβδομάδα	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
Στάδιο κύκλου ζωής					**Έμβρυα**					**Προνύμφες**					**Νεαρά**			**Πριν την ενηλικίωση**	**Ενήλικα άτομα**	
Παράμετροι																				
Γεννητικότητα	F_0														F_1					• Ο σχεδιασμός του πειράματος περιλαμβάνει 7 ομάδες πανομοιότυπων δειγμάτων ○ 5 για αγωγές με την υπό δοκιμή χημική ουσία ○ 2 για αγωγές μάρτυρα (4 εάν χρησιμοποιείται διαλύτης) • Σχεδιασμός εντός των ομάδων ○ 12 πανομοιότυπα δείγματα για την αναπαραγωγή, παθολογικές καταστάσεις και SSC ενήλικων ατόμων (εβδομάδες 10 έως 18) ○ 6 πανομοιότυπα δείγματα για εκκόλαψη, επιβίωση, Vtg, και - SSC και σωματική αύξηση ατόμων πριν την ενηλικίωση (εβδομάδες 1 έως 9) SSC: δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου Vtg: λεκιθογενίνη
Γονιμότητα	F_0														F_1					
Εκκόλαψη					F_1														F_2	
Επιβίωση						F_1						F_1						F_1		
Σωματική αύξηση				F_0								F_1						F_1		
Λεκιθογενίνη												F_1								
Δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου												F_1						F_1		
Ιστοπαθολογία																		F_1		
Εβδομάδα δοκιμής	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	

▼M8

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Στατιστική ανάλυση

52. Δεδομένου ότι το γενετικό φύλο προσδιορίζεται για όλα τα ψάρια της δοκιμής, τα δεδομένα θα πρέπει να αναλύονται ως προς κάθε γενετικό φύλο χωριστά (δηλ. τα αρσενικά XY και τα θηλυκά XX). Αν αυτό δεν συμβεί, θα μειωθεί η στατιστική ισχύς οποιασδήποτε ανάλυσης. Για τις στατιστικές αναλύσεις των δεδομένων θα πρέπει, κατά προτίμηση, να ακολουθούνται οι διαδικασίες που περιγράφονται στο έγγραφο «Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application» (Τρέχουσες προσεγγίσεις στη στατιστική ανάλυση των δεδομένων οικοτοξικότητας: Οδηγός εφαρμογής) του ΟΟΣΑ (32). Στο προσάρτημα 10 παρέχεται καθοδήγηση σχετικά με τη στατιστική ανάλυση.

53. Ο σχεδιασμός της δοκιμής και η επιλογή των στατιστικών ελέγχων θα πρέπει να παρέχουν επαρκή στατιστική ισχύ για την ανίχνευση των μεταβολών με βιολογική σημασία στις παραμέτρους για τις οποίες πρέπει να αναφερθεί NOEC (32). Η αναφορά των σχετικών συγκεντρώσεων και παραμέτρων με επίδραση μπορεί να εξαρτάται από το κανονιστικό πλαίσιο. Σε κάθε παράμετρο θα πρέπει να προσδιορίζεται η ποσοστιαία μεταβολή που είναι σημαντικό να ανιχνευθεί ή να εκτιμηθεί. Ο πειραματικός σχεδιασμός θα πρέπει να είναι ειδικά προσαρμοσμένος έτσι ώστε να παρέχει αυτή τη δυνατότητα. Είναι απίθανο να ισχύει η ίδια ποσοστιαία μεταβολή για όλες τις παραμέτρους, ούτε είναι εφικτό να σχεδιαστεί ένα πείραμα που θα πληροί αυτά τα κριτήρια για όλες τις παραμέτρους και, ως εκ τούτου, έχει σημασία για τον κατάλληλο σχεδιασμό του πειράματος η εστίαση στις παραμέτρους που είναι σημαντικές για το αντίστοιχο πείραμα. Στο προσάρτημα 10 διατίθεται ένα στατιστικό διάγραμμα ροής και καθοδήγηση που βοηθούν στην επεξεργασία των δεδομένων και στην επιλογή του καταλληλότερου στατιστικού ελέγχου ή μοντέλου. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες στατιστικές προσεγγίσεις, εφόσον αυτό δικαιολογείται επιστημονικά.

54. Είναι απαραίτητο να αναλύονται οι μεταβολές σε κάθε σειρά πανομοιότυπων δειγμάτων με διαδικασίες ανάλυσης διασποράς ή πίνακα συνάφειας και να χρησιμοποιούνται κατάλληλες και επαρκείς μέθοδοι στατιστικής ανάλυσης με βάση αυτή την ανάλυση. Για την πολλαπλή σύγκριση των αποτελεσμάτων στις επιμέρους συγκεντρώσεις με τα αποτελέσματα από τους μάρτυρες, συνιστάται η διαδικασία αποκλιμάκωσης (step-down) (π.χ. ο έλεγχος Jonckheere-Terpstra) για συνεχείς αποκρίσεις. Όταν τα δεδομένα δεν είναι συμβατά με μονοτονική σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης, θα πρέπει να χρησιμοποιείται ο έλεγχος του Dunnett ή του Dunn (μετά από επαρκή μετασχηματισμό δεδομένων, εφόσον απαιτείται).

55. Για τη γεννητικότητα, πραγματοποιούνται καθημερινά μετρήσεις των αυγών οι οποίες μπορούν, ωστόσο, να αναλύονται ως συνολικοί αριθμοί αυγών ή ως επαναλαμβανόμενη μέτρηση. Στο προσάρτημα 10 παρέχονται αναλυτικές πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο ανάλυσης της εν λόγω παραμέτρου. Για τα ιστοπαθολογικά δεδομένα σε μορφή βαθμολογιών σοβαρότητας, έχει αναπτυχθεί ένας νέος στατιστικός έλεγχος, ο έλεγχος Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS) (33).

56. Κάθε παρατηρούμενη παράμετρος στο πλαίσιο αγωγών με χημική ουσία η οποία παρουσιάζει σημαντική απόκλιση από τους κατάλληλους μάρτυρες θα πρέπει να αναφέρεται.

Θέματα ανάλυσης δεδομένων

Χρήση υπονομευμένων επιπέδων αγωγής

57. Προκειμένου να καθοριστεί εάν ένα πανομοιότυπο δείγμα ή μια ολόκληρη αγωγή παρουσιάζει έκδηλη τοξικότητα και θα πρέπει να εξαιρεθεί από την ανάλυση, εξετάζεται μια σειρά παραγόντων. Η έκδηλη τοξικότητα ορίζεται ως η εμφάνιση > 4 θανάτων σε οποιοδήποτε πανομοιότυπο δείγμα μεταξύ της 3ης εβδομάδας μετά τη γονιμοποίηση και της 9ης εβδομάδας μετά τη γονιμοποίηση, η οποία δεν μπορεί να αποδοθεί σε τεχνικό σφάλμα. Άλλες

▼M8

ενδείξεις έκδηλης τοξικότητας περιλαμβάνουν την αιμορραγία, μη φυσιολογικές συμπεριφορές, μη φυσιολογικούς τρόπους κολύμβησης, ανορεξία και άλλες κλινικές ενδείξεις ασθένειας. Για υποθανατηφόρες ενδείξεις τοξικότητας, ενδέχεται να χρειάζονται ποιοτικές αξιολογήσεις, οι οποίες θα πρέπει πάντα να πραγματοποιούνται σε συνάρτηση με την ομάδα-μάρτυρα νερού αραίωσης (μόνο καθαρό νερό). Εάν είναι εμφανής έκδηλη τοξικότητα στις αγωγές με την υψηλότερη δόση, συνιστάται να λογοκρίνονται οι αγωγές αυτές από την ανάλυση.

Μάρτυρες με διαλύτη

58. Το ενδεχόμενο χρήσης διαλύτη θα πρέπει να εξετάζεται μόνο ως έσχατη λύση, αφού έχουν εξεταστεί όλες οι άλλες δυνατότητες χορήγησης της χημικής ουσίας. Εάν χρησιμοποιείται διαλύτης, θα πρέπει να χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με έναν μάρτυρα νερού αραίωσης. Στο τέλος της δοκιμής, θα πρέπει να αξιολογούνται οι πιθανές επιδράσεις του διαλύτη. Αυτό πραγματοποιείται μέσω στατιστικής σύγκρισης της ομάδας-μάρτυρα με διαλύτη και της ομάδας-μάρτυρα νερού αραίωσης. Οι πλέον κατάλληλες παράμετροι προς εξέταση στην ανάλυση αυτή είναι οι παράγοντες της σωματικής αύξησης (βάρος), καθώς αυτές επηρεάζονται από τυχόν γενικευμένη τοξικότητα. Σε περίπτωση εντοπισμού στατιστικά σημαντικών διαφορών στις παραμέτρους αυτές μεταξύ των ομάδων μάρτυρα νερού αραίωσης και μάρτυρα με διαλύτη, θα πρέπει να χρησιμοποιείται η βέλτιστη κρίση ειδικών προκειμένου να προσδιοριστεί το κατά πόσον υπονομεύεται η εγκυρότητα της δοκιμής. Εάν υπάρχουν διαφορές μεταξύ των δύο μαρτύρων, οι αγωγές με την υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να συγκρίνονται με τον μάρτυρα με διαλύτη, εκτός εάν είναι γνωστό ότι προτιμάται η σύγκριση με τον μάρτυρα νερού αραίωσης. Εάν δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων μάρτυρα, συνιστάται οι αγωγές με την υπό δοκιμή χημική ουσία να συγκρίνονται με τις συγχωνευμένες ομάδες (ομάδες μάρτυρα με διαλύτη και μάρτυρα νερού αραίωσης), εκτός εάν είναι γνωστό ότι προτιμάται η σύγκριση είτε μόνο με την ομάδα μάρτυρα νερού αραίωσης είτε μόνο με την ομάδα μάρτυρα με διαλύτη.

Έκθεση δοκιμής

59. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία: φυσική μορφή και, εφόσον έχουν σημασία, φυσικοχημικές ιδιότητες,

— στοιχεία ταυτότητας της χημικής ουσίας,

Μονοσυστατική ουσία:

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμίξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ. (περιλαμβανομένης της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα, κατά περίπτωση).

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγματα:

— περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Είδος δοκιμής:

— επιστημονική ονομασία, φυλή εάν είναι γνωστή, προέλευση και μέθοδος συλλογής των γονιμοποιημένων αυγών και μετέπειτα χειρισμός.

Συνθήκες δοκιμής:

— φωτοπερίοδος/-οι,

— σχεδιασμός δοκιμής (π.χ. μέγεθος και υλικό θαλάμου, όγκος νερού, αριθμός θαλάμων δοκιμής και πανομοιότυπων δειγμάτων, αριθμός ιχθυδίων ανά πανομοιότυπο δείγμα),

▼M8

— μέθοδος παρασκευής των αποθεματικών διαλυμάτων και συχνότητα ανανέωσης (θα πρέπει να αναφέρονται το μέσο διαλυτοποίησης και η συγκέντρωσή του, εφόσον χρησιμοποιείται),

— μέθοδος χορήγησης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (π.χ. αντλίες, συστήματα αραίωσης),

— η απόδοση ανάκτησης της μεθόδου και οι ονομαστικές συγκεντρώσεις της δοκιμής, το όριο ποσοτικού προσδιορισμού, ο μέσος όρος των μετρούμενων τιμών και οι τυπικές αποκλίσεις τους στα δοχεία δοκιμής και η μέθοδος με την οποία επιτεύχθηκαν, καθώς και στοιχεία που αποδεικνύουν ότι οι μετρήσεις αναφέρονται στις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε αληθές διάλυμα,

— χαρακτηριστικά του νερού αραίωσης: pH, σκληρότητα, θερμοκρασία, συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου, επίπεδα υπολειμματικού χλωρίου (εφόσον μετρούνται), ολικός οργανικός άνθρακας (εφόσον μετριέται), αιωρούμενα στερεά (εφόσον μετρούνται), αλατότητα του δοκιμαστικού μέσου (εφόσον μετριέται) και τυχόν άλλες μετρήσεις,

— οι ονομαστικές συγκεντρώσεις δοκιμής, οι μέσοι όροι των μετρούμενων τιμών και οι τυπικές αποκλίσεις τους,

— ποιότητα του νερού μέσα στα δοχεία δοκιμής, pH, θερμοκρασία (καθημερινά) και συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου,

— λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη σίτιση (π.χ. είδος τροφής, πηγή, ποσότητα και συχνότητα χορήγησης).

Αποτελέσματα:

— ενδείξεις που αποδεικνύουν ότι οι μάρτυρες πληρούν τα συνολικά κριτήρια επικύρωσης,

— δεδομένα για τον μάρτυρα (και για τον μάρτυρα με διαλύτη, όταν χρησιμοποιείται) και τις ομάδες αγωγής ως εξής: εκκόλαψη (εκκολαψιμότητα και χρόνος μέχρι την εκκόλαψη) για τις γενεές F1 και F2, επιβίωση μετά την εκκόλαψη για τη γενεά F1, σωματική αύξηση (μήκος και σωματικό βάρος) για τη γενεά F1, γονοτυπικό φύλο και σεξουαλική διαφοροποίηση (π.χ. δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου βάσει ιστολογικής εξέτασης των θηλοειδών αποφύσεων του εδρικού πτερυγίου και των γονάδων) για τη γενεά F1, φαινοτυπικό φύλο για τη γενεά F1, δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου (θηλοειδείς αποφύσεις εδρικού πτερυγίου) για τη γενεά F1, *vtg* mRNA (ή πρωτεΐνη VTG) για τη γενεά F1, αξιολόγηση της ιστοπαθολογικής εικόνας (γονάδα, ήπαρ και νεφρός) για τη γενεά F1 και αναπαραγωγή (γεννητικότητα και γονιμότητα) για τις γενεές F0, F1 (βλ. πίνακες 1 και 2),

— προσέγγιση για τη στατιστική ανάλυση (ανάλυση παλινδρόμησης ή ανάλυση διασποράς) και την επεξεργασία των δεδομένων (στατιστικοί έλεγχοι ή στατιστικά μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν),

— συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC) για κάθε απόκριση που αξιολογήθηκε,

— κατώτατη συγκέντρωση στην οποία παρατηρούνται επιπτώσεις (LOEC) για κάθε απόκριση που αξιολογήθηκε (σε $p = 0,05$), EC_x για κάθε απόκριση που αξιολογήθηκε, κατά περίπτωση, και διαστήματα εμπιστοσύνης (π.χ. 90 % ή 95 %), καθώς και γραφική παράσταση του προσαρμοσμένου μοντέλου που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της, κλίση της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης, μαθηματικός τύπος του μοντέλου παλινδρόμησης, εκτιμώμενες παράμετροι του μοντέλου και τα τυπικά σφάλματά τους,

— οποιαδήποτε απόκλιση από την εν λόγω μέθοδο δοκιμών και οι αποκλίσεις από τα κριτήρια αποδοχής, και εκτιμήσεις των δυνητικών επιπτώσεων στην έκβαση της δοκιμής.

▼M8

60. Για τα αποτελέσματα των μετρήσεων παραμέτρων, θα πρέπει να παρουσιάζονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις τους (ει δυνατόν, τόσο ανά πανομοιότυπο δείγμα όσο και ανά συγκέντρωση).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 171), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K and Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. Current Protocols in Toxicology 39: 1-36.

(3) OECD (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. Water Research 16: 457–464.

(5) Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T and Kobayashi K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 19: 1925-1930.

(6) Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T and Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 20: 2552-2560.

(7) Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H and Honjo T. (2002). Effects of 17β-Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Chemosphere 47: 71–80.

(8) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 21: 1692-1698.

(9) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-T*ert*-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 22: 1487-1496.

(10) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. Aquatic Toxicology 79: 288-295.

(11) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. Aquatic Toxicology 77: 78-86.

(12) Nakamaura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T and Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes)*. Journal of Applied Toxicology 35:11-23.

(13) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html.

(14) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P and McLachlan M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. Chemosphere 86: 593-599.

▼**M8**

(15) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 23.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(16) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69–92.

(17) Denny JS, Spehar RL, Mead KE and Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.

(18) Koger CS, Teh SJ and Hinton DE. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). Biology of Reproduction 61: 1287-1293.

(19) Kinoshita M, Murata K, Naruse K and Tanaka M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley- Blackwell.

(20) Gormley K and Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. Ecotoxicology and Environmental Safety 54: 330-338.

(21) Κεφάλαιο Γ.15 του παρόντος παραρτήματος: Ψάρια, δοκιμασία βραχυπρόθεσμης τοξικότητας στα έμβρυα και τα λεκιθοφόρα ιχθύδια.

(22) Κεφάλαιο Γ.37 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμασία 21 ημερών σε ψάρια: Μια βραχυπρόθεσμη δοκιμή διαλογής για την οιστρογονική και ανδρογονική δράση, και την αναστολή αρωματάσης.

(23) Κεφάλαιο Γ.41 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμή σεξουαλικής ανάπτυξης ψαριών.

(24) Κεφάλαιο Γ.48 του παρόντος παραρτήματος: Βραχυπρόθεσμη δοκιμή αναπαραγωγής σε ψάρια.

(25) Κεφάλαιο Γ.47 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμή τοξικότητας στα αρχικά στάδια ζωής των ψαριών.

(26) Κεφάλαιο Γ.49 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμή οξείας τοξικότητας σε έμβρυα ψαριών (FET).

(27) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L and Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Viv*o Endocrine Screening Assays. Chemosphere 92: 1067-1076.

(28) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50: 301-308.

(29) OECD (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 227). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(30) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M and Schartl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. Genetics 163: 245–251.

(31) Shinomiya, A, Otake H. Togashi K. Hamaguchi S and Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, Zoological Science 21: 613-619.

(32) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.

(33) Green JW, Springer TA, Saulnier AN and Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33: 1108-1116.

▼**M8**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα

Δοκιμή ELISA: ενζυμική δοκιμή ανοσοπροσρόφησης

Γεννητικότητα = αριθμός αυγών

Γονιμότητα = αριθμός βιώσιμων αυγών/γεννητικότητα

Μεσουραίο μήκος (fork length, FL): αναφέρεται στο μήκος από την άκρη του ρύγχους έως το άκρο των μεσαίων ακτίνων του ουραίου πτερυγίου και χρησιμοποιείται σε ψάρια στα οποία είναι δύσκολο να εντοπιστεί η κατάληξη της σπονδυλικής στήλης (www.fishbase.org)

Εκκολαψιμότητα = εκκολάψεις/αριθμό εμβρύων που φορτώνονται στον επωαστήρα

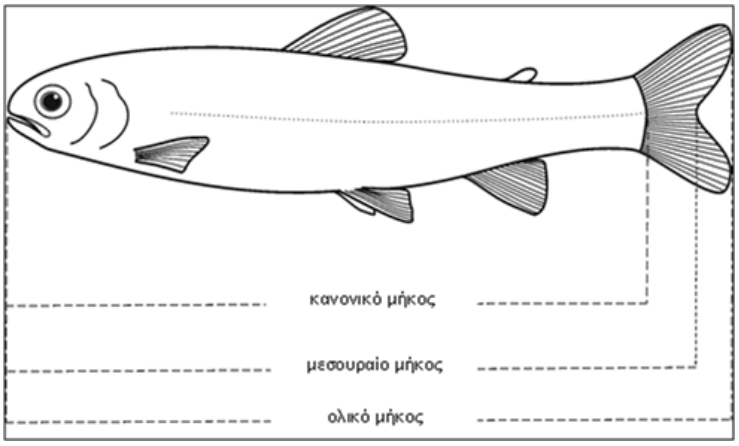
IACUC: Institutional Animal Care and Use Committee (Θεσμική Επιτροπή Φροντίδας και Χρησιμοποίησης Ζώων)

Κανονικό μήκος (standard length, SL): αναφέρεται στο μήκος ψαριού που μετράται από την άκρη του ρύγχους έως το οπίσθιο άκρο του τελευταίου σπονδύλου ή το οπίσθιο άκρο του μεσοπλάγιου τμήματος της υπουραίας πλάκας. Με απλά λόγια, η μέτρηση αυτή δεν περιλαμβάνει το μήκος του ουραίου πτερυγίου (www.fishbase.org)

Ολικό μήκος (total length, TL): αναφέρεται στο μήκος από την άκρη του ρύγχους έως την άκρη του μακρύτερου λοβού του ουραίου πτερυγίου, που συνήθως μετράται με τους λοβούς συμπιεσμένους κατά μήκος του άξονα συμμετρίας. Πρόκειται για μέτρηση ευθείας γραμμής που δεν ακολουθεί την καμπύλη του σώματος (www.fishbase.org)

Σχήμα 1

Περιγραφή των διαφορετικών χρησιμοποιούμενων μηκών



ECx (συγκέντρωση επίδρασης για επίδραση x %): η συγκέντρωση που προκαλεί x % επίδρασης σε υπό δοκιμή οργανισμούς εντός συγκεκριμένης περιόδου έκθεσης σε σύγκριση με μάρτυρα. Για παράδειγμα, η EC50 είναι η συγκέντρωση που εκτιμάται ότι προκαλεί επίδραση σε τελικό σημείο δοκιμής σε ποσοστό 50 % του εκτιθέμενου πληθυσμού επί καθορισμένη περίοδο έκθεσης.

Δοκιμή συνεχούς ροής: δοκιμή με συνεχή ροή των διαλυμάτων δοκιμής διαμέσου του συστήματος δοκιμής κατά τη διάρκεια της έκθεσης.

Άξονας HPG: άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων.

▼**M8**

IUPAC: Διεθνής Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας.

Δείκτης πληθυσμιακού φόρτου: το νωπό βάρος ψαριών κατ' όγκο νερού.

Κατώτατη συγκέντρωση στην οποία παρατηρούνται επιπτώσεις (LOEC) είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην οποία παρατηρείται ότι η εν λόγω ουσία έχει στατιστικά σημαντική επίδραση (με $p < 0,05$), συγκριτικά με τον μάρτυρα. Ωστόσο, όλες οι συγκεντρώσεις δοκιμής που υπερβαίνουν τη LOEC αναμένεται να έχουν βλαβερή επίδραση ίση ή μεγαλύτερη από εκείνη που παρατηρείται στη LOEC. Σε περίπτωση που δεν πληρούνται οι δύο αυτοί όροι, θα πρέπει να εξηγείται πλήρως ο τρόπος επιλογής της LOEC (και, κατ' επέκταση, της NOEC). Τα προσαρτήματα 5 και 6 παρέχουν οδηγίες.

Μέση θανατηφόρος συγκέντρωση (LC50): η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που εκτιμάται ότι είναι θανατηφόρος για το 50 % των υπό δοκιμή οργανισμών κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

Συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC) είναι η αμέσως χαμηλότερη της LOEC συγκέντρωση της δοκιμής, η οποία, συγκριτικά με τον μάρτυρα, δεν έχει στατιστικά σημαντική επίδραση (με $p < 0,05$) εντός συγκεκριμένης περιόδου έκθεσης.

SMILES: (Simplified Molecular Input Line Entry Specification) προδιαγραφή απλοποιημένης μοριακής γραμμικής γραφής.

Πυκνότητα πληθυσμού: ο αριθμός ψαριών κατ' όγκο νερού.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

UVCB: ουσίες άγνωστης ή μεταβλητής σύνθεσης, πολύπλοκα προϊόντα αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά.

VTG: η λεκιθογενίνη είναι φωσφολιπογλυκοπρωτεΐνη που αποτελεί πρόδρομη ένωση των πρωτεϊνών της λεκίθου του αυγού και συναντάται κανονικά σε σεξουαλικά ενεργά θηλυκά άτομα όλων των ωοτόκων ειδών.

WPF: εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση

▼**M8**

Προσάρτημα 2

ΟΡΙΣΜΕΝΑ ΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΟΣ ΑΠΟΔΕΚΤΟΥ ΥΔΑΤΟΣ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

Ουσία	Οριακή συγκέντρωση
Σωματίδια	5 mg/l
Ολικός οργανικός άνθρακας	2 mg/l
Μη ιοντισμένη αμμωνία	1 μg/l
Υπολείμματα χλωρίου	10 μg/l
Ολικά οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα	50 ng/l
Ολικά οργανοχλωριούχα γεωργικά φάρμακα συν πολυχλωριωμένα διφαινύλια	50 ng/l
Ολικό οργανικό χλώριο	25 ng/l
Αργίλιο	1 μg/l
Αρσενικό	1 μg/l
Χρώμιο	1 μg/l
Κοβάλτιο	1 μg/l
Χαλκός	1 μg/l
Σίδηρος	1 μg/l
Μόλυβδος	1 μg/l
Νικέλιο	1 μg/l
Ψευδάργυρος	1 μg/l
Κάδμιο	100 ng/l
Υδράργυρος	100 ng/l
Άργυρος	100 ng/l

▼**M8**

Προσάρτημα 3

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΟΚΙΜΗΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΟGRT

1.	Συνιστώμενο είδος	Ρυζόψαρο (*Oryzias latipes*)
2.	Τύπος δοκιμής	Συνεχής ροή
3.	Θερμοκρασία νερού	Η ονομαστική θερμοκρασία δοκιμής είναι 25°C. Η μέση θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της δοκιμής σε κάθε δεξαμενή είναι 24-26°C.
4.	Ποιότητα φωτισμού	Λαμπτήρες φθορισμού (ευρέος φάσματος και ~150 lumen/m^2) (~150 lux).
5.	Φωτοπερίοδος	16 ώρες φως, 8 ώρες σκοτάδι
6.	Δείκτης πληθυσμιακού φόρτου	F0: 2 ενήλικα/πανομοιότυπο δείγμα· F1: κατά την έναρξη, 20 αυγά (έμβρυα)/πανομοιότυπο δείγμα κατ' ανώτατο όριο, που μειώνονται σε 12 έμβρυα/πανομοιότυπο δείγμα κατά την εκκόλαψη, κατόπιν 2 ενήλικα (ζεύγος αναπαραγωγής XX-XY) στις 9-10 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση για το αναπαραγωγικό στάδιο
7.	Ελάχιστος ωφέλιμος όγκος θαλάμου δοκιμής	1,8 l (π.χ. μέγεθος θαλάμου 18x9x15 cm)
8.	Ανανεώσεις του όγκου των διαλυμάτων δοκιμής	Τουλάχιστον 5 ανανεώσεις όγκου/ημέρα έως και 16 ανανεώσεις όγκου/ημέρα (ή ροή 20 ml/λεπτό)
9.	Ηλικία των υπό δοκιμή οργανισμών κατά την έναρξη	F0: > 12 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση, αλλά συνιστάται να μην υπερβαίνονται οι 16 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση
10.	Αριθμός οργανισμών ανά πανομοιότυπο δείγμα	F0: 2 ψάρια (ζεύγος αρσενικού και θηλυκού)· F1: 20 ψάρια (αυγά)/πανομοιότυπο δείγμα κατ' ανώτατο όριο (παραγόμενα από ζεύγη αναπαραγωγής F0 και F1).
11.	Αριθμός αγωγών	5 αγωγές με υπό δοκιμή χημική ουσία συν κατάλληλοι μάρτυρες
12.	Αριθμός πανομοιότυπων δειγμάτων ανά αγωγή	Τουλάχιστον 6 πανομοιότυπα δείγματα ανά αγωγή για υπό δοκιμή χημική ουσία και τουλάχιστον 12 πανομοιότυπα δείγματα για μάρτυρα και μάρτυρα με διαλύτη, αν χρησιμοποιείται (ο αριθμός των πανομοιότυπων δειγμάτων διπλασιάζεται στην αναπαραγωγική φάση στην F1)
13.	Αριθμός οργανισμών ανά δοκιμή	Τουλάχιστον 84 ψάρια στην F0 και 504 στην F1. (Εάν χρησιμοποιείται μάρτυρας με διαλύτη, 108 ψάρια στην F0 και 648 ψάρια στην F1). Ως μονάδα μέτρησης λαμβάνεται το στάδιο μετά το λεκιθοφόρο ιχθύδιο.
14.	Πρόγραμμα σίτισης	Τα ψάρια τρέφονται με γαρίδες άλμης *Artemia* spp. (ναύπλιοι ηλικίας 24 ωρών) κατά βούληση και, εφόσον χρειαστεί, παρέχεται συμπλήρωμα τροφής του εμπορίου σε νιφάδες (παράδειγμα προγράμματος σίτισης για την εξασφάλιση κατάλληλης ανάπτυξης και σωματικής αύξησης που υποστηρίζει την εύρωστη αναπαραγωγή δίνεται στο προσάρτημα 5).

▼**M8**

15. Αερισμός	Κανένας, εκτός εάν το διαλυμένο οξυγόνο φθάσει < 60 % της τιμής κορεσμού με αέρα
16. Νερό αραίωσης	Καθαρό νερό από επιφανειακά ύδατα, γεώτρηση ή ανασύσταση ή αποχλωριωμένο νερό βρύσης.
17. Περίοδος έκθεσης	Επί το πλείστον 19 εβδομάδες (από F0 έως εκκόλαψη F2)
18. Βιολογικές παράμετροι (κύριες)	Εκκολαψιμότητα (F1 και F2)· επιβίωση [F1, από εκκόλαψη έως 4 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση (τέλος προνυμφικού σταδίου/έναρξη νεαρού σταδίου), από 4 έως 9 (ή 10) εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση (έναρξη νεαρού σταδίου έως υποενηλικίωση) και από 9 έως 15 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση (υποενηλικίωση έως λήξη ενήλικου σταδίου)]· σωματική αύξηση (F1, μήκος και βάρος στις 9 και 15 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση)· δευτερεύοντα χαρακτηριστικά φύλου (F1, θηλές εδρικού πτερυγίου στις 9 και 15 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση)· λεκιθογενίνη (F1, *vtg* mRNA ή πρωτεΐνη VTG στις 15 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση)· φαινοτυπικό φύλο (F1, μέσω ιστολογικής εξέτασης των γονάδων στις 15 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση)· αναπαραγωγή (F0 και F1, γεννητικότητα και γονιμότητα επί 21 ημέρες)· χρόνος ωοτοκίας (F1)· και ιστοπαθολογία (F1, γονάδες, ήπαρ και νεφρός στις 15 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση)
19. Κριτήρια εγκυρότητας της δοκιμής	Διαλυμένο οξυγόνο ≥ 60 % της τιμής κορεσμού με αέρα· μέση θερμοκρασία νερού 24-26°C καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής· επιτυχής αναπαραγωγή ≥ 65 % των θηλυκών μαρτύρων· μέση ημερήσια γεννητικότητα 20 των αυγών των μαρτύρων· Εκκολαψιμότητα ≥ 80 % (κατά μέσο όρο) των μαρτύρων (σε καθεμία από τις F1 και F2)· επιβίωση μετά την εκκόλαψη έως 3 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση ≥ 80 % (μέσος όρος) και από 3 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση έως τη θανάτωση της γενεάς ≥ 90 % (μέσος όρος) των μαρτύρων (F1), οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο διάλυμα θα πρέπει να διατηρούνται σε ικανοποιητικό επίπεδο εντός ± 20 % των μέσων μετρούμενων τιμών.

▼**M8**

Προσάρτημα 4

ΟΔΗΓΙΕΣ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΙΣ ΣΥΝΗΘΕΙΣ ΤΙΜΕΣ ΜΑΡΤΥΡΩΝ

Θα πρέπει να επισημανθεί ότι αυτές οι τιμές μαρτύρων βασίζονται σε περιορισμένο αριθμό μελετών επικύρωσης και ενδέχεται να τροποποιηθούν βάσει περαιτέρω εμπειρίας.

Σωματική αύξηση

Λαμβάνονται μετρήσεις βάρους και μήκους για όλα τα άτομα της δειγματοληψίας στις 9 (ή 10) και στις 15 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση (wpf). Με αυτό το πρωτόκολλο, το προσδοκώμενο υγρό βάρος στις 9 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση είναι 85-145 mg για τα αρσενικά και 95-150 mg για τα θηλυκά. Το προσδοκώμενο βάρος στις 15 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση είναι 250-330 mg για τα αρσενικά και 280-350 mg για τα θηλυκά. Παρότι ενδέχεται να υπάρχουν αποκλίσεις από αυτές τις τιμές σε μεμονωμένα άτομα, εάν το μέσο βάρος των μαρτύρων αποκλίνει σημαντικά από αυτές τις κλίμακες τιμών, ιδίως το κατώτερο όριο, τότε ενδέχεται να υπάρχουν προβλήματα σίτισης, ελέγχου της θερμοκρασίας, ποιότητας του νερού, ασθένειας ή συνδυασμός αυτών των παραγόντων.

Εκκόλαψη

Η επιτυχία εκκόλαψης των μαρτύρων κυμαίνεται συνήθως στο 90 %, εντούτοις δεν είναι σπάνιες τιμές που περιορίζονται στο 80 %. Επιτυχία εκκόλαψης κάτω του 75 % μπορεί να υποδηλώνει ανεπαρκή ανακίνηση των αναπτυσσόμενων αυγών ή ακατάλληλη φροντίδα στον χειρισμό των αυγών, όπως παράλειψη έγκαιρης απομάκρυνσης των νεκρών αυγών, που οδηγεί σε προσβολή από μύκητες.

Επιβίωση

Τα ποσοστά επιβίωσης από την εκκόλαψη έως 3 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση και μετά τις 3 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση είναι συνήθως 90 % ή υψηλότερα για τους μάρτυρες, αλλά αν τα ποσοστά επιβίωσης στα πρώιμα στάδια της ζωής μειώνονται σε επίπεδο έως και 80 % των μαρτύρων δεν θεωρούνται ανησυχητικά. Ποσοστά επιβίωσης των μαρτύρων κάτω του 80 % θα πρέπει να προκαλέσουν ανησυχία και ενδέχεται να υποδηλώνουν ανεπαρκή καθαρισμό των ενυδρείων που οδηγεί σε απώλεια ατόμων σε προνυμφικό στάδιο λόγω ασθένειας ή εξαιτίας ασφυξίας που οφείλεται σε χαμηλά επίπεδα διαλυμένου οξυγόνου. Η θνησιμότητα μπορεί επίσης να οφείλεται σε τραυματισμούς κατά τον καθορισμό της δεξαμενής και σε απώλειες ψαριών σε προνυμφικό στάδιο στο σύστημα αποστράγγισης της δεξαμενής.

Γονίδιο λεκιθογενίνης

Παρότι σε απόλυτα επίπεδα το γονίδιο της λεκιθογενίνης (*vtg*), εκφρασμένο ως αντίγραφα/ng ολικού mRNA, ενδέχεται να παρουσιάζει σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ εργαστηρίων λόγω των διαδικασιών ή του συστήματος οργάνων που χρησιμοποιούνται, η αναλογία *vtg* θα πρέπει να είναι περίπου 200 φορές μεγαλύτερη στους θηλυκούς μάρτυρες σε σύγκριση με τους αρσενικούς μάρτυρες. Εντούτοις, δεν είναι σπάνιο η αναλογία αυτή να ανέρχεται σε τιμές 1.000 έως 2.000, ενώ αναλογίες κάτω του 200 είναι ύποπτες και ενδέχεται να υποδηλώνουν προβλήματα μόλυνσης του δείγματος ή προβλήματα στην διαδικασία και/ή στα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται.

Δευτερεύοντα χαρακτηριστικά του φύλου

Στα αρσενικά, το κανονικό εύρος δευτερευόντων χαρακτηριστικών του φύλου, που ορίζονται ως ο συνολικός αριθμός των τμημάτων των ακτίνων των θηλών του εδρικού πτερυγίου, είναι 40-80 στις 9-10 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση. Στις 15 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση, ο αριθμός στους αρσενικούς μάρτυρες θα πρέπει να είναι περίπου 80-120 και στους θηλυκούς μάρτυρες 0. Για λόγους που παραμένουν ανεξήγητοι, σε σπάνιες περιπτώσεις ορισμένα αρσενικά δεν εμφανίζουν θηλές πριν από τις 9 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση, αλλά δεδομένου ότι όλοι οι αρσενικοί μάρτυρες αναπτύσσουν θηλές έως τις 15 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση, αυτό οφείλεται πιθανότατα σε καθυστερημένη ανάπτυξη. Η παρουσία θηλών σε θηλυκούς μάρτυρες υποδεικνύει την παρουσία αρσενικών XX στον πληθυσμό.

▼**M8**

Αρσενικά XX

Η κανονική συχνότητα εμφάνισης αρσενικών XX στην καλλιέργεια είναι περίπου 4 % ή λιγότερο στους 25°C, ενώ παρατηρείται αυξημένη συχνότητα με την αύξηση της θερμοκρασίας. Θα πρέπει να ληφθούν μέτρα για την ελαχιστοποίηση της αναλογίας των αρσενικών XX στον πληθυσμό. Δεδομένου ότι η συχνότητα εμφάνισης αρσενικών XX οφείλεται εν μέρει σε γενετικό παράγοντα και συνεπώς είναι κληρονομήσιμη, αποτελεσματικό μέσο μείωσης της εμφάνισης αρσενικών XX στον πληθυσμό είναι η παρακολούθηση του αποθέματος της καλλιέργειας και η αποφυγή χρήσης αρσενικών XX για τον πολλαπλασιασμό του.

Δραστηριότητα ωοτοκίας

Η δραστηριότητα ωοτοκίας στα πανομοιότυπα δείγματα-μάρτυρες θα πρέπει να παρακολουθείται καθημερινά πριν από τη διενέργεια αξιολόγησης της γεννητικότητας. Τα ζεύγη μαρτύρων μπορούν να αξιολογηθούν σε ποιοτικό επίπεδο οπτικά για τον εντοπισμό στοιχείων που υποδηλώνουν δραστηριότητα ωοτοκίας. Έως τις 12-14 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση θα πρέπει να παρατηρηθεί ωοτοκία στα περισσότερα ζεύγη μαρτύρων. Μικρός αριθμός ζευγών αναπαραγωγής κατά την περίοδο αυτή υποδηλώνει ενδεχόμενα προβλήματα υγείας, ωριμότητας ή ευζωίας των ψαριών.

Γεννητικότητα

Στα υγιή ρυζόψαρα ηλικίας 12-14 εβδομάδων μετά τη γονιμοποίηση, που σιτίζονται σωστά, η ωοτοκία είναι συνήθως καθημερινή, με παραγωγή που κυμαίνεται από 15 έως 50 αυγά ανά ημέρα. Η παραγωγή αυγών στα 16 από τα προτεινόμενα 24 ζεύγη αναπαραγωγής μαρτύρων (> 65 %) θα πρέπει να υπερβαίνει τα 20 αυγά ανά ημέρα και μπορεί να φθάσει τα 40 αυγά ανά ημέρα. Χαμηλότερη ποσότητα μπορεί να υποδηλώνει ανώριμα, υποσιτιζόμενα ή μη υγιή αναπαραγωγικά ζεύγη.

Γονιμότητα

Το ποσοστό γόνιμων αυγών στα αναπαραγωγικά ζεύγη μαρτύρων είναι κατά κανόνα της τάξης του 90 %, ενώ δεν είναι σπάνιες οι τιμές άνω του 90 %. Ποσοστά γονιμότητας κάτω του 80 % των αυγών των μαρτύρων είναι ύποπτα και μπορεί να υποδηλώνουν την ύπαρξη μη υγιών ατόμων ή μη ιδανικών συνθηκών καλλιέργειας.

▼**M8**

Προσάρτημα 5

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΣΙΤΙΣΗΣ

Στον πίνακα 1 δίνεται ένα παράδειγμα προγράμματος σίτισης για την εξασφάλιση σωστής ανάπτυξης και σωματικής αύξησης, που υποστηρίζει την εύρωστη αναπαραγωγή. Οι αποκλίσεις από αυτό το πρόγραμμα σίτισης είναι αποδεκτές, αλλά συνιστάται η δοκιμή τους για να εξακριβωθεί ότι παρατηρείται αποδεκτό επίπεδο σωματικής αύξησης και αναπαραγωγής. Προκειμένου να ακολουθηθεί το προτεινόμενο πρόγραμμα σίτισης, θα πρέπει πριν από την έναρξη της δοκιμής να προσδιοριστεί το ξηρό βάρος γαρίδων άλμης ανά όγκο πολτού γαρίδων άλμης. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί με ζύγιση ενός προσδιορισμένου όγκου πολτού γαρίδων άλμης ο οποίος έχει ξηρανθεί επί 24 ώρες στους 60 °C σε προζυγισμένα σκεύη. Για να προσμετρηθεί το βάρος του άλατος στον πολτό, θα πρέπει να ξηρανθεί αντίστοιχος όγκος του διαλύματος άλατος που χρησιμοποιήθηκε στον πολτό. Εναλλακτικά, οι γαρίδες άλμης μπορούν να περάσουν από διήθηση και έκπλυση με απεσταγμένο νερό πριν από την ξήρανση, ώστε να μη χρειάζεται να μετρηθεί το βάρος του «τυφλού διαλύματος άλατος». Τα στοιχεία αυτά χρησιμοποιούνται για τη μετατροπή των στοιχείων του πίνακα από ξηρό βάρος γαρίδων άλμης σε όγκο πολτού γαρίδων άλμης που πρέπει να χρησιμοποιηθεί για τη σίτιση ανά άτομο. Επιπλέον, συνιστάται οι κατάλληλες δόσεις πολτού γαρίδων άλμης να ζυγίζονται σε εβδομαδιαία βάση, ώστε να επαληθεύεται ότι χορηγείται το σωστό ξηρό βάρος γαρίδων άλμης.

Πίνακας 1

Παράδειγμα προγράμματος σίτισης

Χρόνος (μετά την εκκόλαψη)	Γαρίδες άλμης (mg ξηρού βάρους/ψάρι/ημέρα)
1η ημέρα	0,5
2η ημέρα	0,5
3η ημέρα	0,6
4η ημέρα	0,7
5η ημέρα	0,8
6η ημέρα	1,0
7η ημέρα	1,3
8η ημέρα	1,7
9η ημέρα	2,2
10η ημέρα	2,8
11η ημέρα	3,5
12η ημέρα	4,2
13η ημέρα	4,5
14η ημέρα	4,8
15η ημέρα	5,2
16η-21η ημέρα	5,6

▼**M8**

Χρόνος (μετά την εκκόλαψη)	Γαρίδες άλμης (mg ξηρού βάρους/ψάρι/ημέρα)
4η εβδομάδα	7,7
5η εβδομάδα	9,0
6η εβδομάδα	11,0
7η εβδομάδα	13,5
8η εβδομάδα-θανάτωση	22,5

▼**M8**

Προσάρτημα 6

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΘΑΛΑΜΟΥ ΕΠΩΑΣΗΣ ΑΥΓΩΝ

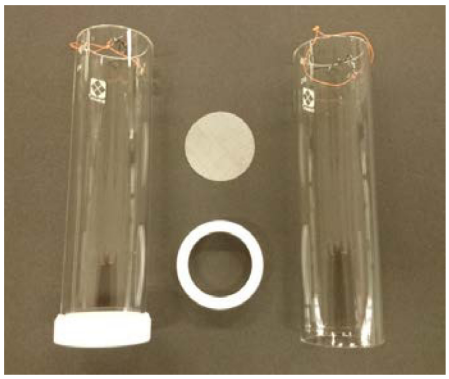
Παράδειγμα Α





Ο επωαστήρας αυτός αποτελείται από έναν γυάλινο σωλήνα φυγοκέντρου κομμένο εγκάρσια, ο οποίος συνδέεται με θήκη από ανοξείδωτο χάλυβα και συγκρατείται στη θέση του από το κοχλιωτό πώμα φυγοκέντρησης. Ένα μικρός σωλήνας από γυαλί ή ανοξείδωτο χάλυβα προβάλλει διαμέσου του πώματος και τοποθετείται κοντά στον στρογγυλό πυθμένα, διοχετεύοντας αέρα με αργό ρυθμό ώστε να αιωρούνται τα αυγά και να μειώνεται η μετάδοση μολύνσεων από σαπροφυτικούς μύκητες μεταξύ των αυγών, ενώ παράλληλα διευκολύνεται η ανταλλαγή χημικών ουσιών μεταξύ του επωαστήρα και της δεξαμενής συγκράτησης.

Παράδειγμα Β



▼**M8**



Ο επωαστήρας αυτός αποτελείται από ένα γυάλινο κυλινδρικό σώμα (διαμέτρου 5 cm και ύψους 10 cm) και συρματόπλεγμα από ανοξείδωτο χάλυβα (0,25 φ και μεγέθους ματιού 32), το οποίο προσδένεται στον πυθμένα του σώματος με έναν δακτύλιο PTFE. Οι επωαστήρες αναρτώνται από τη ράβδο ανύψωσης στις δεξαμενές και ανακινούνται κάθετα (πλάτος περίπου 5 cm) με περιοδικότητα κατάλληλη (περίπου ανά 4 δευτερόλεπτα) για τα αυγά ρυζόψαρου.

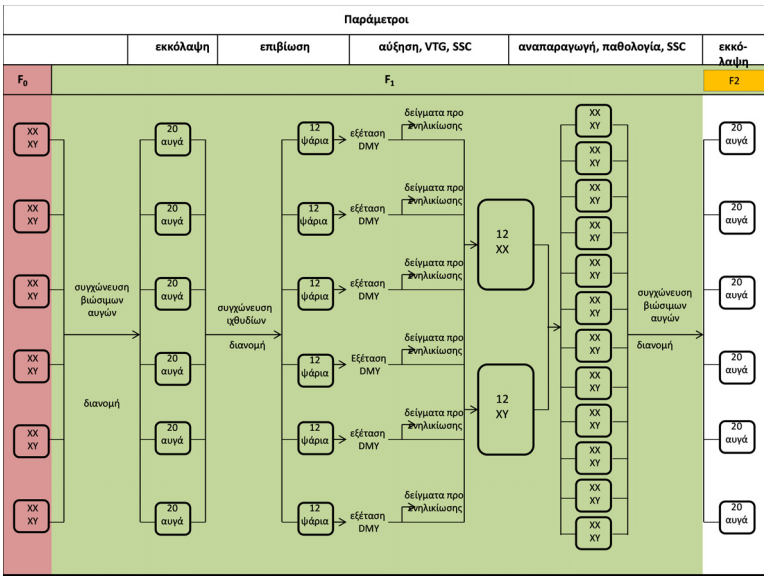
▼**M8**

Προσάρτημα 7

ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΧΩΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΑΤΟΜΩΝ ΣΤΑ ΠΑΝΟΜΟΙΟΤΥΠΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΔΟΚΙΜΩΝ MEOGRT

Σχήμα 1

Συγχώνευση και επανασύσταση πανομοιότυπων δειγμάτων στη μέθοδο MEOGRT. Το σχήμα αναπαριστά μία αγωγή ή ½ του μάρτυρα. Λόγω της συγχώνευσης, τα πανομοιότυπα δείγματα δεν παραμένουν τα ίδια καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Να σημειωθεί ότι ο όρος «αυγά» αναφέρεται σε βιώσιμα γονιμοποιημένα αυγά (αντίστοιχα των εμβρύων).



Αγωγή και πανομοιότυπα δείγματα

Η μέθοδος δοκιμής συνιστά πέντε αγωγές με υπό δοκιμή χημική ουσία με χρήση υλικού τεχνικής καθαρότητας και ενός αρνητικού μάρτυρα. Ο αριθμός των πανομοιότυπων δειγμάτων ανά αγωγή δεν παραμένει σταθερός στη διάρκεια της MEOGRT και ο αριθμός των πανομοιότυπων δειγμάτων στην αγωγή με μάρτυρα είναι διπλάσιος σε σχέση με οποιαδήποτε αγωγή με υπό δοκιμή χημική ουσία. Στην F0, κάθε αγωγή με υπό δοκιμή ουσία έχει έξι πανομοιότυπα δείγματα ενώ η αγωγή με αρνητικό μάρτυρα έχει 12 πανομοιότυπα δείγματα. Συνιστάται ιδιαίτερα η αποφυγή χρήσης διαλυτών και, εφόσον χρησιμοποιούνται, στην έκθεση MEOGRT θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται αιτιολόγηση αφενός της χρήσης του διαλύτη και, αφετέρου, της επιλογής του διαλύτη. Επίσης, εάν χρησιμοποιηθεί διαλύτης, απαιτούνται δύο τύποι μαρτύρων: α) μάρτυρας με διαλύτη και β) αρνητικός μάρτυρας. Καθεμία από τις δύο αυτές ομάδες μαρτύρων θα πρέπει να αποτελείται από πλήρη σειρά πανομοιότυπων δειγμάτων σε όλα τα σημεία του χρονοδιαγράμματος MEOGRT. Στη διάρκεια της δοκιμής ανάπτυξης οργανισμών γενεάς F1 (και F2, έως την εκκόλαψη), αυτή η δομή πανομοιότυπων δειγμάτων παραμένει η ίδια. Εντούτοις, στο ενήλικο στάδιο, όταν διαμορφώνονται τα ζεύγη αναπαραγωγής F1, ο αριθμός πανομοιότυπων δειγμάτων ζευγών αναπαραγωγής ανά αγωγή ιδανικά διπλασιάζεται· έτσι θα υπάρχουν έως και 12 ζεύγη πανομοιότυπων δειγμάτων σε κάθε αγωγή με υπό δοκιμή χημική ουσία και 24 ζεύγη πανομοιότυπων δειγμάτων στην ομάδα μαρτύρων (και άλλα 24 ζεύγη πανομοιότυπων δειγμάτων στον μάρτυρα με διαλύτη, εφόσον χρειαστεί). Ο καθορισμός της εκκόλαψης από έμβρυα που γεννήθηκαν από ζεύγη F1 γίνεται με την ίδια δομή πανομοιότυπων δειγμάτων όπως και με τα έμβρυα που γεννήθηκαν από ζεύγη F0, πράγμα που σημαίνει ότι αρχικά θα υπάρχουν έξι πανομοιότυπα δείγματα ανά αγωγή με υπό δοκιμή χημική ουσία και 12 πανομοιότυπα δείγματα στις ομάδες μαρτύρων.

▼**M8**

Προσάρτημα 8

ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ ΘΗΛΟΕΙΔΩΝ ΑΠΟΦΥΣΕΩΝ ΕΔΡΙΚΟΥ ΠΤΕΡΥΓΙΟΥ

Βασικά υλικά και αντιδραστήρια

— Στερεοσκόπιο (προαιρετικά με συνδεδεμένη φωτογραφική μηχανή)

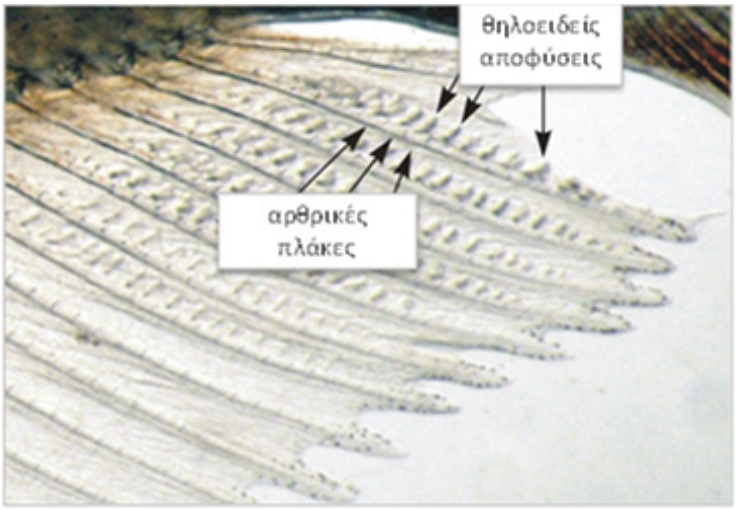
— Μέσο μονιμοποίησης [π.χ. Davidson (δεν συνιστάται το μέσο του Bouin)], σε περίπτωση που η μέτρηση δεν πραγματοποιείται από εικόνα

Διαδικασίες

Μετά τη νεκροψία/νεκροτομή, θα πρέπει να λαμβάνεται εικόνα του εδρικού πτερυγίου ώστε να διευκολύνεται η μέτρηση των θηλοειδών αποφύσεων εδρικού πτερυγίου. Παρότι η φωτογράφιση θεωρείται η συνιστώμενη μέθοδος, το εδρικό πτερύγιο μπορεί να μονιμοποιείται με μέσο μονιμοποίησης του Davidson ή άλλο κατάλληλο μέσο μονιμοποίησης επί περίπου 1 λεπτό. Είναι σημαντικό το εδρικό πτερύγιο να διατηρείται επίπεδο κατά τη μονιμοποίηση ώστε να διευκολύνεται η μέτρηση των θηλοειδών αποφύσεων. Μέχρι την ανάλυση, το πτώμα με το εδρικό πτερύγιο μπορούν να φυλάσσονται σε μέσο μονιμοποίησης του Davidson ή άλλο μέσο μονιμοποίησης. Μετράται ο αριθμός των αρθρικών πλακών (βλ. **σχήμα 1**) με τις θηλοειδείς αποφύσεις που προεξέχουν από την οπίσθια παρυφή της αρθρικής πλάκας.

Σχήμα 1

Θηλοειδείς αποφύσεις εδρικού πτερυγίου



▼M8

Προσάρτημα 9

ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΧΡΟΝΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΤΗΣ MEOGRT

Εβδομάδες δοκιμής 1-3 (F0)

Τα ψάρια ωοτοκίας της γενεάς F0 που πληρούν τα κριτήρια επιλογής (βλ. παραγράφους 16-20) εκτίθενται επί τρεις εβδομάδες προκειμένου να καταστεί εφικτή η έκθεση των αναπτυσσόμενων γαμετών και γοναδικών ιστών στην υπό δοκιμή χημική ουσία. Κάθε δεξαμενή πανομοιότυπων δειγμάτων στεγάζει ένα μεμονωμένο ζεύγος ψαριών αναπαραγωγής (ζεύγος αναπαραγωγής με θηλυκό XX και αρσενικό XY). Τα αυγά της ωοτοκίας συλλέγονται, μετρώνται και αξιολογούνται ως προς τη γονιμότητα επί 21 διαδοχικές ημέρες, με αφετηρία την ημέρα δοκιμής 1.

Εβδομάδα δοκιμής 4 (F0 και F1)

Συνιστάται τα γονιμοποιημένα και βιώσιμα αυγά (έμβρυα) να συλλέγονται σε μία μόνο ημέρα· εντούτοις, εάν δεν υπάρχουν αρκετά έμβρυα, τα έμβρυα μπορούν να συλλέγονται και δεύτερη ημέρα. Εάν συλλέγονται σε δύο ημέρες, όλα τα έμβρυα των αγωγών που συλλέχθηκαν την πρώτη ημέρα συγχωνεύονται με τα έμβρυα που συλλέχθηκαν τη δεύτερη ημέρα. Στη συνέχεια, το σύνολο των συγχωνευμένων εμβρύων για κάθε αγωγή κατανέμεται τυχαία σε καθέναν από τους επωαστήρες πανομοιότυπων δειγμάτων, σε αναλογία 20 εμβρύων ανά επωαστήρα. Οι θνησιμότητες των γονιμοποιημένων αυγών (εμβρύων) ελέγχονται και καταγράφονται καθημερινά. Τα νεκρά αυγά απομακρύνονται από τους επωαστήρες (ο θάνατος γονιμοποιημένων αυγών, ιδίως κατά τα πρώιμα στάδια, διαπιστώνεται από την εμφανή μείωση της διαύγειας και την αλλαγή του φυσικού χρωματισμού, οι οποίες οφείλονται σε πήξη και/ή κατακρήμνιση πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα τα αυγά να αποκτούν λευκή, αδιαφανή εμφάνιση, ΟΟΣΑ 2010).

Σημείωση: Σε περίπτωση που για μια μεμονωμένη αγωγή απαιτείται δεύτερη ημέρα συλλογής, η εν λόγω διαδικασία θα πρέπει να ακολουθείται για όλες τις αγωγές (περιλαμβανομένων των μαρτύρων). Εάν μετά τη δεύτερη ημέρα συλλογής οι αριθμοί των εμβρύων εξακολουθούν να μην αρκούν για την τοποθέτηση πληθυσμού 20 εμβρύων ανά επωαστήρα αγωγής, μειώστε τον αριθμό των εμβρύων που τοποθετούνται σε επωαστήρες σε 15 έμβρυα ανά επωαστήρα για τη συγκεκριμένη αγωγή. Εάν δεν υπάρχουν αρκετά έμβρυα ώστε να τοποθετηθούν 15 ανά επωαστήρα, μειώστε τον αριθμό των επωαστήρων πανομοιότυπων δειγμάτων μέχρις ότου ο αριθμός των εμβρύων να επαρκεί για την τοποθέτηση 15 εμβρύων ανά επωαστήρα. Επιπλέον, μπορούν να προστεθούν περισσότερα ζεύγη αναπαραγωγής ανά αγωγή και μάρτυρες στη γενεά F0 ώστε να παραχθούν περισσότερα αυγά προκειμένου να επιτευχθεί ο συνιστώμενος αριθμός των 20 αυγών ανά επωαστήρα.

Την 24η ημέρα δοκιμής, τα ζεύγη αναπαραγωγής της F0 θανατώνονται με ευθανασία, και καταγράφεται το βάρος και το μήκος τους. Εφόσον απαιτείται, τα ζεύγη αναπαραγωγής της F0 μπορούν να διατηρούνται επί 1-2 επιπλέον ημέρες προκειμένου να δημιουργηθεί νέα γενεά F1.

Εβδομάδες δοκιμής 5-6 (F1)

Μία ή δύο ημέρες πριν από την αναμενόμενη έναρξη της εκκόλαψης, σταματήστε ή μειώστε την ανάδευση των επωαζόμενων αυγών προκειμένου να επισπεύσετε την εκκόλαψη. Καθώς τα έμβρυα εκκολάπτονται κάθε ημέρα, τα ιχθύδια συγχωνεύονται ανά αγωγή και κατανέμονται συστηματικά σε κάθε δεξαμενή προνυμφών πανομοιότυπων δειγμάτων εντός κάθε ορισμένης αγωγής, έως τον αριθμό των 12 ιχθυδίων. Αυτό γίνεται με τυχαία επιλογή ιχθυδίων και τοποθέτηση ενός μεμονωμένου ιχθυδίου τη φορά σε διαδοχικά πανομοιότυπα δείγματα, αδιακρίτως, κατά σειρά στα επιμέρους πανομοιότυπα δείγματα αγωγής μέχρις ότου όλα τα πανομοιότυπα δείγματα της αγωγής να περιλαμβάνουν 12 ιχθύδια. Εάν δεν υπάρχουν αρκετά ιχθύδια ώστε να συμπληρωθούν όλα τα πανομοιότυπα δείγματα, φροντίστε ώστε όσο το δυνατόν περισσότερα δείγματα να περιλαμβάνουν 12 ιχθύδια προκειμένου να ξεκινήσει η φάση της γενεάς F1.

Τα αυγά που δεν έχουν εκκολαφθεί σε χρονικό διάστημα διπλάσιο του διάμεσου αριθμού ημερών εκκόλαψης στον μάρτυρα θεωρούνται μη βιώσιμα και απορρίπτονται. Ο αριθμός των ιχθυδίων καταγράφεται και υπολογίζεται η επιτυχής εκκόλαψη (εκκολαψιμότητα) σε κάθε πανομοιότυπο δείγμα.

▼M8

Εβδομάδες δοκιμής 7-11 (F1)

Η επιβίωση των προνυμφών ελέγχεται και καταγράφεται καθημερινά σε όλα τα πανομοιότυπα δείγματα. Την 43η ημέρα δοκιμής, καταγράφεται ο αριθμός των επιβιωσάντων ψαριών σε κάθε πανομοιότυπο δείγμα, καθώς και ο αρχικός αριθμός των ιχθυδίων που είχαν τοποθετηθεί (κανονικά δώδεκα). Κατ' αυτόν τον τρόπο, επιτρέπεται ο υπολογισμός της ποσοστιαίας επιβίωσης από το στάδιο της εκκόλαψης έως το στάδιο του ατόμου πριν την ενηλικίωση.

Εβδομάδα δοκιμής 12 (F1)

Την ημέρα δοκιμής 78-85 λαμβάνεται μικρό δείγμα από το ουραίο πτερύγιο κάθε ψαριού προκειμένου να προσδιοριστεί το γονοτυπικό φύλο του ατόμου (αποκοπή πτερυγίου) για όλα τα ψάρια. Η πληροφορία αυτή χρησιμοποιείται για τη δημιουργία των ζευγών ζευγαρώματος.

Εντός τριών ημερών μετά τον προσδιορισμό του γονοτυπικού φύλου κάθε ψαριού, δημιουργούνται με τυχαίο τρόπο 12 ζεύγη αναπαραγωγής ανά αγωγή και 24 ζεύγη ανά μάρτυρα. Δύο ψάρια XX και XY από κάθε πανομοιότυπο δείγμα επιλέγονται τυχαία, συγχωνεύονται κατά φύλο και, στη συνέχεια, γίνεται τυχαία επιλογή για τη δημιουργία ενός ζεύγους αναπαραγωγής (ζεύγος XX-XY). Δημιουργούνται τουλάχιστον 12 πανομοιότυπα δείγματα ανά αγωγή με τη χημική ουσία και τουλάχιστον 24 πανομοιότυπα δείγματα για τον μάρτυρα, με ένα ζεύγος αναπαραγωγής ανά πανομοιότυπο δείγμα. Εάν ένα πανομοιότυπο δείγμα δεν διαθέτει είτε δύο ψάρια XX είτε δύο ψάρια XY για συγχώνευση, τα ψάρια με τον κατάλληλο γονότυπο φύλου θα πρέπει να λαμβάνονται από άλλα δείγματα της ίδιας αγωγής.

Τα εναπομείναντα ψάρια (8 ψάρια ανά πανομοιότυπο δείγμα κατά μέγιστο) θανατώνονται με ευθανασία και πραγματοποιείται δειγματοληψία για τις διάφορες παραμέτρους ατόμων πριν την ενηλικίωση. Τα δεδομένα *dmy* (XX ή XY) για όλα τα δείγματα ατόμων πριν την ενηλικίωση διατηρούνται προκειμένου να διασφαλιστεί ότι όλα τα δεδομένα παραμέτρων μπορούν να συσχετιστούν με το γενετικό φύλο κάθε μεμονωμένου ατόμου.

Εβδομάδες δοκιμής 13-14 (F1)

Η έκθεση συνεχίζεται, καθώς τα ζεύγη αναπαραγωγής ατόμων πριν την ενηλικίωση αναπτύσσονται σε ενήλικα άτομα. Την 98η ημέρα δοκιμής (δηλ. την ημέρα προτού ξεκινήσει η συλλογή των αυγών), τα αυγά απομακρύνονται από τα ενυδρεία και τα θηλυκά.

Εβδομάδες δοκιμής 15-17 (F1)

Τα αυγά ωοτοκίας συλλέγονται καθημερινά επί 21 διαδοχικές ημέρες σε κάθε πανομοιότυπο δείγμα, και αξιολογούνται ως προς τη γεννητικότητα και τη γονιμότητα.

Εβδομάδα δοκιμής 18 (επανάληψη της 4ης εβδομάδας δοκιμής) (F1 και F2)

Το πρωί της 120ης ημέρας δοκιμής γίνεται συλλογή των αυγών σε κάθε δεξαμενή πανομοιότυπου δείγματος. Τα συλλεχθέντα αυγά αξιολογούνται και τα γονιμοποιημένα αυγά (αφού αφαιρεθούν τα νημάτια) καθενός από τα ζεύγη αναπαραγωγής συγχωνεύονται ανά αγωγή, και κατανέμονται συστηματικά σε θαλάμους επώασης αυγών, με 20 γονιμοποιημένα αυγά ανά επωαστήρα. Οι επωαστήρες μπορούν να τοποθετούνται είτε σε χωριστές «δεξαμενές επωαστήρων» που διαμορφώνονται για κάθε αγωγή είτε στη δεξαμενή πανομοιότυπου δείγματος στην οποία θα τοποθετηθούν μετά την εκκόλαψη οι εκκολαφθείσες προνύμφες. Συνιστάται τα έμβρυα να συλλέγονται σε μία μόνο ημέρα· ωστόσο, εάν δεν υπάρχουν αρκετά έμβρυα, μπορούν να συλλέγονται και δεύτερη ημέρα. Εάν συλλέγονται σε δύο ημέρες, όλα τα έμβρυα των αγωγών που συλλέχθηκαν την πρώτη ημέρα συγχωνεύονται με τα έμβρυα που συλλέχθηκαν τη δεύτερη ημέρα. Στη συνέχεια, το σύνολο των συγχωνευμένων εμβρύων για κάθε αγωγή κατανέμεται τυχαία σε καθέναν από τους επωαστήρες πανομοιότυπων δειγμάτων, σε αναλογία 20 εμβρύων ανά επωαστήρα. Σημείωση: Σε περίπτωση που για μια μεμονωμένη αγωγή απαιτείται δεύτερη ημέρα συλλογής, η ίδια διαδικασία θα πρέπει να ακολουθείται για όλες τις αγωγές (περιλαμβανομένων των μαρτύρων). Εάν μετά τη δεύτερη ημέρα συλλογής οι αριθμοί των εμβρύων εξακολουθούν να

▼**M8**

μην αρκούν για την τοποθέτηση πληθυσμού 20 εμβρύων ανά επωαστήρα αγωγής, μειώστε τον αριθμό των εμβρύων που τοποθετούνται σε επωαστήρες σε 15 έμβρυα ανά επωαστήρα για τη συγκεκριμένη αγωγή. Εάν δεν υπάρχουν αρκετά έμβρυα ώστε να τοποθετηθούν 15 ανά επωαστήρα, μειώστε τον αριθμό των επωαστήρων πανομοιότυπων δειγμάτων μέχρις ότου ο αριθμός των εμβρύων να επαρκεί για την τοποθέτηση 15 εμβρύων ανά επωαστήρα.

Την 121η ημέρα δοκιμής (ή την 122η ημέρα δοκιμής, προκειμένου να διασφαλιστεί ότι η F2 θα ξεκινήσει καλά), τα ζεύγη αναπαραγωγής της F1 θανατώνονται και αναλύονται ως προς τις παραμέτρους ενήλικων ατόμων. Εφόσον απαιτείται, τα ζεύγη αναπαραγωγής της F1 μπορούν να διατηρούνται επί 1-2 επιπλέον ημέρες προκειμένου να δημιουργηθεί νέα γενεά F2.

Εβδομάδες δοκιμής 19-20 (F2)

Μία ή δύο ημέρες πριν από την αναμενόμενη έναρξη της εκκόλαψης, σταματήστε ή μειώστε την ανάδευση των επωαζόμενων αυγών προκειμένου να επισπεύσετε την εκκόλαψη. Εάν η δοκιμή τερματιστεί πριν την ολοκλήρωση της εκκόλαψης της γενεάς F2, τα ιχθύδια καταμετρώνται και απορρίπτονται καθημερινά. (Τα έμβρυα που δεν έχουν εκκολαφθεί μετά από παρατεταμένο διάστημα επώασης, δηλαδή μετά από χρονικό διάστημα διπλάσιο αυτού του διάμεσου αριθμού ημερών εκκόλαψης του μάρτυρα, θεωρούνται μη βιώσιμα).

▼**M8**

Προσάρτημα 10

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα είδη των βιολογικών δεδομένων που λαμβάνονται με τη δοκιμή MEOGRT δεν αφορούν αποκλειστικά αυτή τη δοκιμή και έχουν αναπτυχθεί πολλές κατάλληλες στατιστικές μεθοδολογίες για την ορθή ανάλυση παρεμφερών δεδομένων (εκτός των δεδομένων για τις παθολογικές καταστάσεις), ανάλογα με τα χαρακτηριστικά των δεδομένων, περιλαμβανομένης της κανονικότητας, της ομοιογένειας της διασποράς, του κατά πόσον ο σχεδιασμός της μελέτης είναι κατάλληλος για έλεγχο υπόθεσης ή ανάλυση παλινδρόμησης, των παραμετρικών έναντι των μη παραμετρικών δοκιμών, κ.λπ. Καταρχήν, οι προτεινόμενες στατιστικές αναλύσεις συμμορφώνονται προς τις συστάσεις του ΟΟΣΑ για τα δεδομένα οικοτοξικότητας (ΟΟΣΑ 2006), και στο σχήμα 2 φαίνεται ένα διάγραμμα ροής λήψης αποφάσεων για την ανάλυση δεδομένων MEOGRT.

Θεωρείται ότι, στην πλειονότητα των περιπτώσεων, τα σύνολα δεδομένων θα εμφανίζουν μονοτονικές αποκρίσεις. Επιπλέον, θα πρέπει να εξετάζεται το θέμα της χρήσης μονόπλευρου στατιστικού ελέγχου έναντι της χρήσης αμφίπλευρου στατιστικού ελέγχου. Συνιστάται η χρήση μονόπλευρων ελέγχων, εκτός εάν υπάρχουν βάσιμοι βιολογικοί λόγοι που καθιστούν τη χρήση τους μη αρμόζουσα. Παρότι στη συνέχεια προτείνονται ορισμένοι στατιστικοί έλεγχοι, εάν αναπτυχθούν καταλληλότερες και/ή ισχυρότερες στατιστικές μέθοδοι που μπορούν να εφαρμοστούν στα συγκεκριμένα δεδομένα που προκύπτουν με την MEOGRT, θα χρησιμοποιούνται οι εν λόγω μέθοδοι προκειμένου να αξιοποιηθούν τα πλεονεκτήματά τους.

Τα δεδομένα από τη MEOGRT θα πρέπει να αναλύονται χωριστά για κάθε γονοτυπικό φύλο. Για την ανάλυση των δεδομένων από ψάρια με αναστροφή φύλου (αρσενικών XX ή θηλυκών XY) χρησιμοποιούνται δύο στρατηγικές: 1) λογοκρισία όλων των δεδομένων που προέρχονται από ψάρια με αναστροφή φύλου σε όλη τη δοκιμή, εκτός του επιπολασμού των περιπτώσεων αναστροφής φύλου σε κάθε πανομοιότυπο δείγμα, 2) διατήρηση των δεδομένων που προέρχονται από όλα τα ψάρια με αναστροφή φύλου στο σύνολο δεδομένων και ανάλυσή τους με βάση τον γονότυπο.

Ιστοπαθολογικά δεδομένα

Τα ιστοπαθολογικά δεδομένα αναφέρονται υπό μορφή βαθμολογιών σοβαρότητας που αξιολογούνται με χρήση μιας στατιστικής διαδικασίας που αναπτύχθηκε πρόσφατα, της διαδικασίας Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS) (Green *et al*., 2014). Κατά τη διόρθωση κατά Rao-Scott διατηρούνται οι πληροφορίες δοκιμής–πανομοιότυπου δείγματος· η διαδικασία by Slices (κατά τομές) βασίζεται στη βιολογική προσδοκία ότι οι βαθμολογίες σοβαρότητας τείνουν να αυξάνονται καθώς αυξάνονται οι συγκεντρώσεις αγωγής. Για κάθε διάγνωση, στα αποτελέσματα της RSCABS προσδιορίζονται οι αγωγές που παρουσιάζουν υψηλότερο επιπολασμό παθολογικών καταστάσεων και το σχετικό επίπεδο σοβαρότητας.

Δεδομένα γεννητικότητας

Οι αναλύσεις για δεδομένα γεννητικότητας περιλαμβάνουν έλεγχο αποκλιμάκωσης Jonckheere-Terpstra ή Williams για τον προσδιορισμό των επιδράσεων της αγωγής, υπό την προϋπόθεση ότι τα δεδομένα συνάδουν με μονοτονική σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης. Στο πλαίσιο ελέγχου αποκλιμάκωσης, όλες οι συγκρίσεις πραγματοποιούνται στο επίπεδο σημασίας 0,05, χωρίς να πραγματοποιείται διόρθωση ως προς τον αριθμό συγκρίσεων. Παρότι αναμένεται ότι τα δεδομένα θα συνάδουν με μονοτονική σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης, αυτό μπορεί να επαληθεύεται είτε μέσω οπτικού ελέγχου των δεδομένων είτε μέσω του υπολογισμού γραμμικών και τετραγωνικών αντιθέσεων των μέσων όρων των αγωγών μετά από μετασχηματισμό των δεδομένων με βάση τη σειρά κατάταξης. Ο έλεγχος τάσεων πραγματοποιείται, εκτός εάν η τετραγωνική αντίθεση είναι σημαντική και η γραμμική αντίθεση δεν είναι. Διαφορετικά, για τον προσδιορισμό των επιδράσεων της αγωγής χρησιμοποιείται ο έλεγχος Dunnett, εφόσον τα δεδομένα είναι κανονικά κατανεμημένα με ομοιογενείς διασπορές. Εάν δεν ικανοποιούνται αυτές οι απαιτήσεις, χρησιμοποιείται ο έλεγχος Dunn με διόρθωση κατά Bonferroni-Holm. Όλοι οι ενδεδειγμένοι έλεγχοι πραγματοποιούνται ανεξάρτητα από τυχόν συνολικό έλεγχο F ή Kruskal-Wallis. Περισσότερες πληροφορίες παρατίθενται στο ΟΟΣΑ 2006.

▼M8

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικές μέθοδοι, όπως γενικευμένο γραμμικό μοντέλο με σφάλματα Poisson όσον αφορά τις μετρήσεις των αυγών (χωρίς μετασχηματισμό), εφόσον τεκμηριώνονται στατιστικά (Cameron and Trividi, 2013). Σε περίπτωση χρήσης εναλλακτικής προσέγγισης, συνιστάται να αναζητάται η παροχή συμβουλών επί στατιστικών θεμάτων.

Καθημερινή μέτρηση αυγών σε μία γενεά

Το μοντέλο ANOVA προκύπτει ως εξής: Y = χρόνος*χρόνος+αγωγή + *αγωγή + χρόνος*αγωγή + *χρόνος*αγωγή, με τυχαίες επιδράσεις «πανομοιότυπο δείγμα(γενεά*αγωγή)» και «χρόνος*πανομοιότυπο δείγμα(αγωγή)», που συνεκτιμά συνιστώσες άνισης διασποράς και των δύο τύπων στις διάφορες γενεές. Εδώ, ο όρος «χρόνος» αναφέρεται στη συχνότητα των μετρήσεων αυγών (π.χ. ημέρα ή εβδομάδα). Πρόκειται για ανάλυση επαναλαμβανόμενων μετρήσεων, στο πλαίσιο της οποίας οι συσχετίσεις μεταξύ των παρατηρήσεων επί των ίδιων πανομοιότυπων δειγμάτων καλύπτουν τη φύση επαναλαμβανόμενων μετρήσεων των δεδομένων.

Οι κύριες επιδράσεις της αγωγής ελέγχονται με χρήση του ελέγχου Dunnett (ή Dunnett-Hsu), στο πλαίσιο του οποίου πραγματοποιείται διόρθωση ως προς τον αριθμό των συγκρίσεων. Χρειάζονται διορθώσεις ως προς την κύρια επίδραση της γενεάς ή του χρόνου επειδή για τους δύο αυτούς παράγοντες δεν υφίσταται επίπεδο «ελέγχου» και κάθε ζεύγος επιπέδων αποτελεί σύγκριση που είναι πιθανό να παρουσιάζει ενδιαφέρον. Για τις εν λόγω δύο κύριες επιδράσεις, εάν ο έλεγχος F είναι σημαντικός στο επίπεδο 0,05, οι συγκρίσεις βάσει ζευγών στα διάφορα επίπεδα του συγκεκριμένου παράγοντα μπορούν να ελέγχονται στο επίπεδο 0,05, χωρίς περαιτέρω διόρθωση.

Το μοντέλο περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις δύο και τριών παραγόντων, κατά τρόπον ώστε η κύρια επίδραση, για παράδειγμα, του χρόνου μπορεί να μην είναι σημαντική, ακόμη και αν ο χρόνος έχει σημαντικές επιπτώσεις στα αποτελέσματα. Ως εκ τούτου, εάν μια αλληλεπίδραση δύο ή τριών παραγόντων που σχετίζεται με τον χρόνο είναι σημαντική στο επίπεδο 0,05, τότε είναι αποδεκτές οι συγκρίσεις των επιπέδων του χρόνου στο επίπεδο σημαντικότητας 0,05 χωρίς περαιτέρω διόρθωση.

Ακολουθούν έλεγχοι F για τη σημαντικότητα της αγωγής εντός του χρόνου, οι καλούμενες τομές στον πίνακα ANOVA. Εάν, για παράδειγμα, η τομή για την αγωγή στη γενεά F1 και τον χρόνο 12, είναι σημαντική στο επίπεδο 0,05, οι συγκρίσεις βάσει ζευγών για την αγωγή στη γενεά F1 και τον χρόνο 12 μπορούν να γίνουν αποδεκτές στο επίπεδο 0,05, χωρίς περαιτέρω διόρθωση. Παρόμοιες δηλώσεις ισχύουν και τους ελέγχους για τον χρόνο εντός της F1 και της αγωγής καθώς και για τη γενεά εντός χρόνο και αγωγής.

Τέλος, όσον αφορά συγκρίσεις που δεν εμπίπτουν σε καμία από τις προαναφερθείσες κατηγορίες, οι συγκρίσεις θα πρέπει να διορθώνονται με χρήση της διόρθωσης των τιμών p κατά Bonferroni-Holm. Περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τις αναλύσεις των εν λόγω μοντέλων παρέχονται από τους Hocking (1985) και Hochberg and Tamhane (1987).

Εναλλακτικά, τα ανεπεξέργαστα δεδομένα καταγράφονται και παρουσιάζονται στην έκθεση μελέτης ως γεννητικότητα (αριθμός αυγών) ανά πανομοιότυπο δείγμα για κάθε ημέρα. Θα πρέπει να υπολογίζεται ο μέσος όρος πανομοιότυπου δείγματος των ανεπεξέργαστων δεδομένων, και, στη συνέχεια, θα πρέπει να εφαρμόζεται μετασχηματισμός τετραγωνικής ρίζας. Θα πρέπει να υπολογίζεται μονόδρομος έλεγχος διασποράς ANOVA επί των μετασχηματισθέντων μέσων όρων πανομοιότυπου δείγματος, ακολουθούμενος από αντιθέσεις Dunnett. Επίσης, μπορεί να είναι σκόπιμος ο οπτικός έλεγχος των δεδομένων γεννητικότητας κάθε αγωγής και/ή πανομοιότυπου δείγματος με διάγραμμα διασποράς που παρουσιάζει τα δεδομένα στην πάροδο του χρόνου. Αυτό επιτρέπει την άτυπη αξιολόγηση των δυνητικών επιδράσεων με την πάροδο του χρόνου.

Όλα τα υπόλοιπα βιολογικά δεδομένα

Οι στατιστικές αναλύσεις βασίζονται στην υποκείμενη παραδοχή ότι, εφόσον η επιλογή δόσεων γίνει σωστά, τα δεδομένα θα είναι μονοτονικά. Ως εκ τούτου, θεωρείται ότι τα δεδομένα είναι μονοτονικά και ότι αξιολογούνται τυπικά ως προς τη μονοτονικότητα με χρήση γραφικών και τετραγωνικών αντιθέσεων. Εάν τα δεδομένα είναι μονοτονικά, συνιστάται η διενέργεια ελέγχου τάσεων Jonckheere-Terpstra στις διάμεσες τιμές των πανομοιότυπων δειγμάτων (όπως συνιστάται στο ΟΟΣΑ 2006). Εάν η τετραγωνική αντίθεση είναι σημαντική και η γραμμική αντίθεση δεν είναι, τα δεδομένα θεωρούνται μη μονοτονικά.

▼**M8**

Εάν τα δεδομένα είναι μη μονοτονικά, ιδίως λόγω της μειωμένης απόκρισης της μίας ή δύο αγωγών με την υψηλότερη δόση, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο λογοκρισίας του συνόλου δεδομένων, ούτως ώστε η ανάλυση να πραγματοποιηθεί χωρίς τις εν λόγω αγωγές. Η εν λόγω απόφαση θα πρέπει να βασίζεται στην κρίση ειδικών και στο σύνολο των διαθέσιμων δεδομένων, ιδίως των δεδομένων που υποδεικνύουν έκδηλη τοξικότητα στα συγκεκριμένα επίπεδα αγωγής.

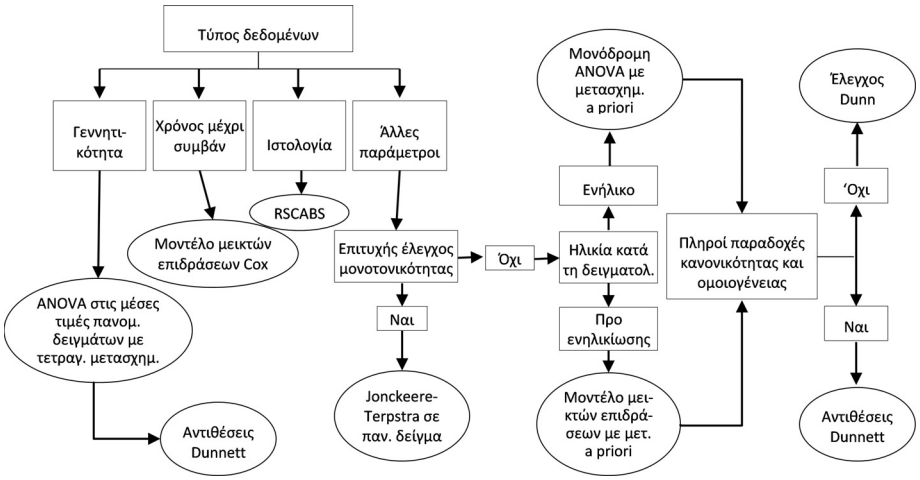
Για το βάρος και το μήκος, δεν συνιστάται η εφαρμογή μετασχηματισμών, αν και ενδέχεται κάποτε να είναι απαραίτητοι. Ωστόσο, για τα δεδομένα λεκιθογενίνης συνιστάται η εφαρμογή λογαριθμικού μετασχηματισμού· για τα δεδομένα SSC (θηλοειδείς αποφύσεις εδρικού πτερυγίου) συνιστάται μετασχηματισμός τετραγωνικής ρίζας· για τα δεδομένα σχετικά με την ποσοστιαία εκκόλαψη, την ποσοστιαία επιβίωση, την αναλογία φύλων και τα ποσοστά γόνιμων αυγών συνιστάται μετασχηματισμός τετραγωνικής ρίζας τόξου ημιτόνου. Ο χρόνος μέχρι την εκκόλαψη και ο χρόνος μέχρι την πρώτη ωοτοκία θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δεδομένα χρόνου μέχρι το συμβάν, με τα μεμονωμένα έμβρυα που δεν εκκολάπτονται εντός του καθορισμένου χρονικού διαστήματος ή τα πανομοιότυπα δείγματα που δεν εμφανίζουν ποτέ ωοτοκία να αντιμετωπίζονται ως λογοκριμένα εκ δεξιών δεδομένα. Ο χρόνος μέχρι την εκκόλαψη θα πρέπει να υπολογίζεται με βάση τη διάμεση ημέρα εκκόλαψης κάθε πανομοιότυπου δείγματος. Οι εν λόγω παράμετροι θα πρέπει να αναλύονται με χρήση μοντέλου αναλογικών κινδύνων Cox μεικτών επιδράσεων.

Τα βιολογικά δεδομένα από δείγματα ενήλικων ατόμων περιλαμβάνουν μία μέτρηση ανά πανομοιότυπο δείγμα, δηλαδή υπάρχει ένα ψάρι XX και ένα ψάρι XY ανά ενυδρείο πανομοιότυπου δείγματος. Ως εκ τούτου, συνιστάται ο υπολογισμός μονόδρομου ελέγχου διασποράς ANOVA επί των μέσων όρων πανομοιότυπου δείγματος. Εφόσον επαληθεύονται οι παραδοχές του ελέγχου ANOVA (η κανονικότητα και η ομοιογένεια της διασποράς συμφωνούν με τις αξιολογήσεις επί των καταλοίπων του ελέγχου ANOVA με έλεγχο Shapiro-Wilk και έλεγχο Levene αντίστοιχα), θα πρέπει να χρησιμοποιούνται αντιθέσεις Dunnett για τον προσδιορισμό των αγωγών που ήταν διαφορετικές σε σχέση με τον μάρτυρα. Από την άλλη πλευρά, εάν οι παραδοχές του ANOVA δεν πληρούνται, θα πρέπει να διενεργείται έλεγχος Dunn για τον προσδιορισμό των αγωγών που ήταν διαφορετικές από τον μάρτυρα. Συνιστάται η διεξαγωγή παρόμοιας διαδικασίας για τα δεδομένα που δίνονται ως ποσοστά (γονιμότητα, εκκόλαψη και επιβίωση).

Τα βιολογικά δεδομένα από δείγματα ατόμων πριν την ενηλικίωση περιλαμβάνουν από 1 έως 8 μετρήσεις ανά πανομοιότυπο δείγμα, δηλαδή μπορεί να υπάρχουν μεταβλητοί αριθμοί ατόμων που συνεισφέρουν στον μέσο όρο πανομοιότυπου δείγματος για κάθε γονοτυπικό φύλο. Ως εκ τούτου, εάν επαληθεύονται οι παραδοχές για την κανονικότητα και την ομοιογένεια της διασποράς (επί των καταλοίπων του ANOVA μεικτών επιδράσεων), συνιστάται η χρήση μοντέλου ANOVA μεικτών δεδομένων, ακολουθούμενου από αντιθέσεις Dunnett. Εάν δεν επαληθεύονται, θα πρέπει να διενεργείται έλεγχος Dunn για τον προσδιορισμό των αγωγών που ήταν διαφορετικές από τον μάρτυρα.

Σχήμα 2

Διάγραμμα ροής για τις συνιστώμενες στατιστικές διαδικασίες στο πλαίσιο ανάλυσης δεδομένων της MEOGRT



▼**M8**

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.

(2) Cameron AC and Trivedi PK (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.

(3) Hocking RR (1985). The Analysis of Linear Models, Monterey, CA: Brooks/Cole.

(4) Hochberg Y and Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

▼**M8**

Γ.53 **ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΥΞΗΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΠΡΟΝΥΜΦΩΝ ΑΜΦΙΒΙΩΝ (LAGDA)**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 241 του ΟΟΣΑ (2015). Η ανάγκη ανάπτυξης και επικύρωσης μιας δοκιμασίας για τον προσδιορισμό και τον χαρακτηρισμό των δυσμενών συνεπειών της έκθεσης σε τοξικές χημικές ουσίες στα αμφίβια προέκυψε από ανησυχίες ότι τα περιβαλλοντικά επίπεδα χημικών ουσιών μπορεί να προκαλέσουν δυσμενείς επιδράσεις τόσο στον άνθρωπο όσο και στη χλωροπανίδα. Η κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών του ΟΟΣΑ για τη δοκιμασία αύξησης και ανάπτυξης προνυμφών αμφιβίων (LAGDA) περιγράφει μια δοκιμή τοξικότητας με ένα είδος αμφιβίου η οποία εξετάζει την αύξηση και την ανάπτυξη από τη γονιμοποίηση μέχρι το πρώιμο νεαρό στάδιο. Πρόκειται για μια δοκιμασία (συνήθως 16 εβδομάδων) που αξιολογεί την πρώιμη ανάπτυξη, τη μεταμόρφωση, την επιβίωση, τη σωματική αύξηση και τη μερική αναπαραγωγική ωρίμανση. Επιπλέον, παρέχει τη δυνατότητα μέτρησης μιας σειράς άλλων παραμέτρων που επιτρέπουν τη διαγνωστική αξιολόγηση χημικών ουσιών για τις οποίες υπάρχουν υπόνοιες ότι αποτελούν ενδοκρινικούς διαταράκτες (EDC) ή άλλου είδους ουσιών τοξικών για την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή. Η μέθοδος που περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών είναι αποτέλεσμα εργασιών επικύρωσης για τον αφρικανικό ονυχοφόρο βάτραχο (*Xenopus laevis*) που διεξήγαγε ο Οργανισμός Προστασίας Περιβάλλοντος (EPA) των ΗΠΑ, με υποστηρικτικές εργασίες στην Ιαπωνία (1). Παρότι είναι δυνατή η προσαρμογή και άλλων ειδών αμφιβίων σε πρωτόκολλα δοκιμής σωματικής αύξησης και ανάπτυξης στο πλαίσιο των οποίων η δυνατότητα προσδιορισμού του γενετικού φύλου αποτελεί σημαντικό στοιχείο, οι συγκεκριμένες μέθοδοι και παράμετροι παρατήρησης που περιγράφονται αναλυτικά στην παρούσα μέθοδο δοκιμών εφαρμόζονται μόνο στο είδος *Xenopus laevis*.

2. Η δοκιμασία LAGDA αποτελεί μια δοκιμή ανώτερης βαθμίδας σε αμφίβιο για τη συλλογή πιο ολοκληρωμένων πληροφοριών συγκέντρωσης-απόκρισης σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις, η οποία είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό και τον χαρακτηρισμό της επικινδυνότητας, καθώς και για την αξιολόγηση του οικολογικού κινδύνου. Η δοκιμασία εντάσσεται στο επίπεδο 4 του εννοιολογικού πλαισίου του ΟΟΣΑ για τις δοκιμές και την αξιολόγηση ενδοκρινικών διαταρακτών, όπου οι *in vivo* δοκιμασίες παρέχουν επίσης δεδομένα για τις δυσμενείς επιδράσεις σε παραμέτρους που σχετίζονται με το ενδοκρινικό σύστημα (2). Ο γενικός πειραματικός σχεδιασμός περιλαμβάνει την έκθεση εμβρύων *X. laevis* σταδίου 8-10 κατά Nieuwkoop και Faber (NF) (3) σε τουλάχιστον τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας (γενικά διατεταγμένες σε ημιλογαριθμικά διαστήματα τουλάχιστον) και μάρτυρα/-ων έως 10 εβδομάδες μετά τον διάμεσο χρόνο έως το στάδιο 62 κατά NF στον μάρτυρα, με ένα ενδιάμεσο μερικό δείγμα (υποδείγμα) στο στάδιο 62 κατά NF [≤ 45 ημέρες, συνήθως περί τις 45 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση (dpf)]. Χρησιμοποιούνται τέσσερα πανομοιότυπα δείγματα σε κάθε συγκέντρωση δοκιμής και οκτώ πανομοιότυπα δείγματα για τον μάρτυρα. Στις παραμέτρους που αξιολογούνται κατά τη διάρκεια της έκθεσης (στο ενδιάμεσο υποδείγμα και το τελικό δείγμα κατά την ολοκλήρωση της δοκιμής) περιλαμβάνονται παράμετροι ενδεικτικές γενικευμένης τοξικότητας: θνησιμότητα, μη φυσιολογική συμπεριφορά και προσδιορισμοί σωματικής αύξησης (μήκος και βάρος), καθώς και παράμετροι που έχουν σχεδιαστεί για τον χαρακτηρισμό ειδικών τρόπων δράσης ενδοκρινικής τοξικότητας που στοχεύουν φυσιολογικές διεργασίες διαμεσολαβούμενες από τα οιστρογόνα, τα ανδρογόνα ή τις θυρεοειδικές ορμόνες. Η μέθοδος δίνει πρωταρχική έμφαση στις δυνητικές επιδράσεις που σχετίζονται με τον πληθυσμό (ήτοι δυσμενείς επιπτώσεις στην επιβίωση, την ανάπτυξη, τη σωματική αύξηση και την αναπαραγωγική ανάπτυξη) για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC) ή της συγκέντρωσης επίδρασης που προκαλεί μεταβολή x% (ECx) στη μετρούμενη παράμετρο. Ωστόσο, θα πρέπει να επισημανθεί ότι οι προσεγγίσεις της ECx σπανίως είναι κατάλληλες για μεγάλες μελέτες αυτού του είδους, στο πλαίσιο των οποίων ενδέχεται να είναι πρακτικά αδύνατη η αύξηση του αριθμού των συγκεντρώσεων δοκιμής προκειμένου να είναι δυνατός ο προσδιορισμός της επιθυμητής ECx. Θα πρέπει, επίσης, να σημειωθεί ότι η μέθοδος δεν καλύπτει το αναπαραγωγικό στάδιο αυτό καθαυτό. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

3. Λόγω του περιορισμένου αριθμού, αφενός, των χημικών ουσιών που έχουν υποβληθεί σε δοκιμή και, αφετέρου, των εργαστηρίων που μετείχαν στην επικύρωση αυτής της σχετικά πολύπλοκης δοκιμασίας, ιδίως δεδομένου ότι

▼M8

η διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα δεν τεκμηριώνεται μέχρι στιγμής με πειραματικά δεδομένα, αναμένεται ότι, όταν καταστεί διαθέσιμος επαρκής αριθμός μελετών ώστε να διαπιστωθεί ο αντίκτυπος του νέου αυτού σχεδιασμού μελέτης, η κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 241 του ΟΟΣΑ θα επανεξεταστεί και, αν χρειαστεί, θα αναθεωρηθεί με βάση την αποκτηθείσα πείρα. Η δοκιμασία LAGDA αποτελεί μια σημαντική δοκιμασία για την εξέταση των δυνητικών παραγόντων που συντελούν στη μείωση των πληθυσμών των αμφιβίων, μέσω της αξιολόγησης των επιπτώσεων από την έκθεση σε χημικές ουσίες κατά το ευαίσθητο προνυμφικό στάδιο, όπου οι επιπτώσεις στην επιβίωση και την ανάπτυξη, συμπεριλαμβανομένης της φυσιολογικής ανάπτυξης των αναπαραγωγικών οργάνων, μπορεί να επηρεάσουν δυσμενώς τους πληθυσμούς.

4. Η δοκιμή έχει σχεδιαστεί με σκοπό την ανίχνευση επιδράσεων κορυφαίου επιπέδου από ενδοκρινικούς και μη ενδοκρινικούς μηχανισμούς και περιλαμβάνει διαγνωστικά τελικά σημεία τα οποία σχετίζονται, εν μέρει, ειδικά με βασικές ενδοκρινικές διαδικασίες. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι, πριν από την ανάπτυξη της δοκιμασίας LAGDA, δεν υπήρχε επικυρωμένη δοκιμασία για τον σκοπό αυτό στα αμφίβια.

5. Πριν από την έναρξη της δοκιμασίας, είναι σημαντικό να υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με τις φυσικοχημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, ιδίως προκειμένου να είναι δυνατή η παραγωγή σταθερών χημικών διαλυμάτων. Είναι επίσης αναγκαίο να υπάρχει επαρκώς ευαίσθητη αναλυτική μέθοδος για την επαλήθευση των συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Για μια περίοδο 16 εβδομάδων περίπου, η δοκιμασία απαιτεί συνολικό αριθμό 480 ζώων, ήτοι εμβρύων *X. laevis* (ή 640 εμβρύων, αν χρησιμοποιείται μάρτυρας με διαλύτη) προκειμένου να διασφαλιστεί επαρκής ισχύς της δοκιμής για την αξιολόγηση των παραμέτρων που σχετίζονται με τον πληθυσμό, όπως η σωματική αύξηση, η ανάπτυξη και η αναπαραγωγική ωρίμανση.

6. Πριν από τη χρήση της μεθόδου δοκιμών για δοκιμές κανονιστικού χαρακτήρα ενός μείγματος, θα πρέπει να εξετάζεται κατά πόσον η μέθοδος αποδίδει αποδεκτά αποτελέσματα για τον επιδιωκόμενο κανονιστικό σκοπό. Επιπλέον, η παρούσα δοκιμασία δεν αξιολογεί άμεσα τη γεννητικότητα και, ως εκ τούτου, ενδέχεται να μην ενδείκνυται για χρήση σε πιο προχωρημένο στάδιο από το επίπεδο 4 του εννοιολογικού πλαισίου του ΟΟΣΑ για τις δοκιμές και την αξιολόγηση ενδοκρινικών διαταρακτών.

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΒΑΣΗ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΔΟΚΙΜΗΣ

7. Πολλά από τα στοιχεία που διαθέτουμε σήμερα σχετικά με τη βιολογία των αμφιβίων έχουν ληφθεί με το εργαστηριακό είδος-μοντέλο *X. laevis*. Αυτό το είδος μπορεί να εκτραφεί συνήθως στο εργαστήριο, η ωορρηξία μπορεί να προκληθεί με ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG) και υπάρχουν άμεσα διαθέσιμα ζωικά αποθέματα από εκτροφείς του εμπορίου.

8. Όπως σε όλα τα σπονδυλωτά, η αναπαραγωγή στα αμφίβια ελέγχεται από τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων (HPG) (4). Τα οιστρογόνα και τα ανδρογόνα είναι μεσολαβητές αυτού του ενδοκρινικού συστήματος και κατευθύνουν την ανάπτυξη και τη φυσιολογία των σεξουαλικά διμορφικών ιστών. Υπάρχουν τρεις ξεχωριστές φάσεις στον κύκλο ζωής των αμφιβίων κατά τις οποίες αυτός ο άξονας είναι ιδιαίτερα δραστήριος: (1) διαφοροποίηση των γονάδων κατά την ανάπτυξη των προνυμφών, (2) ανάπτυξη δευτερευόντων χαρακτηριστικών φύλου και ωρίμανση των γονάδων κατά τη διάρκεια της νεαρής φάσης, και (3) λειτουργική αναπαραγωγή των ενηλίκων. Καθένα από αυτά τα τρία αναπτυξιακά «παράθυρα» είναι πιθανώς επιρρεπές σε ενδοκρινικές διαταραχές από ορισμένες χημικές ουσίες όπως τα οιστρογόνα και τα ανδρογόνα, οι οποίες οδηγούν τελικά σε απώλεια της αναπαραγωγικής ικανότητας των ζώων.

9. Οι γονάδες αρχίζουν να αναπτύσσονται στο στάδιο 43 κατά NF, οπότε και εμφανίζεται η αμφιδύναμη γεννητική ταινία. Η διαφοροποίηση των γονάδων αρχίζει στο στάδιο 52 κατά NF όταν πρωτογενή γεννητικά κύτταρα είτε μεταναστεύουν σε μυελώδη ιστό (αρσενικά) είτε παραμένουν στη φλοιώδη

▼M8

μοίρα (θηλυκά) των αναπτυσσόμενων γονάδων (3). Για πρώτη φορά αναφέρθηκε ότι αυτή η διαδικασία σεξουαλικής διαφοροποίησης των γονάδων είναι ευαίσθητη σε χημική αλλοίωση στον *Xenopus* κατά τη δεκαετία του 1950 (5) (6). Η έκθεση των γυρίνων στην οιστραδιόλη κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου διαφοροποίησης των γονάδων έχει ως αποτέλεσμα την αναστροφή του φύλου των αρσενικών, τα οποία όταν ενηλικιώνονται είναι πλήρως λειτουργικά θηλυκά (7) (8). Η λειτουργική αναστροφή του φύλου θηλυκών σε αρσενικά είναι επίσης δυνατή και έχει αναφερθεί μετά την εμφύτευση ιστού όρχεων στους γυρίνους (9). Ωστόσο, αν και η έκθεση σε αναστολέα αρωματάσης προκαλεί επίσης λειτουργική αναστροφή του φύλου στον *X. tropicalis* (10), αυτό δεν έχει παρατηρηθεί στον *X. laevis*. Ιστορικά, οι τοξικές επιδράσεις στη διαφοροποίηση των γονάδων έχουν αξιολογηθεί με ιστολογική εξέταση των γονάδων κατά τη μεταμόρφωση και η αναστροφή του φύλου μπορούσε να προσδιοριστεί μόνο με ανάλυση της αναλογίας φύλων. Μέχρι πρόσφατα, δεν υπήρχαν μέσα για να προσδιοριστεί άμεσα το γενετικό φύλο του *Xenopus*. Ωστόσο, η πρόσφατη καθιέρωση δεικτών που συνδέονται με το φύλο στον *X. laevis* καθιστά δυνατό τον προσδιορισμό του γενετικού φύλου και επιτρέπει την άμεση αναγνώριση των ζώων των οποίων το φύλο έχει αναστραφεί (11).

10. Στα αρσενικά, η ανάπτυξη νεαρών ατόμων προχωρά καθώς τα επίπεδα της τεστοστερόνης στο αίμα αυξάνονται παράλληλα με την ανάπτυξη των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου και την ανάπτυξη των όρχεων. Στα θηλυκά παράγεται οιστραδιόλη από τις ωοθήκες με αποτέλεσμα την εμφάνιση λεκιθογενίνης (VTG) στο πλάσμα και λεκιθογενετικών ωοκυττάρων στις ωοθήκες και την ανάπτυξη των ωαγωγών (12). Οι ωαγωγοί είναι δευτερογενή χαρακτηριστικά του θηλυκού φύλου που συμμετέχουν στην ωρίμανση των ωοκυττάρων κατά την αναπαραγωγή. Ζελατινώδη περιβλήματα προστίθενται στο εξωτερικό των ωοκυττάρων καθώς αυτά περνούν από τον ωαγωγό και συγκεντρώνονται στον ώσακο, έτοιμα για γονιμοποίηση. Η ανάπτυξη των ωαγωγών φαίνεται να ρυθμίζεται από τα οιστρογόνα καθώς συσχετίζεται με τα επίπεδα οιστραδιόλης στο αίμα στα είδη *X. laevis* (13) και *X. tropicalis* (12). Έχει αναφερθεί η ανάπτυξη ωαγωγών σε αρσενικά μετά από έκθεση σε ενώσεις πολυχλωριωμένων διφαινυλίων (14) και σε 4-*tert*-οκτυλοφαινόλη (15).

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

11. Ο σχεδιασμός της δοκιμής περιλαμβάνει την έκθεση εμβρύων *X. laevis* σταδίων 8-10 κατά NF μέσω του ύδατος σε τουλάχιστον τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας και μάρτυρα/-ων έως 10 εβδομάδες μετά τον διάμεσο χρόνο έως το στάδιο 62 κατά NF στον μάρτυρα, με ένα ενδιάμεσο υποδείγμα στο στάδιο 62 κατά NF. Αν και μπορεί να είναι επίσης δυνατή η χορήγηση εξαιρετικά υδρόφοβων χημικών ουσιών μέσω της τροφής, η μέχρι σήμερα εμπειρία στη χρήση αυτής της οδού έκθεσης σε αυτή τη δοκιμασία είναι μικρή. Χρησιμοποιούνται τέσσερα πανομοιότυπα δείγματα σε κάθε συγκέντρωση δοκιμής και οκτώ πανομοιότυπα δείγματα για κάθε μάρτυρα. Στις παραμέτρους που αξιολογούνται κατά τη διάρκεια της έκθεσης περιλαμβάνονται τα τελικά σημεία που είναι ενδεικτικά γενικευμένης τοξικότητας [δηλαδή θνησιμότητα, μη φυσιολογική συμπεριφορά και προσδιορισμοί σωματικής αύξησης (μήκος και βάρος)], καθώς και παράμετροι που αποσκοπούν στον χαρακτηρισμό ειδικών τρόπων δράσης ενδοκρινικής τοξικότητας που επηρεάζουν φυσιολογικές διεργασίες διαμεσολαβούμενες από τα οιστρογόνα, τα ανδρογόνα ή τις θυρεοειδικές ορμόνες [δηλαδή ιστοπαθολογία θυρεοειδούς, ιστοπαθολογία γονάδων και γοναδικού πόρου, ανώμαλη ανάπτυξη, λεκιθογενίνη πλάσματος (προαιρετικά) και αναλογίες γονοτυπικού/φαινοτυπικού φύλου].

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

12. Για την εγκυρότητα της δοκιμής εφαρμόζονται τα ακόλουθα κριτήρια:

— η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου πρέπει να είναι > 40 % της τιμής κορεσμού με αέρα σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής·

▼**M8**

— η θερμοκρασία πρέπει να είναι 21 ± 1 °C και οι διαφορές μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων / μεταξύ των αγωγών δεν πρέπει να υπερβαίνουν τον 1,0 °C·

— το pH του διαλύματος δοκιμής πρέπει να διατηρείται μεταξύ του 6,5 και του 8,5 και οι διαφορές μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων / μεταξύ των αγωγών δεν πρέπει να υπερβαίνουν το 0,5·

— θα πρέπει να υπάρχουν στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο διάλυμα διατηρήθηκαν ικανοποιητικά στα όρια του ± 20 % του μέσου όρου των τιμών που μετρήθηκαν·

— η θνησιμότητα κατά την περίοδο έκθεσης θα πρέπει να είναι ≤ 20 % σε κάθε πανομοιότυπο δείγμα στους μάρτυρες·

— ≥ 70 % βιωσιμότητα των αυγών που επιλέχθηκαν για την έναρξη της μελέτης·

— Ο διάμεσος χρόνος των μαρτύρων έως το στάδιο 62 κατά NF θα πρέπει να είναι ≤ 45 ημέρες·

— Το μέσο βάρος των οργανισμών δοκιμής στο στάδιο 62 κατά NF και στη λήξη της δοκιμασίας στους μάρτυρες και στους μάρτυρες με διαλύτη (εφόσον χρησιμοποιούνται) θα πρέπει να φτάνει τα 1,0 ± 0,2 και 11,5 ± 3 g αντίστοιχα.

13. Παρόλο που δεν αποτελεί κριτήριο εγκυρότητας, συνιστάται να είναι διαθέσιμα για ανάλυση τουλάχιστον τρία επίπεδα αγωγής με τρία μη υπονομευμένα πανομοιότυπα δείγματα. Η υπερβολική θνησιμότητα, η οποία υπονομεύει μια αγωγή, ορίζεται ως > 4 θάνατοι (> 20 %) σε 2 ή περισσότερα πανομοιότυπα δείγματα, που δεν μπορούν να αποδοθούν σε τεχνικό σφάλμα. Θα πρέπει να είναι διαθέσιμα για ανάλυση τουλάχιστον τρία επίπεδα αγωγής χωρίς προφανή έκδηλη τοξικότητα. Ενδείξεις έκδηλης τοξικότητας περιλαμβάνουν, ενδεικτικά, επίπλευση στην επιφάνεια, παραμονή στον πυθμένα της δεξαμενής, ανεστραμμένη ή ακανόνιστη κολύμβηση, έλλειψη δραστηριότητας ανάδυσης, μη ανταπόκριση σε ερεθίσματα, μορφολογικές ανωμαλίες (π.χ. παραμορφώσεις άκρων), αιμορραγικές βλάβες και κοιλιακό οίδημα.

14. Εάν παρατηρηθεί απόκλιση από τα κριτήρια εγκυρότητας της δοκιμής, οι συνέπειες θα πρέπει να εκτιμώνται σε σχέση με την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων της δοκιμής και οι αποκλίσεις και εκτιμήσεις αυτές θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται στην έκθεση δοκιμής.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

Εργαστηριακός εξοπλισμός

15. Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός και, ειδικότερα, τα ακόλουθα:

α) συσκευή ελέγχου θερμοκρασίας (π.χ. θερμαντήρες ή ψύκτες με δυνατότητα ρύθμισης στους 21 ° ± 1 °C),

▼M8

β) θερμόμετρο,

γ) διοφθάλμιο στερεοσκοπικό μικροσκόπιο και εργαλεία ανατομής,

δ) ψηφιακή φωτογραφική μηχανή με ανάλυση τουλάχιστον 4 megapixel και λειτουργία micro (εάν χρειάζεται),

ε) αναλυτικός ζυγός ακρίβειας 0,001 mg ή 1 μg,

στ) μετρητής διαλυμένου οξυγόνου και μετρητής pH,

ζ) μετρητής έντασης φωτός με δυνατότητα μέτρησης σε lux.

Νερό

Πηγή και ποιότητα

16. Μπορεί να χρησιμοποιείται κάθε νερό που διατίθεται τοπικά (π.χ. νερό πηγής ή νερό βρύσης φιλτραρισμένο με ενεργό άνθρακα) και επιτρέπει τη φυσιολογική σωματική αύξηση και ανάπτυξη των γυρίνων του είδους *X. laevis* και θα πρέπει να είναι διαθέσιμα στοιχεία που αποδεικνύουν τη φυσιολογική αύξηση σε αυτό το νερό. Επειδή η ποιότητα του τοπικού νερού μπορεί να διαφέρει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων περιοχών, θα πρέπει να διεξάγεται ανάλυση της ποιότητας του νερού, ιδιαίτερα εάν δεν υπάρχουν διαθέσιμα ιστορικά δεδομένα σχετικά με τη χρησιμότητα του νερού για την εκτροφή προνυμφών αμφιβίων. Όταν είναι γνωστό ότι η ποιότητα του νερού αραίωσης είναι σχετικά σταθερή, θα πρέπει να γίνονται μετρήσεις βαρέων μετάλλων (π.χ. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), σημαντικών ανιόντων και κατιόντων (π.χ. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), φυτοφαρμάκων, ολικού οργανικού άνθρακα και αιωρούμενων στερεών προτού ξεκινήσει η δοκιμή και/ή π.χ. κάθε έξι μήνες. Μερικά χημικά χαρακτηριστικά αποδεκτού νερού αραίωσης καταγράφονται στο προσάρτημα 2.

Συγκέντρωση ιωδίου στο νερό δοκιμής

17. Για να μπορεί ο θυρεοειδής αδένας να συνθέτει θυρεοειδικές ορμόνες που υποστηρίζουν τη φυσιολογική μεταμόρφωση, πρέπει να παρέχεται επαρκής ποσότητα ιωδίου στις προνύμφες μέσω υδατικών και διατροφικών πηγών, σε συνδυασμό. Επί του παρόντος, δεν υπάρχουν εμπειρικές κατευθυντήριες γραμμές σχετικά με τις ελάχιστες συγκεντρώσεις ιωδίου, είτε στην τροφή είτε στο νερό, που εξασφαλίζουν σωστή ανάπτυξη. Ωστόσο, η διαθεσιμότητα του ιωδίου ενδέχεται να επηρεάσει την ανταπόκριση του θυρεοειδικού συστήματος σε παράγοντες που επιδρούν στον θυρεοειδή και είναι γνωστό ότι επιδρά στο βασικό επίπεδο λειτουργίας του θυρεοειδούς, μια πτυχή στην οποία πρέπει να δίνεται προσοχή κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της ιστοπαθολογικής εξέτασης του θυρεοειδούς. Με βάση προηγούμενες μελέτες, έχει αποδειχθεί ότι η δοκιμασία αποδίδει ικανοποιητικά όταν οι συγκεντρώσεις ιωδίου (I^{-}) στο νερό αραίωσης κυμαίνονται μεταξύ 0,5 και 10 μg/l. Ιδανικά, η ελάχιστη συγκέντρωση ιωδίου στο νερό αραίωσης σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής θα πρέπει να είναι 0,5 μg/l (με προσθήκη ιόντων ιωδίου σε μορφή άλατος με νάτριο ή κάλιο). Σε περίπτωση ανασύστασης του νερού δοκιμής από απιονισμένο νερό, θα πρέπει να προστίθεται ιώδιο σε ελάχιστη συγκέντρωση 0,5 μg/l. Η μετρούμενη συγκέντρωση ιωδίου στο νερό δοκιμής (δηλ. στο νερό αραίωσης) και η συμπλήρωση του νερού δοκιμής με ιώδιο ή άλλα άλατα (εφόσον χρησιμοποιούνται) θα πρέπει να δηλώνονται στην έκθεση. Η περιεκτικότητα σε ιώδιο θα πρέπει να μετριέται και στις τροφές.

Σύστημα έκθεσης

18. Η δοκιμή σχεδιάστηκε με χρήση συστήματος αραιωτή συνεχούς ροής νερού. Τα εξαρτήματα του συστήματος που έρχονται σε επαφή με νερό θα πρέπει να είναι κατασκευασμένα από γυαλί, ανοξείδωτο χάλυβα και/ή άλλα χημικώς αδρανή υλικά. Οι δεξαμενές έκθεσης θα πρέπει να είναι ενυδρεία από γυαλί ή ανοξείδωτο χάλυβα με ωφέλιμο όγκο δεξαμενής από 4,0 έως 10,0 l (ελάχιστο βάθος νερού από 10 έως 15 cm). Το σύστημα θα πρέπει να είναι σε θέση να υποστηρίξει όλες τις συγκεντρώσεις έκθεσης, έναν μάρτυρα και έναν μάρτυρα με διαλύτη, αν χρειάζεται, με τέσσερα πανομοιότυπα δείγματα ανά αγωγή και οκτώ στους μάρτυρες. Η ταχύτητα ροής σε κάθε δεξαμενή θα πρέπει να είναι σταθερή ώστε να διατηρούνται οι βιολογικές συνθήκες και η

▼M8

έκθεση στις χημικές ουσίες. Συνιστάται οι ταχύτητες ροής να είναι κατάλληλες (π.χ. τουλάχιστον 5 κύκλοι ανανέωσης του νερού της δεξαμενής ανά ημέρα) προκειμένου να αποφεύγεται η μείωση των συγκεντρώσεων των χημικών ουσιών μέσω μεταβολισμού τόσο από τους οργανισμούς δοκιμής όσο και από τους μικροοργανισμούς του νερού που περιέχονται στα ενυδρεία, και μέσω αβιοτικών οδών αποδόμησης (υδρόλυση, φωτόλυση) ή διαφυγής (εξάτμιση, προσρόφηση). Οι δεξαμενές αγωγής θα πρέπει να κατανέμονται τυχαία σε μια θέση στο σύστημα έκθεσης, με σκοπό τη μείωση των πιθανών επιδράσεων που οφείλονται στη θέση, συμπεριλαμβανομένων των ελαφρών διακυμάνσεων στη θερμοκρασία, στην ένταση του φωτός κ.λπ. Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη διαμόρφωση συστημάτων έκθεσης συνεχούς ροής νερού ανατρέξτε στον οδηγό του ASTM για τη διεξαγωγή δοκιμών οξείας τοξικότητας σε υλικά δοκιμών με ψάρια, μακροασπόνδυλα και αμφίβια (Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians) (16).

Παροχή της χημικής ουσίας: παρασκευή των διαλυμάτων δοκιμής

19. Για την παρασκευή των διαλυμάτων δοκιμής στο σύστημα έκθεσης, αποθεματικό διάλυμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να χορηγείται σταδιακά στο σύστημα έκθεσης μέσω κατάλληλης αντλίας ή άλλης συσκευής. Η ταχύτητα ροής του αποθεματικού διαλύματος θα πρέπει να βαθμονομείται σύμφωνα με την αναλυτική επιβεβαίωση των διαλυμάτων δοκιμής πριν από την έναρξη της έκθεσης και να υποβάλλεται σε περιοδικό ογκομετρικό έλεγχο κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Το διάλυμα δοκιμής σε κάθε υποδοχέα θα πρέπει να ανανεώνεται με ρυθμό τουλάχιστον 5 ανανεώσεων όγκου/ημέρα.

20. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την εισαγωγή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο σύστημα μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητές της. Ως εκ τούτου, πριν από τη δοκιμή θα πρέπει να λαμβάνονται βασικές πληροφορίες για τη χημική ουσία, οι οποίες να αφορούν τη δυνατότητα δοκιμής της. Στις χρήσιμες πληροφορίες που είναι σχετικές με τις ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας συγκαταλέγονται ο συντακτικός τύπος, το μοριακό βάρος, η καθαρότητα, η σταθερότητα στο νερό και το φως, η pK_a και ο K_{ow}, η υδατοδιαλυτότητα (κατά προτίμηση στο δοκιμαστικό μέσο) και η τάση ατμών, καθώς και τα αποτελέσματα δοκιμής άμεσης βιοαποδομησιμότητας [μέθοδος δοκιμών Γ.4 (17) ή Γ.29 (18)]. Η υδατοδιαλυτότητα και η τάση ατμών μπορούν να χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της σταθεράς του νόμου του Henry, η οποία δείχνει αν είναι πιθανόν να σημειωθούν απώλειες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας λόγω εξάτμισης. Η διενέργεια της δοκιμής χωρίς τις πληροφορίες που παρατίθενται ανωτέρω θα πρέπει να αποτελεί αντικείμενο προσεκτικής εξέτασης καθώς ο σχεδιασμός της μελέτης εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και, χωρίς αυτά τα δεδομένα, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμής μπορεί να είναι δύσκολη ή χωρίς νόημα. Πρέπει επίσης να υπάρχει αξιόπιστη αναλυτική μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στα διαλύματα, της οποίας η ακρίβεια και το όρια ανίχνευσης να είναι γνωστά και δημοσιευμένα. Οι υδατοδιαλυτές υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορούν να διαλύονται σε ποσότητες νερού αραίωσης, σε συγκέντρωση που επιτρέπει την παροχή της χημικής ουσίας στην επιδιωκόμενη συγκέντρωση δοκιμής σε σύστημα συνεχούς ροής νερού. Οι χημικές ουσίες που είναι υγρές ή στερεές σε θερμοκρασία δωματίου και οι οποίες είναι μέτρια διαλυτές στο νερό μπορούν να εισάγονται με τη χρήση μεθόδων κορεσμού υγρού:υγρού ή υγρού:στερεού (π.χ. στήλη υαλοβάμβακα) (19). Αν και μπορεί να είναι επίσης δυνατή η χορήγηση εξαιρετικά υδρόφοβων υπό δοκιμή χημικών ουσιών μέσω της τροφής, η εμπειρία στη χρήση αυτής της οδού έκθεσης σε αυτή τη δοκιμασία είναι μικρή.

21. Τα διαλύματα με τις επιθυμητές συγκεντρώσεις παρασκευάζονται συνήθως με αραίωση αποθεματικού διαλύματος. Το αποθεματικό διάλυμα θα πρέπει, κατά προτίμηση, να παρασκευάζεται με απλή ανάμειξη ή ανακίνηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε νερό αραίωσης, με μηχανικά μέσα (π.χ. ανάδευση και/ή υπερήχους). Για να επιτευχθεί κατάλληλα πυκνό αποθεματικό διάλυμα, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν στήλες/συστήματα κορεσμού ή παθητικές δοσιμετρικές μέθοδοι (20). Προτιμώνται τα συστήματα δοκιμής χωρίς συνδιαλύτη, ωστόσο οι διάφορες υπό δοκιμή χημικές ουσίες έχουν διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, οι οποίες πιθανώς να απαιτούν διαφορετικές προσεγγίσεις όσον αφορά την προετοιμασία του νερού έκθεσης στη χημική

▼M8

ουσία. Είναι προτιμότερο να αποφεύγεται η χρήση διαλυτών ή φορέων επειδή: 1) ορισμένοι διαλύτες ενδέχεται να συνεπάγονται οι ίδιοι τοξικότητα και/ή ανεπιθύμητες ή απρόβλεπτες αποκρίσεις, 2) η διεξαγωγή δοκιμών με χημικές ουσίες σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από την υδατοδιαλυτότητά τους (όπως συμβαίνει συχνά όταν χρησιμοποιούνται διαλύτες) μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα ανακριβείς προσδιορισμούς των αποτελεσματικών συγκεντρώσεων, (3) η χρήση διαλυτών σε μακροχρόνιες δοκιμές μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τον σημαντικό σχηματισμό βιοϋμένων, ο οποίος συνδέεται με μικροβιακή δραστηριότητα που μπορεί να επηρεάσει τις περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς και την ικανότητα διατήρησης των συγκεντρώσεων έκθεσης, και (4) ελλείψει ιστορικών δεδομένων που να καταδεικνύουν ότι ο διαλύτης δεν επηρεάζει την έκβαση της μελέτης, η χρήση διαλυτών απαιτεί αγωγή μάρτυρα με διαλύτη η οποία έχει επιπτώσεις στην καλή μεταχείριση των ζώων, δεδομένου ότι απαιτείται πρόσθετος αριθμός ζώων για τη διεξαγωγή της δοκιμής. Για χημικές ουσίες που παρουσιάζουν δυσκολίες στη δοκιμή, μπορεί να χρησιμοποιείται διαλύτης ως έσχατη λύση· συμβουλευτείτε το έγγραφο κατευθυντήριων γραμμών του ΟΟΣΑ σχετικά με τις δοκιμές υδατικής τοξικότητας δύσκολων ουσιών και μειγμάτων (OECD Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures) (15) για την επιλογή της βέλτιστης μεθόδου. Η επιλογή του διαλύτη θα καθορίζεται από τις χημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και τη διαθεσιμότητα ιστορικών δεδομένων μάρτυρα σχετικά με τον διαλύτη. Εάν δεν υπάρχουν ιστορικά δεδομένα, η καταλληλότητα ενός διαλύτη θα πρέπει να προσδιορίζεται πριν από τη διενέργεια της οριστικής μελέτης. Εάν δεν μπορεί να αποφευχθεί η χρήση διαλύτη και προκύψει μικροβιακή δραστηριότητα (σχηματισμός βιοϋμένων), συνιστάται η καταγραφή και η αναφορά του σχηματισμού βιοϋμένων ανά δεξαμενή (τουλάχιστον σε εβδομαδιαία βάση) σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Ιδανικά, η συγκέντρωση του διαλύτη θα πρέπει να διατηρείται σταθερή στον μάρτυρα με διαλύτη και σε όλες τις αγωγές της δοκιμής. Εάν η συγκέντρωση του διαλύτη δεν διατηρηθεί σταθερή, στον μάρτυρα με διαλύτη θα πρέπει να χρησιμοποιείται η υψηλότερη συγκέντρωση διαλύτη στην αγωγή της δοκιμής. Σε περίπτωση που χρησιμοποιείται διαλύτης ως φορέας, οι μέγιστες συγκεντρώσεις του διαλύτη δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν τα 100 μl/l ή τα 100 mg/l (21), και συνιστάται η συγκέντρωση του διαλύτη να είναι όσον το δυνατόν πιο χαμηλή (π.χ. ≤ 20 μl/l) για να αποφεύγονται πιθανές επιδράσεις του διαλύτη στις μετρούμενες παραμέτρους (22).

Πειραματόζωα

Είδος δοκιμής

22. Το είδος της δοκιμής είναι το *X. laevis* διότι: 1) καλλιεργείται συστηματικά σε εργαστήρια παγκοσμίως, 2) αποκτάται εύκολα από προμηθευτές του εμπορίου και 3) είναι δυνατός ο προσδιορισμός του γενετικού φύλου.

Φροντίδα και αναπαραγωγή ενήλικων ατόμων

23. Η δέουσα φροντίδα και αναπαραγωγή των ατόμων *X. laevis* περιγράφεται στις σχετικές τυποποιημένες κατευθυντήριες γραμμές (23). Η στέγαση και η φροντίδα των ατόμων *X. laevis* περιγράφεται επίσης από τον Read (24). Για την πρόκληση αναπαραγωγής, χορηγείται ενδοπεριτοναϊκώς ένεση ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG) σε τρία έως πέντεζεύγη θηλυκών και αρσενικών ενήλικων ατόμων. Στα θηλυκά και αρσενικά άτομα χορηγούνται με ένεση περίπου 800-1000 IU και 500-800 IU hCG αντίστοιχα, διαλυμένης σε αλατούχο διάλυμα 0,6-0,9 % (ή σε διάλυμα Ringer βατράχου, ένα ισότονο αλατούχο διάλυμα για χρήση σε αμφίβια). Ο όγκος έγχυσης θα πρέπει να είναι περίπου 10 μl/g σωματικού βάρους (~1 000 μl). Εν συνεχεία, τα ζεύγη στα οποία έχει προκληθεί αναπαραγωγή διατηρούνται σε μεγάλες δεξαμενές ανενόχλητα και κάτω από στατικές συνθήκες, για διευκόλυνση του ζευγαρώματος. Στον πυθμένα κάθε δεξαμενής αναπαραγωγής θα πρέπει να υπάρχει ένας ψευδοπυθμένας από πλέγμα ανοξείδωτου χάλυβα (π.χ. με μάτια 1,25 cm) που να επιτρέπει στις μάζες των αυγών να αποτίθενται στον πυθμένα. Οι βάτραχοι που θα δεχτούν ένεση hCG αργά το απόγευμα συνήθως εναποθέτουν τα περισσότερα αυγά μέχρι αργά το πρωί της επόμενης ημέρας. Μετά την απελευθέρωση και γονιμοποίηση επαρκούς ποσότητας αυγών, τα ενήλικα άτομα θα πρέπει να απομακρύνονται από τις δεξαμενές αναπαραγωγής. Εν συνεχεία τα αυγά συλλέγονται και τα ζελατινώδη περιβλήματα αφαιρούνται με χρήση L-κυστεΐνης (23). Θα πρέπει να παρασκευάζεται διάλυμα περιεκτικότητας 2 % σε L-κυστεΐνη και το pH να ρυθμίζεται

▼M8

σε 8,1 με προσθήκη 1 M NaOH. Αυτό το διάλυμα θερμοκρασίας 21 °C προστίθεται σε φιάλη Erlenmeyer 500 ml που περιέχει τα αυγά που προέρχονται από μία διαδικασία ωοτοκίας, περιδινίζεται ήπια για ένα έως δύο λεπτά και εν συνεχεία εκπλένεται σχολαστικά 6-8 φορές με νερό καλλιέργειας θερμοκρασίας 21 °C. Εν συνεχεία τα αυγά μεταφέρονται σε δοχείο κρυστάλλωσης και επιβεβαιώνεται ότι είναι βιώσιμα σε ποσοστό > 70 % με ελάχιστες ανωμαλίες στα έμβρυα που παρουσιάζουν κυτταρική διαίρεση

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Συγκεντρώσεις δοκιμής

24. Συνιστάται η χρήση τουλάχιστον τεσσάρων συγκεντρώσεων χημικής ουσίας και κατάλληλων μαρτύρων (συμπεριλαμβανομένων των μαρτύρων με διαλύτη, εάν είναι απαραίτητο). Γενικά, συνιστάται διαχωρισμός συγκέντρωσης (συντελεστής απόστασης) που δεν υπερβαίνει το 3,2.

25. Για τους σκοπούς της παρούσας δοκιμής, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται, στο μέτρο του δυνατού, τα αποτελέσματα από τις υπάρχουσες μελέτες σχετικά με τα αμφίβια για τον προσδιορισμό της υψηλότερης συγκέντρωσης δοκιμής, ώστε να αποφεύγονται οι υπερβολικά τοξικές συγκεντρώσεις. Πληροφορίες π.χ. από ποσοτικές σχέσεις δομής-δραστικότητας, από συγκριτικές μελέτες και από υπάρχουσες μελέτες σε αμφίβια, όπως η δοκιμασία μεταμόρφωσης αμφιβίων (μέθοδος δοκιμών Γ.38) (25) και η δοκιμασία τερατογένεσης σε έμβρυο βατράχου - *Xenopus* (23) και/ή δοκιμασίες σε ψάρια όπως οι μέθοδοι δοκιμών Γ.48, Γ.41 και Γ.49 (26) (27) (28), μπορούν να συμβάλουν στον προσδιορισμό αυτής της συγκέντρωσης. Πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμασίας LAGDA, μπορεί να διενεργηθεί πείραμα προσδιορισμού εύρους. Συνιστάται η έκθεση προσδιορισμού εύρους να ξεκινά εντός 24 ωρών από τη γονιμοποίηση και να συνεχίζεται για 7-14 ημέρες (ή περισσότερες, εάν χρειάζεται) και οι συγκεντρώσεις δοκιμής να ρυθμίζονται έτσι ώστε να μην απέχουν μεταξύ τους κατά συντελεστή μεγαλύτερο του 10. Τα αποτελέσματα του πειράματος προσδιορισμού εύρους θα πρέπει να χρησιμεύουν για τον καθορισμό της υψηλότερης συγκέντρωσης δοκιμής στη δοκιμασία LAGDA. Να σημειωθεί ότι, εάν πρέπει να χρησιμοποιηθεί διαλύτης, τότε η καταλληλότητα του διαλύτη (δηλαδή το κατά πόσον μπορεί να επηρεάσει το αποτέλεσμα της μελέτης) μπορεί να διαπιστωθεί στο πλαίσιο της μελέτης προσδιορισμού εύρους.

Πανομοιότυπα δείγματα εντός των ομάδων αγωγής και των μαρτύρων

26. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τέσσερις δεξαμενές πανομοιότυπων δειγμάτων ανά συγκέντρωση δοκιμής και τουλάχιστον οκτώ πανομοιότυπα δείγματα για τους μάρτυρες (και τον μάρτυρα με διαλύτη, αν χρειάζεται) (δηλαδή ο αριθμός πανομοιότυπων δειγμάτων στον μάρτυρα και τυχόν μάρτυρα με διαλύτη θα πρέπει να είναι διπλάσιος από τον αριθμό πανομοιότυπων δειγμάτων κάθε ομάδας αγωγής, για να εξασφαλιστεί η κατάλληλη στατιστική ισχύς). Κανένα πανομοιότυπο δείγμα δεν πρέπει να περιέχει περισσότερα από 20 ζώα. Ο ελάχιστος αριθμός ζώων που υποβάλλονται σε επεξεργασία θα είναι 15 (5 για το υποδείγμα στο στάδιο 62 κατά NF και 10 νεαρά άτομα). Ωστόσο, επιπλέον ζώα προστίθενται σε κάθε πανομοιότυπο δείγμα ώστε τυχόν θάνατοι να μη μειώσουν το πλήθος κάτω από τον κρίσιμο αριθμό 15.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Επισκόπηση δοκιμασίας

27. Η δοκιμασία ξεκινά με πρόσφατα έμβρυα (στάδια 8-10 κατά NF) και συνεχίζεται κατά το στάδιο της ανάπτυξης των νεαρών ατόμων. Τα ζώα εξετάζονται καθημερινά για θνησιμότητα και τυχόν σημεία μη φυσιολογικής συμπεριφοράς. Στο στάδιο 62 κατά NF, συλλέγεται υποδείγμα προνυμφών (μέχρι 5 ζώα ανά πανομοιότυπο δείγμα) και εξετάζονται διάφορες παράμετροι (πίνακας 1). Αφού φτάσουν όλα τα ζώα στο στάδιο 66 κατά NF, δηλαδή μετά την ολοκλήρωση της μεταμόρφωσης (ή 70 ημέρες μετά την έναρξη της δοκιμασίας, όποιο από τα δύο προηγείται), θανατώνονται τυχαία

▼M8

(αλλά χωρίς λήψη υποδείγματος) ορισμένα ζώα ώστε να μειωθεί ο αριθμός τους (10 ανά δεξαμενή) (βλ. παράγραφο 43) και συνεχίζεται η έκθεση των υπόλοιπων ζώων μέχρι να παρέλθουν 10 εβδομάδες από τον διάμεσο χρόνο έως το στάδιο 62 κατά NF στον μάρτυρα. Στο τέλος της δοκιμής (δειγματοληψία νεαρών ζώων) πραγματοποιούνται επιπλέον μετρήσεις (πίνακας 1).

Συνθήκες έκθεσης

28. Πλήρης σύνοψη των παραμέτρων της δοκιμής διατίθεται στο προσάρτημα 3. Κατά την περίοδο έκθεσης, το διαλυμένο οξυγόνο, η θερμοκρασία και το pH των διαλυμάτων δοκιμής θα πρέπει να μετρώνται καθημερινά. Η αγωγιμότητα, η αλκαλικότητα και η σκληρότητα μετρώνται μία φορά τον μήνα. Για τη θερμοκρασία νερού των διαλυμάτων δοκιμής, οι διαφορές μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων / μεταξύ των αγωγών (εντός μίας ημέρας) δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν τον 1,0 °C. Επίσης, για το pH των διαλυμάτων δοκιμής, οι διαφορές μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων / μεταξύ των αγωγών δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν το 0,5.

29. Οι δεξαμενές έκθεσης μπορούν να καθαρίζονται καθημερινά με σιφωνισμό για την απομάκρυνση υπολειμμάτων τροφών και αποβλήτων, με προσοχή ώστε να αποφεύγεται η διασταυρούμενη μόλυνση των δεξαμενών. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να ελαχιστοποιείται η πρόκληση στρες και τραυματισμών στα ζώα, ιδιαίτερα κατά τη μετακίνηση, τον καθαρισμό των ενυδρείων και τον χειρισμό. Θα πρέπει να αποφεύγονται οι συνθήκες/δραστηριότητες που προκαλούν στρες, όπως ο δυνατός και/ή αδιάκοπος θόρυβος, τα ελαφριά χτυπήματα στα ενυδρεία ή οι κραδασμοί μέσα στη δεξαμενή.

Διάρκεια έκθεσης στην υπό δοκιμή χημική ουσία

30. Η έκθεση ξεκινά με πρόσφατα έμβρυα (σταδίου 8-10 κατά NF) και συνεχίζεται μέχρι να παρέλθουν δέκα εβδομάδες από τον διάμεσο χρόνο έως το στάδιο 62 κατά NF (≤ 45 ημέρες από την έναρξη της δοκιμασίας) στην ομάδα μάρτυρα. Γενικά, η διάρκεια της δοκιμασίας LAGDA είναι 16 εβδομάδες (17 εβδομάδες κατά μέγιστο).

Έναρξη δοκιμασίας

31. Όσον αφορά τα γονικά ζώα που χρησιμοποιούνται για την έναρξη της δοκιμασίας, θα πρέπει να αποδειχθεί προηγουμένως ότι παράγουν απογόνους των οποίων το φύλο μπορεί να προσδιοριστεί γενετικά (προσάρτημα 5). Μετά την ωοτοκία των ενηλίκων, τα έμβρυα συλλέγονται, υποβάλλονται σε επεξεργασία με κυστεΐνη για την απομάκρυνση του ζελατινώδους περιβλήματος και ελέγχονται ως προς τη βιωσιμότητα (23). Η επεξεργασία με κυστεΐνη επιτρέπει τον χειρισμό των εμβρύων κατά το στάδιο της διαλογής χωρίς αυτά να προσκολλώνται σε επιφάνειες. Η διαλογή πραγματοποιείται μέσω στερεοσκοπικού μικροσκοπίου με χρήση σταγονόμετρου κατάλληλου μεγέθους για την απομάκρυνση των μη βιώσιμων εμβρύων. Είναι προτιμότερο να χρησιμοποιείται για τη δοκιμή μια ωοτοκία που έχει βιωσιμότητα μεγαλύτερη από 70 %. Τα έμβρυα σταδίου 8-10 κατά NF κατανέμονται τυχαία σε δεξαμενές αγωγής έκθεσης που περιέχουν κατάλληλο όγκο νερού αραίωσης, έτσι ώστε η κάθε δεξαμενή να περιέχει 20 έμβρυα. Ο χειρισμός των εμβρύων κατά τη διάρκεια αυτής της μεταφοράς θα πρέπει να πραγματοποιείται με προσοχή, ώστε να ελαχιστοποιείται η πρόκληση στρες λόγω του χειρισμού και να αποφεύγονται τυχόν τραυματισμοί. 96 ώρες μετά τη γονιμοποίηση, οι γυρίνοι θα πρέπει να έχουν ανέλθει στη στήλη ύδατος και να έχουν αρχίσει να προσκολλώνται στα τοιχώματα της δεξαμενής.

Πρόγραμμα σίτισης

32. Η τροφή και η αλλαγή του ρυθμού σίτισης κατά τα διάφορα στάδια ζωής του *X. laevis* αποτελούν πολύ σημαντική πτυχή του πρωτοκόλλου LAGDA. Η υπερβολική σίτιση κατά το προνυμφικό στάδιο προκαλεί κατά κανόνα αύξηση της επίπτωσης και της σοβαρότητας της σκολίωσης (προσάρτημα 8) και θα πρέπει να αποφεύγεται. Αντιθέτως, η ελλιπής σίτιση κατά το προνυμφικό στάδιο προκαλεί ιδιαίτερα μεταβλητούς ρυθμούς ανάπτυξης

▼M8

στους μάρτυρες και ενδέχεται να μειώσει τη στατιστική ισχύ ή να επιδράσει συγχυτικά στα αποτελέσματα της δοκιμής. Στο προσάρτημα 4 περιγράφεται η συνιστώμενη διατροφή και τα προγράμματα σίτισης για τις προνύμφες και τα νεαρά άτομα του *X. laevis* σε συνθήκες συνεχούς ροής, ωστόσο επιτρέπονται εναλλακτικές λύσεις με την προϋπόθεση ότι οι οργανισμοί δοκιμής αυξάνονται και αναπτύσσονται ικανοποιητικά. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι, εάν εξετάζονται παράμετροι που αφορούν το ενδοκρινικό σύστημα, η τροφή δεν θα πρέπει να περιέχει ουσίες που επιδρούν στο ενδοκρινικό σύστημα, όπως άλευρο σόγιας.

Σίτιση των προνυμφών

33. Το συνιστώμενο σιτηρέσιο των προνυμφών περιλαμβάνει αρχικές τροφές για πέστροφες, δισκία φυκών *Spirulina* και νιφάδες για χρυσόψαρα (π.χ. νιφάδες TetraFin®, Tetra, Γερμανία) αναμεμιγμένα σε νερό καλλιέργειας (ή αραίωσης). Το μείγμα αυτό χορηγείται τρεις φορές ημερησίως τις καθημερινές και μία φορά ημερησίως τα Σαββατοκύριακα. Στους γυρίνους χορηγούνται επίσης ζωντανές γαρίδες της άλμης (ναύπλιοι *Artemia* spp. ηλικίας 24 ωρών), δύο φορές ημερησίως τις καθημερινές και μία φορά ημερησίως τα Σαββατοκύριακα, αρχίζοντας την 8η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση. Η σίτιση των προνυμφών, η οποία πρέπει να είναι σταθερή σε κάθε δοχείο δοκιμής, θα πρέπει να επιτρέπει την κατάλληλη αύξηση και ανάπτυξη των ζώων δοκιμής προκειμένου να διασφαλίζεται η αναπαραγωγιμότητα και η δυνατότητα μεταφοράς των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας: 1) ο διάμεσος χρόνος μέχρι το στάδιο 62 κατά NF στους μάρτυρες θα πρέπει να είναι ≤ 45 ημέρες και 2) συνιστάται το μέσο βάρος έως το στάδιο 62 κατά NF να είναι εντός του ορίου 1,0 ± 0,2g στους μάρτυρες.

Σίτιση των νεαρών ατόμων

34. Αφού ολοκληρωθεί η μεταμόρφωση, το πρόγραμμα σίτισης περιλαμβάνει υψηλής ποιότητας βυθιζόμενη τροφή βατράχων, π.χ. Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, FL, ΗΠΑ) (προσάρτημα 4). Για τα πρώιμα νεαρά άτομα, οι κόκκοι αλέθονται για σύντομο χρονικό διάστημα σε συσκευή άλεσης καφέ ή αναμικτήρα ή συνθλίβονται σε γουδί προκειμένου να μειωθεί το μέγεθός τους. Αφού τα νεαρά άτομα μεγαλώσουν αρκετά ώστε να μπορούν να καταναλώνουν πλήρεις κόκκους, δεν χρειάζεται πια άλεση ή σύνθλιψη. Τα ζώα θα πρέπει να σιτίζονται μία φορά ημερησίως. Η σίτιση των νεαρών ατόμων θα πρέπει να επιτρέπει την κατάλληλη αύξηση και ανάπτυξη των οργανισμών: συνιστάται μέσο βάρος 11,5 ± 3 g στα νεαρά άτομα μάρτυρες κατά τη λήξη της δοκιμασίας.

Αναλυτική χημεία

35. Πριν από την έναρξη της δοκιμασίας, θα πρέπει να προσδιορίζεται η σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (π.χ. διαλυτότητα, ικανότητα αποδόμησης και πτητικότητα) και να επιλέγονται οι απαραίτητες αναλυτικές μέθοδοι, π.χ. βάσει των υφιστάμενων πληροφοριών ή γνώσεων. Όταν η δόση χορηγείται μέσω του νερού αραίωσης, συνιστάται, πριν από την έναρξη της δοκιμής, να αναλύονται τα διαλύματα δοκιμής από κάθε δεξαμενή πανομοιότυπου δείγματος προκειμένου να επαληθεύονται οι επιδόσεις του συστήματος. Στη διάρκεια της περιόδου έκθεσης, οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας προσδιορίζονται ανά κατάλληλα χρονικά διαστήματα, κατά προτίμηση κάθε εβδομάδα για τουλάχιστον ένα πανομοιότυπο δείγμα σε κάθε ομάδα αγωγής, με κυκλική εναλλαγή μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων της ίδιας ομάδας αγωγής κάθε εβδομάδα. Συνιστάται να βασίζονται τα αποτελέσματα σε μετρηθείσες συγκεντρώσεις. Ωστόσο, εάν η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο διάλυμα έχει διατηρηθεί ικανοποιητικά εντός του ±20 % της ονομαστικής συγκέντρωσης καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής, τα αποτελέσματα μπορούν να βασίζονται στις ονομαστικές ή στις μετρηθείσες τιμές. Επίσης, ο συντελεστής μεταβλητότητας (CV) των μετρούμενων συγκεντρώσεων δοκιμής καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής σε μία αγωγή θα πρέπει να διατηρείται εντός του ορίου του 20 % ή λιγότερο σε κάθε συγκέντρωση. Όταν οι μετρούμενες συγκεντρώσεις δεν διατηρούνται εντός του ορίου 80-120 % της ονομαστικής συγκέντρωσης (για παράδειγμα, κατά την υποβολή σε δοκιμή χημικών ουσιών με υψηλή ικανότητα αποδόμησης ή προσρόφησης), οι συγκεντρώσεις επίδρασης θα πρέπει να προσδιορίζονται και να εκφράζονται σε σχέση με την αριθμητική μέση συγκέντρωση για τις δοκιμές συνεχούς ροής.

▼M8

36. Οι ρυθμοί ροής του νερού αραίωσης και του αποθεματικού διαλύματος θα πρέπει να ελέγχονται ανά κατάλληλα χρονικά διαστήματα (π.χ. τρεις φορές την εβδομάδα) καθ' όλη τη διάρκεια της έκθεσης. Σε περιπτώσεις χημικών ουσιών που δεν μπορούν να ανιχνευτούν σε ορισμένες ή σε όλες τις ονομαστικές συγκεντρώσεις, (π.χ. λόγω ταχείας αποδόμησης ή προσρόφησης στα δοχεία δοκιμής, ή λόγω έντονης συσσώρευσης στο σώμα των εκτιθέμενων ζώων), συνιστάται ο ρυθμός ανανέωσης του διαλύματος δοκιμής σε κάθε θάλαμο να προσαρμόζεται ώστε να διατηρούνται οι συγκεντρώσεις δοκιμής όσο το δυνατόν πιο σταθερές.

Παρατηρήσεις και μετρήσεις παραμέτρων

37. Οι παράμετροι που αξιολογούνται στη διάρκεια της έκθεσης είναι εκείνες που είναι ενδεικτικές της τοξικότητας, περιλαμβανομένης της θνησιμότητας, της μη φυσιολογικής συμπεριφοράς, όπως κλινικά σημεία ασθένειας και/ή γενικές τοξικότητες, και προσδιορισμοί της σωματικής αύξησης (μήκος και βάρος), καθώς και παράμετροι παθολογίας οι οποίες ενδέχεται να αντιδρούν τόσο στη γενική τοξικότητα όσο και στους ενδοκρινικούς τρόπους δράσης που πλήττουν οδούς που διαμεσολαβούνται από οιστρογόνα, ανδρογόνα ή θυρεοειδικές ορμόνες. Επιπλέον, κατά τη λήξη της δοκιμασίας μπορεί να μετράται προαιρετικά η συγκέντρωση της VTG στο πλάσμα. Η μέτρηση της VTG μπορεί να είναι χρήσιμη για την κατανόηση των αποτελεσμάτων της μελέτης στο πλαίσιο ενδοκρινικών μηχανισμών για εικαζόμενους ενδοκρινικούς διαταράκτες. Οι παράμετροι και το χρονοδιάγραμμα μετρήσεων συνοψίζονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1

Επισκόπηση παραμέτρων της LAGDA

Παράμετροι (*)	Καθημερινά	Ενδιάμεση δειγματοληψία (δειγματοληψία προνυμφών)	Λήξη της δοκιμής (δειγματοληψία νεαρών ατόμων)
Θνησιμότητα και ανωμαλίες	X		
Χρόνος μέχρι το στάδιο 62 κατά NF		X	
Ιστο(παθο)λογία (θυρεοειδής αδένας)		X	
Μορφομετρικά στοιχεία (σωματική αύξηση: βάρος και μήκος)		X	X
Ηπατοσωματικός δείκτης (LSI)			X
Αναλογίες γενετικών/φαινοτυπικών φύλων			X
Ιστοπαθολογία (γονάδες, αναπαραγωγικοί πόροι, νεφρός και ήπαρ)			X
Λεκιθογενίνη (VTG) (προαιρετικά)			X

(*) Όλες οι παράμετροι υποβάλλονται σε στατιστική ανάλυση.

Θνησιμότητα και καθημερινές παρατηρήσεις

38. Όλες οι δεξαμενές δοκιμής θα πρέπει να ελέγχονται καθημερινά για νεκρά ζώα και θα πρέπει να καταγράφονται οι τιμές θνησιμότητας για κάθε δεξαμενή. Τα νεκρά ζώα θα πρέπει να απομακρύνονται από τη δεξαμενή δοκιμής αμέσως μόλις γίνονται αντιληπτά. Θα πρέπει να κατηγοριοποιείται το αναπτυξιακό στάδιο των νεκρών ζώων είτε ως «προ σταδίου 58 κατά NF» (πριν από την εμφάνιση του πρόσθιου άκρου), ως «στάδιο 58 κατά NF έως στάδιο 62 κατά NF», ως «στάδιο 63 κατά NF έως στάδιο 66 κατά NF» (μεταξύ σταδίου 62 κατά NF και πλήρους απορρόφησης της ουράς), ή ως «μετά το στάδιο 66 κατά NF» (μετά το στάδιο της προνύμφης). Τιμές θνησιμότητας που υπερβαίνουν το 20 % ενδέχεται να υποδεικνύουν ακατάλληλες συνθήκες

▼M8

δοκιμής ή έκδηλες τοξικές επιδράσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Τα ζώα είναι συνήθως πιο επιρρεπή στον θάνατο από άλλες αιτίες εκτός των χημικών ουσιών κατά τις πρώτες ημέρες της ανάπτυξης μετά την ωοτοκία και κατά την κορύφωση της μεταμόρφωσης. Τέτοιου είδους θνησιμότητα μπορεί να διαπιστωθεί από τα δεδομένα για τους μάρτυρες.

39. Επιπλέον, τυχόν παρατήρηση μη φυσιολογικής συμπεριφοράς, μακροσκοπικά ορατών δυσπλασιών (π.χ. σκολίωση), ή αλλοιώσεων θα πρέπει να καταγράφεται. Οι παρατηρήσεις σκολίωσης θα πρέπει να μετρώνται (συχνότητα εμφάνισης) και να διαβαθμίζονται ως προς τη σοβαρότητα (π.χ. μη αξιοσημείωτη: NR, ελάχιστη: 1, μέτρια: 2, σοβαρή: 3 – βλ. προσάρτημα 8). Θα πρέπει να καταβάλλονται προσπάθειες ώστε να περιορίζεται ο επιπολασμός της μέτριας και σοβαρής σκολίωσης (π.χ. κάτω του 10 % στους μάρτυρες) καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης, αν και η ύπαρξη υψηλότερου επιπολασμού ανωμαλιών δεν θα πρέπει να αποτελεί απαραιτήτως λόγο διακοπής της δοκιμής. Η φυσιολογική συμπεριφορά των προνυμφών χαρακτηρίζεται από αιώρηση στη στήλη ύδατος με την ουρά σηκωμένη πάνω από το κεφάλι, τακτικό και ρυθμικό χτύπημα του ουραίου πτερυγίου, περιοδική ανάδυση στην επιφάνεια του νερού, ανοιγοκλείσιμο των επικαλυμμάτων των βραγχίων, και αντίδραση σε ερεθίσματα. Μη φυσιολογικές συμπεριφορές μπορεί να περιλαμβάνουν, για παράδειγμα, επίπλευση στην επιφάνεια, παραμονή στον πυθμένα της δεξαμενής, ανεστραμμένη ή ακανόνιστη κολύμβηση, έλλειψη δραστηριότητας ανάδυσης και αδυναμία αντίδρασης σε ερεθίσματα. Για τα ζώα που έχουν ολοκληρώσει το στάδιο της μεταμόρφωσης, πέραν των προαναφερθεισών μη φυσιολογικών συμπεριφορών, θα πρέπει να καταγράφονται τυχόν σημαντικές διαφορές στην κατανάλωση τροφής μεταξύ των αγωγών. Μακροσκοπικές δυσπλασίες και αλλοιώσεις είναι, μεταξύ άλλων, οι μορφολογικές ανωμαλίες (π.χ. παραμορφώσεις άκρων), οι αιμορραγικές βλάβες, το οίδημα της κοιλίας και οι λοιμώξεις από βακτήρια ή μύκητες. Η εμφάνιση αλλοιώσεων στο κεφάλι των νεαρών ατόμων, ακριβώς πίσω από τα ρουθούνια, μπορεί να αποτελεί ένδειξη ανεπαρκών επιπέδων υγρασίας. Οι προσδιορισμοί αυτοί είναι ποιοτικοί και θα πρέπει να θεωρούνται παρόμοιοι με κλινικά σημεία ασθένειας/στρες, καθώς και να γίνονται σε σύγκριση με τα ζώα-μάρτυρες. Εάν η συχνότητα εμφάνισής τους είναι μεγαλύτερη στις δεξαμενές έκθεσης σε σχέση με τους μάρτυρες, θα πρέπει να θεωρούνται ενδείξεις έκδηλης τοξικότητας.

Δειγματοληψία υποδειγμάτων προνυμφών

Συνοπτική περιγραφή της δειγματοληψίας υποδειγμάτων προνυμφών:

40. Οι γυρίνοι που φθάνουν στο στάδιο 62 κατά NF θα πρέπει είτε να απομακρύνονται από τις δεξαμενές και κατόπιν να υποβάλλονται σε δειγματοληψία ή να μετακινούνται σε νέα δεξαμενή για τη διεξαγωγή της επόμενης φάσης έκθεσης, είτε να διαχωρίζονται από τους εναπομείναντες γυρίνους στην ίδια δεξαμενή με διαχωριστικό. Οι γυρίνοι ελέγχονται καθημερινά, και καταγράφεται η ημέρα της μελέτης κατά την οποία ένας μεμονωμένος γυρίνος φθάνει στο στάδιο 62 κατά NF. Το καθοριστικό χαρακτηριστικό που χρησιμοποιείται στην εν λόγω αξιολόγηση είναι το σχήμα του κεφαλιού. Μόλις το μέγεθος του κεφαλιού μειωθεί σε τέτοιο βαθμό ώστε το πλάτος του να είναι οπτικά περίπου ίδιο με το πλάτος του κορμού και των εμπρόσθιων άκρων του γυρίνου στο επίπεδο του μέσου της καρδιάς, τότε θεωρείται ότι το συγκεκριμένο άτομο έχει φθάσει στο στάδιο 62 κατά NF.

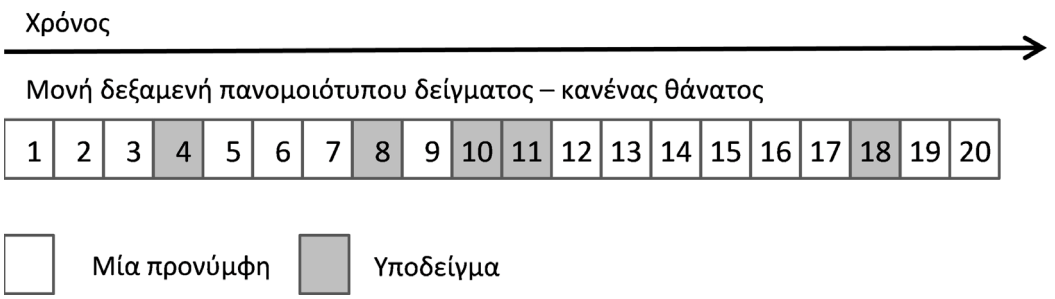
41. Ο στόχος είναι η εξέταση συνολικά πέντε γυρίνων σταδίου 62 κατά NF ανά δεξαμενή πανομοιότυπου δείγματος. Η διαδικασία θα πρέπει να πραγματοποιείται απολύτως τυχαία, αλλά να αποφασίζεται εκ των προτέρων. Ένα υποθετικό παράδειγμα δεξαμενής πανομοιότυπου δείγματος παρέχεται στο **σχήμα 1**. Σε περίπτωση που σε μια συγκεκριμένη δεξαμενή υπάρχουν 20 επιβιώσαντες γυρίνοι όταν το πρώτο άτομο φθάσει στο στάδιο 62 κατά NF, θα πρέπει να επιλέγονται πέντε τυχαίοι αριθμοί μεταξύ 1 και 20. Ο γυρίνος αριθ. 1 είναι το πρώτο άτομο που φθάνει στο στάδιο 62 κατά NF και ο γυρίνος αριθ. 20 είναι το τελευταίο άτομο σε μια δεξαμενή που φθάνει το στάδιο 62 κατά NF. Παρομοίως, εάν σε μια δεξαμενή έχουν επιβιώσει 18 προνύμφες, θα πρέπει να επιλέγονται πέντε τυχαίοι αριθμοί μεταξύ 1 και 18. Η διαδικασία αυτή θα πρέπει να εκτελείται για κάθε δεξαμενή πανομοιότυπου δείγματος όταν το πρώτο άτομο υπό δοκιμή φθάνει στο στάδιο 62 κατά NF. Εάν στη διάρκεια της δειγματοληψίας υπάρχουν θάνατοι ατόμων

▼**M8**

που φθάνουν στο στάδιο 62 κατά NF, τα δείγματα που απομένουν πρέπει να τυχαιοποιούνται εκ νέου ανάλογα με τον αριθμό των προνυμφών που έχουν απομείνει και οι οποίες δεν έχουν φθάσει στο στάδιο 62 κατά NF και ανάλογα με τον αριθμό επιπλέον δειγμάτων που απαιτείται προκειμένου να συμπληρωθούν συνολικά πέντε δείγματα από το συγκεκριμένο πανομοιότυπο δείγμα. Την ημέρα που ένας γυρίνος φθάνει στο στάδιο 62 κατά NF, θα πρέπει να καταγράφεται στον προετοιμασμένο πίνακα δειγματοληψίας το εάν το συγκεκριμένο άτομο υποβάλλεται σε εξέταση ή διαχωρίζεται από τους υπόλοιπους γυρίνους για τη συνέχιση της έκθεσης. Στο παρατιθέμενο παράδειγμα (σχήμα 1), το πρώτο άτομο που φθάνει στο στάδιο 62 κατά NF (δηλ. στο πλαίσιο #1) διαχωρίζεται από τις υπόλοιπες προνύμφες, συνεχίζει να υποβάλλεται σε έκθεση και καταγράφεται η ημέρα της μελέτης στην οποία το συγκεκριμένο άτομο έφθασε στο στάδιο 62 κατά NF. Επακολούθως, τα άτομα #2 και #3 υποβάλλονται στην ίδια διαδικασία με το άτομο #1 και, στη συνέχεια, το άτομο #4 υποβάλλεται σε εξέταση της σωματικής αύξησης και της ιστολογικής εικόνας του θυρεοειδούς (στο συγκεκριμένο παράδειγμα). Η διαδικασία συνεχίζεται μέχρις ότου το 20ο άτομο είτε προστεθεί στα υπόλοιπα άτομα μετά το στάδιο 62 κατά NF είτε υποβληθεί σε εξέταση. Η τυχαία διαδικασία που χρησιμοποιείται πρέπει να παρέχει την ίδια πιθανότητα επιλογής σε κάθε οργανισμό της δοκιμής. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με χρήση οποιασδήποτε μεθόδου τυχαιοποίησης, αλλά θα πρέπει επίσης κάθε γυρίνος να παγιδευτεί με απόχη σε κάποια χρονική στιγμή της περιόδου λήψης υποδειγμάτων σταδίου 62 κατά NF.

Σχήμα 1

Υποθετικό παράδειγμα συστήματος δειγματοληψίας σταδίου 62 κατά NF για μεμονωμένη δεξαμενή πανομοιότυπου δείγματος



42. Για τη δειγματοληψία υποδείγματος προνυμφών, οι μετρούμενες παράμετροι είναι ακόλουθες: 1) χρόνος μέχρι το στάδιο 62 κατά NF (δηλ. αριθμός ημερών μεταξύ της γονιμοποίησης και του σταδίου 62 κατά NF), 2) εξωτερικές ανωμαλίες, 3) μορφομετρικά στοιχεία (π.χ. βάρος και μήκος) και 4) ιστολογική εικόνα του θυρεοειδούς.

Θανάτωση γυρίνων

43. Το υποδείγμα γυρίνων σταδίου 62 κατά NF (5 άτομα ανά πανομοιότυπο δείγμα) θα πρέπει να θανατώνεται με ευθανασία μέσω εμβύθισης επί 30 λεπτά σε κατάλληλες ποσότητες (π.χ. 500 ml) αναισθητικού διαλύματος (π.χ. διάλυμα 0,3 % MS-222, μεθανοσουλφονικής τρικαΐνης, CAS.886-86-2). Στο διάλυμα MS-222 θα πρέπει να προστίθεται διττανθρακικό νάτριο για ρύθμιση του pH περίπου στο 7,0, διότι το διάλυμα MS-222 χωρίς ρυθμιστικό διάλυμα είναι όξινο και προκαλεί ερεθισμό στο δέρμα του βατράχου, με αποτέλεσμα κακή απορρόφηση και περιττό στρες.

44. Με χρήση απόχης, ένας γυρίνος απομακρύνεται από τον πειραματικό θάλαμο και μεταφέρεται (τοποθετείται) στο διάλυμα ευθανασίας. Το ζώο έχει θανατωθεί κατάλληλα και είναι έτοιμο για νεκροψία/νεκροτομή όταν δεν αντιδρά σε εξωτερικά ερεθίσματα, όπως το τσίμπημα του οπίσθιου άκρου με λαβίδα.

Μορφομετρικά στοιχεία (βάρος και μήκος)

45. Αμέσως μόλις ο γυρίνος σταματήσει να αντιδρά λόγω αναισθησίας, θα πρέπει να πραγματοποιούνται μετρήσεις του νωπού βάρους (με ακρίβεια χιλιοστόγραμμου) και του μήκους ρύγχους-αμάρας (SVL) (με ακρίβεια 0,1 χιλιοστόμετρου) κάθε γυρίνου (σχήμα 2α). Μπορεί να χρησιμοποιείται λογισμικό

▼M8

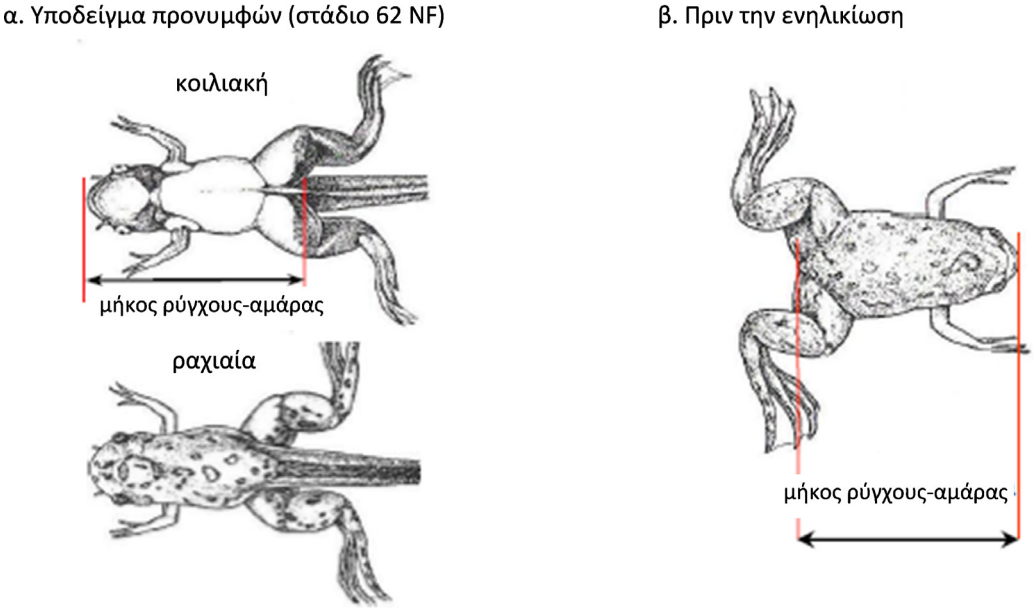
ανάλυσης εικόνας για τη μέτρηση του SVL από φωτογραφία. Προτού ζυγιστούν, οι γυρίνοι θα πρέπει να στεγνώνονται με απορροφητικό χαρτί ώστε να αφαιρείται τυχόν περίσσεια νερού. Μετά τις μετρήσεις του σωματικού μεγέθους (βάρος και SVL), θα πρέπει να καταγράφονται ή να σημειώνονται τυχόν μακροσκοπικές ανωμαλίες και/ή κλινικά σημεία τοξικότητας όπως σκολίωση (βλ. προσάρτημα 8), πετέχειες και αιμορραγία, η τεκμηρίωση των οποίων συνιστάται να γίνεται με ψηφιακά μέσα. Επισημαίνεται ότι οι πετέχειες είναι μικρές αιμορραγίες κόκκινου ή μωβ χρώματος στα τριχοειδή αγγεία του δέρματος.

Συλλογή και μονιμοποίηση ιστών

46. Για το υποδείγμα προνυμφών, αξιολογείται η ιστολογική εικόνα του θυρεοειδούς αδένα. Το κάτω τμήμα του κορμού που βρίσκεται πίσω από τα πρόσθια άκρα αφαιρείται και απορρίπτεται. Το υπόλοιπο σώμα μονιμοποιείται σε μέσο μονιμοποίησης Davidson. Ο όγκος του μέσου μονιμοποίησης στον περιέκτη θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 10 φορές μεγαλύτερος του κατά προσέγγιση όγκου των ιστών. Θα πρέπει να διασφαλίζεται η κατάλληλη ανακίνηση ή κυκλοφορία του μέσου μονιμοποίησης προκειμένου να μονιμοποιούνται επαρκώς οι υπό μελέτη ιστοί. Όλοι οι ιστοί παραμένουν σε μέσο μονιμοποίησης Davidson επί τουλάχιστον 48 ώρες, αλλά όχι περισσότερο από 96 ώρες, οπότε και εκπλένονται με απιονισμένο νερό και φυλάσσονται σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης 10 % (1) (29).

Ιστολογία θυρεοειδούς

47. Αξιολογείται η ιστολογική εικόνα του θυρεοειδούς αδένα κάθε υποδείγματος προνυμφών (μονιμοποιημένοι ιστοί), δηλ. διάγνωση και αξιολόγηση σοβαρότητας (29) (30).



Σχήμα 2: Ορόσημα για τη μέτρηση του μήκους ρύγχους-αμάρας για τη LAGDA σε άτομα σταδίου 62 κατά NF 62 (α) και νεαρούς βατράχους (β). Τα καθοριστικά χαρακτηριστικά του σταδίου 62 κατά NF 62 (α) είναι τα ακόλουθα: το κεφάλι έχει το ίδιο πλάτος με τον κορμό, το μήκος του οσφρητικού νεύρου είναι μικρότερο από τη διάμετρο του οσφρητικού βολβού (ραχιαία όψη), και τα πρόσθια άκρα βρίσκονται στο επίπεδο της καρδιάς (κοιλιακή όψη). Εικόνες προσαρμοσμένες από Nieuwkoop και Faber (1994).

Λήξη της έκθεσης των προνυμφών

48. Δεδομένου του αρχικού αριθμού των γυρίνων, αναμένεται ότι πιθανώς θα υπάρχει μικρό ποσοστό ατόμων που δεν θα αναπτυχθούν φυσιολογικά και δεν θα ολοκληρώσουν τη μεταμόρφωση (στάδιο 66 κατά NF) εντός εύλογου

▼M8

χρονικού διαστήματος. Το προνυμφικό διάστημα της περιόδου έκθεσης δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τις 70 ημέρες. Οι γυρίνοι που τυχόν απομένουν μετά το διάστημα αυτό θα πρέπει να θανατώνονται με ευθανασία (βλ. παράγραφο 43), να εξετάζονται ως προς το νωπό βάρος και το SVL και να κατατάσσονται σε στάδιο κατά Nieuwkoop και Faber (1994), και τυχόν αναπτυξιακές ανωμαλίες θα πρέπει να σημειώνονται.

Επιλεκτική θανάτωση μετά το στάδιο 66 κατά NF

49. Δέκα άτομα ανά δεξαμενή θα πρέπει να συνεχίσουν από το στάδιο 66 κατά NF (πλήρης απορρόφηση της ουράς) μέχρι τη λήξη της έκθεσης. Ως εκ τούτου, αφού όλα τα ζώα φθάσουν στο στάδιο 66 κατά NF ή μετά από 70 ημέρες (όποιο από τα δύο συμβεί πρώτο), θα πρέπει να γίνει επιλεκτική θανάτωση κάποιων ατόμων. Τα ζώα μετά το στάδιο 66 κατά NF που δεν θα συνεχίσουν να εκτίθενται θα πρέπει να επιλέγονται τυχαία.

50. Τα ζώα που δεν επιλέγονται για συνέχιση της έκθεσης θανατώνονται με ευθανασία (βλ. παράγραφο 43). Για κάθε ζώο πραγματοποιούνται μετρήσεις του αναπτυξιακού σταδίου, του νωπού βάρους και του SVL (σχήμα 2β) και διενεργείται μακροσκοπική νεκροψία. Το φαινοτυπικό φύλο (βάσει της γονα-δικής μορφολογίας) σημειώνεται ως θηλυκό, αρσενικό ή απροσδιόριστο.

Δειγματοληψία νεαρών ατόμων

Συνοπτική περιγραφή της δειγματοληψίας νεαρών ατόμων

51. Τα ζώα που απομένουν συνεχίζουν να εκτίθενται μέχρι να παρέλθουν 10 εβδομάδες μετά τον διάμεσο χρόνο μέχρι το στάδιο 62 κατά NF στον μάρτυρα νερού αραίωσης (και/ή στον μάρτυρα με διαλύτη, εάν υπάρχει). Κατά τη λήξη της περιόδου έκθεσης, τα ζώα που απομένουν (10 βάτραχοι ανά πανομοιότυπο δείγμα κατά μέγιστο) θανατώνονται με ευθανασία και οι διάφορες παράμετροι μετρώνται ή αξιολογούνται και καταγράφονται: 1) μορφομετρικά στοιχεία (βάρος και μήκος), 2) αναλογίες φαινοτυπικών/γονοτυπικών φύλων, 3) βάρος ήπατος (ηπατοσωματικός δείκτης), 4) ιστοπαθολογία (γονάδες, αναπαραγωγικοί πόροι, ήπαρ και νεφρός) και, προαιρετικά, 5) VTG πλάσματος.

Θανάτωση βατράχων με ευθανασία

52. Τα δείγματα νεαρών ατόμων, οι βάτραχοι μετά τη μεταμόρφωση, θανατώνονται με ευθανασία με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση αναισθητικού, π.χ. MS-22210 % σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών. Η εξέταση των βατράχων μπορεί να γίνει αφού αυτοί σταματήσουν να αντιδρούν (συνήθως γύρω στα 2 λεπτά μετά την έγχυση, εάν χρησιμοποιηθεί MS-22210 % σε δοσολογία 0,01 ml ανά γραμμάριο βατράχου). Τα νεαρά άτομα βατράχων μπορούν επίσης να αναισθητοποιούνται με εμβύθιση σε αναισθητικό (MS-222) υψηλότερης συγκέντρωσης, αλλά η εμπειρία έχει δείξει ότι το χρονικό διάστημα που απαιτείται για την αναισθητοποίησή τους είναι μεγαλύτερο όταν χρησιμοποιείται αυτή η μέθοδος και η αναισθησία μπορεί να μη διαρκεί όσο χρειάζεται για τη δειγματοληψία. Με την έγχυση εξασφαλίζεται αποτελεσματική και ταχεία ευθανασία πριν από τη δειγματοληψία. Η δειγματοληψία δεν θα πρέπει να ξεκινά μέχρι να επιβεβαιωθεί η απουσία αντίδρασης των βατράχων, ούτως ώστε να διασφαλίζεται ότι όλα τα ζώα είναι νεκρά. Εάν οι βάτραχοι εμφανίζουν συμπτώματα έντονης οδύνης (μπορεί να προβλεφθεί με ασφάλεια η πρόκληση ιδιαίτερα έντονης οδύνης και θανάτου) και θεωρούνται ετοιμοθάνατοι, πρέπει να αναισθητοποιούνται και να θανατώνονται με ευθανασία, και να συγκαταλέγονται στην παράμετρο της θνησιμότητας στο πλαίσιο της ανάλυσης δεδομένων. Όταν ένας βάτραχος θανατώνεται με ευθανασία λόγω νοσηρότητας, αυτό θα πρέπει να καταγράφεται και να περιλαμβάνεται στην έκθεση δοκιμής. Ανάλογα με τη χρονική στιγμή της μελέτης κατά την οποία θανατώνεται ο βάτραχος, μπορεί να διατηρείται με σκοπό τη διεξαγωγή ιστοπαθολογικής ανάλυσης (μονιμοποίηση του βατράχου για πιθανή ιστοπαθολογική ανάλυση).

Μορφομετρικά στοιχεία (βάρος και μήκος)

53. Οι μετρήσεις του νωπού βάρους και του SVL (σχήμα 2β) είναι όμοιες με εκείνες που περιγράφονται για τη δειγματοληψία υποδειγμάτων προνυμφών.

▼**M8**

VTG πλάσματος (προαιρετικά)

54. Η VTG είναι ευρέως αποδεκτή ως βιοδείκτης που προκύπτει από την έκθεση σε οιστρογονικές χημικές ουσίες. Για τη LAGDA, μπορεί να μετράται προαιρετικά η VTG πλάσματος σε δείγματα νεαρών ατόμων (η μέτρηση μπορεί να είναι ιδιαίτερα χρήσιμη εάν υπάρχουν υπόνοιες ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι οιστρογόνο).

55. Τα οπίσθια άκρα του θανατωμένου νεαρού ατόμου αποκόπτονται και συλλέγεται αίμα με ηπαρινισμένο τριχοειδές σωληνάριο (αν και μπορεί να είναι κατάλληλες εναλλακτικές μέθοδοι συλλογής αίματος, όπως η καρδιακή παρακέντηση). Το αίμα αποβάλλεται σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης (π.χ. όγκου 1,5 ml) και φυγοκεντρείται για να ληφθεί το πλάσμα. Τα δείγματα αίματος θα πρέπει να φυλάσσονται στους -70 °C ή σε χαμηλότερη θερμοκρασία μέχρι τον προσδιορισμό της VTG. Η συγκέντρωση της VTG στο πλάσμα μπορεί να μετρηθεί με ενζυμική ανοσοπροσροφητική μέθοδο προσδιορισμού (ELISA) (προσάρτημα 6) ή με εναλλακτική μέθοδο, όπως φασματομετρία μάζας (31). Προτιμώνται αντισώματα ειδικά για το συγκεκριμένο ζωικό είδος, λόγω της μεγαλύτερης ευαισθησίας τους.

Προσδιορισμός γενετικού φύλου

56. Το γενετικό φύλο κάθε νεαρού ατόμου βατράχων αξιολογείται βάσει των δεικτών που ανέπτυξαν οι Yoshimoto *et al.* (11). Για τον προσδιορισμό του γενετικού φύλου, τμήμα (ή ολόκληρο) ενός οπίσθιου άκρου (ή οποιουδήποτε άλλου ιστού) που αφαιρέθηκε κατά την ανατομή συλλέγεται και φυλάσσεται σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης (δείγματα ιστών βατράχων μπορούν να ληφθούν από οποιονδήποτε ιστό). Ο ιστός μπορεί να φυλάσσεται στους -20 °C ή σε χαμηλότερη θερμοκρασία μέχρι την απομόνωση του δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (DNA). Η απομόνωση του DNA από τους ιστούς μπορεί να πραγματοποιείται με κιτ του εμπορίου, ενώ η ανάλυση για την παρουσία ή την απουσία του δείκτη πραγματοποιείται με μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) (προσάρτημα 5). Γενικά, η συμφωνία μεταξύ του ιστολογικού φύλου και του γονοτύπου στα ζώα μάρτυρες κατά τη χρονική στιγμή της δειγματοληψίας νεαρών ατόμων σε ομάδες μάρτυρες υπερβαίνει το 95 %.

Συλλογή ιστών και μονιμοποίηση για ιστοπαθολογική εξέταση

57. Κατά την τελευταία δειγματοληψία συλλέγονται οι γονάδες, οι γεννητικοί πόροι, οι νεφροί και τα ήπατα για ιστοπαθολογική ανάλυση. Η κοιλιακή κοιλότητα ανοίγεται και πραγματοποιείται εκτομή και ζύγιση του ήπατος. Στη συνέχεια, τα όργανα του πεπτικού συστήματος (π.χ. στόμαχος, έντερο) αφαιρούνται προσεκτικά από την κάτω κοιλιακή χώρα προκειμένου να αποκαλυφθούν οι γονάδες, οι νεφροί και οι γεννητικοί πόροι. Τυχόν μακροσκοπικές μορφολογικές ανωμαλίες στις γονάδες θα πρέπει να σημειώνονται. Τέλος, τα οπίσθια άκρα θα πρέπει να αφαιρούνται, εάν δεν έχουν ήδη αφαιρεθεί για συλλογή αίματος. Τα συλλεχθέντα ήπατα και το νεκρό σώμα με τις γονάδες αφημένες *in situ* θα πρέπει να τοποθετούνται αμέσως σε μέσο μονιμοποίησης Davidson. Ο όγκος του μέσου μονιμοποίησης στον περιέκτη θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 10 φορές μεγαλύτερος του κατά προσέγγιση όγκου των ιστών. Όλοι οι ιστοί παραμένουν σε μέσο μονιμοποίησης Davidson επί τουλάχιστον 48 ώρες, αλλά όχι περισσότερο από 96 ώρες, οπότε και εκπλένονται με απιονισμένο νερό και φυλάσσονται σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης 10 % (1) (29).

Ιστοπαθολογία

58. Πραγματοποιείται αξιολόγηση της ιστολογικής εικόνας κάθε νεαρού ατόμου για την ανίχνευση τυχόν παθολογικών καταστάσεων στον ιστό των γονάδων, των γεννητικών πόρων, των νεφρών και του ήπατος, δηλ. διάγνωση και αξιολόγηση σοβαρότητας (32). Από την αξιολόγηση προσδιορίζεται επίσης ο φαινότυπος των γονάδων (π.χ. ωοθήκες, όρχεις, ακαθόριστο) και οι παρατηρήσεις αυτές, μαζί με τις ατομικές μετρήσεις γενετικού φύλου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό των αναλογιών των φαινοτυπικών/γονοτυπικών φύλων.

▼M8

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Στατιστική ανάλυση

59. Από τη LAGDA προκύπτουν τρεις τύποι δεδομένων προς στατιστική ανάλυση: 1) ποσοτικά συνεχή δεδομένα (βάρος, SVL, LSI, VTG), 2) δεδομένα χρόνου μέχρι το συμβάν, για τους ρυθμούς ανάπτυξης (δηλ. ημέρες μέχρι το στάδιο 62 κατά NF από την έναρξη της δοκιμασίας) και 3) διατάξιμα δεδομένα υπό μορφή βαθμολογιών σοβαρότητας ή αναπτυξιακών σταδίων από ιστοπαθολογικές αξιολογήσεις.

60. Συνιστάται ο σχεδιασμός της δοκιμής και η επιλογή στατιστικού ελέγχου να παρέχουν επαρκή στατιστική ισχύ για την ανίχνευση των μεταβολών με βιολογική σημασία στις παραμέτρους σε σχέση με τις οποίες πρέπει να αναφέρεται NOEC ή ECx. Για τις στατιστικές αναλύσεις των δεδομένων (γενικά, βάσει του μέσου όρου πανομοιότυπων δειγμάτων) θα πρέπει, κατά προτίμηση, να ακολουθούνται οι διαδικασίες που περιγράφονται στο έγγραφο «Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application» (Σύγχρονες προσεγγίσεις στη στατιστική ανάλυση των δεδομένων οικοτοξικότητας: Οδηγός εφαρμογής) (33). Στο προσάρτημα 7 της παρούσας μεθόδου δοκιμών περιλαμβάνεται το συνιστώμενο διάγραμμα αποφάσεων στατιστικής ανάλυσης και καθοδήγηση για την επεξεργασία των δεδομένων και την επιλογή του καταλληλότερου στατιστικού ελέγχου ή μοντέλου για χρήση στο πλαίσιο της LAGDA.

61. Τα δεδομένα από τη δειγματοληψία νεαρών ατόμων (π.χ. σωματική αύξηση, LSI) θα πρέπει να αναλύονται για κάθε γονοτυπικό φύλο χωριστά, δεδομένου ότι το γονοτυπικό φύλο προσδιορίζεται για όλα τα άτομα.

Θέματα ανάλυσης δεδομένων

Χρήση υπονομευμένων πανομοιότυπων δειγμάτων και αγωγών

62. Τα πανομοιότυπα δείγματα και οι αγωγές ενδέχεται να υπονομευτούν εξαιτίας υπέρμετρης θνησιμότητας λόγω έκδηλης τοξικότητας, ασθένειας ή τεχνικού σφάλματος. Σε περίπτωση υπονόμευσης μιας αγωγής λόγω ασθένειας ή τεχνικού σφάλματος, θα πρέπει να υπάρχουν τρεις μη υπονομευμένες αγωγές με τρία μη υπονομευμένα πανομοιότυπα δείγματα διαθέσιμα για ανάλυση. Σε περίπτωση εμφάνισης έκδηλης τοξικότητας στις αγωγές υψηλής δόσης, καλό είναι να υπάρχουν τουλάχιστον τρία επίπεδα αγωγής με τρία μη υπονομευμένα πανομοιότυπα δείγματα διαθέσιμα για ανάλυση [όπως ορίζεται στην προσέγγιση μέγιστης ανεκτής συγκέντρωσης για τις κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών του ΟΟΣΑ (34)]. Πέραν της τοξικότητας, στα σημεία έκδηλης τοξικότητας μπορεί να περιλαμβάνονται συμπεριφορικές επιδράσεις (π.χ. επίπλευση στην επιφάνεια, παραμονή στον πυθμένα της δεξαμενής, ανεστραμμένη ή ακανόνιστη κολύμβηση, έλλειψη δραστηριότητας ανάδυσης), μορφολογικές αλλοιώσεις (π.χ. αιμορραγικές αλλοιώσεις, κοιλιακό οίδημα) ή αναστολή των φυσιολογικών αντιδράσεων σίτισης σε ποιοτική σύγκριση με τα ζώα μάρτυρες.

Μάρτυρας με διαλύτη

63. Στο τέλος της δοκιμής θα πρέπει να αξιολογούνται οι πιθανές επιδράσεις του διαλύτη (εφόσον χρησιμοποιείται). Αυτό πραγματοποιείται μέσω στατιστικής σύγκρισης της ομάδας-μάρτυρα με διαλύτη και της ομάδας-μάρτυρα νερού αραίωσης. Οι πλέον κατάλληλες παράμετροι προς εξέταση στην ανάλυση αυτή είναι οι παράγοντες της σωματικής αύξησης (βάρος και μήκος), καθώς αυτές επηρεάζονται από τυχόν γενικευμένη τοξικότητα. Σε περίπτωση εντοπισμού στατιστικά σημαντικών διαφορών στις παραμέτρους αυτές μεταξύ των ομάδων μάρτυρα νερού αραίωσης και μάρτυρα με διαλύτη, θα πρέπει να χρησιμοποιείται η βέλτιστη κρίση ειδικών προκειμένου να προσδιοριστεί το κατά πόσον υπονομεύεται η εγκυρότητα της δοκιμής. Εάν υπάρχουν διαφορές μεταξύ των δύο μαρτύρων, οι αγωγές με την υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να συγκρίνονται με τον μάρτυρα με διαλύτη, εκτός εάν είναι γνωστό ότι προτιμάται η σύγκριση με τον μάρτυρα νερού αραίωσης. Εάν δεν υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων μάρτυρα, συνιστάται οι αγωγές με την υπό δοκιμή χημική ουσία να συγκρίνονται με τις συγχωνευμένες ομάδες (ομάδες μάρτυρα με διαλύτη και μάρτυρα νερού αραίωσης), εκτός εάν είναι γνωστό ότι προτιμάται η σύγκριση είτε μόνο με την ομάδα μάρτυρα νερού αραίωσης είτε μόνο με την ομάδα μάρτυρα με διαλύτη.

▼M8

Έκθεση δοκιμής

64. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

— φυσική μορφή και, εφόσον έχουν σημασία, φυσικοχημικές ιδιότητες,

— Μονοσυστατική ουσία:

φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

στοιχεία ταυτοποίησης της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμίξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ. (περιλαμβανομένης της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα, κατά περίπτωση).

— Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγματα:

περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Είδος δοκιμής:

— επιστημονική ονομασία, φυλή εάν είναι γνωστή, προέλευση και μέθοδος συλλογής των γονιμοποιημένων αυγών και μετέπειτα χειρισμός,

— συχνότητα εμφάνισης σκολίωσης σε ιστορικούς μάρτυρες για την αποθεματική καλλιέργεια που χρησιμοποιείται.

Συνθήκες δοκιμής:

— φωτοπερίοδος/-οι,

— σχεδιασμός δοκιμής (π.χ. μέγεθος και υλικό κατασκευής θαλάμου, όγκος νερού, αριθμός θαλάμων δοκιμής και πανομοιότυπων δειγμάτων, αριθμός οργανισμών δοκιμής ανά πανομοιότυπο δείγμα),

— μέθοδος παρασκευής των αποθεματικών διαλυμάτων και συχνότητα ανανέωσης (θα πρέπει να αναφέρεται το μέσο διαλυτοποίησης και η συγκέντρωσή του, εφόσον χρησιμοποιείται),

— μέθοδος χορήγησης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (π.χ. αντλίες, συστήματα αραίωσης),

— η απόδοση ανάκτησης της μεθόδου και οι ονομαστικές συγκεντρώσεις της δοκιμής, το όριο ποσοτικού προσδιορισμού, ο μέσος όρος των μετρούμενων τιμών και οι τυπικές αποκλίσεις τους στα δοχεία δοκιμής και η μέθοδος με την οποία επιτεύχθηκαν, καθώς και στοιχεία που αποδεικνύουν ότι οι μετρήσεις αναφέρονται στις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε αληθές διάλυμα,

— χαρακτηριστικά του νερού αραίωσης: pH, σκληρότητα, θερμοκρασία, συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου, επίπεδα υπολειμματικού χλωρίου (εφόσον μετρούνται), ολικό ιώδιο, ολικός οργανικός άνθρακας (εφόσον μετριέται), αιωρούμενα στερεά (εφόσον μετρούνται), αλατότητα του δοκιμαστικού μέσου (εφόσον μετριέται) και τυχόν άλλες μετρήσεις,

— οι ονομαστικές συγκεντρώσεις δοκιμής, οι μέσοι όροι των μετρούμενων τιμών και οι τυπικές αποκλίσεις τους,

— ποιότητα του νερού μέσα στα δοχεία δοκιμής, pH, θερμοκρασία (καθημερινά) και συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου,

▼M8

— λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη σίτιση (π.χ. είδος τροφής, πηγή, ποσότητα και συχνότητα χορήγησης).

Αποτελέσματα:

— ενδείξεις που αποδεικνύουν ότι οι μάρτυρες πληρούν τα κριτήρια εγκυρότητας,

— δεδομένα για τον μάρτυρα (συν τον μάρτυρα με διαλύτη, όταν χρησιμοποιείται) και τις ομάδες αγωγής, ως εξής: παρατηρούμενη θνησιμότητα και ανωμαλίες, χρόνος μέχρι το στάδιο 62 κατά NF, ιστολογική αξιολόγηση του θυρεοειδούς (μόνο στο δείγμα προνυμφών), σωματική αύξηση (βάρος και μήκος), LSI (μόνο στο δείγμα νεαρών ατόμων), αναλογίες γενετικών/γονοτυπικών φύλων (μόνο στο δείγμα νεαρών ατόμων), αποτελέσματα ιστοπαθολογικής αξιολόγησης για τις γονάδες, τους γεννητικούς πόρους, τον νεφρό και το ήπαρ (μόνο στο δείγμα νεαρών ατόμων) και VTG πλάσματος (μόνο στο δείγμα νεαρών ατόμων, εάν διεξάγεται),

— προσέγγιση για τη στατιστική ανάλυση και την επεξεργασία των δεδομένων (στατιστικός έλεγχος ή στατιστικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε),

— συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC) για κάθε απόκριση που αξιολογήθηκε,

— κατώτατη συγκέντρωση στην οποία παρατηρούνται επιπτώσεις (LOEC) για κάθε απόκριση που αξιολογήθηκε (σε α = 0,05), ECx για κάθε απόκριση που αξιολογήθηκε, κατά περίπτωση, και διαστήματα εμπιστοσύνης (π.χ. 95 %), καθώς και γραφική παράσταση του προσαρμοσμένου μοντέλου που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της, κλίση της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης, μαθηματικός τύπος του μοντέλου παλινδρόμησης, εκτιμώμενες παράμετροι του μοντέλου και τα τυπικά σφάλματά τους,

— οποιαδήποτε απόκλιση από τη μέθοδο δοκιμών και οι αποκλίσεις από τα κριτήρια αποδοχής, και εκτιμήσεις των δυνητικών επιπτώσεων στην έκβαση της δοκιμής.

65. Για τα αποτελέσματα των μετρήσεων παραμέτρων, θα πρέπει να παρουσιάζονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις τους (ει δυνατόν, τόσο ανά πανομοιότυπο δείγμα όσο και ανά συγκέντρωση).

66. Θα πρέπει να υπολογίζεται ο διάμεσος χρόνος μέχρι το στάδιο 62 κατά NF στους μάρτυρες και να παρουσιάζεται ως ο μέσος όρος των διάμεσων τιμών των πανομοιότυπων δειγμάτων με την τυπική απόκλισή τους. Παρομοίως, για τις αγωγές, θα πρέπει να υπολογίζεται μια διάμεση τιμή αγωγής και να παρουσιάζεται ως ο μέσος όρος των διάμεσων τιμών των πανομοιότυπων δειγμάτων με την τυπική απόκλισή τους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report.

(2) OECD (2012a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 150) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) Nieuwkoop PD and Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, USA.

(4) Kloas W and Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. Journal of Chromatography A 1130: 16-27.

▼**M8**

(5) Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. Journal of the Royal Society of Medicine 93: 140-144.

(6) Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 237: 1565.

(7) Villalpando I and Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. International Journal of Developmental Biology 34: 281-285.

(8) Miyata S, Koike S and Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335-340.

(9) Mikamo K and Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. Genetics 48: 1411.

(10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K and Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. Aquatic Toxicology 91: 143-150.

(11) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T and Ito M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469-2474.

(12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S and Degitz SJ. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

(13) Tobias ML, Tomasson J and Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. Journal of Neurobiology 37: 441-448.

(14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR and Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. Aquatic Toxicology 84: 321-327.

(15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A and Degitz SJ. (2011). Effects of 4-*Tert*-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. Aquatic Toxicology 103: 159-169.

(16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Philadelphia, PA, USA.

(17) Κεφάλαιο Γ.4 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμή άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας.

(18) Κεφάλαιο Γ.29 του παρόντος παραρτήματος: Άμεση βιοαποικοδομησιμότητα - CO_2 σε σφραγισμένα δοχεία (δοκιμή υπερκείμενης φάσης).

(19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL and Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. Chemosphere 39: 539-551.

▼**M8**

(20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. Chemosphere, 86(6): 593-9.

(21) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 23), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69–92.

(23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Philadelphia, PA, USA.

(24) Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, U.K., 84 pp.

(25) Κεφάλαιο Γ.38 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμασία μεταμόρφωσης αμφίβιων.

(26) Κεφάλαιο Γ.48 του παρόντος παραρτήματος: Βραχυπρόθεσμη δοκιμή αναπαραγωγής σε ψάρια.

(27) Κεφάλαιο Γ.41 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμή σεξουαλικής ανάπτυξης ψαριών.

(28) Κεφάλαιο Γ.49 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμή οξείας τοξικότητας σε έμβρυα ψαριών (FET).

(29) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology.Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No 82) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC and Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415-424.

(31) Luna LG and Coady K.(2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Techniques 5(3): 194.

(32) OECD (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 228), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(33) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 54), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(34) Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. Aquatic Toxicology 91(3): 197-202.

▼**M8**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Παράμετρος κορυφαίου επιπέδου: που έχει επίδραση σε επίπεδο πληθυσμού

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα

Δοκιμή ELISA: ενζυμικός ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός

ECx: (συγκέντρωση επίδρασης για επίδραση x %) η συγκέντρωση που προκαλεί x % επίδρασης σε υπό δοκιμή οργανισμούς εντός συγκεκριμένης περιόδου έκθεσης σε σύγκριση με μάρτυρα. Για παράδειγμα, η EC50 είναι η συγκέντρωση που εκτιμάται ότι προκαλεί επίδραση σε παράμετρο δοκιμής σε ποσοστό 50 % του εκτιθέμενου πληθυσμού επί καθορισμένη περίοδο έκθεσης.

dpf: (days post fertilization) ημέρες μετά τη γονιμοποίηση

Έλεγχος συνεχούς ροής: δοκιμή με συνεχή ροή των διαλυμάτων δοκιμής μέσω του συστήματος δοκιμής κατά τη διάρκεια της έκθεσης

Άξονας HPG: άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων

IUPAC: Διεθνής Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας

Κατώτατη συγκέντρωση στην οποία παρατηρούνται επιπτώσεις (LOEC): είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην οποία παρατηρείται ότι η εν λόγω ουσία έχει στατιστικά σημαντική επίδραση (με $p < 0,05$), συγκριτικά με τον μάρτυρα. Ωστόσο, όλες οι συγκεντρώσεις δοκιμής που υπερβαίνουν τη LOEC αναμένεται να έχουν βλαβερή επίδραση ίση ή μεγαλύτερη από εκείνη που παρατηρείται στη LOEC. Σε περίπτωση που δεν πληρούνται οι δύο αυτοί όροι, θα πρέπει να εξηγείται πλήρως ο τρόπος επιλογής της LOEC (και, κατ' επέκταση, της NOEC). Το προσάρτημα 7 παρέχει οδηγίες.

Μέση θανατηφόρος συγκέντρωση (LC50): η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που εκτιμάται ότι είναι θανατηφόρος για το 50 % των υπό δοκιμή οργανισμών κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

Συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC): είναι η αμέσως χαμηλότερη της LOEC συγκέντρωση της δοκιμής, η οποία, συγκριτικά με τον μάρτυρα, δεν έχει στατιστικά σημαντική επίδραση ($p < 0,05$) εντός συγκεκριμένης περιόδου έκθεσης.

SMILES: (Simplified Molecular Input Line Entry Specification) προδιαγραφή απλοποιημένης μοριακής γραμμικής γραφής

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

UVCB: ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, πολύπλοκα προϊόντα αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά.

VTG: η λεκιθογενίνη είναι φωσφολιπογλυκοπρωτεΐνη που αποτελεί πρόδρομη ένωση των πρωτεϊνών της λεκίθου του αυγού και συναντάται κανονικά σε σεξουαλικά ενεργά θηλυκά άτομα όλων των ωοτόκων ειδών.

▼**M8**

Προσάρτημα 2

ΟΡΙΣΜΕΝΑ ΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΟΣ ΑΠΟΔΕΚΤΟΥ ΝΕΡΟΥ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

Ουσία	Οριακή συγκέντρωση
Σωματίδια	5 mg/l
Ολικός οργανικός άνθρακας	2 mg/l
Μη ιοντισμένη αμμωνία	1 μg/l
Υπολείμματα χλωρίου	10 μg/l
Ολικά οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα	50 ng/l
Ολικά οργανοχλωριούχα φυτοφάρμακα συν πολυχλωριωμένα διφαινύλια	50 ng/l
Ολικό οργανικό χλώριο	25 ng/l
Αργίλιο	1 μg/l
Αρσενικό	1 μg/l
Χρώμιο	1 μg/l
Κοβάλτιο	1 μg/l
Χαλκός	1 μg/l
Σίδηρος	1 μg/l
Μόλυβδος	1 μg/l
Νικέλιο	1 μg/l
Ψευδάργυρος	1 μg/l
Κάδμιο	100 ng/l
Υδράργυρος	100 ng/l
Άργυρος	100 ng/l

▼**M8**

Προσάρτημα 3

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΟΚΙΜΗΣ ΓΙΑ ΤΗ LAGDA

1. Είδος δοκιμής	*Xenopus laevis*
2. Τύπος δοκιμής	Συνεχούς ροής
3. Θερμοκρασία νερού	Η ονομαστική θερμοκρασία είναι 21 °C. Η μέση θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της δοκιμής είναι 21 ± 1°C (οι διαφορές μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων και μεταξύ των αγωγών δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν τον 1,0°C)
4. Ποιότητα φωτισμού	Λαμπτήρες φθορισμού (ευρέος φάσματος) 600-2000 lux (lumen/m^2) στην επιφάνεια του νερού
5. Φωτοπερίοδος	12 ώρες φως/12 ώρες σκοτάδι
6. Όγκος υπό δοκιμή χημικής ουσίας και δοχείο δοκιμής (δεξαμενή)	4-10 l (βάθος νερού τουλάχιστον 10–15 cm) Δεξαμενή από γυαλί ή ανοξείδωτο χάλυβα
7. Ανανεώσεις του όγκου των διαλυμάτων δοκιμής	Σταθερές, βάσει της διατήρησης των βιολογικών συνθηκών και της έκθεσης στη χημική ουσία (π.χ. 5 ανανεώσεις του όγκου δεξαμενής ημερησίως)
8. Ηλικία των οργανισμών δοκιμής κατά την έναρξη	Στάδιο 8-10 κατά Nieuwkoop και Faber (NF)
9. Αριθμός οργανισμών ανά πανομοιότυπο δείγμα	20 ζώα (έμβρυα)/δεξαμενή (πανομοιότυπο δείγμα) κατά την έναρξη της έκθεσης και 10 ζώα (νεαρά άτομα)/δεξαμενή (πανομοιότυπο δείγμα) μετά το στάδιο 66 κατά NF μέχρι τη λήξη της έκθεσης
10. Αριθμός αγωγών	Τουλάχιστον 4 αγωγές με την υπό δοκιμή χημική ουσία, συν κατάλληλοι μάρτυρες
11. Αριθμός πανομοιότυπων δειγμάτων ανά αγωγή	4 πανομοιότυπα δείγματα ανά αγωγή για την υπό δοκιμή χημική ουσία και 8 πανομοιότυπα δείγματα για τον ή τους μάρτυρες
12. Αριθμός οργανισμών ανά συγκέντρωση δοκιμής	Τουλάχιστον 80 ζώα ανά αγωγή για την υπό δοκιμή χημική ουσία και τουλάχιστον 160 ζώα για τον ή τους μάρτυρες
13. Νερό αραίωσης	Οποιοδήποτε νερό επιτρέπει τη φυσιολογική αύξηση και ανάπτυξη του *X. laevis* (π.χ. νερό πηγής ή νερό βρύσης διηθημένο από φίλτρο ενεργού άνθρακα)
14. Αερισμός	Δεν απαιτείται, αλλά ο αερισμός των δεξαμενών μπορεί να είναι απαραίτητος σε περίπτωση που τα επίπεδα του διαλυμένου οξυγόνου μειωθούν κάτω από τα συνιστώμενα όρια και μεγιστοποιηθούν οι αυξήσεις της ροής του διαλύματος δοκιμής.
15. Διαλυμένο οξυγόνο του διαλύματος δοκιμής	Διαλυμένο οξυγόνο: ≥ 40 % της τιμής κορεσμού αέρα ή ≥ 3,5 mg/l

▼**M8**

16. pH του διαλύματος δοκιμής	6,5-8,5 (οι διαφορές μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων και μεταξύ των αγωγών δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν το 0,5)
17. Σκληρότητα και αλκαλικότητα του διαλύματος δοκιμής	10-250 mg $CaCO_3$/l
18. Πρόγραμμα σίτισης	(βλέπε προσάρτημα 4)
19. Περίοδος έκθεσης	Από το στάδιο 8-10 κατά NF έως δέκα εβδομάδες μετά τον διάμεσο χρόνο μέχρι το στάδιο 62 κατά NF σε νερό και/ή ομάδα μάρτυρα με διαλύτη (17 εβδομάδες κατά μέγιστο)
20. Βιολογικές παράμετροι	Θνησιμότητα (και ανωμαλίες στην εμφάνιση), χρόνος μέχρι το στάδιο 62 κατά NF (δείγμα προνυμφών), ιστολογική αξιολόγηση του θυρεοειδούς (μόνο στο δείγμα προνυμφών), σωματική αύξηση (βάρος και μήκος), ηπατοσωματικός δείκτης (δείγμα νεαρών ατόμων), αναλογίες γενετικών/γονοτυπικών φύλων (δείγμα νεαρών ατόμων), ιστοπαθολογική αξιολόγηση γονάδων, γεννητικών πόρων, νεφρών και ήπατος (δείγμα νεαρών ατόμων) και VTG πλάσματος (δείγμα νεαρών ατόμων, προαιρετικά)
21. Κριτήρια εγκυρότητας της δοκιμής	Το διαλυμένο οξυγόνο θα πρέπει να είναι > 40 % της τιμής κορεσμού αέρα· η μέση θερμοκρασία του νερού θα πρέπει να είναι 21 ± 1 °C και οι διαφορές μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων / μεταξύ των αγωγών πρέπει να είναι 1,0°C· το pH του διαλύματος δοκιμής θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 6,5 και 8,5· η θνησιμότητα στον μάρτυρα θα πρέπει να είναι ≤ 20 % σε κάθε πανομοιότυπο δείγμα, και ο μέσος χρόνος μέχρι το στάδιο 62 κατά NF στον μάρτυρα θα πρέπει να είναι ≤ 45 ημέρες· το μέσο βάρος των οργανισμών δοκιμής στο στάδιο 62 κατά NF και στη λήξη της δοκιμασίας στους μάρτυρες και στους μάρτυρες με διαλύτη (εφόσον χρησιμοποιούνται) θα πρέπει να φτάνει τα 1,0 ± 0,2 και 11,5 ± 3 g, αντίστοιχα· θα πρέπει να υπάρχουν στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο διάλυμα διατηρήθηκαν ικανοποιητικά στα όρια του ± 20 % του μέσου όρου των τιμών που μετρήθηκαν.

▼**M8**

Προσάρτημα 4

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΙΤΙΣΗΣ

Θα πρέπει να επισημανθεί ότι παρότι το παρόν πρόγραμμα σίτισης είναι το συνιστώμενο, επιτρέπεται η εφαρμογή εναλλακτικών προγραμμάτων υπό την προϋπόθεση ότι οι οργανισμοί δοκιμής αυξάνονται και αναπτύσσονται με τον κατάλληλο ρυθμό.

Σίτιση των προνυμφών

Παρασκεύασμα για σιτηρέσιο προνυμφών

Α. 1:1 (κ.ό.) αρχική τροφή για πέστροφες: φύκη/TetraFin® (ή ισοδύναμο),

1. Αρχική τροφή για πέστροφες: αναμίξτε 50 g αρχικής τροφής για πέστροφες (λεπτοί κόκκοι ή σκόνη) και 300 ml κατάλληλα διηθημένου νερού σε αναμικτήρα σε υψηλή ταχύτητα επί 20 δευτερόλεπτα

2. Μείγμα φυκών/TetraFin® (ή ισοδύναμο): αναμίξτε 12 g δισκίων φυκών σπιρουλίνας και 500 ml διηθημένου νερού σε αναμικτήρα σε υψηλή ταχύτητα επί 40 δευτερόλεπτα, αναμίξτε 12 g Tetrafin® (ή ισοδύναμο) με 500 ml διηθημένου νερού και, στη συνέχεια, συνδυάστε τα για να παρασκευάσετε 1 l φυκών σπιρουλίνας 12 g/l και Tetrafin® (ή ισοδύναμο) 12 g/l

3. Συνδυάστε ίσους όγκους της αναμεμειγμένης αρχικής τροφής πέστροφας και του μείγματος φυκών/TetraFin® (ή ισοδύναμο)

Β. Γαρίδες της άλμης:

15 ml αυγών γαρίδας της άλμης εκκολάπτονται σε 1 l αλατισμένου νερού (παρασκευάζεται με προσθήκη 20 ml NaCl σε 1 l απιονισμένου νερού). Μετά από αερισμό επί 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό σταθερό φωτισμό, οι γαρίδες συλλέγονται. Οι γαρίδες αφήνονται να κατακαθίσουν επί 30 λεπτά με διακοπή του αερισμού. Οι κύστεις που επιπλέουν στην επιφάνεια του δοχείου αποχύνονται και απορρίπτονται, και οι γαρίδες διηθούνται από κατάλληλα φίλτρα και φέρονται στα 30 ml με διηθημένο νερό.

Πρωτόκολλο σίτισης

Στον πίνακα 1 παρέχονται στοιχεία αναφοράς όσον αφορά τον τύπο και την ποσότητα της τροφής που χρησιμοποιείται στα στάδια έκθεσης των προνυμφών. Τα ζώα θα πρέπει να σιτίζονται τρεις φορές ημερησίως από Δευτέρα έως Παρασκευή και μία φορά ημερησίως τα Σαββατοκύριακα.

Πίνακας 1

Πρόγραμμα σίτισης για τις προνύμφες *X. laevis* σε συνθήκες συνεχούς ροής

Χρόνος (*) (μετά τη γονιμοποίηση)	Αρχική τροφή για πέστροφες: φύκη/TetraFin® (ή ισοδύναμο)		Γαρίδες της άλμης	
	Καθημερινές (τρεις φορές ημερησίως)	Σαββατοκύριακο (μία φορά ημερησίως)	Καθημερινές (δύο φορές ημερησίως)	Σαββατοκύριακο (μία φορά ημερησίως)
Ημέρες 4-14 (τις εβδομάδες 0-1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (από την ημέρα 8 έως την ημέρα 15) 1 ml (από την ημέρα 16)	0,5 ml (από την ημέρα 8 έως την ημέρα 15) 1 ml (από την ημέρα 16)
Εβδομάδα 2	0,67 ml	2,4 ml		
Εβδομάδα 3	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Εβδομάδα 4	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Εβδομάδα 5	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml

▼M8

Χρόνος (*) (μετά τη γονιμοποίηση)	Αρχική τροφή για πέστροφες: φύκη/TetraFin® (ή ισοδύναμο)		Γαρίδες της άλμης	
	Καθημερινές (τρεις φορές ημερησίως)	Σαββατοκύριακο (μία φορά ημερησίως)	Καθημερινές (δύο φορές ημερησίως)	Σαββατοκύριακο (μία φορά ημερησίως)
Εβδομάδα 6	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Εβδομάδα 7	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Εβδομάδες 8-10	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

(*) Η ημέρα 0 ορίζεται ως η ημέρα που πραγματοποιείται η έγχυση hCG.

Μετάβαση από το σιτηρέσιο προνυμφών στο σιτηρέσιο νεαρών ατόμων

Καθώς οι προνύμφες ολοκληρώνουν τη μεταμόρφωση, μεταβαίνουν σε παρασκεύασμα σιτηρεσίου νεαρών ατόμων, το οποίο επεξηγείται παρακάτω. Στη διάρκεια της μετάβασης αυτής, το σιτηρέσιο προνυμφών θα πρέπει να μειώνεται καθώς αυξάνεται η τροφή για νεαρά άτομα. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω αναλογικής μείωσης της τροφής προνυμφών με ταυτόχρονη αναλογική αύξηση της τροφής για τα νεαρά άτομα καθώς κάθε ομάδα πέντε γυρίνων περνά το στάδιο 62 κατά NF και πλησιάζει την ολοκλήρωση της μεταμόρφωσης στο στάδιο 66 κατά NF.

Σίτιση των νεαρών ατόμων

Σιτηρέσιο νεαρών ατόμων

Αφού ολοκληρωθεί η μεταμόρφωση (στάδιο 66), το πρόγραμμα σίτισης αλλάζει και πλέον χορηγείται αποκλειστικά υψηλής ποιότητας βυθιζόμενη τροφή βατράχων 3/32 ιντσών (Xenopus Express™, FL, ΗΠΑ) ή αντίστοιχη.

Παρασκεύασμα συνθλιμμένων κόκκων για τη μετάβαση από τις προνύμφες στα νεαρά άτομα

Οι κόκκοι βυθιζόμενης τροφής βατράχων αλέθονται για σύντομο χρονικό διάστημα σε συσκευή άλεσης καφέ, αναμικτήρα ή γουδί προκειμένου να μειωθεί το μέγεθος των κόκκων κατά περίπου 1/3. Η επεξεργασία για υπερβολικά μεγάλο χρονικό διάστημα έχει ως αποτέλεσμα την κονιοποίηση του παρασκευάσματος και δεν συνιστάται.

Πρωτόκολλο σίτισης

Στον **πίνακα 2** παρέχονται στοιχεία αναφοράς όσον αφορά τον τύπο και την ποσότητα της τροφής που χρησιμοποιείται στα στάδια των νεαρών ατόμων και της ενήλικης ζωής. Τα ζώα θα πρέπει να σιτίζονται μία φορά ημερησίως. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι καθώς τα ζώα μεταμορφώνονται, εξακολουθούν να λαμβάνουν μέρος του σιτηρεσίου γαρίδων της άλμης μέχρις ότου το 95 % εξ αυτών ολοκληρώσει τη μεταμόρφωση.

Τα ζώα δεν θα πρέπει να σιτίζονται την ημέρα της λήξης της δοκιμής, προκειμένου να αποφευχθεί η πρόκληση σύγχυσης στις μετρήσεις του βάρους λόγω της τροφής.

Πίνακας 2

Πρόγραμμα σίτισης για τα νεαρά άτομα *X. laevis* σε συνθήκες συνεχούς ροής. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι τα ζώα που δεν έχουν μεταμορφωθεί, περιλαμβανομένων των ζώων των οποίων η μεταμόρφωση έχει καθυστερήσει λόγω της αγωγής με την υπό δοκιμή ουσία, δεν μπορούν να καταναλώσουν μη αλεσμένους κόκκους.

Χρόνος (*) (Εβδομάδες μετά τη διάμεση ημερομηνία μεταμόρφωσης)	Αλεσμένοι κόκκοι (mg ανά νεαρό άτομο)	Ολόκληροι κόκκοι (mg ανά νεαρό άτομο)
Καθώς τα ζώα ολοκληρώνουν τη μεταμόρφωση	25	0
Εβδομάδες 0-1	25	28

▼**M8**

Χρόνος (*) (Εβδομάδες μετά τη διάμεση ημερομηνία μεταμόρφωσης)	Αλεσμένοι κόκκοι (mg ανά νεαρό άτομο)	Ολόκληροι κόκκοι (mg ανά νεαρό άτομο)
Εβδομάδες 2-3	0	110
Εβδομάδες 4-5	0	165
Εβδομάδες 6-9	0	220

(*) Η πρώτη ημέρα της εβδομάδας 0 είναι η διάμεση ημερομηνία μεταμόρφωσης στα ζώα μάρτυρες.

▼**M8**

Προσάρτημα 5

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΦΥΛΟΥ

Η μέθοδος προσδιορισμού του γενετικού φύλου για το *Xenopus laevis* βασίζεται στην εργασία των Yoshimoto *et al.*, 2008. Οι αναλυτικές διαδικασίες για τη γονοτύπηση παρατίθενται στην εργασία αυτή, αν χρειαστεί. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικές μέθοδοι (π.χ. qPCR υψηλής απόδοσης), εφόσον θεωρούνται κατάλληλες.

Εκκινητές X. laevis

Δείκτης DM-W

Πρόσθιος: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Αντίστροφος: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Θετικός μάρτυρας

Πρόσθιος: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Αντίστροφος: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

Καθαρισμός DNA

Καθαρίστε το DNA από ιστούς μυών ή δέρματος χρησιμοποιώντας π.χ. το DNeasy Blood and Tissue Kit της Qiagen (αριθ. κατ. 69 506) ή παρόμοιο προϊόν, σύμφωνα με τις οδηγίες του κιτ. Το DNA μπορεί να εκλούεται από τις στήλες με μικρότερη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ώστε να προκύπτουν δείγματα υψηλότερης συγκέντρωσης, εφόσον θεωρείται απαραίτητο για την PCR. Επισημαίνεται ότι το DNA είναι αρκετά σταθερό και, ως εκ τούτου, χρειάζεται προσοχή ώστε να αποφεύγεται η διασταυρούμενη μόλυνση που θα μπορούσε να έχει ως αποτέλεσμα εσφαλμένο χαρακτηρισμό αρσενικών ως θηλυκών ή το αντίστροφο.

PCR

Ένα παράδειγμα πρωτοκόλλου με χρήση της JumpStart™ *Taq* της Sigma περιγράφεται συνοπτικά στον **πίνακα 1**.

Πίνακας 1

Παράδειγμα πρωτοκόλλου με χρήση της JumpStart™ *Taq* της Sigma

Κύριο μείγμα	1x (μl)	[Τελικό]
NFW (*)	11	—
Ρυθμιστικό διάλυμα 10X	2,0	—
$MgCl_2$ (25mM)	2,0	2,5 mM
dNTP (10mM το καθένα)	0,4	200 μM
Πρόσθιος εκκινητής δείκτη (8 μM)	0,8	0,3 μM
Αντίστροφος εκκινητής δείκτη (8 μM)	0,8	0,3 μM
Πρόσθιος εκκινητής μάρτυρα (8 μM)	0,8	0,3 μM
Αντίστροφος εκκινητής μάρτυρα (8 μM)	0,8	0,3 μM
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 μονάδες/μl
Μήτρα DNA	1,0	~200 pg/μl

(*) Νερό ελεύθερο νουκλεασών
Σημείωση: Κατά την παρασκευή των κύριων μειγμάτων, παρασκευάζετε επιπλέον ποσότητες για την περίπτωση τυχόν απώλειας κατά το πιπετάρισμα (παράδειγμα: το 25x θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο για 24 αντιδράσεις).

▼**M8**

Αντίδραση:

Κύριο μείγμα	19,0 μl
Μήτρα	1,0 μl
Σύνολο	20,0 μl

Χαρακτηριστικά θερμικού κυκλοποιητή (Thermocycler):

Στάδιο 1.	94°C	1 λεπτό
Στάδιο 2.	94°C	30 δευτερόλεπτα
Στάδιο 3.	60°C	30 δευτερόλεπτα
Στάδιο 4.	72°C	1 λεπτό
Στάδιο 5.	Μετάβαση στο στάδιο 2.	35 κύκλοι
Στάδιο 6.	72°C	1 λεπτό
Στάδιο 7.	4°C	αναμονή

Τα προϊόντα PCR μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα σε γέλη ή να φυλαχθούν στους 4°C.

Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης (3 %) (παράδειγμα πρωτοκόλλου)

50X TAE

Tris	24,2 g
Παγόμορφο οξικό οξύ	5,71 ml
Na_2 (EDTA)·$2H_2O$	3,72 g

Προσθέστε νερό μέχρι τα 100 ml

1X TAE

H_2O	392 ml
50X TAE	8 ml

Αγαρόζη 3:1

3 μέρη αγαρόζης NuSieve™ GTG™

1 μέρος αγαρόζης Fisher χαμηλής ηλεκτροενδόσμωσης (EEO)

Μέθοδος

1. Παρασκευάστε γέλη 3 % προσθέτοντας 1,2 g μείγματος αγαρόζης σε 43 ml TAE 1X. Αναδεύστε με κυκλικές κινήσεις για να αποκολληθούν τα μεγάλα συσσωματώματα.

2. Θερμάνετε το μείγμα αγαρόζης σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί τελείως (αποφύγετε την υπερχείλιση). Αφήστε να κρυώσει ελαφρώς.

3. Προσθέστε 1,0 μL βρωμιούχου αιθιδίου (10 mg/ml). Αναδεύστε τη φιάλη. Επισημαίνεται ότι το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μεταλλαξιγόνο και, ως εκ τούτου, στο στάδιο αυτό θα πρέπει να χρησιμοποιούνται εναλλακτικές χημικές ουσίες εφόσον αυτό είναι τεχνικά εφικτό, ούτως ώστε να ελαχιστοποιούνται οι κίνδυνοι για την υγεία των εργαζομένων ([1]).

4. Χύστε τη γέλη σε καλούπι με κτένι. Αφήστε να κρυώσει εντελώς.

([1]) Σύμφωνα με το άρθρο 4 παράγραφος 1 της οδηγίας 2004/37/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 29ης Απριλίου 2004, σχετικά με την προστασία των εργαζομένων από τους κινδύνους που συνδέονται με την έκθεση σε καρκινογόνους ή μεταλλαξιογόνους παράγοντες κατά την εργασία (έκτη ειδική οδηγία κατά την έννοια του άρθρου 16 παράγραφος 1 της οδηγίας 89/391/ΕΟΚ του Συμβουλίου) (ΕΕ L 158 της 30.4.2004, σ. 50).

▼**M8**

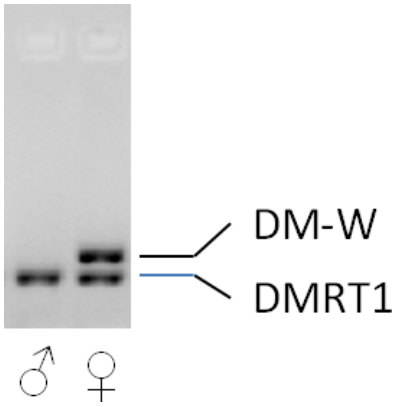
5. Προσθέστε τη γέλη στη συσκευή. Καλύψτε τη γέλη με TAE 1X.

6. Προσθέστε 1 μl χρωστικής φόρτωσης 6x σε κάθε προϊόν PCR 10 μl.

7. Μεταγγίστε τα δείγματα στις κοιλότητες με πιπέτα.

8. Ηλεκτροφορήστε στα 160 V σταθερής τάσης επί ~20 λεπτά.

Στο **σχήμα 1** φαίνεται εικόνα γέλης αγαρόζης με ενδεικτικές ζώνες για τα αρσενικά και τα θηλυκά άτομα.



Σχήμα 1: Εικόνα γέλης αγαρόζης με τις ζώνες που υποδεικνύουν αρσενικό άτομο (♂) (μία ζώνη ~203 bp: DMRT1) και θηλυκό άτομο (♀) (δύο ζώνες στα ~259 bp: DM-W και στα 203 bp: DMRT1).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469-2474.

▼**M8**

Προσάρτημα 6

ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΛΕΚΙΘΟΓΕΝΙΝΗΣ

Η μέτρηση της λεκιθογενίνης (VTG) πραγματοποιείται με χρήση μεθόδου ενζυμικού ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού (ELISA) που αναπτύχθηκε αρχικά για τη VTG του χοντροκέφαλου φοξίνου (Parks *et al.*, 1999). Δεν υπάρχουν στο εμπόριο αντισώματα για τον *X. laevis* προς το παρόν. Ωστόσο, δεδομένης της πληθώρας των πληροφοριών για τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη και της διαθεσιμότητας οικονομικά αποδοτικών εμπορικών υπηρεσιών παραγωγής αντισωμάτων, θεωρείται εύλογα ότι τα εργαστήρια θα μπορούν εύκολα να αναπτύξουν μια μέθοδο ELISA για τη μέτρηση αυτή (Olmstead *et al.*, 2009). Επίσης, οι Olmstead *et al.* (2009) παρέχουν μια περιγραφή της δοκιμασίας, όπως τροποποιήθηκε για τη VTG στον *X. tropicalis*, όπως φαίνεται παρακάτω. Η μέθοδος χρησιμοποιεί ένα αντίσωμα που παρήχθη ενάντια στη VTG του *X. tropicalis*, αλλά το οποίο είναι γνωστό ότι δεσμεύει και τη VTG του *X. laevis*. Σημειώνεται ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν και μη ανταγωνιστικές μέθοδοι ELISA, και ότι αυτές ίσως έχουν χαμηλότερα όρια ανίχνευσης απ' ό,τι η μέθοδος που περιγράφεται παρακάτω.

Υλικά και αντιδραστήρια

— Ορός προ-προσροφημένου 1ου αντισώματος (Ab)

— Αναμίξτε 1 μέρος ορού 1ου Ab αντι-VTG *X. tropicalis* με 2 μέρη πλάσματος αρσενικού μάρτυρα και αφήστε σε θερμοκρασία δωματίου επί ~ 75 λεπτά, τοποθετήστε σε πάγο επί 30 λεπτά, φυγοκεντρήστε > 20K x g επί 1 ώρα στους 4°C, αφαιρέστε το υπερκείμενο υγρό, χωρίστε σε μερίδες και φυλάξτε στους -20°C.

— 2ο αντίσωμα

— συζευγμένο αντίσωμα αιγός έναντι πρωτεϊνών κουνελιού IgG-HRP (π.χ. Bio-Rad 172-1019)

— Πρότυπο VTG

— κεκαθαρμένη VTG *X. laevis* στα 3,3 mg/ml

— TMB (3,3',5,5'-τετραμεθυλοβενζιδίνη) (π.χ. KPL 50-76-00 ή Sigma T0440)

— Κανονικός ορός αιγός (NGS)(π.χ. Chemicon® S26-100 ml)

— Τρυβλία μικροτιτλοδότησης EIA 96 κοιλοτήτων από πολυστυρόλιο (π.χ. ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher: 07-200-35)

— Κλίβανος υβριδοποίησης 37°C (ή επωαστήρας αέρα ταχείας εξισορρόπησης) για τρυβλία, υδατόλουτρο για σωληνάρια

— Άλλος συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός, χημικές ουσίες και υλικά.

Συνταγές

Ρυθμιστικό διάλυμα επικάλυψης (50 mM ρυθμιστικού διαλύματος ανθρακικών, pH 9,6):

$NaHCO_3$	1,26 g
Na_2CO_3	0,68 g
νερό	428 ml

10X PBS (0,1 M φωσφορικού άλατος, 1,5 M NaCl):

$NaH_2PO_4.H_2O$	0,83 g
$Na_2HPO_4.7\ H_2O$	20,1 g
NaCl	71 g
νερό	810 ml

▼**M8**

Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (PBST):

10X PBS	100 ml
νερό	900 ml

Ρυθμίστε το pH σε 7,3 με HCl 1 M και κατόπιν προσθέστε 0,5 ml Tween-20

Ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμασίας:

Κανονικός ορός αιγός (NGS)	3,75 ml
Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης	146,25 ml

Συλλογή δειγμάτων

Το αίμα συλλέγεται με ηπαρινισμένο σωληνάριο μικροαιματοκρίτη και τοποθετείται σε πάγο. Μετά από φυγοκέντρηση επί 3 λεπτά, το σωληνάριο βαθμολογείται, ανοίγεται και το πλάσμα μεταφέρεται σε σωληνάρια μικροφυγοκέντρησης 0,6 ml που περιέχουν 0,13 μονάδες λυοφιλιωμένης απροτινίνης. (Τα σωληνάρια αυτά προετοιμάζονται εκ των προτέρων, με προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας απροτινίνης, κατάψυξη και λυοφιλίωση σε speed-vac σε χαμηλή θερμότητα μέχρι να ξηρανθούν). Φυλάσσετε το πλάσμα στους -80°C μέχρι την ανάλυση.

Διαδικασία για ένα τρυβλίο

Επικάλυψη του τρυβλίου

Αναμίξτε 20 μl κεκαθαρμένης VTG με 22 ml ρυθμιστικού διαλύματος ανθρακικών (τελικό 3 μg/ml). Προσθέστε 200 μl σε κάθε κοιλότητα τρυβλίου 96 κοιλοτήτων. Καλύψτε το τρυβλίο με αυτοκόλλητη μεμβράνη στεγανοποίησης και αφήστε να επωαστεί στους 37°C επί 2 ώρες (ή στους 4°C όλη τη νύχτα).

Παρεμπόδιση του τρυβλίου

Παρασκευάζεται παρεμποδιστικό διάλυμα με προσθήκη 2 ml κανονικού ορού αιγός (NGS) σε 38 ml ρυθμιστικού διαλύματος ανθρακικών. Αφαιρέστε το διάλυμα επικάλυψης και τινάξτε το τρυβλίο για να στεγνώσει. Προσθέστε 350 μl του παρεμποδιστικού διαλύματος σε κάθε κοιλότητα. Καλύψτε με αυτοκόλλητη μεμβράνη στεγανοποίησης και αφήστε να επωαστεί στους 37°C επί 2 ώρες (ή στους 4°C όλη τη νύχτα).

Παρασκευή των προτύπων

5,8 μl κεκαθαρμένου προτύπου VTG αναμιγνύονται με 1,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας σε αναλώσιμο σωληνάριο δοκιμής 12 x 75 mm από βοριοπυριτικό γυαλί. Κατ' αυτόν τον τρόπο προκύπτουν 12 760 ng/ml. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται διαδοχική αραίωση με προσθήκη 750 μl της προηγούμενης αραίωσης σε 750 μl ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας ώστε να προκύψουν τελικές συγκεντρώσεις 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100, και 50 ng/ml.

Παρασκευή των δειγμάτων

Ξεκινήστε με αραίωση πλάσματος 1:300 (συνδυάζοντας π.χ. 1 μl πλάσματος με 299 μl ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας) ή 1:30 σε ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμασίας. Εάν αναμένεται μεγάλη ποσότητα VTG, μπορεί να χρειαστούν πρόσθετες ή μεγαλύτερες αραιώσεις. Προσπαθήστε να διατηρήσετε το B/B_o εντός της περιοχής των προτύπων. Για δείγματα χωρίς υπολογίσιμη VTG, π.χ. αρσενικά και θηλυκά μάρτυρες (τα οποία είναι όλα ανώριμα), χρησιμοποιήστε την αραίωση 1:30. Δείγματα που αραιώνονται σε αναλογίες μικρότερες από αυτή μπορεί να εμφανίσουν ανεπιθύμητα φαινόμενα μήτρας.

Επιπλέον, συνιστάται να χρησιμοποιείτε ένα δείγμα θετικού μάρτυρα σε κάθε τρυβλίο. Το δείγμα αυτό προέρχεται από δεξαμενή πλάσματος που περιέχει υψηλά επίπεδα VTG από επαγωγή. Η δεξαμενή αραιώνεται αρχικά σε NGS, διαιρείται σε μερίδες και φυλάσσεται στους -80°C. Για κάθε τρυβλίο, μία μερίδα αποψύχεται, αραιώνεται περαιτέρω σε ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμασίας και χρησιμοποιείται κατά τον ίδιο τρόπο με το δείγμα δοκιμής.

▼**M8**

Επώαση με το 1ο αντίσωμα

Το 1ο Ab παρασκευάζεται μέσω αραίωσης ορού προ-προσροφημένου 1ου Ab 1:2000 σε ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμασίας (π.χ. 8 μl σε 16 ml ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας). Συνδυάστε 300 μl διαλύματος 1ου Ab με 300 μl δείγματος/προτύπου σε γυάλινο σωληνάριο. Το σωληνάριο B_o ετοιμάζεται με παρόμοιο τρόπο με 300 μl ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας και 300 μl αντισώματος. Επίσης, θα πρέπει να ετοιμαστεί σωληνάριο NSB με χρήση 600 μl μόνο ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας, δηλ. χωρίς Ab. Καλύψτε τα σωληνάρια με Parafilm και περιδινήστε ήπια για να αναμιχθούν. Επωάστε σε υδατόλουτρο στους 37°C επί 1 ώρα.

Έκπλυση του τρυβλίου

Ακριβώς πριν ολοκληρωθεί η επώαση του 1ου Ab, εκπλύνετε το τρυβλίο. Αυτό γίνεται τινάζοντας το τρυβλίο για να φύγει το περιεχόμενο και ταμπονάροντας ελαφρά με απορροφητικό χαρτί για να στεγνώσει. Στη συνέχεια, γεμίστε τις κοιλότητες με 350 μl διαλύματος έκπλυσης, αδειάστε και ταμπονάρετε ελαφρά. Σε αυτό το στάδιο είναι χρήσιμη μια πολυκάναλη πιπέτα ή συσκευή έκπλυσης τρυβλίων. Το στάδιο της έκπλυσης επαναλαμβάνεται δύο φορές ώστε να γίνουν συνολικά τρεις εκπλύσεις.

Φόρτωση του τρυβλίου

Μετά την έκπλυση του τρυβλίου, αφαιρέστε τα σωληνάρια από το υδατόλουτρο και περιδινήστε ελαφρά. Προσθέστε 200 μl από κάθε σωληνάριο δείγματος, προτύπου, B_o και NSB σε διπλές κοιλότητες του τρυβλίου. Καλύψτε το τρυβλίο με αυτοκόλλητη μεμβράνη στεγανοποίησης και αφήστε να επωαστεί επί 1 ώρα στους 37°C.

Επώαση με το 2ο αντίσωμα

Μετά το τέλος της επώασης του προηγούμενου σταδίου, το τρυβλίο θα πρέπει να εκπλυθεί εκ νέου τρεις φορές, όπως περιγράφεται παραπάνω. Το αραιωμένο 2ο Ab παρασκευάζεται με ανάμιξη 2,5 μl του 2ου Ab με 50 ml ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας. Προσθέστε 200 μl αραιωμένου 2ου Ab σε κάθε κοιλότητα, καλύψτε με αυτοκόλλητο όπως παραπάνω, και επωάστε επί 1 ώρα στους 37°C.

Προσθήκη υποστρώματος

Αφού ολοκληρωθεί η επώαση με το 2ο Ab, εκπλύνετε το τρυβλίο τρεις φορές όπως περιγράφεται παραπάνω. Στη συνέχεια, προσθέστε 100 μl υποστρώματος TMB σε κάθε κοιλότητα. Αφήστε την αντίδραση να εξελιχθεί επί 10 λεπτά, κατά προτίμηση μακριά από έντονο φως. Διακόψτε την αντίδραση προσθέτοντας 100 μl φωσφορικού οξέος 1 M. Το χρώμα θα αλλάξει από μπλε σε έντονο κίτρινο. Μετρήστε την απορρόφηση στα 450 nm χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης τρυβλίων.

Υπολογισμός του B/Bo

Αφαιρέστε τη μέση τιμή NSB από όλες τις μετρήσεις. Το B/B_o για κάθε δείγμα και πρότυπο υπολογίζεται με διαίρεση της τιμής απορρόφησης (B) διά της μέσης απορρόφησης του δείγματος B_o.

Χάραξη πρότυπης καμπύλης και προσδιορισμός άγνωστων ποσοτήτων

Χαράξτε μια πρότυπη καμπύλη με τη βοήθεια λογισμικού σχεδίασης γραφικών παραστάσεων (π.χ. Slidewrite™ ή Sigma Plot®) η οποία θα υπολογίζει μέσω παρεκβολής την ποσότητα από το B/B_o δείγματος με βάση το B/B_o των προτύπων. Συνήθως η ποσότητα χαράσσεται σε λογαριθμική κλίμακα και η καμπύλη έχει σιγμοειδές σχήμα. Ωστόσο, μπορεί να φαίνεται γραμμική όταν χρησιμοποιείται μικρό εύρος προτύπων. Διορθώστε τις ποσότητες δειγμάτων ως προς τον συντελεστή αραίωσης και αναφέρατε την ποσότητα σε mg VTG/ml πλάσματος.

Προσδιορισμός των ελάχιστων ορίων ανίχνευσης (MDL)

Συχνά, ιδίως στα φυσιολογικά αρσενικά, δεν θα είναι σαφής ο τρόπος αναφοράς των αποτελεσμάτων από χαμηλές τιμές. Σε αυτές τις περιπτώσεις, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τα όρια εμπιστοσύνης 95 % προκειμένου να προσδιοριστεί εάν μια τιμή θα πρέπει να αναφερθεί ως μηδενική ή ως κάποιος άλλος αριθμός. Εάν

▼**M8**

το αποτέλεσμα του δείγματος βρίσκεται εντός της περιοχής του διαστήματος εμπιστοσύνης του μηδενικού προτύπου (B_o), το αποτέλεσμα θα πρέπει να αναφέρεται ως μηδενικό. Το ελάχιστο επίπεδο ανίχνευσης θα είναι το χαμηλότερο πρότυπο που είναι σταθερά διαφορετικό από το μηδενικό πρότυπο· με άλλα λόγια, τα δύο διαστήματα εμπιστοσύνης δεν επικαλύπτονται. Για οποιοδήποτε αποτέλεσμα δείγματος που βρίσκεται εντός των ορίων εμπιστοσύνης του ελάχιστου επιπέδου ανίχνευσης, ή πάνω από αυτό, θα αναφέρεται η υπολογισθείσα τιμή. Εάν ένα δείγμα βρίσκεται μεταξύ των διαστημάτων εμπιστοσύνης του μηδενικού προτύπου και του ελάχιστου επιπέδου ανίχνευσης, ως τιμή για το εν λόγω δείγμα θα πρέπει να δίνεται το ήμισυ του ελάχιστου επιπέδου ανίχνευσης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S, Degitz SJ. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 123: 113-125.

▼**M8**

Προσάρτημα 7

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Από τη LAGDA προκύπτουν τρεις τύποι δεδομένων προς στατιστική ανάλυση: 1) ποσοτικά συνεχή δεδομένα, 2) δεδομένα χρόνου μέχρι το συμβάν για τους ρυθμούς ανάπτυξης (χρόνος μέχρι το στάδιο 62 κατά NF) και 3) διατάξιμα δεδομένα υπό μορφή βαθμολογιών σοβαρότητας ή αναπτυξιακών σταδίων από ιστοπαθολογικές αξιολογήσεις. Στον πίνακα 1 φαίνεται το συνιστώμενο διάγραμμα αποφάσεων στατιστικής ανάλυσης για τη LAGDA. Επίσης, στη συνέχεια παρατίθενται ορισμένες σημειώσεις που μπορεί να είναι χρήσιμες για τη διεξαγωγή της στατιστικής ανάλυσης των μετρήσεων της LAGDA. Όσον αφορά το διάγραμμα αποφάσεων ανάλυσης, τα αποτελέσματα των μετρήσεων για τη θνησιμότητα, τη σωματική αύξηση (βάρος και μήκος) και τον ηπατοσωματικό δείκτη (LSI) θα πρέπει να αναλύονται σύμφωνα με το σκέλος «Άλλες παράμετροι».

Συνεχή δεδομένα

Τα δεδομένα για συνεχείς παραμέτρους θα πρέπει πρώτα να ελέγχονται ως προς τη μονοτονικότητα μέσω μετασχηματισμού των δεδομένων κατά βαθμίδα, την προσαρμογή σε μοντέλο ANOVA και τη σύγκριση γραμμικών και τετραγωνικών αντιθέσεων. Εάν τα δεδομένα είναι μονοτονικά, θα πρέπει να εφαρμόζεται έλεγχος τάσεων Jonckheere-Terpstra αποκλιμάκωσης στις διάμεσες τιμές των πανομοιότυπων δειγμάτων, και δεν θα πρέπει να διενεργούνται επακόλουθες αναλύσεις. Μια εναλλακτική μέθοδος για δεδομένα που εμφανίζουν κανονική κατανομή με ομοιογενείς διασπορές είναι ο έλεγχος Williams αποκλιμάκωσης. Εάν τα δεδομένα δεν είναι μονοτονικά (η τετραγωνική αντίθεση είναι σημαντική και η γραμμική δεν είναι), θα πρέπει να αναλύονται με χρήση μοντέλου ANOVA μεικτών επιδράσεων. Στη συνέχεια, τα δεδομένα θα πρέπει να αξιολογούνται ως προς την κανονικότητα (κατά προτίμηση με χρήση του ελέγχου Shapiro-Wilk ή Anderson-Darling) και την ομοιογένεια της διασποράς (κατά προτίμηση με χρήση του ελέγχου Levene). Και οι δύο έλεγχοι εκτελούνται επί των καταλοίπων του μοντέλου ANOVA μεικτών επιδράσεων. Η γνώμη ενός ειδικού μπορεί να αντικαταστήσει αυτούς τους τυπικούς ελέγχους όσον αφορά την κανονικότητα και την ομοιογένεια της διασποράς, ωστόσο προτιμάται η διεξαγωγή τυπικών ελέγχων. Εάν τα δεδομένα εμφανίζουν κανονική κατανομή με ομοιογενή διασπορά, τότε οι παραδοχές του μοντέλου ANOVA μεικτών επιδράσεων επαληθεύονται και μια σημαντική επίδραση της αγωγής προσδιορίζεται με τον έλεγχο Dunnett. Σε περίπτωση μη κανονικότητας ή έλλειψης ομοιογένειας της διασποράς, οι παραδοχές του ελέγχου Dunnett παραβιάζονται και θα πρέπει να αναζητείται μετασχηματισμός κανονικοποίησης και σταθεροποίησης της διασποράς. Εάν δεν βρεθεί παρόμοιος μετασχηματισμός, τότε μια σημαντική επίδραση αγωγής προσδιορίζεται με έλεγχο Dunn. Όποτε είναι εφικτό, θα πρέπει να διενεργείται μονόπλευρος αντί για αμφίπλευρο έλεγχο, ωστόσο χρειάζεται κρίση ειδικού για να προσδιοριστεί ποιος από τους δύο τύπους ελέγχου είναι ο κατάλληλος για μια δεδομένη παράμετρο.

Θνησιμότητα

Τα δεδομένα θνησιμότητας θα πρέπει να αναλύονται για τη χρονική περίοδο που καλύπτει ολόκληρη τη δοκιμή, και θα πρέπει να εκφράζονται ως αναλογία ζώων που πέθαναν σε μια συγκεκριμένη δεξαμενή. Οι γυρίνοι που δεν ολοκληρώνουν το στάδιο της μεταμόρφωσης εντός του καθορισμένου χρονικού πλαισίου, οι γυρίνοι που ανήκουν στην κοόρτη υποδείγματος προνυμφών, οι νεαροί βάτραχοι που θανατώνονται επιλεκτικά και τα ζώα που τυχόν πεθαίνουν λόγω σφάλματος του πειραματιστή θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως λογοκριμένα δεδομένα και να μην περιλαμβάνονται στον παρονομαστή του υπολογισμού ποσοστών. Πριν από τη διενέργεια στατιστικών αναλύσεων, για τις αναλογίες θνησιμότητας θα πρέπει να εφαρμόζεται μετασχηματισμός τετραγωνικής ρίζας τόξου ημιτόνου. Μια εναλλακτική λύση είναι η χρήση του ελέγχου Cochran-Armitage αποκλιμάκωσης, πιθανώς με προσαρμογή Rao-Scott εάν υπάρχει υπερδιασπορά.

Βάρος και μήκος (δεδομένα σωματικής αύξησης)

Τα αρσενικά και τα θηλυκά δεν είναι σεξουαλικώς διμορφικά κατά τη μεταμόρφωση και, κατά συνέπεια, τα δεδομένα σωματικής αύξησης του υποδείγματος προνυμφών θα πρέπει να αναλύονται ανεξάρτητα από το φύλο. Τα δεδομένα σωματικής αύξησης των νεαρών ατόμων, αντιθέτως, θα πρέπει να αναλύονται χωριστά με βάση το γενετικό φύλο. Για τις παραμέτρους αυτές μπορεί να χρειάζεται λογαριθμική προσαρμογή, δεδομένου ότι η λογαριθμική κανονικότητα των δεδομένων μεγέθους δεν είναι ασυνήθης.

▼**M8**

Ηπατοσωματικός δείκτης (LSI)

Τα βάρη ήπατος θα πρέπει να κανονικοποιούνται ως αναλογία έναντι του βάρους ολόκληρου του σώματος (LSI) και να αναλύονται χωριστά με βάση το γενετικό φύλο.

Χρόνος μέχρι το στάδιο 62 κατά NF

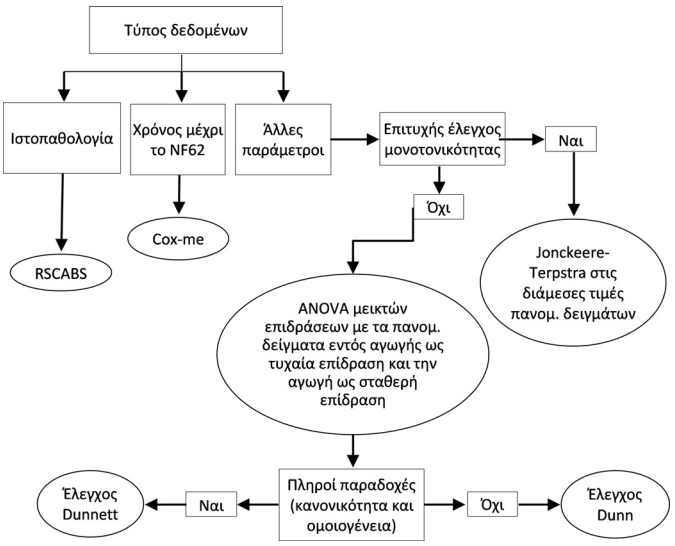
Τα δεδομένα για τον χρόνο μέχρι τη μεταμόρφωση θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δεδομένα χρόνου έως το συμβάν, με τυχόν θανάτους ή άτομα που δεν φθάνουν στο στάδιο 62 κατά NF μέσα σε 70 ημέρες να αντιμετωπίζονται ως δεδομένα λογοκριμένα εκ δεξιών (δηλ. η πραγματική τιμή είναι μεγαλύτερη από 70 ημέρες αλλά η μελέτη σταματά προτού τα ζώα φθάσουν στο στάδιο 62 κατά NF σε 70 ημέρες). Ο διάμεσος χρόνος μέχρι την ολοκλήρωση της μεταμόρφωσης σταδίου 62 κατά NF στους μάρτυρες νερού αραίωσης θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ημερομηνίας λήξης της δοκιμής. Ο διάμεσος χρόνος μέχρι την ολοκλήρωση της μεταμόρφωσης μπορεί να προσδιορίζεται με εκτιμητές γινομένου-ορίου Kaplan-Meier. Η παράμετρος αυτή θα πρέπει να αναλύεται με χρήση μοντέλου αναλογικών κινδύνων Cox μεικτών επιδράσεων το οποίο λαμβάνει υπόψη τη δομή πανομοιότυπων δειγμάτων της μελέτης.

Δεδομένα ιστοπαθολογίας (βαθμολογίες σοβαρότητας και αναπτυξιακά στάδια)

Τα δεδομένα ιστοπαθολογίας έχουν μορφή βαθμολογιών σοβαρότητας ή αναπτυξιακών σταδίων. Ένας έλεγχος που καλείται RSCABS (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) χρησιμοποιεί έλεγχο τάσεων Cochran-Armitage προσαρμοσμένο στον έλεγχο Rao-Scott αποκλιμάκωσης σε κάθε επίπεδο σοβαρότητας μιας ιστοπαθολογικής απόκρισης (Green *et al.*, 2014). Με την προσαρμογή Rao-Scott ενσωματώνεται στον έλεγχο ο πειραματικός σχεδιασμός δοχείων πανομοιότυπων δειγμάτων. Η διαδικασία «κατά τομές» (by slices) συνεκτιμά τη βιολογική προσδοκία ότι η σοβαρότητα της επίδρασης τείνει να αυξάνεται όσο αυξάνονται οι δόσεις ή οι συγκεντρώσεις, ενώ ταυτόχρονα διατηρούνται οι βαθμολογίες των επιμέρους ατόμων και αποτυπώνεται η σοβαρότητα τυχόν διαπιστωθείσας επίδρασης. Η διαδικασία RSCABS προσδιορίζει όχι μόνο τις αγωγές που είναι στατιστικά διαφορετικές από τους μάρτυρες (δηλαδή εμφανίζουν σοβαρότερες παθολογικές καταστάσεις απ' ό,τι οι μάρτυρες), αλλά και τη βαθμολογία σοβαρότητας στην οποία έγκειται η διαφορά, παρέχοντας, κατ' αυτόν τον τρόπο, εξαιρετικά χρήσιμες πληροφορίες για την ανάλυση. Κατά τον προσδιορισμό του αναπτυξιακού σταδίου των γονάδων και των γεννητικών πόρων, θα πρέπει να εφαρμόζεται πρόσθετος χειρισμός των δεδομένων, καθώς μία παραδοχή της διαδικασίας RSCABS είναι ότι η σοβαρότητα της επίδρασης αυξάνεται με τη δόση. Η παρατηρούμενη επίδραση μπορεί να είναι μια καθυστέρηση ή επιτάχυνση της ανάπτυξης. Ως εκ τούτου, τα δεδομένα αναπτυξιακών σταδίων θα πρέπει να αναλύονται όπως έχουν αναφερθεί, ώστε να προσδιορίζεται η επιτάχυνση της ανάπτυξης, και στη συνέχεια να αντιστρέφονται με μη αυτόματο τρόπο πριν από τη διεξαγωγή δεύτερης ανάλυσης για τον προσδιορισμό τυχόν καθυστέρησης της ανάπτυξης.

Σχήμα 1

Διάγραμμα αποφάσεων στατιστικής ανάλυσης για τα δεδομένα LAGDA



▼M8

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33, 1 108-1 116.

▼**M8**

Προσάρτημα 8

ΖΗΤΗΜΑΤΑ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΛΑΧΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑΣ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΣΚΟΛΙΩΣΗΣ

Η ιδιοπαθής σκολίωση, η οποία εκδηλώνεται συνήθως ως κύρτωμα της ουράς στους γυρίνους *Xenopus laevis*, μπορεί να περιπλέξει τις μορφολογικές και συμπεριφορικές παρατηρήσεις επί των πληθυσμών της δοκιμής. Θα πρέπει να καταβάλλονται προσπάθειες για την ελαχιστοποίηση της συχνότητας εμφάνισης της σκολίωσης, τόσο στο απόθεμα όσο και υπό συνθήκες δοκιμής. Στην οριστική δοκιμή, συνιστάται ο επιπολασμός της μέτριας και της σοβαρής σκολίωσης να μην υπερβαίνει το 10 %, ώστε να βελτιωθεί η εμπιστοσύνη στην ικανότητα της δοκιμής να ανιχνεύει αναπτυξιακές επιδράσεις που σχετίζονται με την αγωγή σε κατά τα άλλα υγιείς προνύμφες αμφίβιων.

Στο πλαίσιο καθημερινών παρατηρήσεων στη διάρκεια της οριστικής δοκιμής θα πρέπει να καταγράφεται τόσο η συχνότητα εμφάνισης (μέτρηση ατόμων) όσο και η σοβαρότητα της σκολίωσης, όταν υπάρχει. Η φύση της ανωμαλίας θα πρέπει να περιγράφεται ως προς τη θέση (π.χ. μπροστά ή πίσω από την αμάρα) και ως προς την κατεύθυνση της κυρτότητας (π.χ. πλευρική ή ραχιαία/κοιλιακή). Η σοβαρότητα μπορεί να βαθμολογηθεί ως εξής:

(NR) Μη αξιοσημείωτη: δεν υπάρχει κυρτότητα

(1) Ελάχιστη: ελαφριά, πλευρική κυρτότητα πίσω από την αμάρα· εμφανής μόνο κατά την ηρεμία

(2) Μέτρια: πλευρική κυρτότητα πίσω από την αμάρα· διαρκώς ορατή αλλά δεν εμποδίζει την κίνηση

(3) Σοβαρή: πλευρική κυρτότητα μπροστά από την αμάρα Η οποιαδήποτε κυρτότητα που εμποδίζει την κίνηση Η οποιαδήποτε ραχιαία/κοιλιακή κυρτότητα

Μια επιστημονική συμβουλευτική επιτροπή FIFRA της EPA των ΗΠΑ (FIFRA SAP 2013) μελέτησε συνοπτικά δεδομένα για τη σκολίωση σε δεκαπέντε δοκιμασίες μεταμόρφωσης αμφίβιων με τον *X. laevis* (στάδιο 51 έως 60+ κατά NF) και έδωσε γενικές συστάσεις για τη μείωση του επιπολασμού της ανωμαλίας αυτής στους πληθυσμούς δοκιμής. Οι συστάσεις αφορούν τη LAGDA, παρότι η συγκεκριμένη δοκιμή αφορά μεγαλύτερο χρονικό διάστημα ανάπτυξης.

Ιστορικές επιδόσεις ωοτοκίας

Γενικά, ως ζεύγη ζευγαρώματος θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή ενήλικα άτομα υψηλής ποιότητας· η εξάλειψη των ζευγών αναπαραγωγής που παράγουν απογόνους με σκολίωση μπορεί να ελαχιστοποιήσει τη συχνότητα εμφάνισης με την πάροδο του χρόνου. Ειδικότερα, η ελαχιστοποίηση της χρήσης αποθέματος αναπαραγωγής που έχει αιχμαλωτιστεί από τη φύση μπορεί να αποδειχθεί ωφέλιμο μέτρο. Η περίοδος έκθεσης της LAGDA ξεκινά με έμβρυα σταδίου 8-10 κατά NF, και δεν είναι εφικτό να προσδιοριστεί κατά την έναρξη της δοκιμής το κατά πόσον συγκεκριμένα άτομα θα αναπτύξουν σκολίωση. Ως εκ τούτου, πέραν της παρακολούθησης της συχνότητας εμφάνισης της σκολίωσης σε ζώα που υποβάλλονται σε δοκιμή, θα πρέπει να τεκμηριώνονται και οι ιστορικές επιδόσεις εμβρύων της ίδιας μητέρας (περιλαμβανομένης της συχνότητας εμφάνισης της σκολίωσης σε τυχόν προνύμφες που αφέθηκαν να αναπτυχθούν). Μπορεί να είναι σκόπιμη η περαιτέρω παρακολούθηση τμήματος της κάθε ομάδας εμβρύων της ίδιας μητέρας που δεν χρησιμοποιείται σε συγκεκριμένη μελέτη και η αναφορά των σχετικών παρατηρήσεων (FIFRA SAP 2013).

Ποιότητα του νερού

Είναι σημαντικό να διασφαλίζεται η επαρκής ποιότητα του νερού, τόσο στο εργαστηριακό απόθεμα όσο και κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Πέραν των κριτηρίων ποιότητας του νερού που αξιολογούνται στο πλαίσιο της συνήθους πρακτικής αναφορικά με τις δοκιμές τοξικότητας για τους υδρόβιους οργανισμούς, μπορεί να είναι σκόπιμη η παρακολούθηση και η διόρθωση τυχόν ελλείψεων θρεπτικών συστατικών (π.χ. έλλειψη βιταμίνης C, ασβεστίου, φωσφόρου) ή υπερβολικών επιπέδων σεληνίου και χαλκού, τα οποία έχει αναφερθεί ότι προκαλούν σκολίωση ποικίλου βαθμού στα είδη *Rana* sp. και *Xenopus* sp. που εκτρέφονται στο εργαστήριο (Marshall *et al.* 1980, Leibovitz *et al.* 1992, Martinez *et al.* 1992, όπως αναφέρεται στο FIFRA SAP 2013). Η χρήση του κατάλληλου προγράμματος σίτισης (βλ. προσάρτημα 4) και ο τακτικός καθαρισμός των δεξαμενών βελτιώνουν κατά κανόνα την ποιότητα του νερού και την υγεία των πειραματόζωων.

▼**M8**

Σιτηρέσιο

Συγκεκριμένες συστάσεις για πρόγραμμα σίτισης, το οποίο έχει διαπιστωθεί ότι είναι επιτυχές με τη LAGDA, περιλαμβάνονται αναλυτικά στο προσάρτημα 4. Συνιστάται οι πηγές τροφής να ελέγχονται για την ύπαρξη βιολογικών τοξινών, ζιζανιοκτόνων και άλλων φυτοφαρμάκων που είναι γνωστό ότι προκαλούν σκολίωση στον *X. laevis* ή σε άλλα υδρόβια ζώα (Schlenk και Jenkins 2013). Για παράδειγμα, η έκθεση σε ορισμένους αναστολείς της χολινεστεράσης έχει συσχετιστεί με σκολίωση στα ψάρια (Schultz *et al.* 1985) και τους βατράχους (Bacchetta *et al.* 2008).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara, and G. Vailati. 2008. Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. Science of the Total Environment 392: 110 – 118.

Schultz, T.W., J.N. Dumont, and R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathyrogenic effects of semicarbazide. Toxicology 36: 185-198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley, and J.P. Geaghan. 1982. Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively culture bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) reared at two pH levels. Journal of the World Aquaculture Society 13: 322-328.

Marshall, G.A., R.L. Amborski, and D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. Journal of the World Aquaculture Society 11: 445-453.

Martinez, I., R. Alvarez, I. Herraez, and P. Herraez. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles. Anatomical Records 233(2): 314-320.

Schlenk, D., and Jenkins, F. 2013. Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. US EPA FIFRA SAP Minutes No. 2013-03. May 21-23, 2013. Washington, DC.